

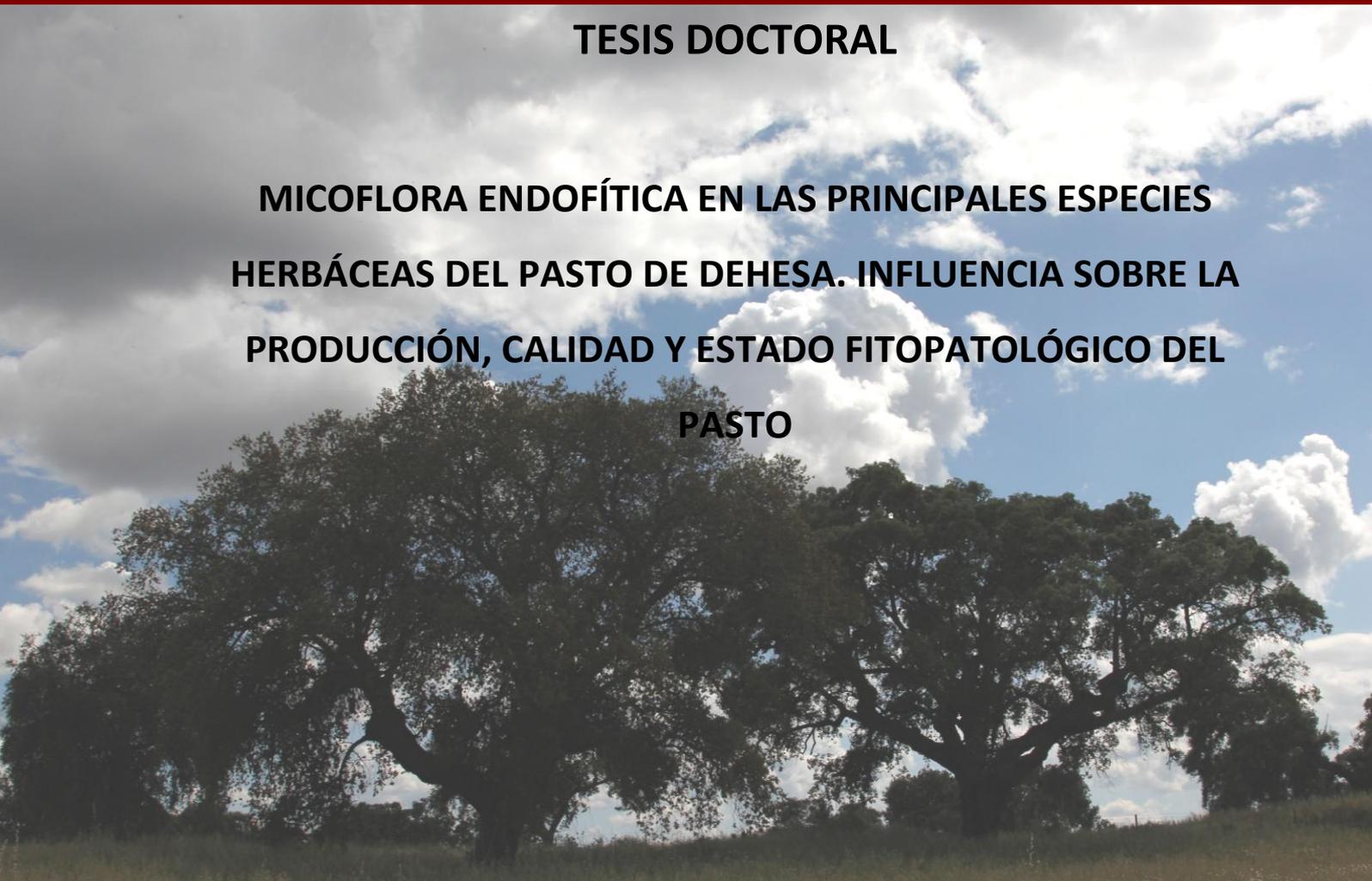
**UNIVERSIDAD**



**DE EXTREMADURA**

**TESIS DOCTORAL**

**MICROFLORA ENDOFÍTICA EN LAS PRINCIPALES ESPECIES  
HERBÁCEAS DEL PASTO DE DEHESA. INFLUENCIA SOBRE LA  
PRODUCCIÓN, CALIDAD Y ESTADO FITOPATOLÓGICO DEL  
PASTO**



**Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal**

**SANTIAGO LLEDÓ GÓMEZ**

**2016**

**TESIS DOCTORAL**

**MICOFLORA ENDOFÍTICA EN LAS PRINCIPALES ESPECIES  
HERBÁCEAS DEL PASTO DE DEHESA. INFLUENCIA SOBRE LA  
PRODUCCIÓN, CALIDAD Y ESTADO FITOPATOLÓGICO DEL  
PASTO.**

Santiago Lledó Gómez

Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal

**DIRECTOR:**

Dr. Óscar Santamaría Becerril

Fdo.: \_\_\_\_\_

**2016**



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Doctor Óscar Santamaría Becerril, director de la tesis doctoral, por la gran oportunidad brindada y por su constante aportación técnica y profesional. A la Doctora Sara Morales Rodrigo por su valiosa colaboración. A la Doctora M<sup>a</sup> José Poblaciones Suarez-Bárcena por ayudar en todos los momentos requeridos. Y por su puesto a mi compañero y gran apoyo en el laboratorio, Don Teodoro García White, técnico del laboratorio de Producción Vegetal de la Universidad de Extremadura. También agradecer al laboratorio de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, por su disposición a la hora de la cesión de material de laboratorio y en especial al Doctor Santiago Ruiz-Moyano por la gran ayuda prestada en todos los momentos requeridos. Y por último a todos los compañeros del Departamento de Producción Vegetal y de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, que han colaborado de una manera u otra en la realización del presente trabajo.

Por otra parte agradecer a diferentes organismos regionales como al Servicio de Sanidad Vegetal; Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía del Gobierno de Extremadura; por la cesión del patógeno *Fusarium moniliforme* y al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) por prestar las tierras de ensayo de campo. Al Doctor Alejandro Solla Hach de la Universidad de Plasencia, por facilitarnos las fincas de muestreo de la zona norte de Extremadura. A nivel nacional a la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Valladolid y en especial al Doctor Julio Diez Casero y al personal de su laboratorio, por su gran recibimiento, durante mi estancia en su departamento, para el aprendizaje de técnicas moleculares requeridas en el estudio. Y por último, internacionalmente, agradecer al Instituto Nacional de Investigação Agrária INRB/IP-INIA, Elvas, Portugal, por la cesión de unos de los patógenos utilizados en el estudio. Y por último a todas aquellas personas que de forma voluntaria e involuntaria me han apoyado y animado en todo momento.

El presente trabajo fue financiado por el Proyecto AGL2011-27454, otorgado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación) y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); realizado en la Escuela de Ingenierías Agrarias de Badajoz de la Universidad de Extremadura.





# ÍNDICE

RESUMEN .....	23
ABSTRACT .....	27
1. INTRODUCCIÓN.....	31
1.1. El ecosistema dehesa. ....	33
1.1.1. Aspectos generales. ....	33
1.1.2. Componentes de la biocenosis.....	34
1.1.3. Principales especies herbáceas del pasto de dehesa utilizadas en el trabajo. ....	35
1.1.4. Estado fitopatológico del pasto de dehesa. ....	38
1.2. Microbiota endofítica.....	41
1.2.1. Definición del término y diversidad endofítica. ....	41
1.2.2. Clasificación de los endófitos y sus formas de transmisión. ....	42
1.2.3. Especificidad por el hospedante y tipos de interacción con éste. ....	44
1.2.4. Factores que afectan a las comunidades de hongos endófitos.....	46
1.2.5. Influencia de endófitos sobre el crecimiento vegetal. ....	46
1.2.6. Influencia de endófitos sobre el estado fitosanitario. ....	48
1.2.7. Identificación molecular aplicada a los hongos endófitos.....	49
2. OBJETIVOS .....	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1. DIVERSIDAD ENDOFÍTICA EN ESPECIES DE PASTO. ....	57
3.1.1. Caracterización de las zonas de estudio y recogida de muestras.....	57
3.1.2. Aislamiento de la microbiota endofítica a partir del material vegetal recolectado.....	60
3.1.3. Identificación de los aislados por procedimientos moleculares (ITS).....	61
3.1.4. Curva acumulativa de especies y análisis estadístico.....	65
3.2. INFLUENCIA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL PASTO.....	67

3.2.1. Material fúngico utilizado.....	67
3.2.2. Caracterización de las zonas de ensayo y análisis edafoclimático. ....	68
3.2.3. Obtención del material vegetal, inoculación de la microbiota endofítica y diseño experimental.....	70
3.2.4. Caracterización patogénica de cada hongo endófito en condiciones de invernadero..	74
3.2.5. Influencia de la microbiota endofítica sobre la producción de biomasa y parámetros de calidad en condiciones de invernadero y campo. ....	75
3.2.6. Análisis estadístico. ....	77
3.3. INFLUENCIA SOBRE PATÓGENOS FÚNGICOS.....	79
3.3.1. Obtención del material fúngico a utilizar en los ensayos. ....	79
3.3.2. Efecto del filtrado de la microbiota endofítica sobre el crecimiento de los patógenos <i>Biscogniauxia mediterranea</i> y <i>Fusarium moniliforme</i> . ....	80
3.3.3. Efecto de la asociación endófito-patógeno sobre la virulencia, producción y calidad del forraje en <i>Lolium rigidum</i> . ....	81
3.3.4. Análisis estadístico. ....	83
4. RESULTADOS .....	85
4.1. DIVERSIDAD ENDOFÍTICA EN ESPECIES DE PASTO.....	87
4.1.1. Microbiota endofítica asociada a <i>Trifolium subterraneum</i> y <i>Ornithopus compressus</i> . ....	87
4.2. INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA ENDOFÍTICA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL PASTO.....	100
4.2.1. Efectos sobre la producción de biomasa aérea y radicular. ....	100
<i>Trifolium subterraneum</i> . ....	100
<i>Ornithopus compressus</i> . ....	102
<i>Poa pratensis</i> . ....	103
4.2.2. Efectos sobre el valor nutritivo.....	105
<i>Trifolium subterraneum</i> . ....	105

<i>Ornithopus compressus</i> .....	108
<i>Poa pratensis</i> .....	110
4.2.3. Efecto sobre la acumulación de minerales. ....	111
<i>Trifolium subterraneum</i> .....	111
<i>Ornithopus compressus</i> .....	114
<i>Poa pratensis</i> .....	116
4.3. INFLUENCIA SOBRE PATÓGENOS FÚNGICOS. ....	118
4.3.1. Efecto del filtrado de la micobiota endofítica sobre el crecimiento y esporulación de los patógenos seleccionados. ....	118
4.3.2. Efecto de la asociación endófito-patógeno sobre la patogenicidad, producción de forraje y calidad de éste en <i>Lolium rigidum</i> . ....	122
5. DISCUSIÓN .....	133
5.1. DIVERSIDAD ENDOFÍTICA EN ESPECIES DE PASTO. ....	135
5.1.1. Micobiota endofítica asociada a <i>Trifolium subterraneum</i> y <i>Ornithopus compressus</i> . ....	135
5.2. INFLUENCIA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL PASTO. ....	143
5.2.1. Influencia de la micobiota endofítica sobre la producción de biomasa, calidad y acumulación de minerales en <i>Trifolium subterraneum</i> , <i>Ornithopus compressus</i> y <i>Poa pratensis</i> . ....	143
5.3. INFLUENCIA SOBRE PATÓGENOS FÚNGICOS. ....	154
5.3.1. Efecto del filtrado sobre el crecimiento y la germinación esporal de los patógenos considerados. ....	154
5.3.2. Efecto de la asociación del endófito-patógeno sobre la patogenicidad y calidad de <i>Lolium rigidum</i> . ....	157
6. CONCLUSIONES .....	163
7. BIBLIOGRAFÍA .....	167



# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Características de las diferentes dehesas estudiadas y sus variables edafoclimáticas. En los valores edáficos se presenta el valor medio y error estándar de cuatro muestras.....	58
<b>Tabla 2</b> Concentraciones iniciales y finales de los reactivos utilizados para la amplificación de la región ITS. ....	63
<b>Tabla 3</b> Origen e identificación de las especies endofíticas utilizadas en los ensayos.....	67
<b>Tabla 4</b> Análisis edafológico del sustrato de invernadero y del suelo de campo. ....	70
<b>Tabla 5</b> Origen e identificación de los hongos endófitos utilizados en el ensayo <i>in vitro</i> . ....	79
<b>Tabla 6</b> Frecuencia de los aislados endofíticos de <i>Trifolium subterraneum</i> , zona y tejidos donde fueron recogidos. ....	89
<b>Tabla 7</b> Frecuencia de los aislados endofíticos de <i>Ornithopus compressus</i> , zona y tejidos donde fueron recogidos. ....	92
<b>Tabla 8</b> ANOVA para <i>Trifolium subterraneum</i> que muestra el efecto de la dehesa, el tipo de tejido y su interacción en la frecuencia de aislamiento, riqueza de especies y el índice de diversidad de Shannon-Weaver de las especies endofítica encontradas. ....	94
<b>Tabla 9</b> ANOVA para <i>Ornithopus compressus</i> , que muestra el efecto de la dehesa, el tipo de tejido y su interacción en la frecuencia de aislamiento, la riqueza de especies y el índice de diversidad de Shannon-Weaver de los endófitos encontrados.....	95
<b>Tabla 10</b> Regresiones lineales simples y múltiples significativas en <i>Ornithopus compressus</i> entre el índice de diversidad (ID), la riqueza de especies (RE) y la frecuencia de aislamiento (FA) con las variables edafoclimáticas consideradas. ....	97
<b>Tabla 11</b> ANOVA de dos vías en <i>Trifolium subterraneum</i> que muestra el efecto del endófito, fecha de siembra y su interacción sobre la biomasa forrajera (MSA) y radicular (MSR) en ambos ensayos (condiciones de invernadero y campo). En la primera fila se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (* $P \leq 0,05$ , ** $P \leq 0,01$ , *** $P \leq 0,001$ ) de cada una de las variables indicadas. ....	100

- Tabla 12** ANOVA de dos vías de *Ornithopus compressus* para cada parámetro evaluado. En la segunda columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.....102
- Tabla 13** ANOVA de dos vías en *Poa pratensis* para cada parámetro evaluado. En la segunda columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.....103
- Tabla 14** ANOVA de dos vías de *Trifolium subterraneum* que muestra el efecto del endófito, fecha de siembra y su interacción en cada parámetro evaluado en ambos ensayos (condiciones de invernadero y campo). En la primera fila se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) de cada una de las variables indicadas. ....106
- Tabla 15** Media  $\pm$  error estándar de los diferentes parámetros medidos en *Trifolium subterraneum* que fueron significativos ( $P < 0,05$ ) para el test LSD para la variable principal "Fecha de siembra" de acuerdo con el resultado obtenido en el test ANOVA de dos vías, realizado en los ensayos de invernadero y campo. Para cada parámetro, las medias con diferente letra son significativamente diferentes según el test de LSD.108
- Tabla 16** ANOVA de dos vías de *Ornithopus compressus* para cada parámetro evaluado. En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.....108
- Tabla 17** ANOVA de una vía en *Poa pratensis* para cada parámetro evaluado (PB y FND). En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.....110
- Tabla 18** ANOVA de dos vías de *Trifolium subterraneum* que muestra el efecto del endófito, fecha de siembra y su interacción en cada parámetro evaluado en ambos ensayos (condiciones de invernadero y campo). En la primera fila se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de

significación (* $P \leq 0,05$ , ** $P \leq 0,01$ , *** $P \leq 0,001$ ) de cada una de las variables indicadas.....	111
<b>Tabla 19</b> Media $\pm$ error estándar de los diferentes parámetros medidos en <i>Trifolium subterraneum</i> que fueron significativos ( $P < 0,05$ ) para el test LSD para la variable respuesta "Fecha de siembra" de acuerdo con el resultado obtenido en el test ANOVA de dos vías, realizado en los ensayos de invernadero y campo. Para cada parámetro, las medias con diferente letra son significativamente diferentes según el test de LSD ( $\alpha = 0,05$ ). Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar.....	112
<b>Tabla 20</b> Concentración (media $\pm$ error estándar) de los minerales de <i>Trifolium subterraneum</i> obtenidos de cada endófito inoculado en cada ensayo (invernadero y campo).....	113
<b>Tabla 21</b> ANOVA de dos vías en <i>Ornithopus compressus</i> para cada parámetro evaluado. En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (* $P \leq 0,05$ ; ** $P \leq 0,01$ ; *** $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado. ....	114
<b>Tabla 22</b> Concentración de minerales (media $\pm$ error estándar) en <i>Ornithopus compressus</i> obtenidos de cada uno de los endófitos inoculados en el ensayo de invernadero. ....	115
<b>Tabla 23</b> Concentraciones de cada uno de los minerales (media $\pm$ error estándar) para el efecto principal "Fecha de siembra" (viejo: fecha de siembra temprana; joven: fecha de siembra tardía) en <i>Ornithopus compressus</i> . Los valores que se muestran aquí son los que fueron afectados significativamente ( $P < 0,05$ ) según ANOVA. Aunque el test LSD se realizó en algunos casos con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. ....	115
<b>Tabla 24</b> ANOVA de una vía en <i>Poa pratensis</i> para cada parámetro evaluado. En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (* $P \leq 0,05$ ; ** $P \leq 0,01$ ; *** $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado. ....	116
<b>Tabla 25</b> Concentración de los minerales (media $\pm$ error estándar) en el forraje de <i>Poa pratensis</i> obtenidos de cada uno de los endófitos inoculados en invernadero. ....	117

- Tabla 26** ANOVA de una vía para evaluar la influencia del filtrado sobre el crecimiento del patógeno *Biscogniauxia mediterranea* en tres mediciones diferentes (una cada día). En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.....118
- Tabla 27** ANOVA de una vía para evaluar el crecimiento del patógeno *Fusarium moniliforme* sobre el filtrado de los endófitos. En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.....119
- Tabla 28** ANOVA de una vía para evaluar el crecimiento del patógeno *Fusarium moniliforme* sobre el filtrado de los endófitos. En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado. En el periodo de 24 h (Germinación 1ª), 36 h (Germinación 2ª) y a las 48 h (Germinación 3ª) después de la siembra de esporas.....121
- Tabla 29** ANOVA de tres vías que muestra el efecto de la fecha de siembra (grupo de edad de las plantas; dos grupos), patógeno (control, *Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme*), endófito (E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*) y sus interacciones en cada una de las mediciones semanales de patogenicidad para *Lolium rigidum* en condiciones de invernadero, partiendo como primera medición la fecha (18/03/2014) y finalizando el (23/04/2014). En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ). .....122
- Tabla 30** ANOVA de tres vías que muestra el efecto del grupo de edad de las plantas (dos grupos), el patógeno (control, *Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme*), el endófito (E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*) y sus interacciones sobre la producción de materia seca aérea (MSA) y materia seca radicular (MSR) en plantas de *Lolium rigidum* en condiciones de invernadero. En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás se muestra

el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ).....126

**Tabla 31** ANOVA de tres vías que muestra el efecto de la fecha de siembra (grupo de edad de las plantas; dos grupos), del patógeno (control y *Fusarium moniliforme*), del endófito (E0: control, E071: *Sordaria fimicola*, E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*) y sus interacciones en cada uno de los parámetros de calidad analizados del forraje de *Lolium rigidum* en condiciones de invernadero. En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ )..... 129

**Tabla 32** Resumen de los efectos causados por cada endófito inoculado sobre *Trifolium subterraneum* en los diferentes parámetros evaluados (MSA: materia seca aérea; MSR: materia seca radicular; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente y el estado mineral) en los ensayos de invernadero (Inv.) y de campo (Camp.). (+) (-) Indica si el endófito aumentó o redujo dicho parámetro respetivamente, comparándolos con el control. ( $P = 0,05$ ). ..... 146

**Tabla 33** Resumen de los efectos de cada endófito sobre *Ornithopus compressus* en los diferentes parámetros evaluados (MSA: materia seca aérea; MSR: materia seca radicular; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente y el estado mineral) en los ensayos de invernadero. (+) (-) Indica si el endófito aumentó o redujo dicho parámetro respetivamente, comparándolos con el control. ( $P = 0,05$ )..... 147

**Tabla 34** Efectos de cada endófito inoculado sobre *Poa pratensis* en los diferentes parámetros de producción y calidad evaluados (MSA: materia seca aérea; MSR: materia seca radicular; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente y el estado mineral) en los ensayos de invernadero. El símbolo positivo (+) indica si el endófito aumentó y el negativo (-) redujo dichos parámetros respetivamente, comparándolos con el control. ( $P = 0,05$ ).. 149



# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Puntos de localización de las diferentes fincas muestreadas, donde AB: La Abadía, ET: El Tarro, HA: La Haza, LB: La Barrosa, MA: Mampolín, MO: Moheda de Olalla, PI: La Pizarrilla, SE: San Esteban, TA: La Talanquera y VA: Valdesequera...57
- Figura 2** Representación gráfica de la humedad relativa, temperaturas máximas y mínimas en condiciones de invernadero desde el comienzo del ensayo (03/12/2012) hasta su finalización (06/05/2013). Datos en promedios de cada periodo de 10 días. ....68
- Figura 3** Representación gráfica de las medias de las precipitaciones mensuales, medias de las temperaturas máximas y medias de las mínimas del año 2013 en condiciones de campo, desde su trasplante 26/02/2013 hasta su recolección 08/05/2013 (REDAREX: <http://redarexplus.gobex.es/RedarexPlus/>). ....69
- Figura 4** Herramienta con la que se realizó las heridas en las plantas. ....72
- Figura 5** Distribución del ensayo de invernadero. ....74
- Figura 6** Distribución del ensayo en condiciones de campo. ....74
- Figura 7** Representación gráfica de la humedad relativa, temperaturas máximas y mínimas en invernadero (promedios de cada período de 15 días) desde su comienzo, 26 de noviembre 2013 hasta su finalización, el 24 de abril 2014. ....82
- Figura 8** Curvas acumulativa de especies en *Trifolium subterraneum*, que muestra la relación entre el número de plantas analizadas y el número total de especies de hongos encontrados, el número de especies singulares (especies representadas por un aislado) y el número de especies plurales (especies representadas por dos o más aislamientos). ....88
- Figura 9** Curvas acumulativa de especies en *Ornithopus compressus*, muestra la relación entre el número de plantas analizadas y el número total de especies de hongos encontrados, el número de especies singulares (especies representadas por un aislado) y el número de especies plurales (especies representadas por dos o más aislamientos). ....91
- Figura 10** Efecto de la dehesa y tipo de tejido (hojas y tallos) sobre las variables respuesta: frecuencia de aislados, riqueza de especies e índice de diversidad endofítica

(Shannon-Weaver) en *Trifolium subterraneum*. Las barras de error indican el error estándar. AB: La Abadía; ET: El Tarro; HA: La Haza; LB: La Barrosa; MA: Mampolín; MO: Moheda de Olalla; PI: La Pizarrilla; SE: San Esteban; TA: La Talanquera y VA: Valdesequera. ....94

**Figura 11** Efecto de la dehesa y tipo de tejido (H: hojas y T: tallos) sobre las variables respuesta: frecuencia de aislados, riqueza de especies e índice de diversidad endofítica (Shannon-Weaver) en *Ornithopus compressus*. Las barras de error indican el error estándar. AB: La Abadía; ET: El Tarro; HA: La Haza; LB: La Barrosa; MA: Mampolín; MO: Moheda de Olalla; PI: La Pizarrilla; SE: San Esteban; TA: La Talanquera y VA: Valdesequera. Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representan los valores sin transformar. ....96

**Figura 12** Primer y segundo eje del Análisis Canónico de Correspondencias en *Trifolium subterraneum* que muestra las variables ambientales que más influyeron en la composición de la microbiota endofítica. En los análisis sólo se consideraron las especies con frecuencia de aislamiento superior a 4. El nombre completo de las especies de hongos se puede observar en la tabla 6. Prec.: precipitación anual. ....98

**Figura 13** Primer y segundo eje del Análisis Canónico de Correspondencias en *Ornithopus compressus*, que muestran las variables ambientales que más influyeron en la composición de la microbiota endofítica. En los análisis sólo se consideraron las especies con frecuencia de aislamiento superior a 4. El nombre completo de las especies de hongos se puede observar en la tabla 7. Prec.: precipitación anual, Temp.: temperatura y root-sha.:  $^2\sqrt{\text{sombra}}$ . ....99

**Figura 14** Contenido en materia secas aerea de *Trifolium subterraneum* para cada endófito inoculado en los ensayos de invernadero (izquierda) y campo (derecha). Las barras horizontales indican las medias mientras que las líneas horizontales el error estándar. Para cada ensayo las mismas letras indican que no hay diferencias significativas en el test LSD con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. El tratamiento de control fue E0, mientras que E060: *Fusarium lateritium*; E071: *Sordaria fimicola*; E140:

*Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp. y E631: *Epicoccum nigrum*. ..... 101

**Figura 15** Contenido en materia seca radicular en función de la edad de la planta (plantas "joven" y plantas "viejo") en *Trifolium subterraneum* cuando se inocula con cada endófito en condiciones de invernadero. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. El tratamiento de control fue E0, mientras que E060: *Fusarium lateritium*; E071: *Sordaria fimicola*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp. y E631: *Epicoccum nigrum*. 102

**Figura 16** Contenido en materia seca radicular en función de la edad de la planta en *Ornithopus compressus* cuando se inocula con cada endófito en invernadero. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E138: *Embellisia leptinellae*; E631: *Epicoccum nigrum* y E636: *Sporormiella pilosa*. ..... 103

**Figura 17** Efecto de la interacción endófito \* fecha de siembra (plantas "joven": aquellas sembradas más tarde; plantas "viejo": aquellas sembradas en primer lugar) en (a) materia seca aérea y (b) materia seca radicular de *Poa pratensis*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representó los valores sin transformar. E0: Control; E060: *Fusarium lateritium*; E138: *Embellisia leptinellae*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp. ; E269: *Penicillium* sp.; E361: CODE361 y E631: *Epicoccum nigrum*. ..... 105

**Figura 18** Influencia del efecto principal sobre los parámetros de calidad (a) PB: proteína bruta; b) FND: fibra neutro detergente; c) FAD: fibra ácido detergente; d) LAD: lignina ácido detergente) de *Trifolium subterraneum* cuando se inocula con cada endófito en invernadero y campo. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro y ensayo la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras, indica que no fue significativo. E0: Control; E060: *Fusarium lateritium*; E071: *Sordaria fimicola*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp. y E631: *Epicoccum nigrum*. .....107

**Figura 19** Parámetros de calidad (a) PB: proteína bruta; b) FND: fibra neutro detergente; y FAD: fibra ácido detergente; c) LAD: lignina ácido detergente y cenizas) de *Ornithopus compressus* cuando se inocula con cada endófito en condiciones de invernadero. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras, indica que no fue significativo el efecto según ANOVA. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E138: *Embellisia leptinellae*; E631: *Epicoccum nigrum* y E636: *Sporormiella pilosa*. .....109

**Figura 20** Influencia del efecto endófito en (a) proteína bruta y (b) fibra neutro detergente (FND) en *Poa pratensis*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras, indica que no fue significativo el efecto según ANOVA. E0: Control; E060: *Fusarium lateritium*; E138: *Embellisia leptinellae*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp.; E269: *Penicillium* sp.; E361: CODE361 y E631: *Epicoccum nigrum*. .....110

**Figura 21** Crecimiento en  $\text{mm}^2$  del patógeno *Biscogniauxia mediterranea*, creciendo en presencia de los filtrados de los diferentes endófitos considerados. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada

medición la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras indica que ese parámetro no fue significativo según ANOVA. El valor que se expresa se refiere a la cantidad en  $\text{mm}^2$  crecido en: medición 1ª (un día después de la siembra), medición 2ª (segundo día después de la siembra) y medición 3ª (tercer día después de la siembra). ..... 119

**Figura 22** Crecimiento en  $\text{mm}^2$  del patógeno *Fusarium moniliforme*, creciendo en presencia de los filtrados de los diferentes endófitos considerados. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada medición la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras indica que ese parámetro no fue significativo según ANOVA. El valor que se expresa se refiere a la cantidad en  $\text{mm}^2$  crecido en: medición 1ª (un día después de la siembra), medición 2ª (segundo día después de la siembra), medición 3ª (tercer día después de la siembra), medición 4ª (cuarto día después de la siembra), medición 5ª (quinto día después de la siembra) y medición 6ª (sexto día después de la siembra). ..... 120

**Figura 23** Porcentaje de germinación esporal de *Fusarium moniliforme*, creciendo en presencia de los filtrados de los diferentes endófitos considerados. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada germinación la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras indica que ese parámetro no fue significativo según ANOVA. El valor que se expresa, porcentaje de esporas germinadas (longitud del tubo germinativo supera la longitud de la espora) en el periodo de 24 h (Germinación 1ª), 36 h (Germinación 2ª) y a las 48 h (Germinación 3ª) después de realizar la siembra. ..... 121

**Figura 24** Índice de severidad en cada semana de medición para el efecto principal "Patógeno" (B: control, BS: *Biscogniauxia mediterranea* y FS: *Fusarium moniliforme*) sobre *Lolium rigidum*. Las barras verticales indican la media, mientras

que las líneas verticales el error estándar. Para cada semana, la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test de comparaciones múltiples LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . .....123

**Figura 25** Índice de severidad de las plantas en las diferentes mediciones que fueron significativas (a: severidad en la semana 1<sup>a</sup>; b: severidad en la semana 5<sup>a</sup> y c: severidad en la semana 6<sup>a</sup>) para la interacción "Endofito \* Patogeno" (B: control, BS: *Biscogniauxia mediterranea* y FS: *Fusarium moniliforme*) y los endófitos E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum* sobre *Lolium rigidum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada semana, la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test de comparaciones múltiples LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . .....125

**Figura 26** Materia seca aérea (MSA) en g maceta<sup>-1</sup> afectada por el efecto principal "Endófito". E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. La misma letra indica que no hay diferencias significativas según test LSD de Fisher con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. ....127

**Figura 27** Materia seca radicular (MSR) en g maceta<sup>-1</sup> afectada por la interacción "Endófito \* Patogeno". Patogeno (B: control, BS: *Biscogniauxia mediterranea* y FS: *Fusarium moniliforme*. Endofitos (E0: control, E071: *Sordaria fimicola*, E222: *Trichoderma gamsii*, E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicocum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*). Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. La misma letra indica que no hay diferencias significativas según test LSD de Fisher con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. ....128

**Figura 28** Parámetros de calidad (PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente contenido en cenizas) afectadas por la interacción "Patógeno

\* Endófito" en plantas de *Lolium rigidum* cuando se inocula el patógeno (B: control, FS: *Fusarium moniliforme*) y endófito (E0: control, E071: *Sordaria fimicola*, E222: *Trichoderma gamsii*, E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicocum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*). Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro, la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .....130



# **RESUMEN**



La dehesa es un ecosistema muy importante en el suroeste de la Península Ibérica tanto por la gran extensión que ocupa, alrededor de 1,3 millones de hectáreas en Extremadura, como desde un punto de vista social, ecológico y económico. Los tres componentes esenciales de la biocenosis de este ecosistema, y sobre los que más se ha estudiado, son el ganado (doméstico y silvestre), el estrato arbóreo y al estrato herbáceo. Sin embargo, existe un cuarto componente, la micoflora endofítica que, aunque no se le haya prestado especial atención, tiene gran importancia en muchos aspectos de la producción vegetal y animal de la dehesa, e influye en gran medida sobre los otros tres componentes. Los hongos endofíticos, que aparecen en el interior de la mayor parte de los vegetales, durante todo o parte de su ciclo vital, en numerosas ocasiones provocan un efecto beneficioso sobre las plantas hospedantes, aumentando su valor adaptativo, particularmente en condiciones de estrés y protegiéndolas frente a enfermedades y/o patógenos. Esto hace que en muchos casos tengan una gran influencia sobre las producciones de la biomasa herbácea y la calidad de éstas, alterando las características bromatológicas y nutritivas o produciendo sustancias tóxicas para el ganado.

Por tanto, viendo la importancia del ecosistema dehesa en el suroeste peninsular y la gran influencia de los endófitos sobre las producciones herbáceas y las calidades de éstas, los principales objetivos del presente trabajo fueron: (1) Identificar y caracterizar la microbiota endofítica de dos especies de leguminosas características de los pastos de la Dehesa Extremeña y determinar cómo influyen los factores edafoclimáticos y la especie hospedante sobre su abundancia y diversidad específica; (2) Determinar la influencia de las especies endofíticas más abundantes sobre la producción y determinados parámetros de calidad del pasto (proteína, fibra, lignina, digestibilidad, nutrientes, etc.); (3) Evaluar el efecto antagonista de hongos endofíticos sobre algunos patógenos fúngicos y analizar la influencia de la asociación endófito-patógeno en su patogenicidad en planta (*Lolium rigidum*), producción de materia seca y calidad del forraje.

Para ello se procedió a la recolección de muestras de *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus* de cinco dehesas de Badajoz y cinco dehesas de Cáceres, con condiciones ambientales diversas. Estas muestras se esterilizaron y se sembraron en placas Petri, de donde se aislaron los endófitos. Se identificaron molecularmente y morfológicamente. De todos estos endófitos se seleccionaron los más característicos y se inocularon sobre *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus* y *Poa pratensis* en condiciones de invernadero, y además sobre *T. subterraneum* en condiciones de campo. Justo antes de la floración se procedió a su recolección, para determinar el contenido en biomasa radicular y aérea, parámetros de calidad, contenido en cenizas y minerales. Por último para ver el efecto antagonista del endófito sobre

dos patógenos (*Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme*) se realizó un ensayo en el que se vio el efecto del filtrado de los hongos endófitos sobre el crecimiento de los patógenos considerados y la germinación de esporas de *Fusarium moniliforme*. Posteriormente se realizó un ensayo en condiciones de invernadero sobre *Lolium rigidum* para ver el efecto de la asociación endófito-patógeno y cómo influye en la calidad del forraje.

De todos estos ensayos realizados se obtuvieron los siguientes resultados: con respecto a los ensayos de diversidad endofítica, se identificó que la mayoría de los hongos obtenidos en *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus* pertenecieron al phylum *Ascomycota*, presentando una gran abundancia y riqueza de especies. Las clases más ricas y abundantes fueron Dothideomycetes y Sordariomycetes. De ambas especies analizadas se obtuvieron un total de 773 y 726 aislados respectivamente, que correspondieron con 54 y 61 genotipos cada una. En los dos hospedantes analizados, tanto la zona muestreada (y algunas de sus condiciones edafoclimáticas) como el tipo de tejido analizado (hojas y tallos) tuvieron una influencia significativa sobre la diversidad y la riqueza endofítica. En cuanto a la influencia del endófito sobre la producción y calidad del pasto, gran parte de la micoflora endofítica estudiada, tanto en *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus* como en *Poa pratensis*, presentaron un efecto positivo sobre las plantas en las que habían sido inoculados. Es el caso del endófito *Chaetosphaeronema* sp., que aumentó el contenido en biomasa forrajera de *T. subterraneum* en condiciones de campo en un 80 %, mientras que *Epicoccum nigrum* provocó un descenso en la acumulación de Pb en *T. subterraneum* y *O. compressus* del 80 y 38 %, respectivamente. Dicho efecto dependió de la asociación endófito-hospedante y de las condiciones ambientales. Por último referente a la influencia del endófito sobre el patógeno y sobre su severidad en condiciones *in vitro* y en planta, ciertos endófitos se pueden comportar como antagonistas de hongos patógenos afectando a alguna de sus características fisiológicas y fitopatógenas, tales como el crecimiento miceliar, severidad y daños en la producción y calidad del forraje. Como es el caso del crecimiento miceliar de *Fusarium moniliforme*, que fue limitado por *Sordaria fimicola* y *Paecilomyces variotii* (15,46 y 27,42 %, respectivamente), y el de *Biscogniauxia mediterranea* por los endófitos *Trichoderma gamsii*, *Paecilomyces variotii* y *Penicillium chrysogenum* (20,50, 56,71 y 51,68 %, respectivamente), en condiciones *in vitro*. Por tanto, se concluye que la utilización de endófitos puede ser una buena estrategia de mejora de la producción vegetal en especies de pasto, o de su calidad bromatológica para hacer frente a posibles deficiencias de nutrientes o problemas de toxicidad, o protegiendo las plantas ante diversos agentes.

# **ABSTRACT**



The *dehesa* is a very important ecosystem in the southwest of the Iberian Peninsula due to the large area it extends, around 1.3 million hectares in Extremadura, and from a social, ecological and economic point of view. There are three essential components of the biocenosis in this ecosystem, which have been very studied, livestock (domestic and wild animals), trees and herb layer. However, there is a fourth component (endophytic microbiota), which traditionally has not received much attention. Endophytes can affect largely many aspects of plant and animal production in *dehesas*, and they can affect greatly the other three components. Endophytic fungi inhabit the inner tissues of most of plants, during all or part of their life cycle. Many times they cause a beneficial effect on host plants, increasing their adaptive value, particularly under stressful conditions and protecting them against pest and/or diseases. This means that in many cases, they have a great influence on the biomass production and nutritive value of forage, by altering bromatological and nutritional characteristics or producing toxic substances for livestock.

Therefore, due to the importance of the *dehesa* ecosystem in southwestern Spain and the great influence that endophytes can have on grass productions and nutritive value of forage, the main objectives of the present study were: (1) to identify and characterize the endophytic mycobiota occurring in two legume species characteristics in *dehesas* of Extremadura and to determine how abundance and diversity are affected by edafoclimatic factors and host species. (2) To determine the influence of a collection of endophytic species on biomass yield and nutritive value of the forage (protein, fiber, lignin, digestibility, nutrients, etc.) in pasture species; and (3) to assess the antagonistic effect of endophytic fungi on several fungal pathogens and to analyze the influence of endophyte-pathogen interactions in plant pathogenicity, dry matter productivity and forage quality in plants of *Lolium rigidum*.

For this purpose *Trifolium subterraneum* and *Ornithopus compressus* plants were collected from ten *dehesas* (five in the province of Badajoz and five in the province of Cáceres) with different environmental conditions. These samples were surface sterilized and placed in Petri dishes, where endophytes were isolated from. They were identified by both morphological and molecular methods. From all these endophytes, those more characteristic were selected and inoculated in plants of *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus* and *Poa pratensis* under greenhouse conditions, and also in plants of *T. subterraneum* under field conditions. Before flowering, plants were harvested and carried to laboratory where the dry biomass of both herbage and root system, nutritive value parameters, and minerals content were determined. Finally the antagonistic effect of endophytes on two pathogens (*Biscogniauxia mediterranea* and *Fusarium*

## Abstract

*moniliforme*) was evaluated *in vitro* by analyzing the effect of endophytic filtrates on the mycelial growth of both pathogens and on the spore germination of *Fusarium moniliforme*. In addition, an *in planta* test was carried out under greenhouse conditions on *Lolium rigidum* to evaluate the effect of the endophyte-pathogen association and how it affects biomass yield and forage quality.

The experiments showed the following results: regarding the endophytic mycobiota associated to these two legume species, most of the fungi identified in *Trifolium subterraneum* and *Ornithopus compressus* belonged to the phylum *Ascomycota*, and it presented a great abundance and species richness. The richest and most abundant classes were Dothideomycetes and Sordariomycetes. Both legume species accounted a total of 773 and 726 isolates, respectively, which corresponded to 54 and 61 genotypes, respectively. In both hosts analyzed, the sampled area (and several of the edafoclimatic conditions) and the tissue type analyzed (leaves and stems) had a significant influence on the diversity and richness of endophytes. Regarding the influence of endophytes on biomass yield and nutritive value of the forage, many of the fungal endophytes presented a positive effect on plants of *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus* and *Poa pratensis*. That was the case of the endophyte *Chaetosphaeronema* sp. which increased the forage yield around a 80% in *T. subterraneum* under field conditions; while *Epicoccum nigrum* caused a decrease in the accumulation of Pb in the *T. subterraneum* and *O. compressus* forage in a 80 and 38 %, respectively. These effects depended on the endophyte-host interaction and environmental conditions. Finally regarding the antagonistic effects of endophytes on pathogens *in vitro*, and the association endophyte-pathogen in plants, the results indicated that several of the endophytes showed an antagonistic behaviour against the pathogenic fungi studied, affecting some of their physiological traits, such as mycelial growth, severity and damage on forage productivity and nutritive value characteristics. For instance, the mycelial growth of *Fusarium moniliforme* was limited by *Sordaria fimicola* and *Paecilomyces variotii* (a 15.46 and 27.42 %, respectively), and the growth of *Biscogniauxia mediterranean* by the endophytes *Trichoderma gamsii*, *Paecilomyces variotii* and *Penicillium chrysogenum* (a 20.50, 56.71 and 51.68 %, respectively) in *in vitro* conditions. Therefore, it can be concluded that the use of endophytes can be a good strategy for the improvement of plant production in pasture species, or of nutritive value of their forage, by addressing potential nutrient deficiencies or toxicity problems, or protecting plants against diverse agents.

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. El ecosistema dehesa.

### 1.1.1. Aspectos generales.

El presente trabajo se encuadra en la dehesa, pudiendo ser definida como un ecosistema agrosilvopastoral en el que conviven fundamentalmente especies herbáceas y arbóreas en ambientes mediterráneos semiáridos, cuyos recursos son utilizados por animales domésticos y/o cinegéticos en régimen extensivo, con respeto al medio ambiente y a su sostenibilidad (Olea *et al.*, 2004). Respecto a su extensión geográfica, en la Península Ibérica es uno de los ecosistemas más importantes debido en parte a la gran superficie que domina. Esta superficie varía según diferentes autores debido a la diferente interpretación del concepto dehesa. Olea *et al.* (2005) indicaron una superficie de 3,5 - 4 millones de hectáreas en la Península Ibérica, de las cuales 1,30 millones están situadas en Extremadura. Por otra parte, en el Plan Español de Dehesas (Barba *et al.*, 2008) se indica que la dehesa se extiende por 5,74 millones de hectáreas, aunque esta superficie se refiere a "zonas adehesadas" que incluyen un mayor número de ecosistemas que lo que conocemos como "dehesa típica".

En el suroeste de la Península Ibérica, el ecosistema dehesa se caracteriza por un clima semiárido mediterráneo con veranos calurosos y secos e inviernos relativamente fríos (temperatura media de las mínimas del mes más frío entre 1° y 6 °C, según Le Houerou, 1975) y húmedos (Olea *et al.*, 1991). La pluviometría interanual es muy irregular, oscilando entre 400 - 800 mm, y claramente estacional, siendo más elevada en otoño y primavera. Desde el punto de vista geológico, las dehesas extremeñas se enmarcan principalmente dentro del dominio cambriano, precámbrico y silúrico del Paleozoico, formadas por pizarras y afloramientos de tipo eruptivo (Olea *et al.*, 1987). Aparecen también recubrimientos posteriores correspondientes al Terciario, ocupando un área pequeña y en menor grado del Cuaternario. Las dehesas extremeñas se asientan principalmente sobre suelos ácidos, procedentes de sustratos pizarrosos y graníticos, encuadrados dentro de las denominadas "tierras pardas meridionales". Suelen ser suelos poco profundos, fácilmente erosionables, con escaso contenido en materia orgánica, pH entre 5 - 6, y especialmente pobres en fósforo, nitrógeno y en suelos graníticos, también en calcio (Olea y Paredes, 1997).

### 1.1.2. Componentes de la biocenosis.

Gran parte de la literatura relacionada con la dehesa coincide en destacar al ganado doméstico y silvestre, al estrato arbóreo y herbáceo como los tres componentes esenciales de la biocenosis de este ecosistema (San Miguel-Ayanz, 1994). Respecto a la ganadería doméstica, se suelen explotar razas ganaderas autóctonas que se encuentran perfectamente adaptadas al medio en el que viven y que presentan una buena rusticidad. El ganado ovino es la especie que tradicionalmente se ha utilizado en los pastos de dehesa para producción cárnica y lechera. Además de ésta, también se puede encontrar ganadería bovina y caprina, éstas complementadas con la montanera del cerdo, principalmente de raza ibérica. Las especies silvestres más abundantes son las de caza menor como la perdiz, conejo, liebre, paloma, etc.; la caza mayor, de menor abundancia, está representada principalmente por ciervos y jabalís. En cuanto al estrato arbóreo, las especies más características de la dehesa son la encina (*Quercus ilex* L. ssp. *ballota*) y el alcornoque (*Quercus suber* L.), presentándose en ocasiones quejigos (*Quercus faginea* L.) en las zonas de mayor humedad. Aparte de sus funciones productivas, su principal labor es proporcionar estabilidad ecológica, económica e incluso social al sistema. Aprovechándose además como recurso forrajero ya sea mediante ramoneo, forraje o frutos, con producciones medias entre 100 y 800 kg ha<sup>-1</sup> (Olea y San Miguel-Ayanz, 2006).

El componente principal, fundamental e ineludible de la dehesa es el estrato herbáceo; florísticamente es muy variado, abundando especies mayoritariamente terofíticas (la producción se concentra en primavera-otoño, y casi nula en verano), compuesto casi exclusivamente por anuales, cuyos principales atributos son: un pequeño porte, su carácter efímero (agostamiento precoz) (Fernández y Porras, 1998), su extensividad (suele cubrir la mayor parte de la superficie), su persistencia (dan lugar a una población de semillas que permanece latente en el subsuelo y germina, en parte, todas las otoñadas) y su protagonismo (ni son todos los años las mismas, ni durante su ciclo su papel e importancia es el mismo) (Granda y Prieto, 1991). La diversidad específica del pasto natural en las dehesas de Extremadura es muy elevada, destacando por su abundancia e importancia pascícola las siguientes especies: entre las gramíneas, *Lolium rigidum* Gaud., *Dactylis glomerata* L. y *Poa bulbosa* L. y entre las leguminosas, *Trifolium subterraneum* L., *Ornithopus compressus* L. y *Biserrula pelecinus* L.. Las producciones medias anuales según Olea y San Miguel-Ayanz (2006) pueden cifrarse en 1.440 kg M.S. ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. No obstante las producciones presentan unas grandes oscilaciones, entre 600 y 3.500 kg M.S ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> según Martín-Bellido *et al.* (1986), debido a diferentes factores edafoclimáticos, entre los que destacan la textura, la profundidad del suelo, la capacidad

de retención hídrica, la pluviometría (especialmente la de otoño) y el frío invernal (Olea *et al.*, 1986). Por lo general, en un año medio, con lluvias de otoño y primavera medias, la producción se reparte: 20 % en otoño, 12 % en invierno y 68 % en primavera. Por lo contrario, en años en que los otoños son secos, casi la totalidad de la producción es obtenida en primavera (Olea *et al.*, 1986). Los pastos naturales de dehesa tienen en general una baja calidad, condicionando la producción animal y el sistema de manejo. Olea y San Miguel-Ayanz (2006) analizaron la calidad del pasto, obteniendo unos valores medios de 10,3 % de proteína bruta (PB); 55,2 % de digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y un porcentaje de leguminosas de 8,5 %. Además, la evolución de la calidad puede ir variando a lo largo del año partiendo en otoño e invierno con unos niveles de proteína bruta del 17 y 18 % y presentando una gran reducción en febrero, alcanzando unos niveles de 13-14 %; otra reducción significativa se inicia en abril, siendo progresiva hasta el secado completo del pasto en junio, donde se llegan a alcanzar mínimos entre 6,5 y 7 %. La digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DMO) de estos pastos parte de niveles entre 56 y 58 % en otoño, invierno y principios de primavera, sufriendo una fuerte disminución a partir de final de abril cuando ocurre la plena floración, llegando a niveles del 44 % cuando el pasto está totalmente seco (Osorio, 1972).

### **1.1.3. Principales especies herbáceas del pasto de dehesa utilizadas en el trabajo.**

#### *Trifolium subterraneum*

El trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum* L.) es una leguminosa de origen mediterráneo que presenta la capacidad de auto-regeneración anual. Se produce de forma natural en los pastizales y dehesas del suroeste de España en suelos ácidos. Esta leguminosa es la más importante en implantaciones de praderas, siendo utilizada tanto sola como mezclada con otras especies, tanto en España como en otros países con climas templados o Mediterráneos, como Australia, el sur de América Latina, el sur de Europa, el noroeste y sureste de Estados Unidos, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Japón, etc. (Frame *et al.*, 1998). Hay muchos factores que afectan al crecimiento, la producción de biomasa, la calidad bromatológica, la persistencia y la regeneración de *T. subterraneum*. Las condiciones climáticas, especialmente las precipitaciones durante la estación de crecimiento, son sin duda, el factor más importante (Bolger *et al.*, 1993), pero la fertilidad del suelo (Saul *et al.*, 1999), la competencia con otras especies de plantas (Conning *et al.*, 2011), el sombreado (Kyriazopoulos *et al.*, 2012), el manejo del ganado (Ates *et al.*, 2013) y las plagas y enfermedades (Simpson *et al.*, 2011) también pueden llegar a

tener una gran influencia en estos parámetros. Esta especie produce una cantidad de biomasa herbácea relativamente abundante y con una alta calidad para la alimentación del ganado, con valores de 2.330 - 3.550 kg ha<sup>-1</sup> de materia seca y un contenido de proteína bruta (PB) alrededor de 15 a 19 % (García-Criado *et al.*, 1986). Además, presenta una alta palatabilidad y digestibilidad debido a su bajo contenido relativo en fibra y lignina, con valores promedio de fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD) de 26,8; 21,8 y 3,23 %, respectivamente (García-Ciudad *et al.*, 1985).

### *Ornithopus compressus*

La Serradela amarilla (*Ornithopus compressus* L.), es una especie anual de pasto de origen mediterráneo. Es endémica de los pastizales del suroeste de España, debido a su adaptación al clima mediterráneo y tolerancia a suelos arenosos y ácidos que contienen bajos niveles de materia orgánica. Debido a su carácter pionero, además de su capacidad como leguminosa de modificar la estructura del suelo y fertilidad, ha sido ampliamente utilizada para la recuperación de suelos degradados (Sandoval *et al.*, 2011). Aunque muy variables debido a la irregularidad interanual típica del clima mediterráneo, su rendimiento forrajero oscila entre 2.200 - 6.000 kg ha<sup>-1</sup> (Frame *et al.*, 1998; Ovalle *et al.*, 2006). Esta especie produce forraje con excelente valor nutritivo, con concentración alta en proteína bruta y digestibilidad. Los valores reportados en la etapa de plena floración son: PB de 21,7 a 29 % de materia seca, FAD de 18,8 a 23,1 % de materia seca, y niveles de energía metabolizable de 11,2 a 12,0 MJ kg<sup>-1</sup> de materia seca (Frame *et al.*, 1998). Por esta razón, es utilizada comúnmente para la alimentación animal. Se ha utilizado como forraje sembrado en su espacio europeo nativo, pero también se ha introducido a otras zonas de clima mediterráneo, principalmente en Chile (Del Pozo y Ovalle, 2009) y Australia (Bolland y Gladstones, 1987; Nichols *et al.*, 2012). Es mayormente utilizada en Australia donde se cultiva sola o mezclada con serradela rosa o francesa (*Ornithopus sativus* Brot.), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum* L.), y/u otros tréboles y especies de *Biserrula* (Frame *et al.*, 1998; Anonymous, 2001).

### *Lolium rigidum*

El vallico, *Lolium rigidum* Gaud., es una gramínea forrajera anual espontánea, que se encuentra de forma natural en los pastos de dehesa (Santamaría *et al.*, 2014), y que presenta muy buena capacidad adaptativa a condiciones de secano. Es una planta alógama autoincompatible

(Fearon *et al.*, 1983), por lo que presenta polinización cruzada, diploide y con elevada variabilidad genética (Powles, 1995). Es una especie muy polimórfica, en la que se reconoce al menos dos subespecies: *Lolium rigidum* subsp. *rigidum* muy extendido por la cuenca mediterránea y *Lolium rigidum* subsp. *rottbolloides* limitado a las zonas costeras orientales del Mediterráneo (Terrel, 1968). También se cultiva principalmente en el sur de Australia e Italia para pastoreo invernal (Terrell, 1968; Bullita, 1976). En nuestro país su uso no ha llegado a generalizarse por considerarla en principio una planta que puede infectar los campos y tierras agrícolas. Su interés radica en la calidad del forraje (Oliveira y López, 1999). La producción de forraje es variable y difícil de predecir, tanto la cuantía como el momento del aprovechamiento, ya que aquélla dependerá de la abundancia y del buen reparto de las precipitaciones, al igual que de la fertilidad del suelo, siendo más elevada cuanto mayor sean ambas. En nuestras condiciones las producciones pueden oscilar de 1.500 a 5.000 kg ha<sup>-1</sup> de materia seca, presentado un contenido de materia orgánica de 85,5 %; proteína bruta de 15,6 % y fibra bruta 10,1 % (Oliveira y López, 1999).

### *Poa pratensis*

El pasto azul de Kentucky (*Poa pratensis* L.) es una hierba nativa perenne común en Europa, Asia, América del Norte y el norte de África. Su variabilidad ecológica le permite adaptarse a los climas fríos de invierno (Reader *et al.*, 1994), lo que explica su capacidad de crecer en diversas condiciones y diferentes latitudes. En las zonas del Mediterráneo, por ejemplo, es común encontrarla en praderas permanentes, prados, bosques abiertos, praderas y zonas alteradas. Debido a su alta capacidad adaptativa, ha sido ampliamente cultivada en climas templados como forraje y césped. Como forraje, sus rendimientos oscilan desde 4.100 a 10.400 kg ha<sup>-1</sup>, en función de las condiciones del medio ambiente (Dürr *et al.*, 2005). Varios estudios se han centrado en diferentes calidades del forraje de *P. pratensis* (Dürr *et al.*, 2005; Holman *et al.*, 2007). Se ha indicado que el contenido de proteína bruta varía entre 7,6 - 26,6 %, y el contenido de fibra neutro detergente desde 43,5 a 58,7 %. Sin embargo, en las zonas mediterráneas, la productividad de forraje es baja, a pesar de su alta calidad nutritiva. Como cultivo forrajero, se pueden sembrar sola o mezclada con otras gramíneas o leguminosas como el trébol blanco (*Trifolium repens* L.) (Murphy *et al.*, 1997). Las condiciones climáticas, especialmente la precipitación durante la estación de crecimiento, son los factores más importantes que afectan al crecimiento, la producción de biomasa, los rasgos de calidad, la persistencia y la regeneración de *P. pratensis* (Croce *et al.*, 2001). Sin embargo, la fertilidad del suelo (Hodge, 2004), la etapa de

crecimiento de la planta (Holman *et al.*, 2007), y el fotoperiodo (Hay y Heide, 1983) pueden también afectar a estos parámetros.

#### 1.1.4. Estado fitopatológico del pasto de dehesa.

A las enfermedades criptogámicas de los pastos de dehesa no se le suelen prestar mucha atención, ya que al ser un pasto biodiverso siempre hay especies menos afectadas y raramente hay episodios epidémicos que afecten significativamente a la superficie de forma continua. Aun así, las distintas especies del pasto de dehesa también sufren el ataque de plagas y enfermedades. Según la bibliografía (Frame, 2006), *Trifolium subterraneum* es de todas las leguminosas, una de las menos propensas a padecer enfermedades. No obstante una de las enfermedades que le puede afectar es *Phytophthora clandestina* Taylor que provoca pudriciones en la parte radicular, afectando indirectamente al forraje, y que se encuentra tanto en condiciones de secano como de regadío (Taylor y Greenhalgh, 1987). Otro conjunto de hongos que causan pudriciones radiculares pueden ser *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* spp., pero en realidad éstos son considerados como patógenos secundarios, es decir que suelen aparecer cuando la planta está debilitada, ya sea por las condiciones ambientales o por el ataque de otras plagas y/o enfermedades. Por otro lado, puede verse afectada por antracnosis, causada por *Kabatella caulivora* Kirchn., que provoca quemaduras en la parte aérea, causando graves daños (Frame, 2006). En estaciones de primavera con gran humedad y temperaturas altas es frecuente la presencia del oídio (*Erysiphe polygoni* Dc.). También pueden padecer virosis que afectan a la superficie foliar, producción y rendimiento de semilla en planta. Estos virus (virus del mosaico amarillo, moteado del trébol subterráneo, el virus del enanismo, etc.) son generalmente transmitidos por áfidos que actúan como vectores (Jones, 1992; Helms *et al.*, 1993). En cuanto a las plagas, los ácaros (*Halotydeus destructor* Tucker, *Acyrtosiphon kondai* Shinji.) pueden afectar a la supervivencia del conjunto plántula-semillas. En *Ornithopus compressus* la producción de semillas se puede ver afectada gravemente por la presencia de un lepidóptero (*Heliothis punctigera* Wallengren) que se alimenta de ella. Respecto a las gramíneas que intervienen en el estudio, en el caso de la floración de *Lolium rigidum* puede ser afectada por el hongo *Fusarium moniliforme* (Gladys *et al.*, 1999), mientras que *Poa pratensis*, según la bibliografía consultada (Frame, 2006), no suele presentar enfermedades problemáticas.

Como en un ecosistema se producen interacciones continuas entre los diferentes componentes de la biocenosis, tampoco se pueden obviar las enfermedades que afectan al estrato

arbóreo, que muchas veces también pueden afectar al estrato herbáceo o actuar éste como reservorio de propágulos. En este sentido, la enfermedad más importante que ahora mismo afecta al arbolado es la denominada como “seca”. Esta enfermedad que provoca el decaimiento y muerte de encinas y alcornoques, ha sido asociada con el hongo *Phytophthora cinnamomi* (Camilo-Alves *et al.*, 2013; Pérez-Sierra *et al.*, 2013). No obstante, la “seca” parece un síndrome complejo en el que, además de agentes bióticos, parecen estar implicadas las condiciones ambientales y de manejo (Sánchez *et al.*, 2002). Este síndrome se manifestándose principalmente en dehesas marginales donde existe baja fertilidad, con sequias, demasiada humedad, etc. Las dehesas donde se realiza un mal mantenimiento del terreno, como roturaciones del estrato arbustivo o laboreo cada cierto periodo de años, hace que el terreno se degrade y el árbol sea más vulnerable ante cualquier otro problema biótico o abiótico. Otra enfermedad importante es el chancro carbonoso, causada por el hongo *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze. Es un hongo Xylareaceo que en hospedantes, especialmente del género *Quercus*, sometidos a estrés ambiental, es capaz de colonizar el xilema y la corteza, induciendo la necrosis y la formación del chancro (Henriques *et al.*, 2015).

Dentro de los patógenos fúngicos del estrato arbóreo y herbáceo vamos a describir en más profundidad los siguientes por haber sido utilizados en el presente trabajo debido a su importancia:

#### *Biscogniauxia mediterranea*

Conocido como chancro carbonoso, es un hongo Xylaraceo que a lo largo de su vida se comporta como endófito en ramas, cortezas, hojas y en menor medida en madera. Pero en hospedantes sometidos a estrés ambiental, es capaz de colonizar el xilema y la corteza, induciendo la necrosis y la formación del chancro. Es un patógeno que afecta a una amplia gama de hospedantes leñosos, en particular al género *Quercus* (Vannini *et al.*, 2009). Se describió por primera vez en Portugal afectando al alcornoque (*Quercus súber*) (Baeta Neves, 1948; 1949; 1954; Vieira Natividade, 1950). En España, la primera referencia del Chancro carbonoso fue en 1963, identificado con el nombre *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Ces. & De Not. (Torres, 1985). Los últimos criterios taxonómicos, lo clasifican dentro del género *Biscogniauxia* perteneciente a la división *Ascomycota*. Debido a su importancia en la dehesa, y a que fue encontrado como endófito en especies de pasto, las cuales posiblemente actúan como reservorio del patógeno, se decidió estudiar una forma de control biológico, mediante la utilización de hongos endófitos, para limitar o disminuir estas fuentes adicionales de propágulos.

*Fusarium moniliforme*

Conocido por tener la capacidad de producir una gran cantidad de micotoxinas, entre ellas fumonisinas y zearalenonas, al igual que en otras especies del género, como *F. solani* (Mart.) Sacc. (Muneera *et al.*, 2011). En nuestro caso *F. moniliforme* Sheld. ha sido citado por varios autores, produciendo moniliforminas, micotoxinas descubiertas por primera vez en 1970 en maíz de E.E.U.U. por Cole *et al.* (1973). La moniliformina afecta al entorno del metabolismo de los glúcidos, inhibiendo además el mecanismo base de las enzimas (tiamina, piruvato deshidrogenasa, cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato descarboxilasa y ácido acetohidroxi sintetasa). Al compartir todas estas enzimas un cofactor, se sugiere que la acción de la moniliformina se basa en el ataque a la Vitamina B (tiamina) (Soriano del Castillo, 2007). Todo esto puede provocar cáncer en el ganado (García Martínez, 2002). Además de esto existen otros tipos de especies como *F. oxysporum* Schltdl. y *F. tricinctum* (Corda) Sacc. las cuales afectan a plantas de interés agrícola. Este patógeno fue utilizado ya que se considera una enfermedad que afecta a la floración de *Lolium* sp. (Gladys *et al.*, 1999) y es uno de los patógenos más importantes para el consumo humano y animal por su secreción de micotoxinas como zearalenona, tricotecenos y fumonisinas (Peraica *et al.*, 1999). Además, este riesgo es reconocido por el Codex Alimentarius publicado por las organizaciones internacionales FAO, WHO y normativas sobre los límites que se deben establecer en cuanto a la presencia de las principales toxinas en los alimentos y materias primas en la Unión Europea (Soldevilla *et al.*, 2005). Por tanto, como su control en especies de gramíneas parece muy conveniente, también se decidió estudiar una forma de control biológico, mediante la utilización de hongos endófitos.

## 1.2. Micobiota endofítica.

### 1.2.1. Definición del término y diversidad endofítica.

Además de los tres componentes esenciales de la biocenosis del ecosistema dehesa expuestos anteriormente, existiría un cuarto componente, la micobiota endofítica, el cual ha sido muy poco estudiado en la dehesa, y que puede tener una gran importancia en bastantes aspectos de la producción vegetal y animal de este ecosistema. La micoflora o micobiota endofítica comprende a los hongos que se encuentran en el interior de la mayoría de las especies vegetales, sujetos a una evolución conjunta y que en la mayor parte de los casos no se tiene muy claro el papel que desempeñan en el sistema.

El término "hongo endófito" ha sufrido una continua evolución en su definición desde que De Bary lo utilizó en el siglo XIX para "describir hongos que viven en el interior de las plantas" (De Bary, 1866). Más recientemente, Large (1940) y Carroll (1986) propusieron que además de vivir en el interior de las plantas, éstos tenían que infectar plantas aparentemente sanas sin causar síntomas, pudiendo así diferenciarlos de los hongos patógenos. Por otro lado Wilson (1995) fue más allá, definiéndolos como "hongos que, durante todo o parte de su ciclo vital, invaden los tejidos de plantas vivas y causan infecciones asintomáticas únicamente en los tejidos internos de la planta pero sin causar síntomas de enfermedad". Los primeros estudios sobre hongos endófitos fueron realizados a finales del siglo XIX donde las especies más estudiadas eran las gramíneas, en especial *Lolium linicolum* A.Br. y *Lolium temulentum* L. (Nestler, 1898; Neubauer y Remer, 1902). El interés por el estudio de los hongos endófitos sobre gramíneas tuvo un nuevo impulso a raíz de la observación de que *L. temulentum* no era consumido por los animales, y que esto era causado por la secreción de una toxina por parte de un hongo que vivía en su interior, impidiendo su ingesta (Kingsbury, 1964). Por otro lado, los estudios en otras familias diferentes de las gramíneas no comenzaron hasta los años 70. Se conocen hongos endófitos en todas las especies de plantas que han sido estudiadas, tanto en zonas tropicales y de clima templado, como desérticas o boreales (Schulz y Boyle, 2005; Higgins *et al.*, 2006).

Estos organismos son muy abundantes, llegándose a encontrar en todas las especies de plantas que han sido analizadas con dicho propósito. Diversos estudios realizados han revelado su presencia en plantas pertenecientes al grupo de las algas (Hawksworth, 1988), musgos (Schulz *et al.*, 1993), líquenes (Li *et al.*, 2007), y plantas superiores tanto del estrato arbóreo (Bernstein y Carroll, 1977; Rodrigues, 1996; Collado *et al.*, 1999; Santamaría y Diez, 2005; Arnold, 2007),

arbustivo (Shamoun y Sieber, 1993; Fisher *et al.*, 1995), como del herbáceo (Schulz y Boyle, 2005; Higgins *et al.*, 2006; Porrás-Alfaro *et al.*, 2008). De los estudios realizados anteriormente al siglo XX, como media se identificaron 50 especies para cada especie vegetal (Stone *et al.*, 2004). Esto sufrió un cambio cuando aparecieron las técnicas moleculares, permitiendo que las especies estériles pudieran ser identificadas (Arnold *et al.*, 2000). Con estas técnicas, los hongos identificados aumentaron significativamente. Estos endófitos se distribuyen con una gran diversidad específica, perteneciendo a numerosos órdenes y géneros; aunque la gran mayoría pertenecen a la división *Ascomycota* (Stone *et al.*, 2004; Arnold y Lutzoni, 2007).

### **1.2.2. Clasificación de los endófitos y sus formas de transmisión.**

En general se han descrito cuatro tipos de hongos endófitos reflejando las diferencias en la relación evolutiva, taxonómica, plantas a las que hospedan y funciones ecológicas. Al primer tipo (o tipo I) pertenecen los endófitos denominados endófitos clavicipitáceos, que infectan principalmente gramíneas. Los otros tres tipos (tipos II, III y IV) pertenecen a los denominados endófitos no clavicipitáceos, que pueden ser obtenidos de diversos grupos de plantas y no sólo gramíneas, desde plantas no vasculares, helechos y plantas afines, coníferas y angiospermas. La mayoría de los estudios se han centrado en los endófitos clavicipitáceos dada su importancia e impacto agrícola (Wen-Jing *et al.*, 2012), o han examinado conjuntamente los endófitos clavicipitáceos y no clavicipitáceos (Arnold, 2007). Antiguamente los endófitos no clavicipitáceos eran tratados como un único grupo, aunque ya se han separado en los tres anteriormente indicados. Esto era debido a la falta de conocimiento sobre la importancia ecológica de los endófitos no clavicipitáceos.

Los endófitos clavicipitáceos (endófito-C) representan un pequeño número de especies filogenéticamente relacionadas con una gran preferencia por el hospedante, que suelen ser especies de gramíneas, tanto de estaciones frías como cálidas (Bischoff y White, 2005). Normalmente estos endófitos se encuentran dentro de los brotes de las plantas, donde se producen las infecciones sistémicas intercelulares. La transmisión de estos endófitos principalmente es vertical, es decir, el hongo a través de la planta materna pasa a su descendencia a través de las semillas infectadas (Saikkonen *et al.*, 2002). Las plantas colonizadas por lo general albergan abundantes aislados/genotipos del hongo (Wille *et al.*, 1999). Frecuentemente este hongo confiere unas mejoras adaptativas a la especie que hospedan como: aumento de la biomasa vegetal, tolerancia a la sequía y producción de sustancias químicas

tóxicas para los animales, disminuyendo la herbivoría (Clay, 1988). Sin embargo, los beneficios conferidos parecen depender de la especie hospedante, el genotipo del hongo y de las condiciones ambientales (Saikkonen *et al.*, 1999; Faeth y Sullivan, 2003; Faeth *et al.*, 2006).

Por otra parte, los endófitos no clavicipitáceos (endófito-NC) son muy diversos; lo que representa un conjunto polifilético de hongos principalmente Ascomicetos con diversas funciones ecológicas mal definidas o desconocidas. Los endófitos-NC se han encontrado en una gran cantidad de plantas terrestres y de todos los ecosistemas terrestres, que van desde los trópicos hasta las tundras (Arnold y Lutzoni, 2007). La gran diversidad de este grupo, sus posibles funciones ecológicas y sus posibles aplicaciones a nivel de producción vegetal han hecho que este grupo cada vez tenga más interés y que vayan aumentando los estudios por parte de micólogos, ecologistas, fisiólogos y científicos aplicados (Vasiliauskas *et al.*, 2007; Maciá-Vicente *et al.*, 2008; Selosse *et al.*, 2008). Como ya se ha indicado, los endófitos-NC se pueden dividir a su vez en tres tipos basándonos en los patrones de colonización del hospedante, el mecanismo de transmisión entre generaciones, el nivel de biodiversidad en planta y su función ecológica. Aunque las tres clases tienen rangos amplios de hospedantes, el tipo II puede crecer en la parte aérea y radicular. Por el contrario, los endófitos de los tipos III y IV están restringidos a los tejidos aéreos ó radiculares, respectivamente. También existen diferencias en la colonización de los tejidos del hospedante, en la que el tipo III forma infecciones muy localizadas, mientras que los tipos II y IV son capaces de colonizar extensas regiones de tejidos. En general, la diversidad del tipo II en plantas huéspedes individuales es bastante limitada (Rodríguez *et al.*, 2008), mientras que la diversidad del tipo III puede ser muy elevada; por ejemplo más de 20 especies registradas a partir de una sola hoja de una planta tropical (Arnold *et al.*, 2003). La diversidad del tipo IV en plantas individuales no ha sido suficientemente evaluada. Las diferencias en la biodiversidad en planta de los tipos II y III pueden reflejar diferencias en la colonización del hospedante y en los patrones de transmisión, aunque los miembros de ambos tipos se transmiten horizontalmente, es decir a través de esporas de planta a planta. El tipo II también se puede transmitir verticalmente a través de la cubierta de la semilla, semillas o rizomas. Un aspecto único del tipo II es su capacidad para conferir tolerancia al estrés abiótico de las plantas que se encuentran infectadas con dicho hongo, único tipo en el que se ha demostrado ésto (Rodríguez *et al.*, 2008). Mientras que en la mayoría de las especies de los tipos III y IV no se ha evaluado este carácter beneficioso.

Diversos estudios muestran que las semillas y las plántulas están prácticamente libres de endófitos y la presencia de éstos aumenta a medida que las hojas o semillas van envejeciendo

(Arnold *et al.*, 2003; Gallery *et al.*, 2007). A pesar de ello existen algunas especies de endófitos, como es el caso de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* (hongos clavicipitáceos), cuya dispersión puede ser a través de semillas infectadas (Freeman, 1904). Teniendo en cuenta que los endófitos no suelen provocar síntomas a sus hospedantes, en el caso de los hongos no clavicipitáceos existe la incertidumbre sobre donde se puede producir el inóculo endofítico, ya que su producción puede estar a veces asociada a la formación de lesiones y estructuras a menudo macroscópicas en plantas. Los endófitos que se comportan como saprofitos latentes, podrían producir el inóculo tras la muerte de su hospedante. En estos casos particulares, la hojarasca y otros restos vegetales podrían ser un foco de inóculo de endófitos (Bills y Polishook, 1994). Tadych *et al.* (2007) comprobaron que en algunas plantas vivas se conocen algunas situaciones en las cuales se producen conidios de manera imperceptible en la superficie foliar. También existen algunos insectos que juegan un papel fundamental en su dispersión, ya que las esporas pueden quedar pegadas en su cuerpo, o bien algunas especies tienen esporas resistentes al paso por el aparato digestivo del insecto (Devarajan y Suryanarayanan, 2006).

### 1.2.3. Especificidad por el hospedante y tipos de interacción con éste.

En los diversos estudios realizados sobre hongos endófitos, las hojas son los órganos más estudiados. Las tasas de infección son elevadas, entre el 78 y el 100 % de las hojas analizadas contienen alguna especie de hongo endófito (Petrini *et al.*, 1982; Arnold *et al.*, 2000). Al estudiar la distribución interna de los endófitos en las hojas, se han obtenido estimaciones que indican que entre el 30 y el 73 % de ésta puede estar colonizada por endófitos (Rodrigues, 1994; Arnold *et al.*, 2000). En este caso, las especies *Neotyphodium* y *Epichloë* infectan sistémicamente el espacio intercelular de las hojas, tallos reproductivos, y semillas de sus anfitriones (Clay y Schardl, 2002; Leuchtmann *et al.*, 2014). En ocasiones los hongos pueden actuar como patógeno en unas plantas y como endófito en otras plantas de la misma especie o de otra especie. Esto se ha estudiado en varias especies de *Colletotrichum* que son patógenos de una determinada especie pero pueden infectar asintómicamente plantas de otra especie (Redman *et al.*, 2001). Otro ejemplo ocurre con *Fusarium moniliforme* que ha sido descrito como patógeno que causa pudrición de granos, raíces, tallos y plántulas de maíz (Rheeder *et al.*, 1992; Bacon y Hinton, 1996), y que sin embargo ha sido también encontrado como endófito en otras plantas de la misma especie (Kedera *et al.*, 1994). En infecciones asintomáticas analizadas en maíz, las hifas crecen intercelularmente, mientras que en las patogénicas el crecimiento es además intracelular (Bacon y Hinton, 1996).

También se demuestra la especificidad por el hospedante en diversos estudios (Schirrmann y Leuchtmann, 2015), donde se investigaron las posibles barreras de reproducción en cuatro miembros de *Epichloë typhina*: *E. typhina* que infectaba a *Dactylis glomerata*; *E. typhina* subsp. *clarkii* infectando a *Holcus lanatus*; *E. typhina* subsp. *poae* infectando a *Poa nemoralis* y *E. typhina* infectando a *P. trivialis*. Esto reveló distintos patrones de relación específica con el hospedante. Sugiriendo que las poblaciones naturales de *Epichloë* pueden ser genéticamente diferenciados debido a la especificidad con el hospedante.

Existen múltiples interacciones entre planta y hongo endofítico. Los hongos pueden ser (1) patógenos de debilidad, (2) mutualistas o simbioses ó (3) saprófitos latentes. En el primer caso, los patógenos estarían en estado de latencia, esperando a que la planta tuviera algún problema que debilitase su sistema defensivo, para atacar los tejidos vegetales y proliferar. En este sentido, varios trabajos como los de Sánchez-Márquez *et al.* (2007), han identificado reconocidos patógenos dentro de la cohorte endofítica de diversas plantas. Por otra parte, con respecto a las relaciones mutualistas o simbióticas, se ha demostrado que bajo influencia de factores de estrés biótico o abiótico, las interacciones con endófitos son beneficiosas para las plantas, y éstas a su vez le suministran protección y alimento al hongo. Esta cualidad, cuyo interés parece que va en aumento, ha llevado a algunos autores a decir tras diversos estudios, que las interacciones con estos hongos son muy importantes para la adaptación y supervivencia de las plantas (Rodríguez y Redman, 2008). Hoy en día se conocen casos de las ventajas y beneficios que pueden producir los hongos endófitos a las plantas. Estas ventajas y beneficios van en dos líneas fundamentales: (a) pueden conferir a la planta mejoras adaptativas ante diversos tipos de estrés abiótico (Assuero *et al.*, 2006; Oberhofer *et al.*, 2014; Vázquez de Aldana, *et al.*, 2015) y (b) pueden por otra parte servir de protección a las plantas frente a herbívoros, plagas y enfermedades (Clarke *et al.*, 2006; Santamaria *et al.*, 2012; Schardl *et al.*, 2013). Estas ventajas y beneficios han motivado la realización de diversos estudios para intentar aprovecharlas, tal y como se desarrolla en el apartado siguiente. Otras especies se comportan como saprofitos latentes, hongos que infectan asintóticamente plantas y que cuando las plantas empieza a envejecer o mueren, colonizan sus tejidos, pudiendo llegar a formar estructuras reproductivas y completar su ciclo de vida (Promputtha *et al.*, 2007).

#### 1.2.4. Factores que afectan a las comunidades de hongos endófitos.

Los patrones de distribución de las comunidades de hongos endofíticos entre hospedantes vegetales y/o dentro del hospedante han sido muy estudiados en las últimas décadas (Petrini y Fisher 1990; Collado *et al.*, 2000). Dentro de una misma especie hospedante, la composición de su micobiota endofítica va a variar en gran medida tanto del factor geográfico como de la distancia entre plantas (Arnold *et al.*, 2003; Gange *et al.*, 2007; Giauque y Hawkes, 2013), o la estación del año (Collado *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2013). La especie hospedante también presenta una gran influencia sobre la micoflora endofítica (Maciá-Vicente *et al.*, 2008); sin embargo, se encuentra frecuentemente poca especificidad entre el hospedante-endófito (Waller *et al.*, 2005; Sánchez-Márquez, 2009). También se ha comprobado que el órgano de la planta influye claramente sobre las comunidades fúngicas que se observe. En este sentido, se ha comprobado que en algunos endófitos se presenta una especificidad sobre el tipo de tejido de la planta (Fisher y Petrini, 1992; Rodrigues, 1994; Carroll, 1995; Gazis y Chaverri, 2010), tanto a nivel radicular (Jumpponen y Trappe, 1998; Mandyam y Jumpponen, 2005; Waller *et al.*, 2005; Porrás-Alfaro *et al.*, 2008), como a nivel de semillas (Gallery *et al.*, 2007). Por supuesto, en el caso de las hojas, puede existir especificidad en función de la zona donde se encuentra el hongo, tal y como muestran algunos estudios (Rodrigues y Samuels, 1999) en los que una especie desconocida de *Phomopsis* se encontró exclusivamente en el raquis de las hojas de *Spondias mombin* L. y otras especies se encontraron exclusivamente en el peciolo (Hata y Sone, 2008).

#### 1.2.5. Influencia de endófitos sobre el crecimiento vegetal.

Los endófitos han demostrado en numerosos estudios tener diversos efectos, muchos de ellos beneficiosos, sobre las características productivas de las plantas hospedantes. Respecto a la influencia de los hongos endófitos sobre la producción de biomasa herbácea, esta vendría impuesta principalmente por la ventaja adaptativa que el endófito aporta a la planta infectada, que le permite adaptarse mejor a condiciones de sequía y estrés abiótico (Malinowski y Belesky, 2000; Assuero *et al.*, 2006; Oberhofer *et al.*, 2014; Vázquez de Aldana, *et al.*, 2015). Dicha influencia directa sobre la producción ha sido constatada por diversos autores. West *et al.* (1988), tras ensayos de campo con riego deficitario, observaron un incremento de la materia seca en aquellas plantas con el endófito inoculado. Este ensayo fue acompañado de otro en invernadero donde se incrementó el ahijamiento y la producción de materia seca en las plantas inoculadas con endófito (De Battista *et al.*, 1990). Vázquez de Aldana *et al.* (2013), observaron que en plantas

de *Festuca rubra* en presencia de *Epichloë*, la competencia mostrada por especies de pastos era menor que en aquellas no infectadas con el endofito. También se ha constatado en plantas infectadas por endófitos una mejor adaptación a la deficiencia de nutrientes en suelos (Malinowski y Belesky, 2000; Zabalgogezcoa *et al.*, 2006), o al exceso de aluminio (Malinowski y Belesky, 1999), zinc (Monnet *et al.*, 2001) y cadmio (Likar y Regvar, 2013). No obstante, la influencia de la infección endofítica sobre la producción no está totalmente clara, y hay varios estudios que no encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa de plantas infectadas con respecto a las que no, como es el caso estudiado por Zabalgogezcoa *et al.* (2006) sobre *Festuca rubra* en campo inoculada con *Epichloë festucae* Leuchtm. La falta de efecto también ha sido constatada en otros estudios (Fritz y Collins, 1991) sobre el binomio *Festuca arundinacea-Neotyphodium coenophialum* Morgan-Jones & W. Gams.

También se ha observado un efecto de los hongos endófitos sobre los parámetros de calidad y su contenido nutritivo (Oliveira *et al.*, 2004; Soto-Barajas *et al.*, 2015). Ciertos endófitos secretan metabolitos secundarios que de una u otra forma pueden afectar a la palatabilidad del pasto para el ganado. Respecto a los principales parámetros de calidad del pasto, fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina (LAD) y digestibilidad de la materia orgánica (DMO), se ha observado en diferentes estudios (Zabalgogezcoa *et al.*, 2006) una disminución del contenido de FND, y por tanto un aumento de la digestibilidad en plantas de *Festuca rubra* inoculadas con *Epichloë festucae* durante el periodo reproductivo de las plantas; y lo mismo para plantas de *Festuca arundinacea* infectadas creciendo en condiciones óptimas de nutrientes (Vázquez de Aldana *et al.*, 2000). Por el contrario en otros estudios (Oliveira *et al.*, 2002) se ha encontrado que, con bajos niveles de fertilización en *Lolium perenne* L., no hubo ningún efecto significativo entre plantas infectadas y no infectadas, aunque con altas dosis de fertilización sí que se produjo un incremento en la digestibilidad de las plantas infectadas. Por tanto, también se observan resultados contradictorios en la literatura con respecto a la influencia del endófito sobre la calidad del pasto, y son también frecuentes los trabajos en los que no se observó un efecto significativo (Fritz y Collins, 1991; Humphry *et al.*, 2002). Si que parece que hay más efecto sobre la capacidad de absorción de nutrientes por parte de la planta. Este es el caso de los trabajos de Zabalgogezcoa *et al.* (2006), donde encontraron un incremento de los contenidos de fósforo y un descenso en los de manganeso en las plantas de *Festuca rubra* infectadas con *Epichloë festucae* con respecto a las que no. Ese mismo efecto sobre el fósforo también fue encontrado por Malinowsky *et al.* (1998) en plantas de *Festuca arundinacea* infectadas con *Neotyphodium coenophialum*, autores

que también encontraron un aumento de calcio y magnesio en las plantas infectadas. En otros estudios la infección con *Neotyphodium* spp. dio lugar a una mayor actividad antioxidante en las gramíneas *Stipa robusta* (Vasey) Scribn. y *Festuca arizonica* Vasey (Hamilton y Bauerle, 2012). Con respecto al cobre, se ha observado en varios sistemas planta-endófito un descenso significativo en el contenido respecto a plantas no infectadas (Dennis *et al.*, 1998; Zabalgogazcoa *et al.*, 2006).

### 1.2.6. Influencia de endófitos sobre el estado fitosanitario.

Además de los beneficios aportados frente a condiciones abióticas, también se ha comprobado que ciertos hongos endófitos protegen a las plantas frente a ataques de un gran número de especies de insectos (Breen, 1994; Zabalgogazcoa, 2008). Estos endófitos también protegen de varias especies de nematodos (Timper *et al.*, 2005; Martinuz *et al.*, 2014) y de varias especies de patógenos fúngicos (Felber *et al.*, 2015; Larran *et al.*, 2016). Sobre este último punto, por ejemplo Clarke *et al.* (2006) han demostrado como la infección de la gramínea *Festuca rubra* L. con el endófito *Epichloë festucae* Leuchtm. Scharndl, produjo un aumento de la resistencia al hongo patógeno *Sclerotinia homeocarpa* Bennett. Esta simbiosis endofito-planta también redujo la severidad de la enfermedad del hilo rojo, causada por *Laetisaria fuciformis* (McAlpine) Burds. en *Festuca rubra* L. subsp. *rubra* y *Festuca rubra* L. subsp. *fallax* gracias al endófito *Epichloë festucae* (Bonos *et al.*, 2005). Algunas especies entomopatógenas como *Cordyceps bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Li *et al.*, 2007) pueden colonizar como endófitos diversas especies de plantas (Quesada-Moraga *et al.*, 2006; Zabalgogazcoa *et al.*, 2008, Felber *et al.*, 2015), algo que también se ha observado con hongos nematófagos (Bordallo *et al.*, 2002; Martinuz *et al.*, 2014). Estos últimos autores demostraron que al inocular *Fusarium oxysporum* (Fo162) sobre *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh se redujo significativamente el número de *Meloidogyne incognita* juveniles que infectaban las raíces y el número de agallas que producen. La capacidad de los hongos endófitos de actuar como antagonistas de patógenos fúngicos también se encuentra en el estudio de Gherbawy y Yaser, (2003) en el que en este caso mediante *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokoningii* y *Gliocladium* se logró controlar significativamente el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

La presencia de este tipo de hongos podría alterar las poblaciones de fitopatógenos cercanas a plantas infectadas, existiendo un interés por la utilización de este tipo de endófitos como agentes de control biológico. Estos endófitos también pueden ser capaces de producir una

serie de sustancias alelopáticas y antibióticas (Santamaría *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Lima Fávoro *et al.*, 2012) que favorecen el predominio de las especies infectadas frente a otras. Este efecto se demostró, por ejemplo, en el estudio realizado por Sutherland *et al.* (1999) donde se puso de manifiesto el predominio de plantas de *Lolium perenne* L. infectadas con un determinado endófito cuando eran sembradas en mezcla junto con *Trifolium repens* L. En otros casos, se ha observado que los endófitos son capaces de proteger a las plantas que infectan de los herbívoros, como por ejemplo el ganado, debido a la producción de metabolitos secundarios (Paterson *et al.*, 1995; Bazely *et al.*, 1997; Thom *et al.*, 2013), afectando a su palatabilidad y a otras propiedades nutritivas.

### **1.2.7. Identificación molecular aplicada a los hongos endófitos.**

Con todos los estudios indicados en el apartado anterior, se constata la gran importancia que los hongos endófitos pueden llegar a tener sobre la producción y la calidad de las principales especies de pasto utilizadas como base de la alimentación animal. Claramente parece que el efecto depende tanto de la especie endofítica considerada, de la planta hospedante y de las condiciones concretas de la zona de estudio. Por tanto, a la hora de iniciar estudios sobre la interacción hongo endófito-especie herbácea, lo primero sería conocer la micoflora endofítica autóctona de la zona de estudio, y de que parámetros ambientales depende. Para ello, sería básico el aislamiento de las especies endofíticas y su identificación. Lo más común para la identificación es la utilización de placas Petri donde los endófitos previamente han sido aislados, y se identifican a partir de las estructuras reproductoras. El problema de dicha identificación es que en muchos casos los aislados son estériles y no producen estructuras reproductoras en placa, dificultando o imposibilitando su identificación. En algunos casos, los aislados estériles son agrupados en "morfo-taxones" o "morfoespecies", en base a características macroscópicas de los cultivos tales como color, tasa de crecimiento o aspecto del micelio (Polishook *et al.*, 1996; Umali *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2000; Fröhlich *et al.*, 2000) y son usados frecuentemente como unidades taxonómicas funcionales (Guo *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2003). Para solucionar este problema han emergido diferentes técnicas moleculares (Takamatsu, 1998; Ranghoo *et al.*, 1999), que son utilizadas para la identificación de hongos (Rollo *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). A finales del siglo XX, se comenzó a aplicar técnicas moleculares al estudio de las plantas (Hamby y Zimmer, 1988; Bousquet *et al.*, 1990; Bruns *et al.*, 1990) y de los hongos (O'Donnell, 1992; Simon *et al.*, 1992; Kiss y Nakasone, 1998), y posteriormente se aplicarían al estudio de los hongos endófitos (Sharples *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2001),

facilitando en gran medida su identificación. En los últimos años se han realizado multitud de trabajos en los que se describe la gran diversidad de la población endofítica basado en técnicas moleculares (Girlanda *et al.*, 2002; Bernardi-Wenzel *et al.*, 2010; Martín-García *et al.*, 2011; Brathen *et al.*, 2015; Clay *et al.*, 2016).

La utilización de las técnicas moleculares ha proporcionado un gran avance en los estudios de identificación, de estudios poblacionales y sobre las relaciones evolutivas en las especies de hongos endófitos. Hay diversas técnicas moleculares que se pueden utilizar para la identificación de hongos endofíticos, basadas en la utilización de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) como son la técnica de PLFRs (polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del ADNr/ARNr), que consiste en cortar el ADN con unas enzimas de restricción que generan un patrón de bandas que puede ser único para cada especie; o como es la técnica RAPD (polimorfismo del ADN aleatoriamente amplificado), que se basa en utilizar "iniciadores" o "cebadores" de cadena corta, que amplifican el ADN en varios puntos, generándose patrones diferentes en función del "iniciador" y de la especie de hongo que se trate. Sin embargo, desde que la secuenciación es una técnica operativa, ha desbancado a las demás debido a su grado de precisión. Obviamente, la secuenciación del genoma completo sería algo inabordable para un trabajo de estas características; sin embargo, se conoce que dentro del ADN fúngico, hay una región, conocida como región del espaciador interno transcrito (ITS, del inglés Internal Transcribed Spacer), que es particularmente útil en el análisis de especies cercanas en muchos géneros (Zervakis *et al.*, 2004), ya que es relativamente pequeña y por tanto asumible su secuenciación (de unas 650 pares de bases), y evoluciona rápidamente, siendo muy variable y permitiendo por tanto la diferenciación o determinación interespecífica (Jorgensen y Cluster, 1988; Cullings *et al.*, 1996; Vogler y Bruns, 1998), y a veces incluso, una diferenciación intraespecífica (Baura *et al.*, 1992). No obstante, hoy en día, además del análisis de la región ITS, existen otras técnicas que podrían ser utilizadas para apoyar nuestros resultados, tal como el análisis del gen que codifica la  $\beta$ -tobulina y EF-1 $\alpha$ , utilizados en numerosos trabajos (Wang *et al.*, 2014; García-Lopez *et al.*, 2016). Una vez que se dispone de la secuenciación de la región ITS, se puede comparar con las depositadas en la base de datos del GenBank que dispone de millones de secuencias aportadas constantemente por los investigadores. Este hecho hace que sea la más indicada en la actualidad para la identificación de las diversas especies endofíticas.

## **2. OBJETIVOS**



## Objetivos

Del análisis del apartado anterior se deduce que los estudios efectuados sobre los hongos endófitos y sus aplicaciones en pastos de dehesa son muy escasos, especialmente en condiciones mediterráneas. Por tanto, conociendo la gran importancia que tiene el ecosistema dehesa en el suroeste de España, no solo en términos de superficie, sino también desde un punto de vista económico, ecológico y social, y el importante papel que parecen jugar las especies de hongos endófitos sobre la producción y calidad de los pastos, principal producción de estos sistemas, toma especial importancia el estudio en profundidad de estos organismos.

La hipótesis de partida es que las especies pratenses localizadas en el ecosistema dehesa, con una gran diversidad microclimática y específica, contienen a su vez una gran diversidad de micoflora endofítica; y que esta micoflora endofítica, de la que gran parte se desconoce, tiene que desempeñar algún papel en el ciclo de vida del hospedante al cual infecta. Dentro de los diferentes tipos de roles que pueden jugar las diferentes especies de endófitos, partimos de la hipótesis de que pueden influir de manera significativa sobre parámetros muy importantes en la producción vegetal y por tanto de la alimentación animal, principal activo y motor de la dehesa. Por tanto conocer la frecuencia endofítica en las condiciones de dehesa, los factores que regulan esa distribución de frecuencias y los efectos principales que esta tiene sobre la producción y calidad del pasto, puede suponer un avance significativo en el conocimiento de estos organismos y una nueva herramienta que nos puede permitir un manejo y una gestión del ecosistema dehesa más eficaz, de manera que se pueda aumentar la rentabilidad y permita su sostenibilidad.

La principal novedad que aporta el estudio realizado es que ha sido llevado a cabo en un medio, como es la dehesa, prácticamente no estudiado en este aspecto y en el que la microbiota endofítica pueden tener una gran influencia sobre los parámetros productivos. Además, casi todos los trabajos se vienen realizando con gramíneas, siendo muy limitados los estudios con otras familias de pratenses también muy importantes como las leguminosas. Es por ello que ante el análisis de un nuevo medio, y nuevos hospedantes, el número y diversidad específica de los endófitos aparecidos posiblemente sean diferentes de trabajos anteriores, pudiendo hacer pruebas sobre especies no contrastadas anteriormente que hagan avanzar, aclarar y arrojar un poco más de luz sobre estos organismos y sus eventuales aplicaciones sobre la producción vegetal.

Por todo ello, los objetivos concretos del estudio fueron los siguientes:

1. Identificar y caracterizar, mediante procedimientos moleculares principalmente (región ITS), aunque también morfológicos, la microbiota endofítica asociada a especies pascícolas con gran interés en la dehesa del suroeste peninsular, como *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*. La influencia de las condiciones edafoclimáticas

## Objetivos

y del tejido de la planta analizado sobre la diversidad y distribución endofítica fue también evaluada.

2. Evaluar en condiciones de invernadero la influencia de la inoculación con una selección de especies de hongos endófitos en plantas de *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus* y *Poa pratensis* sobre la producción de biomasa herbácea y diversos parámetros de calidad del forraje producido, entre las que se encuentran proteína bruta, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente, lignina y contenido en nutrientes. Con el fin de analizar la posible extrapolación de los resultados, dicha evaluación también se realizó en condiciones de campo con la especie *T. subterraneum*.
3. Evaluar el efecto *in vitro* de los filtrados producidos por una selección de hongos endófitos sobre el crecimiento miceliar de dos patógenos fúngicos, *Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme*, y sobre la germinación esporal de *F. moniliforme*, con el fin de analizar su eventual uso como agentes de control biológico. Además con uno de los patógenos (*F. moniliforme*) se evaluó la influencia de la asociación endófito-patógeno en su patogenicidad en planta (*Lolium rigidum*), producción de materia seca y calidad del forraje al ser ambos inoculados en condiciones de invernadero.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. DIVERSIDAD ENDOFÍTICA EN ESPECIES DE PASTO.

#### 3.1.1. Caracterización de las zonas de estudio y recogida de muestras.

Para la recogida de muestras del material vegetal del presente estudio se eligieron diez dehesas de la Comunidad Autónoma de Extremadura (cinco en la provincia de Badajoz y otras cinco en Cáceres), intentando que englobaran las características edafoclimáticas lo más representativas posible de la región (Figura 1).



**Figura 1** Puntos de localización de las diferentes fincas muestreadas, donde AB: La Abadía, ET: El Tarro, HA: La Haza, LB: La Barrosa, MA: Mampolín, MO: Moheda de Olalla, PI: La Pizarrilla, SE: San Esteban, TA: La Talanquera y VA: Valdesequera.

El estrato arbóreo en las dehesas estaba formado predominantemente por encinas (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.). Los pastos naturales, o estrato herbáceo, estaba formado mayoritariamente por especies anuales espontáneas (*Helianthemetalia*, *Brometalia*, *Sisymbrietalia*, etc.), aunque también estaban presentes algunas especies perenne (*Agrostietalia*, *Poetalia*, etc.). Todas las dehesas se encontraban en zona mediterránea caracterizada por veranos secos y calurosos e inviernos moderadamente fríos, con precipitaciones anuales que oscilan entre 540-920 mm, caracterizado por una fuerte variación estacional e interanual. La ubicación, altitud y características edafoclimáticas de las diez dehesas seleccionadas se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1** Características de las diferentes dehesas estudiadas y sus variables edafoclimáticas. En los valores edáficos se presenta el valor medio y error estándar de cuatro muestras.

Dehesas	La Abadía (AB)	El Tarro (ET)	La Haza (HA)	La Barrosa (LB)	Mampolín (MA)	Moheda de Olalla (MO)	La Pizarrilla (PI)	San Esteban (SE)	La Talanquera (TA)	Valdesequera (VA)
Provincia	Cáceres	Badajoz	Cáceres	Cáceres	Badajoz	Cáceres	Badajoz	Cáceres	Badajoz	Badajoz
Coordenadas UTM (Datum 29 Zona Norte) (m)	X=751,761 Y=4.461,076	X=677,915 Y=4.353,026	X=748,510 Y=4.428,827	X= 692,853 Y=4.357,660	X=675,686 Y=4.258,595	X= 704,216 Y=4.349,073	X=685,420 Y=4.243,932	X=694,509 Y=4.431,826	X=653,013 Y=4.267,740	X=685,365 Y=4.325,603
Media T <sup>a</sup> (C°)*	15	16	16	16	17	16	16	16	17	17
Precipitación (mm)*	918	609	838	549	661	562	677	811	563	541
Solar radiación (10 KJ m <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> μm <sup>-1</sup> )*	2.034	2.023	2.036	2.031	2.030	2.033	2.035	2.049	2.036	2.039
Elevación (m.s.n.m.)*	486	392	300	327	300	300	402	425	200	213
Tipo de suelo †	Entisol Orthent	Entisol Orthent	Inceptisol Xerept	Inceptisol Xerept	Entisol Orthent	Entisol Orthent	Entisol Orthent	Entisol Orthent	Entisol Orthent	Alfisol Xeralf
Textura de suelo	Franco	Franco arenoso	Franco	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso
pH (1 : 2,5)	5,46 ± 0,10	5,07 ± 0,17	4,72 ± 0,21	5,36 ± 0,07	5,23 ± 0,11	5,76 ± 0,24	4,86 ± 0,06	5,77 ± 0,32	5,54 ± 0,10	5,35 ± 0,12
CE (dS m <sup>-1</sup> ) (1 : 5)	4,97 ± 0,74	5,72 ± 0,75	4,66 ± 0,14	7,75 ± 1,75	5,74 ± 0,86	7,04 ± 0,51	7,15 ± 0,78	7,09 ± 1,00	9,80 ± 0,36	8,55 ± 0,62
C <sub>org</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	11,37 ± 0,69	7,41 ± 0,16	14,27 ± 2,26	9,60 ± 0,75	7,11 ± 0,46	18,50 ± 5,34	9,50 ± 0,73	10,43 ± 1,05	6,09 ± 0,76	6,96 ± 0,66
CIC (mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	80,5 ± 10,7	106,3 ± 26,2	108,8 ± 23,2	102,3 ± 27,7	87,4 ± 14,4	123,6 ± 28,8	79,5 ± 8,0	77,9 ± 2,7	60,6 ± 2,2	63,0 ± 5,1
N <sub>tot</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	1,50 ± 0,11	1,35 ± 0,23	2,00 ± 0,12	1,68 ± 0,06	1,13 ± 0,06	1,98 ± 0,43	1,50 ± 0,18	1,60 ± 0,11	1,03 ± 0,12	1,28 ± 0,11
P <sub>Olsen</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	3,20 ± 0,18	11,63 ± 2,79	3,84 ± 0,12	3,51 ± 0,33	3,08 ± 0,71	3,93 ± 0,67	15,14 ± 6,87	3,48 ± 0,35	2,70 ± 0,10	10,03 ± 1,65
K <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	74,3 ± 5,5	109,58 ± 4,9	118,3 ± 16,3	83,1 ± 4,7	45,9 ± 5,6	121,2 ± 39,7	103,6 ± 12,8	284,4 ± 41,4	75,3 ± 4,3	115,3 ± 27,9
Mg <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	267,4 ± 30,3	34,0 ± 5,6	66,5 ± 8,3	212,7 ± 38,6	267,4 ± 44,4	571,2 ± 187,1	426,2 ± 33,6	419,3 ± 53,0	170,1 ± 59,5	243,1 ± 19,8
Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	831,6 ± 54,7	781,5 ± 29,9	1062,1 ± 85,5	761,5 ± 42,3	691,4 ± 60,9	881,7 ± 82,4	531,0 ± 29,1	751,5 ± 39,5	681,3 ± 42,3	681,3 ± 84,5
Na <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	43,11 ± 7,54	33,34 ± 2,54	28,16 ± 1,99	44,26 ± 5,57	41,38 ± 1,88	39,66 ± 2,94	36,78 ± 9,26	36,78 ± 7,09	66,10 ± 8,35	54,03 ± 15,23
Cu <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	1,84 ± 0,23	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,22	0,93 ± 0,17	0,66 ± 0,09	0,92 ± 0,15	1,06 ± 0,13	0,36 ± 0,24	0,87 ± 0,08	0,76 ± 0,09
Fe <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	163,9 ± 18,2	57,8 ± 10,8	200,6 ± 48,9	85,5 ± 35,6	143,0 ± 23,0	76,7 ± 11,1	157,0 ± 39,8	81,1 ± 15,0	34,5 ± 1,4	107,7 ± 48,3
Mn <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	36,16 ± 9,95	11,50 ± 3,15	9,02 ± 1,23	66,23 ± 12,00	13,71 ± 2,07	88,63 ± 29,35	82,60 ± 9,15	10,25 ± 2,07	95,73 ± 7,74	79,48 ± 21,94
Zn <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	1,60 ± 0,13	1,50 ± 0,21	1,60 ± 0,05	1,85 ± 0,48	1,56 ± 0,25	2,56 ± 0,46	1,89 ± 0,39	0,95 ± 0,12	1,41 ± 0,17	1,88 ± 0,26

\* De acuerdo con el Atlas Climático Digital de la península Ibérica (Ninyerola *et al.*, 2005).† Datos obtenidos de la Infraestructura de Datos Especiales de Extremadura (<http://www.ideextremadura.com/IDEEXVisor/>) de acuerdo con la clasificación USDA, 2006.

Para la determinación de los parámetros edáficos, en cada finca se tomaron manualmente y de manera aleatoria cuatro muestras de suelo en la zona de recogida del material vegetal. Cada muestra de suelo se tomó hasta una profundidad de 30 cm, profundidad hasta la que de manera mayoritaria llega el sistema radicular de las especies estudiadas. Cada muestra se secó en estufa a 70 °C hasta pesada constante y se tamizó a < 2 mm, utilizando un molino de rodillo.

De cada muestra se determinó:

- Textura, mediante determinaciones gravimétricas.
- pH, mediante un medidor de pH calibrado (relación de 10 g de suelo : 25 mL de H<sub>2</sub>O desionizada).
- Conductividad eléctrica (CE), por medio de un medidor de CE.
- Carbono orgánico (C<sub>org</sub>), por oxidación con dicromato.
- Capacidad de intercambio catiónico (CIC), por el procedimiento de Chapman (Chapman, 1965).
- Nitrogeno total, usando el método Kjeldahl (Bremner, 1996), con el medidor Kjeltac™ K350 (Buchi Ltd., Flawil, Suiza)
- Fósforo asimilable, por el método Olsen (Olsen *et al.*, 1954).
- Concentraciones totales de K, Mg, Ca, Na, Cu, Fe, Mn, y Zn se determinaron por el Servicio Ionómica del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) por medio de la técnica ICP-OES (plasma de acoplamiento inductivo junto a un espectrofotómetro de emisión óptico). Se basa en la medición de la radiación de la línea espectral emitida por los átomos excitados en un plasma de argón generado por calentamiento inductivo con un campo electromagnético de alta frecuencia.

La recogida del material vegetal fue realizada en abril del 2012, momento en que las diferentes especies de pasto estaban florecidas, facilitando así su identificación. En cada dehesa se realizaron recorridos aleatorios seleccionando diez plantas sanas de cada una de las dos especies de pasto consideradas (*Ornithopus compressus* y *Trifolium subterraneum*). En la finca "La Barrosa" sólo se fue capaz de recoger cuatro plantas de *T. subterraneum*. Las plantas recogidas fueron seleccionadas aleatoriamente dentro de los recorridos, pero tenían que cumplir una serie de condiciones: estar sanas, sin síntomas visibles de enfermedades; separadas al menos 50 m unas de otras (dentro de las de la misma especie) y situadas fuera de la influencia de la

cubierta arbórea, ya que esta última puede tener un efecto sobre las condiciones microclimáticas afectando a la composición endofítica. Las plantas seleccionadas fueron cortadas a ras del suelo, incluyendo hojas y tallos, posteriormente fueron guardadas en sobres de papel y llevadas al laboratorio para su procesado. Con el fin de limitar el deterioro de las muestras, éstas fueron refrigeradas a 4 °C hasta su procesado, que se realizó lo antes posible.

### **3.1.2. Aislamiento de la microbiota endofítica a partir del material vegetal recolectado.**

Una vez en laboratorio y previamente a su cultivo en placa Petri, el material vegetal fue sometido a un proceso de desinfección superficial mediante una inmersión durante 30 segundos en etanol al 70 % v/v BP (Panreac, Barcelona; España) seguido de la inmersión en una solución al 2 % de NaClO (10 % w/v QP, Panreac, Barcelona; España) con dos gotas de Tween-80 (Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España) durante cuatro minutos para tallos y dos minutos para hojas, por último se finalizaría con tres inmersiones en agua destilada estéril durante un minuto cada una. Este procedimiento fue similar al propuesto por Bills (1996) para el aislamiento de hongos endófitos, con el fin de eliminar epífitos y microorganismos contaminantes de laboratorio que limitarían la obtención de los endófitos. Para comprobar que la esterilización superficial había sido lo suficientemente eficaz, se seleccionaron al azar cinco hojas y cinco tallos (n = 10 muestras en total) ya esterilizados y se presionaron durante unos segundos sobre la superficie de la placa Petri conteniendo PDA estéril (patata, dextrosa y Agar: 39 g L<sup>-1</sup>. Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España). La ausencia de crecimiento de cualquier microorganismo en el medio, confirmó que el procedimiento de esterilización superficial fue eficaz.

Después se cortaron pequeños trozos de hojas y tallos de unos 5 mm de longitud y fueron sembrados en placas Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo 20 mL de medio de cultivo PDA, a razón de cinco trozos por placa. Para cada una de las plantas recogidas se prepararon dos placas, una con los fragmentos de hojas, y otra con los fragmentos de tallos, que se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente de 24 °C. Según iban emergiendo los hongos de las porciones de hojas y tallos, fragmentos de micelio fueron transferidos a nuevas placas con PDA, teniendo así, cada uno de los hongos aislados. Posteriormente los aislados fúngicos se agruparon en morfotipos en función de diferentes características morfológicas tales como: producción, longitud y morfología de las esporas (en aquellos casos en las que se produjera), color del micelio, textura, forma, exudados y tasa de crecimiento. En aquellos casos que produjeron

estructuras reproductoras se intentó una identificación morfológica mediante la ayuda de varias claves (Sutton, 1980; Kiffer y Morelet, 1999).

### **3.1.3. Identificación de los aislados por procedimientos moleculares (ITS).**

En cualquier caso, para cada morfotipo identificado, se realizó una identificación molecular, a partir de la secuenciación de la región ITS y posterior comparación con la base de datos del Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Para este caso se procedió siguiendo el proceso: obtención del material fúngico, extracción del ADN, amplificación del ADN mediante PCR, electroforesis, secuenciación y comparación de la secuencia en el Genbank. El criterio de asignación de especies a morfotipos fue el siguiente: con porcentajes de homología > 97 % con respecto a secuencias del Genbank, se propuso la misma especie; con porcentajes de homología entre el 94 - 97 %, se propuso el mismo género; con porcentajes de homología por debajo del 94 % se dejó el morfotipo como desconocido. En el caso de discrepancias, ambigüedades o de varias especies en el Genbank con el porcentaje de homología superiores al 97 %, o bien se utilizaron las características morfológicas (en el caso de que se tuvieran las apropiadas) para resolverlas, o bien no se ponía ninguna especie, sino la categoría taxonómica más próxima de consenso.

#### Obtención del material fúngico.

En primer lugar fue necesaria la obtención de material fúngico apto para la extracción del ADN. Para el crecimiento del micelio se utilizó medio de cultivo PDB (Caldo de Patata y Dextrosa, 24 g L<sup>-1</sup>, Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España), usando el método expuesto por Smith y Stanosz (1995) que había sido ligeramente modificado del de Gilbertson *et al.* (1991). El micelio fúngico fue obtenido mediante el cultivo de un trozo de micelio de 5 mm de diámetro para su crecimiento en Eppendorf de 1,5 mL con 1 mL de medio PDB. Cuando el micelio hubo crecido lo suficiente, los Eppendorf fueron centrifugados a 10.000 rpm durante diez minutos para que éste se fuera al fondo y poder eliminar fácilmente la mayor parte del medio de cultivo. Para limpiar el resto del medio que pudiera quedar, el micelio se resuspendió en 0,5 mL de buffer TE (Tris-HCl pH8 1M, Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España; EDTA 500 mM, AppliChem, Darmstadt; Alemania; y agua destilada estéril), se volvió a centrifugar a 10.000 rpm durante cinco minutos, y se eliminó el sobrenadante. A continuación las muestras eran conservadas en congelador a -20 °C hasta su extracción de ADN.

### Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se trasladó el micelio de cada muestra a un Eppendorf de 2 mL, donde se adicionó aproximadamente 0,70 g de arena previamente esterilizada de unos 1 - 2 mm de grosor (Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España ), y 300  $\mu$ L de Buffer de lisis (Tris-HCl pH8 1M, Scharlau, Sentmenat, Barcelona, España; EDTA 500 mM, AppliChem, Darmstadt, Alemania; agua destilada estéril, Sodium dodecyl sulfate 20 %, Panreac, Barcelona, España; y  $\beta$ -mercaptoetanol, Acros, New Jersey, USA). Esa mezcla se llevó a un agitador de brazos (Retsch MM 400) durante cuatro minutos a una frecuencia de 300 Hz, con el fin de romper las paredes celulares del micelio y dejar el material genético libre. Una vez realizado, las muestras se llevaron a un baño termostático de precisión (IDL-AG5) durante una hora a 65 °C, con el fin de favorecer la degradación de las paredes celulares del micelio.

Para el resto del proceso, era necesario trabajar en medio frío, a unas condiciones térmicas de 4 °C, para ello se trabajó en una bandeja de poliespán con hielo, con el fin de evitar la desnaturalización del ADN. Para cada tubo de muestra se adicionó 350  $\mu$ L de fenol cloroformo alcohol isoamílico (IAA) de Sigma, St. Louis; USA, en una proporción de 25:24:1 para separar los ácidos nucleídos de las proteínas, a continuación se centrifugó las muestras en Vortex durante un minuto y una frecuencia de 300 Hz. Posteriormente se realizó otra centrifugación en la centrifuga Biocen durante dos minutos a una frecuencia de 140 rpm, para separar el contenido de los Eppendorf en tres fases bien diferenciadas. La primera fase es donde se encuentra el ADN, la interfase, de color blanquecino donde se encuentran los restos celulares y por último la tercera fase transparente donde se encuentran los restos del fenol cloroformo alcohol isoamílico (IAA). A continuación se extrajo la fase correspondiente al ADN depositándolo en Eppendorf estéril de 1,5 mL, al que se le adicionó 250  $\mu$ L de fenol cloroformo alcohol isoamílico y se volvió a centrifugar como anteriormente. De nuevo, de las tres fases en las que se separó la solución, nos quedamos con la correspondiente al ADN (primera fase).

Esta fase con el ADN se llevó a otro Eppendorf donde se adicionó 100  $\mu$ L de cloroformo isoamil alcohol (24:1) de Sigma, St. Louis; USA, y se centrifugaron durante dos minutos en agitador Vortex y otros tres minutos en centrifuga Biocen. Una vez centrifugado se quitó nuevamente la primera fase, midiendo el volumen del mismo con la micropipeta, posteriormente se añadió por cada 100  $\mu$ L de fase extraída 60  $\mu$ L de solución PEG (NaCl 2,5 M y 20 % de polietilenglicol 6000). Una vez incorporado, se dejó reposar durante veinte minutos en hielo (4 °C), y a continuación se centrifugó a velocidad máxima de 14.600 rpm durante veinte minutos. Un vez terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante dejando el contenido de ADN en

el fondo del Eppendorf, se añadió 1 mL de etanol al 70 % v/v BP (Panreac, Barcelona; España), con el fin de limpiar la muestra y a continuación se centrifugó durante cinco minutos, quitando el alcohol, para posteriormente introducirlo en la estufa a 50 °C durante unos 10 - 15 minutos, hasta que se evaporase todo el contenido de etanol. Por último se añadió 50 µL de TE (Tris-HCl (pH8) 1 M (Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España); EDTA 500 mM (AppliChem, Darmstadt; Alemania) y agua destilada estéril), después se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente y se introdujo en el frigorífico a 4 °C.

#### Amplificación del ADN mediante la PCR.

Una vez extraído el ADN se procedió a la amplificación de la región ITS (región diferenciadora en los hongos) siendo necesario la utilización de un MIX, el cual se preparó con los componentes necesarios para que la amplificación se desarrollara adecuadamente, el volumen por muestra de MIX fue de 40,5 µL de agua para biología molecular (Lonzan, Verviers; Bélgica), 5 µL de 10x Buffer, 2 µL MgCl<sub>2</sub>, 1 µL dNTPs (Biotools, Madrid; España), 1 µL de oligonucleótidos y los primers ITS1 (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Por último se añadió 1 µL de polimerasa (Biotools, Madrid; España) (Tabla 2).

**Tabla 2** Concentraciones iniciales y finales de los reactivos utilizados para la amplificación de la región ITS.

Fuente	C. Inicial	C. Final	1 muestra (µL)
DDW*	-	-	40,5
10x Buffer	10x	1x	5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM		2
dNTPs	10 mM	200 µM	1
ITS 1	25 µM	0,5 µM	1
ITS 4	25 µM	0.5 µM	1
Polimerasa	1 U	1 U	1
		TOTAL	49
ADN			1

\* DDW, agua destilada estéril.

Las muestras ya preparadas se llevaron a un termociclador de TECHNE TC3000G (Bibby Scientific), para llevar a cabo la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C durante tres minutos, seguidos por treinta ciclos de 94 °C durante treinta segundos, 52 °C durante un minuto, y 72 °C durante un minuto y treinta segundos; tras estos ciclos una extensión final a 72 °C durante cinco minutos y por último conservado a una temperatura de 4 °C. Un vez amplificado el ADN, se realizó una electroforesis para comprobar que la PCR amplificó correctamente y para estimar el tamaño de la región ITS;

previo a la secuenciación, fue necesario purificarlo mediante el kit NucleoSpin; Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren; Alemania).

### Electroforesis.

Se cogió la cubeta de electroforesis y se colocaron los peines para que dejarán los orificios donde se iba a introducir el ADN, y a continuación se adicionó el gel de Agarosa D1 Low EEO (Conda-Pronadisa, Torrejón de Ardoz, Madrid; España) al 1 %, utilizando 1 g de Agarosa por cada 100 mL de TAE 1X, que se calentó al microondas agitando cada cierto tiempo, para que la Agarosa se disolviera adecuadamente y a continuación se adicionó 5  $\mu$ L de PRONASAFE (Conda-Pronadisa, Torrejón de Ardoz, Madrid; España) Nucleic Acid Staining Solution (20.000x), sustancia que se une al ADN y expuesto a radiación ultravioleta emite fluorescencia de color verdoso; este aditivo debía ser repartido homogéneamente para evitar problemas en la visualización del ADN amplificado. Una vez preparado el Agar con PRONASAFE se adicionó en la cubeta y se dejó polimerizar durante unos 45 - 60 minutos, y se puso en la cubeta de electroforesis, llenándola de TAE 1X hasta que cubriese el gel de Agarosa. El TAE 1X se realizó a partir de 20 mL de TAE 50X (Tris-base (Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España); ácido acético glacial (Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España) y EDTA pH8 0,5 M (AppliChem, Darmstadt; Alemania) en 1 L de agua mili-q.

Las muestras, antes de introducirlas en los pocillos del gel de Agarosa, tuvieron que tener una preparación previa. Se extrajo 5  $\mu$ L de cada una de las muestras consideradas junto con los controles positivos y negativos, depositándolos en un parafilm® a los cuales se adicionó 1  $\mu$ L de buffer de carga LB 6X (Takara, Shiga; Japón), proporcionándole al ADN peso, permitiendo así que cayera fácilmente en los pocillos y no se disperse por el medio líquido TAE 1X. A continuación se cargaron los pocillos de gel de Agarosa con 6  $\mu$ L de muestra, siendo el último cargado con el marcador de 1 kb (Biotools, Madrid; España) preparado con (1  $\mu$ L de LB 6X + 4  $\mu$ L de agua destilada estéril + 1  $\mu$ L de marcador), con el fin de obtener una referencia respecto al tamaño y concentración que presentaba el ADN. Por último se encendió la fuente generadora de electricidad con unos parámetros de 120 V, 71 mA y 8 W. Una vez transcurrido el tiempo oportuno, el gel se expuso a la radiación ultravioleta, para observar la banda de amplificación.

### Secuenciación de la región ITS.

Una vez realizada la extracción, verificada la amplificación, y purificado el ADN, el siguiente paso consistió en la secuenciación. Para ello se envió al Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura (SAIUEX), donde fueron secuenciadas tanto en

la dirección 5' - 3' como la 3' - 5'. La secuenciación fue realizada con un secuenciador de ADN de Applied Biosystems 4-capillary 3130. Las secuencias brutas recibidas de la secuenciación, fueron modificadas con el programa BioEdit, con el cual se llegó a una secuencia consenso, que es la que se introdujo en la base de datos del EMBL/Genbank de secuencias de hongos, utilizando el algoritmo FASTA (Pearson, 1990).

### 3.1.4. Curva acumulativa de especies y análisis estadístico.

Con el fin de analizar si con el número de plantas muestreadas se recogió la mayor parte de la diversidad específica de hongos endófitos en las especies de pasto analizadas y con el propósito de realizar comparaciones de riqueza cuando el número de plantas muestreadas es distinto, se realizaron curvas de acumulación de especies. Estas curvas muestran la riqueza de especies en función de un número teórico de plantas muestreadas en base a los datos reales obtenidos. Estas curvas se hicieron tanto para la riqueza específica total, como para la riqueza de especies singulares (las aisladas sólo una vez) y la de especies plurales (aquellas aisladas al menos dos veces). Para su construcción, se hizo un muestreo aleatorio sin reemplazo de los datos de las especies de hongos obtenidos de cada una de las plantas muestreadas siguiendo la metodología propuesta por Colwell y Coddington (1994). Estos cálculos se realizaron con el software EstimateS 9.1 (Colwell, 2013).

Estadísticas univariante.

Con el fin de analizar la influencia de las variables edafoclimáticas sobre la frecuencia de aislados, riqueza y diversidad de endófitos, se realizaron dos tipos de análisis: el primero a nivel de planta, utilizando la frecuencia de aislados, la riqueza de especies y el índice de diversidad de Shannon-Weaver como variables respuesta. Se realizó un test ANOVA de dos vías, con la dehesa (10 dehesa), tejido de muestreo (hojas y tallos) y la interacción entre ambos como factores, mediante el procedimiento "General Linear Models Procedure" de SAS (Statistical Analysis Software v. 9.1.3). En el caso de *Ornithopus compressus* las variables frecuencia de aislados, riqueza de especies y índice de diversidad fueron transformadas ( $\ln(x + 1)$ ) con el fin de normalizar la distribución de los datos y estabilizar la varianza de los residuales. En estos análisis, con el fin de disponer de información suficiente por repetición, los datos de cada dos plantas se agruparon al azar, es decir, el número de repeticiones fueron cinco ( $n = 5$ ). El segundo análisis fue a nivel de dehesa; donde se realizaron regresión lineal simple y múltiple entre las mismas tres variables respuesta y cada una de las variables edafoclimáticas analizadas

(temperatura media, precipitación, radiación solar, elevación, pH, CE, CIC, nitrógeno, fosforo, potasio, magnesio, calcio y sodio). En este análisis se trabajó con valores promedio de cada parámetro por dehesa de muestreo.

Análisis multivariante.

Con el fin de evaluar con más detalle la influencia de las principales variables edafoclimáticas sobre la presencia de hongos, se hizo también un Análisis Canónico de Correspondencias (ACC), utilizando la "composición de especies de hongos aislados" como variable respuesta. Para ello se realizó el procedimiento "Forward selection" aplicando el test de Monte Carlo, que se aplicó para probar la relevancia de las variables, primero con 499 permutaciones para un análisis exploratorio y luego ya con 999 permutaciones para los resultados finales (Legendre y Legendre, 1998). Se usó el método de la ordenación constreñida "Constrained ordination" utilizando la configuración predeterminada del programa y con los datos de las especies transformados o no según correspondiera mediante el programa informático CANOCO para Windows versión 4.5 (Ter Braak y Smiluaer, 2002).

## 3.2. INFLUENCIA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL PASTO.

### 3.2.1. Material fúngico utilizado.

De las especies de hongos endofíticos encontradas en el apartado anterior se seleccionaron inicialmente ocho especies, cuatro de *Ornithopus compressus* y cuatro de *Trifolium subterraneum* (Tabla 3), para ser utilizadas en la inoculación de plantas de *O. compressus*, *T. subterraneum* y *Poa pratensis*, y evaluar su influencia sobre la producción de biomasa y parámetros de calidad de su forraje.

**Tabla 3** Origen e identificación de las especies endofíticas utilizadas en los ensayos.

Nº aislado	Planta hosped <sup>a</sup>	Planta hosped <sup>b</sup>	Origen geográfico	Cordenadas UTM (Datum 29 N) (m)	Identificador <sup>c</sup>
E060	<i>T. subterraneum</i> L.	<i>T. subterraneum</i>	Moheda de Olalla (Cáceres)	X=704,216 Y=4.349,073	<i>Fusarium lateritium</i> Nees
E071	<i>T. subterraneum</i> L.	<i>T. subterraneum</i> <i>O. compressus</i>	Talanquera (Badajoz)	X=653,013 Y=4.267,740	<i>Sordaria fimicola</i> (Rob. ex Desm.) Ces. & De Not.
E138	<i>O. compressus</i> L.	<i>O. compressus</i> <i>P. pratensis</i>	Talanquera (Badajoz)	X=653013 Y=4.267,740	<i>Embellisia leptinellae</i> (Simmons & Hill)
E140	<i>T. subterraneum</i> L.	<i>T. subterraneum</i> <i>P. pratensis</i>	Haza (Cáceres)	X=748,510 Y=4.428,827	<i>Stemphylium globuliferum</i> (Vestergr.)
E202	<i>O. compressus</i> L.	<i>T. subterraneum</i> <i>P. pratensis</i>	Haza (Cáceres)	X=748,510 Y=4.428,827	<i>Chaetosphaeronema</i> sp.
E244	<i>O. compressus</i> L.	<i>T. subterraneum</i> <i>P. pratensis</i>	Haza (Cáceres)	X=748,510 Y=4.428,827	Pleosporales sp.
E269	<i>L. rigidum</i> Gaud.	<i>P. pratensis</i>	Moheda de Olalla (Cáceres)	X=704,216 Y=4.349,073	<i>Penicillium</i> sp.
E361	<i>L. rigidum</i> Gaud.	<i>P. pratensis</i>	Talanquera (Badajoz)	X=653,013 Y=4.267,740	CODE361
E631	<i>O. compressus</i> L.	<i>T. subterraneum</i> <i>O. compressus</i> <i>P. pratensis</i>	Talanquera (Badajoz)	X=653,013 Y=4.267,740	<i>Epicoccum nigrum</i> Link
E636	<i>T. subterraneum</i> L.	<i>O. compressus</i>	Abadía (Cáceres)	X=751761 Y=4.461,076	<i>Sporormiella pilosa</i> (Cain) Ahmed & Cain

<sup>a</sup>Planta hosped.: Planta hospedante de la que había sido aislada la especie endofítica.

<sup>b</sup>Planta hosped.: Planta hospedante en la que fue inoculada el endófito en los ensayos.

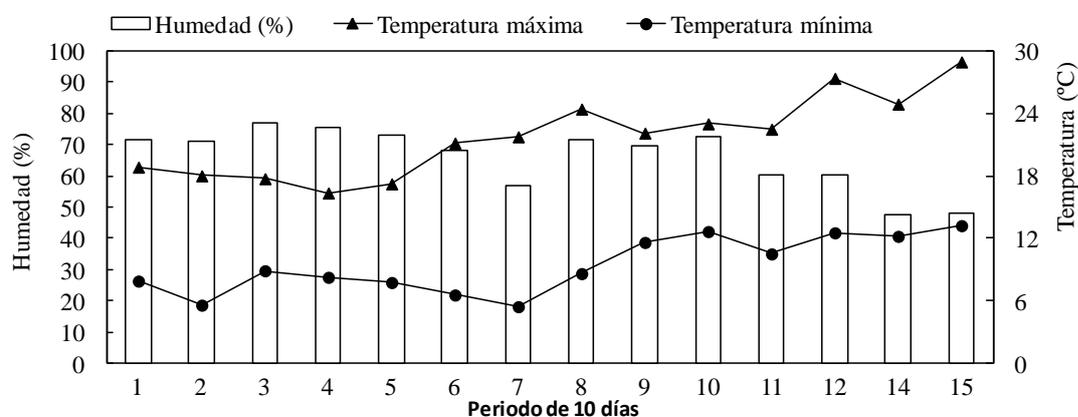
<sup>c</sup> Basado en las características morfológicas y en comparación con sus secuencias en el GenBank con una similitud > 97 %.

La selección se hizo en base a una serie de criterios: (1) que hubieran sido frecuentemente aisladas, lo que nos indicaría amplitud ecológica, y/o (2) que produjeran metabolitos secundarios fácilmente visibles en placa, que pudieran eventualmente tener algún efecto sobre la planta, y/o (3) que en la bibliografía hubieran sido referenciadas por tener algún efecto sobre el crecimiento de sus plantas hospedantes. Además, como en los ensayos también se iba a utilizar una especie de gramínea (*P. pratensis*), para tener en cuenta algún cierto grado de especificidad por el hospedante, también se decidió incorporar otros dos aislados de hongos endófitos, procedentes de una gramínea (*Lolium rigidum*), que habían sido obtenidos por el Grupo de Investigación de Agronomía (Universidad de Extremadura) en otros trabajos (Tabla 3). El ensayo por tanto se

hizo con 10 especies de hongos endófitos. No obstante, tal y como se indica en la tabla 3, no todas las especies endofíticas fueron utilizados en los análisis de los resultados de todas las especies hospedante, sino sólo aquellas cuyo reaislamiento había resultado positivo en alguna de las especie hospedante, con el fin de asegurar una inoculación efectiva.

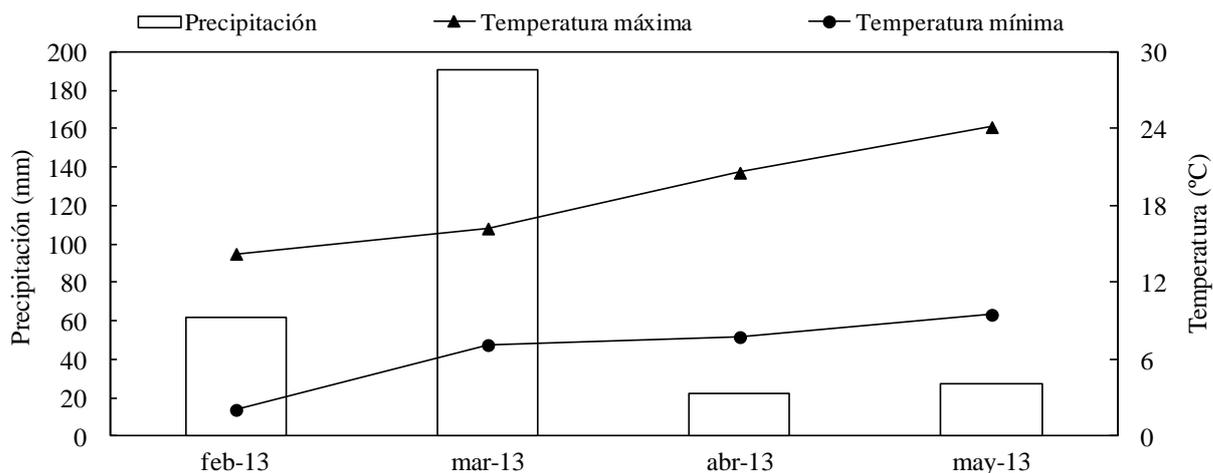
### 3.2.2. Caracterización de las zonas de ensayo y análisis edafoclimático.

La evaluación del endófito sobre la producción y calidad de las tres especies pratenses estudiadas (*Ornithopus compressus*, *Trifolium subterraneum* y *Poa pratensis*) se hizo en invernadero con condiciones más controladas. No obstante, con el fin de evaluar la extrapolación de los resultados a condiciones más reales, en una de las especies de pasto (*T. subterraneum*), el ensayo también se hizo en condiciones de campo. Para el ensayo en condiciones controladas, se utilizó un invernadero situado en la Escuela de Ingenieras Agrarias de Badajoz (Coordenadas UTM Datum 29 Zona Norte: X = 676.133,05 m, Y = 43.007.241,35 m). El invernadero constaba de dos módulos tipo túnel o semicilíndrico, con estructura totalmente metálica (tubos de hierro galvanizado), con una cubierta de polietileno térmico de larga duración de 800 galgas y paramentos verticales de policarbonato. Las dimensiones del invernadero eran de 8 m x 28 m cada módulo. La ventilación se realizaba mediante una combinación de ventanas laterales (entrada de aire) y cenitales (salida de aire). Así mismo constaba con un sistema de calefacción (caldera de gasoil) y refrigeración (cooling-system), por si fuera necesario. Las condiciones ambientales, (temperaturas máximas, mínimas y humedad relativa) fueron recogidas mediante un Datalogger MicroLite (Lite5032P-RH, Fourtec SA), durante el periodo que las plantas del ensayo permanecieron en el invernadero (Figura 2).



**Figura 2** Representación gráfica de la humedad relativa, temperaturas máximas y mínimas en condiciones de invernadero desde el comienzo del ensayo (03/12/2012) hasta su finalización (06/05/2013). Datos en promedios de cada periodo de 10 días.

Para el ensayo de campo, éste se realizó en una dehesa representativa de Extremadura, propiedad del Instituto de Investigaciones Agrarias Finca La Orden-Valdesequera, Badajoz, (Coordenadas UTM Datum 29 Zona Norte: X = 686.589,45 m, Y = 4.323.729,89 m). Las variables climatológicas (precipitación, temperaturas máximas y mínimas) a lo largo de la duración del ensayo fueron obtenidas de la estación meteorológica de Rueda Chica, Badajoz mediante la plataforma del Gobierno de Extremadura "Red de Asesoramiento al Regante de Extremadura (REDAREX)" (Figura 3).



**Figura 3** Representación gráfica de las medias de las precipitaciones mensuales, medias de las temperaturas máximas y medias de las mínimas del año 2013 en condiciones de campo, desde su trasplante 26/02/2013 hasta su recolección 08/05/2013 (REDAREX: <http://redarexplus.gobex.es/RedarexPlus/>).

En ambos ensayos, en los de invernadero y campo, se realizó una caracterización de los parámetros edáficos. En el caso del invernadero, se analizó el sustrato que iba a ser utilizado para llenar las macetas donde se iban a crecer las plantas para el ensayo. Este sustrato estaba formado por 50 % perlita y 50 % de un sustrato comercial compuesto por turba, perlita, cal, activador de raíces y fertilizante NPK (COMPO SANA Universal, COMPO GmbH & Co. KG, Münster Germany). Por otro lado, en el ensayo de campo se tomaron 4 muestras de suelo de forma aleatoria tal y como fue descrito en el apartado 3.1.1. Los análisis de sustrato o de suelo en ambos casos se realizaron de igual manera que lo ya descrito en el indicado apartado 3.1.1. Los resultados de estos análisis pueden observarse en la tabla 4.

**Tabla 4** Análisis edafológico del sustrato de invernadero y del suelo de campo.

Ensayo Invernadero			
Parámetro		Parámetro	
pH (1:2.5)	4,43 ± 0,01	K <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	1210,59 ± 98,98
EC (S m <sup>-1</sup> ) (1:5)	0,05 ± 0,01	Li <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	4,61 ± 0,74
N <sub>tot</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	9,6 ± 0,2	Mg <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	521,42 ± 40,11
P <sub>Olsen</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	5,11 ± 0,30	Mn <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	26,55 ± 2,51
K (mg kg <sup>-1</sup> )	238,51 ± 0,01	Mo <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	< 0,01
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	7,23 ± 0,07	Na <sub>tot</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	3,86 ± 0,67
Al <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	532,88 ± 37,08	P <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	286,39 ± 13,46
B <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	3,19 ± 0,17	Pb <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	2,07 ± 0,18
Ca <sub>tot</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	5,16 ± 0,50	S <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	765,59 ± 13,46
Cu <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	5,19 ± 0,64	Se <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	< 0,01
Fe <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	436,16 ± 85,89	Zn <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	6,86 ± 56,51
Ensayo Campo			
Parámetro		Parámetro	
pH (1:2.5)	6,3 ± 0,18	K <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,34 ± 0,01
EC (S m <sup>-1</sup> ) (1:5)	850,5 ± 135,72	Li <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	1,04 ± 0,82
N <sub>tot</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	0,11 ± 0,01	Mg <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,10 ± 0,00
P <sub>Olsen</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	1,66 ± 0,85	Mn <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	539,50 ± 39,46
K (mg kg <sup>-1</sup> )	1,56 ± 0,12	Mo <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	< 0,1
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	3,25 ± 0,29	Na <sub>tot</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	0,03 ± 0,00
Al <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	17935,07 ± 885,40	P <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,02 ± 0,00
B <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	5,52 ± 0,12	Pb <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	16,09 ± 0,84
Ca <sub>tot</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	0,08 ± 0,00	S <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,01 ± 0,00
Cu <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	6,84 ± 0,31	Se <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,82 ± 0,16
Fe <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	11395,38 ± 494,21	Zn <sub>tot</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	18,96 ± 0,67

### 3.2.3. Obtención del material vegetal, inoculación de la microbiota endofítica y diseño experimental.

En primer lugar tuvimos que conseguir el material vegetal en el que hacer las inoculaciones. Para ello, se consideraron como leguminosas las dos especies de donde fueron aislados los hongos (*Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*). Además, con el fin de ver el comportamiento de los mismos hongos sobre especies de gramínea, se utilizó la especie *Poa pratensis*, considerada de gran producción y calidad bromatológica. Para las tres especies se utilizaron cultivares comerciales mediante la adquisición de sus semillas: *Trifolium subterraneum* L. cultivar 'Valmoreno' (Finca La Orden-Valdesequera, Junta de Extremadura), *Ornithopus compressus* L. cultivar 'Mazagón'. (Cereales Vallecillo, S.L. Polígono Industrial Ramapallas, 06100, Olivenza, Badajoz, España) y *Poa pratensis* L. cultivar 'Sobra' (Semillas Batlle, S.A., 08750, Molins de Rei, Barcelona, España).

Antes de la siembra se realizó una esterilización superficial de las semillas mediante su inmersión en una solución de 2,5 % de NaClO con dos gotas de Tween-80 (Scharlau, Sentmenat, Barcelona; España) durante cinco minutos para *T. subterraneum* y *O. compressus*, mientras que para *P. pratensis* fueron dos minutos, seguido de tres inmersiones en agua destilada estéril. Una

vez esterilizadas, fueron sembradas con fecha 03/12/2012 (5 semillas maceta<sup>-1</sup>) en pequeñas macetas de plástico (7 x 7 cm y 6 cm de alto) con el sustrato correspondiente ya descrito. Toda la siembra se repitió completamente aproximadamente a los quince días (18/12/2012), con el fin de tener plantas de dos grupos de edad para poder evaluar el efecto de la edad de la planta en la influencia del endófito sobre ésta. Esto fue realizado porque ha sido constatado que la edad de las plantas influye de alguna manera en la colonización de los tejidos por parte de los endófitos (Arnold y Herre, 2003).

A pesar de la esterilización superficial de la semilla, algunas especies de endófitos presentan una dispersión vertical, por lo que si la semilla se encontraba internamente infectada, podría dar como resultado plantas infectadas con otros hongos que pudieran alterar los resultados. Para evitar estas posibles infecciones, y otras que pudieran surgir una vez emergida la planta (transmisión horizontal), se procedió a la aplicación del fungicida sistémico AMISTAR XTRA®, (Syngenta Agro, S.A.) formado por Azoxistrobin (20 % p/v) y Ciproconazol (8 % p/v). Se realizaron tres aplicaciones, una cada 10 días, comenzando la primera aproximadamente al mes de realizar la primera siembra de plantas. En cada dosis se aplicó mediante un atomizador sobre la parte aérea de la planta 1 mL maceta<sup>-1</sup> de una solución compuesta por 1 mL de producto por 1 L de agua destilada estéril. En la tercera dosis, se aplicó además 1 mL de dicha solución al sustrato de cada maceta siguiendo la metodología propuesta por Zabalgogezcoa *et al.* (2008). Una vez realizada la aplicación del fungicida, se realizaron pruebas para comprobar su eficacia. Para ello se tomaron muestras vegetales al mes de la última aplicación (con carácter previo a la inoculación de endófitos) y se llevaron al laboratorio. Dichas muestras fueron esterilizadas superficialmente y puestas en placas Petri con medio de cultivo PDA para la obtención de hongos potenciales que estuvieran en su interior. En ninguna de las muestras analizadas se obtuvo ningún hongo creciendo dentro.

Transcurridas aproximadamente tres semanas, después de la aplicación de la última dosis del fungicida, se procedió a la inoculación de cada uno de los hongos endófitos. Existe una gran cantidad de métodos de inoculación de organismos fúngicos en especies vegetales (Dhingra y Sinclair, 1995), sin embargo, la gran mayoría se basan en la utilización de esporas u otras estructuras reproductivas del hongo. Como la mayor parte de los hongos endófitos no fructifican en medio de cultivo (Sánchez-Márquez, 2009) se decidió realizar una variante del método de Dhingra y Sinclair (1995) en el que se utiliza micelio vegetativo del hongo como inóculo. En nuestro caso antes de dicha inoculación, y como la capacidad de penetración depende en gran medida de las condiciones climáticas externas, se decidió realizar unas pequeñas heridas en las

plantas con carácter previo a la inoculación para facilitar la infección. Las heridas se realizaron con una herramienta que consta de dos brazos que terminan en dos superficies planas. En una de ellas hay una serie de agujas en un extremo (que hubo que esterilizar previamente), y la otra era completamente plana (Figura 4), de tal forma que al situar el material vegetal entre las agujas y la superficie plana, éstas conseguían realizar pequeñas heridas en las plantas sin quedar seriamente dañadas.



**Figura 4** Herramienta con la que se realizó las heridas en las plantas.

Para obtener suficiente inóculo del micelio de cada hongo para los ensayos, con una antelación de dos meses se realizaron cultivos de cada uno en medio líquido PDB. Dichos cultivos se realizaron en tarros de 1,5 L, que contenían 1 L de medio de cultivo PDB y a los que se dejó creciendo durante los ya indicados dos meses en condiciones de oscuridad y a 24 °C. Uno de los tratamientos consistió en medio de cultivo PDB, sin ningún hongo creciendo, para ser utilizado como tratamiento control. En el momento de la inoculación, el micelio junto con el medio de cultivo fue homogeneizado mediante una batidora. La inoculación se llevó a cabo usando un pulverizador de mano en dos dosis: la mitad del inóculo homogeneizado (es decir, 500 mL) se aplicó inmediatamente después de haber realizado las heridas en las plantas, y la otra mitad se aplicó tres días más tarde. Durante 48 h después de la inoculación, las plantas se mantuvieron bajo condiciones de alta humedad para favorecer la infección del hongo endófito, y el riego se realizó por la parte inferior de los tiestos poniéndolas en bandejas con agua, para así evitar que un riego foliar arrastrase el micelio aplicado en la parte aérea, impidiendo la infección.

Con el fin de comprobar la efectividad de las inoculaciones, un mes después de éstas, se procedió a tomar muestras vegetales aéreas de plantas de cada uno de los hospedantes estudiados y se llevaron al laboratorio. Allí se procedió al aislamiento e identificación del hongo contenido en dicho material según el procedimiento ya descrito con anterioridad consistente en la desinfección superficial y siembra en medio de cultivo PDA de hojas y tallos. La presencia e identificación positiva en el medio de cultivo del hongo inoculado indicaría que la inoculación y posterior infección del endófito se había realizado de manera adecuada.

Cada uno de los hongos utilizados en cada especie pratense (Tabla 3) fue inoculado en las plantas (14/02/2013) contenidas en 5 macetas para cada una de las especies hospedante (*Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus* y *Poa pratensis*) y para cada uno de los dos grupos de edad (plantas jóvenes: aquellas sembradas más tarde; y plantas viejas: aquellas sembradas de manera más temprana). La maceta era considerada nuestra unidad muestral, por lo que cada tratamiento (inoculación con cada hongo) constó de 5 repeticiones. Las plantas de 5 macetas por especie hospedante y grupo de edad fueron también inoculadas siguiendo el mismo procedimiento con el medio de cultivo sin hongo, para que sirvieran como control. En el caso del trébol subterráneo se utilizó el doble de macetas por tratamiento, especie hospedante y grupo de edad, es decir 10 macetas en lugar de 5. De tal forma que la mitad de las macetas se dejó en el invernadero para completar allí el ensayo de invernadero junto con *O. compressus* y *P. pratensis*, mientras que la otra mitad se trasladó al campo 15 días después de la inoculación con el fin de comprobar los efectos en condiciones reales y de analizar la posible extrapolación de los resultados de invernadero con los obtenidos en condiciones de campo.

En el ensayo de invernadero las plantas se pusieron sobre mesas de 80 cm de altura y una superficie de (10 m x 1,76 m), con un soporte metálico y una plataforma de aglomerado siguiendo un diseño experimental completamente aleatorio (Figura 5). Cada maceta se dispuso separada de las que tenía alrededor una distancia suficiente para impedir el contacto directo entre plantas. Las plantas fueron regadas cada 2 - 3 días hasta capacidad de campo durante toda la duración del ensayo. Durante el transcurso del ensayo en invernadero las plantas no recibieron aporte fertilizante.



**Figura 5** Distribución del ensayo de invernadero.

Para el ensayo de campo las plantas que habían sido crecidas e inoculadas en el invernadero fueron llevadas a campo y trasplantadas a finales de febrero (26/02/2013), aproximadamente 15 días después de la primera inoculación. En el campo (Finca Valdesequera), las plantas fueron trasplantadas siguiendo también un diseño completamente aleatorio en líneas orientadas en la dirección noreste-suroeste con un marco de 50 x 50 cm (Figura 6). Después del trasplante, las plantas recibieron un riego para facilitar su arraigue y supervivencia. Durante el transcurso del ensayo de campo las plantas no recibieron aporte de fertilizante, ni más riegos.



**Figura 6** Distribución del ensayo en condiciones de campo.

#### **3.2.4. Caracterización patogénica de cada hongo endófito en condiciones de invernadero.**

En el ensayo de invernadero se procedió a hacer una caracterización patogénica de cada endófito inoculado para comprobar que éste no hiciera daño ni provocara ninguna sintomatología

fitopatológica en la planta. Para ello, se hicieron análisis visuales de las plantas cada semana durante dos meses, comenzando al mes de la inoculación, anotándose todo aquello que indicara cualquier tipo de sintomatología, como clorosis, necrosis, síntomas híper o hipoplásicos, manchas foliares, etc., y cualquier signo que indicara la presencia del hongo, como estructuras reproductoras, micelio, etc.

### **3.2.5. Influencia de la micobiota endofítica sobre la producción de biomasa y parámetros de calidad en condiciones de invernadero y campo.**

Para evaluar la influencia que cada hongo tiene sobre el crecimiento vegetal y poder medir los parámetros de producción de biomasa vegetal y los diversos parámetros de calidad del forraje considerados, las plantas fueron recolectadas el 08/05/2013, es decir 2,7 meses después de la inoculación en el caso del ensayo de campo y 2,6 meses después de la inoculación en el caso del ensayo de invernadero (06/05/2013). Para la recogida de la parte aérea, las plantas fueron cortadas a ras de suelo, con precaución de no coger sustrato/suelo, guardadas en sobres de papel y llevadas al laboratorio donde se secaron en estufa a 70 °C durante 48 horas hasta pesada constante. En el caso de las plantas de invernadero, cómo éstas estaban creciendo en macetas, además se recogió la biomasa radicular. Para ello, se lavaron primero las raíces cuidadosamente con agua del grifo para eliminar los restos del sustrato. Luego se llevaron al laboratorio donde también se secaron en estufa a 70 °C durante 48 horas hasta pesada constante. Para la determinación de la cantidad de biomasa producida (en g de materia seca por maceta) a lo largo del ensayo, de la parte aérea en el caso del ensayo en campo y de la parte aérea y radicular en el caso del ensayo en invernadero, las muestras fueron pesadas en la balanza de precisión una vez estuvieron secas. Posteriormente, las muestras aéreas fueron molidas en un molino de cuchillas y pasadas por un tamiz de luz 1 mm para realizar las determinaciones de los parámetros de calidad del forraje, que fueron: proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), lignina ácido detergente (LAD), cantidad de cenizas (conjunto de minerales) y concentración total de cada mineral (Al, B, Ca, Cd, Cu, Cr, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, Ti, Tl y Zn). En el caso de *Poa pratensis*, debido a cantidad limitada de forraje obtenido, para determinar los parámetros de calidad se tuvo que prescindir de uno de los factores principales "Fecha de siembra" y unir ambos tratamientos "Viejo y Joven". Los métodos y procedimientos utilizados para la determinación de los parámetros de calidad se describen a continuación.

Para la determinación de la proteína bruta (PB), se obtuvo primero el contenido en nitrógeno a partir del método Kjeldahl (AOAC, 2005), con un sistema compuesto de un digestor y un destilador (Distillation Unit K-350, BÜCHI, Flawil, Suiza). Para la determinación del nitrógeno se utilizó un gramo de muestra, al cual se le añadieron 10 g de catalizador (Kjeldahl Catalyst Cu-Se, 1,5 % CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O + 2 % Se) y 20 mL de ácido sulfúrico al 98 %. Una vez obtenido el porcentaje de nitrógeno con el método Kjeldahl, se multiplicó por el factor 6,25 siguiendo las indicaciones de Henneberg (1985) para obtener el contenido en proteína bruta de la muestra.

Para la fibra FND se utilizó el analizador de fibra ANKOM 8-98, cuyo procedimiento consta en el método oficial AOAC Ba 6a-05 (2005) y que se basan en los métodos de Goering y Van Soest (1970). El procedimiento que se utilizó fue el siguiente:

- Preparación de una bolsa de filtrado, introduciendo 0,5 g (con un error de 5 ‰) de muestra molida.
- Se colocaron las bolsas (23 bolsas y 1 blanco) en el suspensor, introduciendo en el digestor (ANKOM 220 Fiber Analyzer, Fairport, Nueva York, Estados Unidos) 2 L de una solución neutra compuesta por: 120 g de solución detergente neutra (Sodium Lauryl Sulfate, EDTA disodium, Borate dibasic. Ankona Technology, NY, USA) 20 mL de trietilen-glicol, 20 g de sodio sulfito y 4 mL de  $\alpha$ -amilasa, tras la cual se aplicaron cuatro lavados con agua destilada, añadiéndole a los dos primeros de nuevo  $\alpha$ -amilasa.
- Tras los lavados se realizó un tratamiento con acetona durante tres minutos y secado al aire. Para que se secan bien, se introdujeron en la estufa a 105 °C durante 2 horas.
- A continuación se pesaron y se realizaron los cálculos para determinar la FND.

La determinación de la fibra FAD se realizó por medio del analizador de fibra ANKOM 8-98, siguiendo el procedimiento oficial AOAC (2005). Como materia de análisis se tomó las bolsas utilizadas anteriormente, siguiendo los pasos que se indican a continuación:

- Las bolsas de filtrados procedentes de la determinación de la FND, se colocaron en el suspensor, al cual se añadió 2 L de una solución ácida compuesta por: 40 g de 1-Bromuro de hexadecil trimetil-amonio y 55,2 mL de ácido sulfúrico al 98 %.
- A continuación se realizaron cuatro lavados con agua destilada. Tras esto se introdujeron las bolsas en acetona durante tres minutos. Secándose al aire y en la estufa como en el

apartado anterior y finalmente realizar la pesada de las bolsas y determinar, aplicando los cálculos, la FAD.

Para determinar la cantidad de lignina LAD presente en las muestras se procedió según lo descrito en el método oficial AOAC (2005). Como materia de análisis se toman las bolsas de filtrado usadas para la determinación de la fibra ácido detergente. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- En un vaso de precipitado se añadió un reactivo de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  al 72 % en peso). Se introdujeron las bolsas, cada media hora durante 3 horas, se presionaron con la ayuda de otro vaso de precipitado treinta veces.
- Pasado este tiempo se hacen cuatros lavado con agua caliente, durante 5 minutos cada uno, presionando otras treinta veces en cada lavado.
- Una vez secadas al aire se pesan y se calcula el valor de lignina.

Para conocer la cantidad de cenizas (minerales) presente en las distintas muestras, se procedió según el método oficial AOAC (2005). Se usaron las bolsas de filtrado usadas para el análisis de lignina. Siguiendo los pasos siguientes:

- Las bolsas una vez pasadas por el cálculo de lignina se introdujeron en crisoles para someterlas a un proceso de incineración en horno mufla durante 3 h a 525 °C.
- Pesado de muestras y determinación de los valores de ceniza mediante las operaciones indicadas en el método utilizado.

Las determinaciones de los minerales fueron realizadas por el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC) en Murcia. Después de una digestión con  $HNO_3 / H_2O_2$ , las muestras fueron procesadas mediante espectroscopía de plasma ICP-OES (plasma de acoplamiento inductivo junto a un espectrofotómetro de emisión óptico) para obtener las concentraciones de los siguientes minerales: Al, B, Ca, Cd, Cu, Cr, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, Ti, Tl y Zn.

### **3.2.6. Análisis estadístico.**

La influencia del tratamiento (hongo endófito inoculado), la edad de las plantas y su interacción sobre los diferentes parámetros de producción y calidad considerados, fue evaluada para cada especie hospedante por separado mediante análisis de varianza y test de comparaciones

múltiples LSD de Fisher para ver las diferencias entre los distintos tratamientos en el caso de diferencias significativas en el test ANOVA.

En todos los análisis las hipótesis de normalidad y homocedasticidad que deben de seguir la distribución de los datos de las variables respuesta fueron comprobadas, entre otros medios, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y por el test de Levene respectivamente. En los casos en los que no se cumplieran dichas hipótesis, con el fin de normalizar la distribución y estabilizar la varianza de los residuos, se realizó la transformación de las siguientes variable. En el caso de *Trifolium subterraneum*:  $\ln(x + 1)$  para Al, B, Cu, Fe, K, Li, Mn, P, Pb y Zn en el ensayo de invernadero y Fe, Mn y Zn en el ensayo de campo;  $\sqrt{x}$  para MSA en el ensayo de campo;  $\sqrt[3]{x}$  para MSA y MSR en el ensayo de invernadero, y Cd, Li, Na, P, y Pb en el ensayo de campo; y  $\sqrt[5]{x}$  para el Cd, Cr, Mo y Ni en el ensayo de invernadero, y LAD, Al, Cr, Mo, Ni y Se en el ensayo de campo. Para *Ornithopus compressus*:  $\sqrt{x}$  para Al, MSR, cenizas y proteína bruta. Mientras que para las variables Mo, Se y MSA se realizó la transformación  $\sqrt[5]{x}$ . Por último para la variedades *Poa pratensis*:  $\sqrt{x}$  para la MSA, MSR, Cr, Mo, Se; y para las variables Al y Ti se realizó la transformación  $\sqrt[3]{x}$ .

### 3.3. INFLUENCIA SOBRE PATÓGENOS FÚNGICOS.

#### 3.3.1. Obtención del material fúngico a utilizar en los ensayos.

Además de comprobar cómo los hongos endófitos afectan a la calidad del pasto, otro aspecto muy importante es ver su posible aplicación como agentes de control biológico frente a enfermedades fúngicas. Para realizar los ensayos fue necesaria en primer lugar la selección de los diferentes hongos patógenos y endófitos a utilizar. En el caso de los patógenos utilizados, *Biscogniauxia mediterranea*, agente causal del chancro carbonoso del alcornoque, fue aislado como endófito en especies de pasto en el presente trabajo. Por tanto debido a esta potencial dualidad en su comportamiento, pudiendo permanecer como endófito en especies pratenses, actuando éstas como un reservorio del patógeno que estaría a la espera de poder infectar pies de alcornoque, nos pareció muy interesante de ser incluida esta especie para ser investigada en profundidad. Así, podría ser de gran aplicación el uso de hongos endofíticos como antagonistas de *B. mediterranea* para limitar su presencia en especies de pasto y disminuir su inóculo y por tanto su infección a alcornoques. Por otra parte *Fusarium moniliforme*, conocido agente causal de varias enfermedades en cultivos de gramíneas, fue cedido por el Servicio de Sanidad Vegetal (Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía del Gobierno de Extremadura).

Con respecto a los endófitos, de todos los aislados obtenidos en el objetivo primero del presente estudio, para hacer la selección (Tabla 5), se hizo un estudio previo de confrontaciones *in vitro* en cultivos duales endófito-patógeno (datos no mostrados). La confrontación se hizo en placas Petri de PDA en condiciones de oscuridad.

**Tabla 5** Origen e identificación de los hongos endófitos utilizados en el ensayo *in vitro*.

Nº aislado	Planta hospedante	Origen geográfico	Cordenadas UTM (Datum 29 N) (m)	Identificador <sup>a</sup>
E071	<i>B. mollis</i> L.	La Talanquera (Badajoz)	X=653,013 Y=4.267,740	<i>Sordaria fimicola</i> (Rob. ex Desm.) Ces. & De Not.
E222	<i>T. subterraneum</i> L.	La Haza (Cáceres)	X=748,510 Y=4.428,827	<i>Trichoderma gamsii</i> Samuels & Druzhin
E408	<i>B. pelecinus</i> L.	Mampolín (Badajoz)	X=675,686 Y=4.258,595	<i>Paecilomyces variotii</i> Biourge & Bainier
E631	<i>B. mollis</i> L.	La Talanquera (Badajoz)	X=653,013 Y=4.267,740	<i>Epicoccum nigrum</i> Link
E635	<i>M. polymorpha</i> L.	Mampolín (Badajoz)	X=675,686 Y=4.258,595	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom

<sup>a</sup> Basado en las características morfológicas y en comparación con sus secuencias en el GenBank con una similitud > 97 % (www.NCBI.nlm.nih.gov).

Los endófitos que mejor respuesta mostraron frente a los patógenos y que consiguieron disminuir o limitar su crecimiento fueron *Sordaria fimicola* (E071); *Trichoderma gamsii* (E222); *Paecilomyces variotii* (E408); *Epicoccum nigrum* (E631) y *Penicillium chrysogenum* (E635).

### **3.3.2. Efecto del filtrado de la microbiota endofítica sobre el crecimiento de los patógenos *Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme*.**

#### Obtención de los filtrados.

Los endófitos seleccionados se pusieron a crecer en medio de cultivo PDB durante dos meses al igual que se realizó en el apartado 3.2.3. En este caso, en lugar del micelio, lo que nos interesaba era la fracción líquida que será donde se habrá excretado el eventual metabolito secundario producido por el hongo y que es lo que queremos evaluar. Ese líquido resultante, con el potencial principio activo del hongo, es a lo que vamos a llamar "filtrado" del hongo y sobre el que vamos a evaluar su efecto sobre el crecimiento micelial y sobre la germinación esporal de los patógenos. Para quedarnos con el filtrado se procedió de la siguiente manera. Para eliminar la mayor parte del micelio, después de los dos meses de crecimiento, el medio de cultivo con el hongo creciendo se hizo pasar por una doble gasa. El líquido resultante fue nuevamente filtrado por medio de filtros de celulosa de acetato estériles con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , que incorporan una jeringa de plástico estéril. Este líquido resultante es a lo que vamos a considerar el filtrado del hongo. De cada uno de los filtrados, 2 mL (concentración 100 %) del filtrado fueron distribuidos uniformemente sobre placas Petri (90 x 15 mm) que contendrían 18 mL de PDA cuando el medio todavía estaba líquido, con el fin de que el filtrado estuviera uniformemente distribuido. De esta forma se hicieron placas de PDA con el filtrado añadido en una concentración 1/10 con respecto a la concentración madre, para ser utilizadas en los ensayos. Para los controles se añadió 2 mL de medio PDB estéril en lugar del filtrado.

#### Efecto del filtrado sobre el crecimiento.

Para determinar el efecto de los filtrados sobre el crecimiento del micelio, en cada una de las placas con medio de cultivo PDA + filtrado, se sembró un bocado de 4 mm de diámetro de cada colonia (patógenos) que estuviera creciendo activamente sobre medio de cultivo. Dichas placas se incubaron a 24 °C en oscuridad. Diariamente, se midió el crecimiento de los dos diámetros perpendiculares de la colonia, hasta que alcanzaron las dimensiones de la placa Petri. En el caso de *Biscogniauxia mediterranea*, debido a su elevada tasa de crecimiento, sólo se realizaron tres mediciones, mientras que para *Fusarium moniliforme* debido a su menor

crecimiento en comparación con *Biscogniauxia mediterranea*, se realizaron un total de seis mediciones. Para cada combinación filtrado-patógeno, se realizaron cinco repeticiones. Como variable respuesta se utilizó el área de la colonia que se estimó mediante la fórmula:  $A = \pi/4 \cdot d_1 \cdot d_2$ , donde  $d_1$  y  $d_2$  son los diámetros perpendiculares de la colonia (Santamaría *et al.*, 2004).

#### Efecto del filtrado sobre la esporulación.

El efecto sobre la germinación de esporas sólo se hizo sobre el patógeno *Fusarium moniliforme*, que fue el único sobre el que se consiguió esporular *in vitro*. El primer paso para llevar a cabo este ensayo, fue la obtención de las esporas. Para ello, se realizó una siembra del patógeno (4 mm de diámetro) sobre una placa Petri con medio de cultivo PDA, y se creció a temperatura de 24 °C. Transcurridas alrededor de dos semanas, la colonia adquirió una coloración rosácea, momento óptimo en el que el patógeno empezó a producir esporas. Para extraer las esporas, se adicionó sobre el micelio del patógeno agua destilada estéril y mediante un asa de siembra se esparció por toda la superficie, de esta manera se favorecería la extracción de las esporas, que ayudado por medio de una micropipeta, se tomó y se guardó a 4 °C en un Eppendorf de 1,5 mL hasta su utilización.

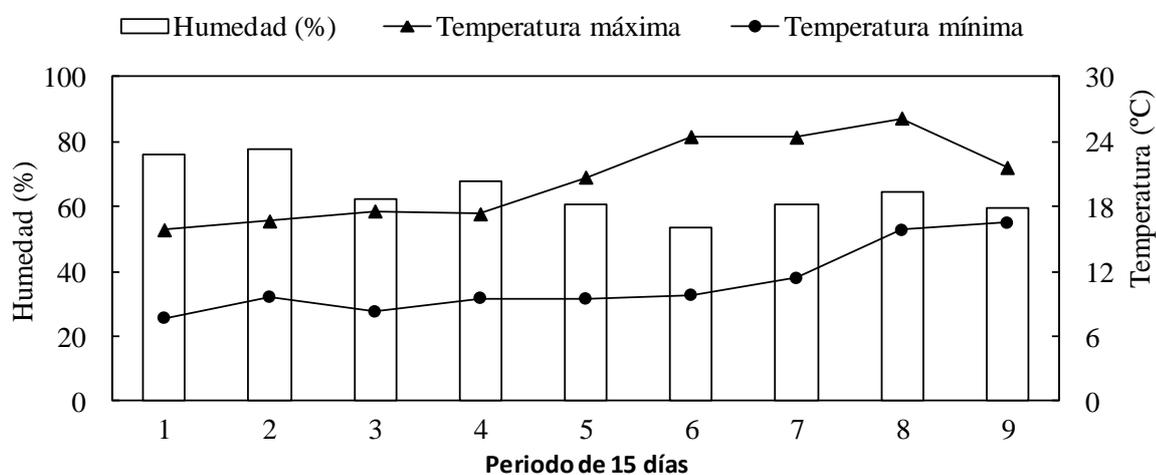
Una vez conseguidas las esporas, se ajustó la concentración a valores de  $10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Una vez ajustada, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución esporal a la placa Petri que contenía el medio de cultivo PDA más el filtrado del hongo, distribuyéndolos uniformemente con un asa de siembra estéril. Dichas placas se incubaron a 24 °C en oscuridad durante 24, 36 y 48 horas, momentos en los cuales se realizaron los conteos de las esporas germinadas. Se consideró que una espора había germinado, cuando la longitud del tubo germinativo superaba la longitud de la propia espора. Se realizaron 4 repeticiones/conteos de 50 esporas por cada combinación filtrado-tiempo de medición. La variable respuesta para cada repetición fue por tanto el porcentaje de esporas germinadas.

#### **3.3.3. Efecto de la asociación endófito-patógeno sobre la virulencia, producción y calidad del forraje en *Lolium rigidum*.**

Con el fin de analizar el efecto de los mismos endófitos de los apartados anteriores sobre los mismos patógenos, pero ahora en condiciones de planta, se diseñó el ensayo en invernadero que se describe a continuación. Se eligió la especie pratense *Lolium rigidum*, como matriz vegetal porque es muy abundante en las condiciones mediterráneas de la dehesa y es una

gramínea, familia principalmente afectada por especies generalmente del genero *Fusarium* al cual pertenece uno de los patógenos probados. Semillas del cultivar 'Wimmera' de *Lolium rigidum* fueron obtenidas a través de la casa comercial (Semillas Batlle, S.A., 08750, Molins de Rei, Barcelona, España). El ensayo se realizó en este caso únicamente en condiciones controladas de invernadero, con el propósito de que los posibles efectos observados fueran debidos exclusivamente por la inoculación de los hongos y no por agentes ambientales externos. La forma de proceder a la hora de realizar la siembra de las plantas (26/11/2013), la aplicación del fungicida (26/12/2013), y la inoculación de los endófitos y patógenos (20/02/2014 y 06/03/2014, respectivamente), fue similar a la ya descrita en el apartado 3.2.3., salvo que la inoculación del patógeno se realizó aproximadamente dos semanas más tarde que la del endófito. Para evaluar la patogenicidad y virulencia de los tratamientos se obtuvo con carácter semanal lo que se ha denominado el 'índice de severidad', que no era más que el porcentaje de la planta que estaba afectado por algún tipo de sintomatología de enfermedad.

Las plantas, se mantuvieron en las mismas condiciones que las descritas anteriormente para el ensayo de invernadero (apartado 3.2.3). También al mes de la inoculación fueron tomadas plantas y llevadas al laboratorio para aislar e identificar a los hongos inoculados. Durante el transcurso del ensayo se registraron las siguientes temperaturas y humedad relativas (Figura 7).



**Figura 7** Representación gráfica de la humedad relativa, temperaturas máximas y mínimas en invernadero (promedios de cada período de 15 días) desde su comienzo, 26 de noviembre 2013 hasta su finalización, el 24 de abril 2014.

Al finalizar el tiempo del ensayo (24/04/2014), la parte aérea y radicular de las plantas fue recogida y llevada al laboratorio para las determinaciones de la producción de materia seca (aérea y radicular) y parámetros de calidad (proteína, fibra neutro y ácido detergente, lignina y cenizas) del forraje (parte aérea de las plantas). En el caso de la materia seca se evaluó la

influencia de ambos patógenos (*Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme*), mientras que para los parámetros de calidad solo se evaluó *F. moniliforme* debido a que fue el único que mostró capacidad patogénica en el estudio. Todas las determinaciones fueron realizadas de la misma forma a las descritas en el apartado 3.2.5.

#### 3.3.4. Análisis estadístico.

El efecto del filtrado sobre el crecimiento micelial se analizó para cada patógeno por separado y el efecto sobre la germinación esporal sólo en *Fusarium moniliforme*. En el primer caso se analizó el efecto del endófito, en función del tiempo de medición, sobre el crecimiento micelial mediante ANOVA de una vía. En el segundo caso, se analizó el efecto del endófito y del tiempo de medición sobre el porcentaje de germinación esporal también con ANOVA de una vía. En ambos casos, la comparación entre tratamientos se realizó con test LSD de Fisher en el caso de influencia significativa en el ANOVA.

Para ver el efecto de la asociación endófito-patógeno sobre las variables de producción, se realizó una test ANOVA de tres vías en el que los factores fueron: fecha de siembra (edad de la planta), especie de patógeno, especie de endófito y sus posibles interacciones. En el caso de los parámetros de calidad, como sólo se hicieron para *F. moniliforme*, se utilizó un ANOVA de dos vías en el que los factores fueron: fecha de siembra (edad de la planta), especie de endófito y sus posibles interacciones. Para aquellas variables que fueran significativas en el ANOVA, se realizó un test LSD de Fisher para ver la diferencia entre los diferentes grupos.

En todos los test paramétricos, las hipótesis de normalidad y homocedasticidad que deben de cumplir la distribución de los datos de las variables respuesta fueron comprobadas, entre otros medios, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y por el test de Levene respectivamente. En el caso de que no cumplieran dichas hipótesis, se realizaron las oportunas transformaciones; en el caso de la MSA, MSR y LAD se realizó la transformación  $^2\sqrt{x}$ .



## **4. RESULTADOS**



## 4.1. DIVERSIDAD ENDOFÍTICA EN ESPECIES DE PASTO.

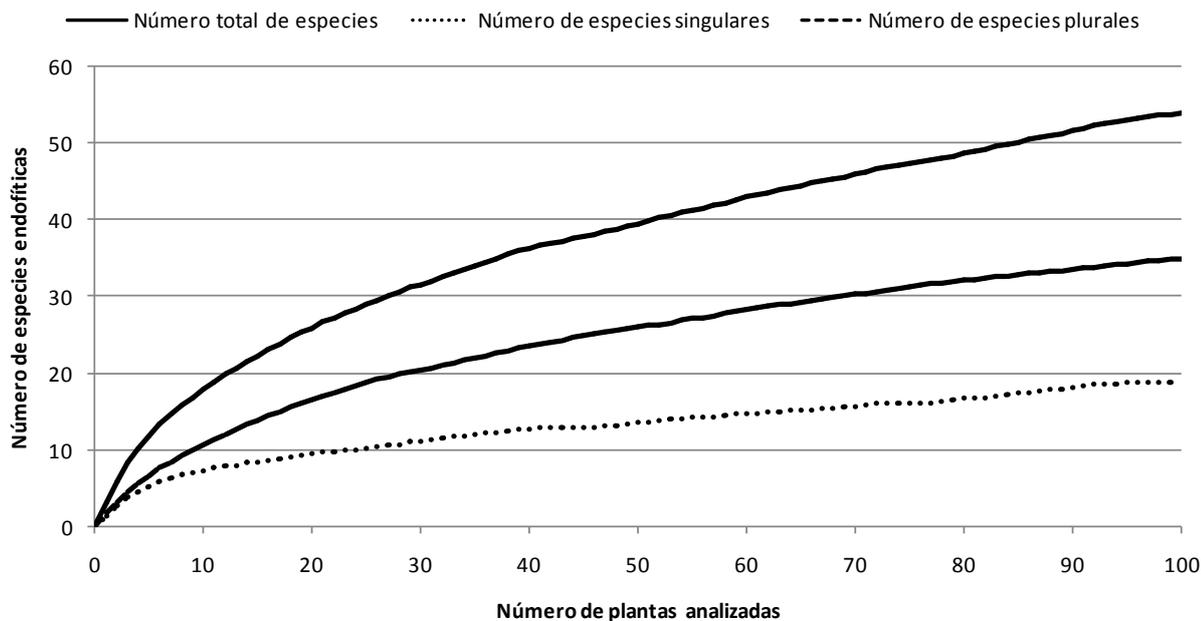
### 4.1.1. Micobiota endofítica asociada a *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*.

#### Identificación molecular.

De las plantas muestreadas, se obtuvieron un total de 773 aislamientos en *Trifolium subterraneum* y 726 en *Ornithopus compressus*. El 94 y 99 % de las plantas presentaban al menos un aislamiento, respectivamente. Según sus características morfológicas, para la planta hospedante *T. subterraneum* se diferenciaron 173 morfotipos, mientras que para *O. compressus* fueron 199. Al secuenciarse la región ITS del ADNr de cada uno de los morfotipos, se identificaron mediante la comparación con la base de datos EMBL/GenBank y/o mediante sus características morfológicas 54 genotipos para *T. subterraneum* (Tabla 6) y 61 genotipos para *O. compressus* (Tabla 7), siendo comunes para ambas especies 31 de los genotipos y específicos 23 y 30 genotipos respectivamente. Para ambas especies hospedantes la mayoría de los endófitos se incluyen en el *phylum Ascomycota*, con la excepción de *Mucor fragilis* y *Mucor hiemalis* que pertenecen a *Zygomycota* y *Ceratobasidiaceae* sp.1, que pertenece a *Basidiomycota*. De acuerdo con el número de taxones incluidos por Clase, la más abundante para ambas especies estudiadas, fue la Clase Dothideomycetes representada por los órdenes: Pleosporales (38 especies), Capnodiales (3 especies) y Dothidiales (1 especie). En segundo lugar por números de especies fue la Clase Sordariomycetes, que estuvo representada por el orden Hypocreales (7 especies), Sordariales (7 especies), Diaporthales (1 especie), Microascales (1 especie) e Incertae Sedis (3 especies). Los órdenes Helotiales (1 especie), Mucorales (2 especies), Ustilaginales (1 especie) y Eurotiales (3 especie) correspondían a las Clases Leotiomycetes, Ustilagomycetes y Eurotiomycetes, respectivamente (Tabla 6 y 7).

En el caso de *Trifolium subterraneum*, sólo cinco de las especies identificadas, *Leptosphaerulina australis*, *Alternaria* sp.4, *Sordaria fimicola*, *Fusarium lateritium* y *Drechslera biseptata*, representaron más del 66 % de los aislados observados; y diez de las especies observadas representaron el 81 % de los aislados (Tabla 6). De ellos, *Leptosphaerulina australis* y *Alternaria* sp.4, fueron las únicas especies que se encontraron en todas las dehesas. Cuatro de las especies fueron aisladas de ocho dehesas, dos especies de siete, dos especies de seis dehesas, cuatro especies de cuatro y 37 especies de tres o menos dehesas. Por tanto, 10 especies se puede considerar que tuvieron una amplia distribución (habiendo aparecido en más de cinco lugares), mientras que la gran mayoría de los taxones, 44 especies, tuvieron una distribución restringida o limitada, apareciendo en cinco o menos sitios. Por otra parte, 27

endófitos fueron encontrados en ambos tipos de tejidos (hojas y tallos), aunque diez de éstos mostraron una clara preferencia por uno de los tejidos, *Leptosphaerulina australis*, *Sordaria fimicola*, *Drechslera biseptata*, *Colletotrichum trifolii*, *Epicoccum nigrum* y *Podospora anserina* se encontraron con más frecuencia en hojas, mientras *Fusarium lateritium*, *Fusarium* sp.3 y *Fusarium avenaceum* se hallaron principalmente en tallos. Además, 14 especies sólo fueron aisladas en hojas y 13 en tallo (aunque todos ellos presentaron una frecuencia de aislamiento inferior a 3). En general, las hojas fueron el tejido del que se obtuvo mayor número de aislamientos, con 430, en comparación con los tallos, con 343. Sin embargo, ambos tejidos mostraron un número similar de especies endofíticas: 41 en hojas y 40 en tallos (Tabla 6). Las curvas acumulativas de especies (Figura 8), mostraron un crecimiento no asintótico, tanto para las especies singulares (las representadas por un único aislamiento), las especies plurales (las representadas por dos o más aislamientos), y como para el total de las especies.



**Figura 8** Curvas acumulativa de especies en *Trifolium subterraneum*, que muestra la relación entre el número de plantas analizadas y el número total de especies de hongos encontrados, el número de especies singulares (especies representadas por un aislamiento) y el número de especies plurales (especies representadas por dos o más aislamientos).

**Tabla 6** Frecuencia de los aislados endofíticos de *Trifolium subterraneum*, zona y tejidos donde fueron recogidos.

Especie de endófito*	Code <sup>†</sup>	Clase	Orden	Nº de acceso Genbank	H/T <sup>‡</sup>	Nº de aislados por dehesa <sup>§</sup>										Total
						AB	ET	HA	LB	MA	MO	PI	SE	TA	VA	
<i>Leptosphaerulina australis</i> McAlp.	LEA	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698328	136/45	27	14	37	6	34	8	11	26	12	6	181
<i>Alternaria</i> sp.4	AL4	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698349	80/74	11	41	16	18	11	14	4	2	32	5	154
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	SOF	Sordariomycetes	Sordariales	KP698327	52/14	1	3	2	-	2	15	8	33	2	66	
<i>Fusarium lateritium</i> Nees	FUL	Sordariomycetes	Hypocreales	KP698325	9/55	-	6	6	-	8	10	3	13	16	2	64
<i>Drechslera biseptata</i> (Sacc. & Roum.) Richardson & Fraser	DRB	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698352	35/13	13	3	1	2	8	-	1	1	-	19	48
<i>Fusarium</i> sp.3	FU3	Sordariomycetes	Hypocreales	KP698324	3/32	-	1	6	6	-	3	11	3	4	1	35
<i>Lewia infectoria</i> (Fuckel) M.E. Barr & E.G. Simmons	LEW	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698369	15/9	1	-	-	-	2	3	-	1	8	9	24
<i>Colletotrichum trifolii</i> Bain	COT	Sordariomycetes	<i>Incertae sedis</i>	KP698368	16/5	2	-	-	-	3	-	-	16	-	-	21
<i>Diaporthe phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	DIA	Sordariomycetes	Diaporthales	KP698344	11/10	6	-	7	-	1	1	2	2	-	2	21
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	EPI	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698340	9/3	-	-	1	-	1	1	-	-	2	7	12
<i>Stemphylium globuliferum</i> (Vestergr.) E.G. Simmons	STG	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698338	5/7	-	1	2	-	3	1	-	1	-	4	12
<i>Podospira anserina</i> (Rabenh.) Niessl	PAN	Sordariomycetes	Sordariales	KP698331	8/3	8	-	-	-	-	2	-	1	-	-	11
<i>Boeremia exigua</i> (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley	BOE	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698366	3/7	1	1	-	1	2	1	2	-	2	-	10
<i>Alternaria</i> sp.3	AL3	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698322	4/5	-	2	-	-	2	3	-	2	-	-	9
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	FUA	Sordariomycetes	Hypocreales	KP698339	1/8	-	2	1	3	1	-	2	-	-	-	9
Helotiales sp.1	HE1	Leotiomycetes	Helotiales	KP698336	0/9	-	-	5	-	-	-	-	2	-	2	9
<i>Alternaria alternata</i> complex (Fr.) Keissler	ALA	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698351	5/3	1	3	-	-	-	3	-	-	1	-	8
<i>Didymella phacae</i> Corbaz	DIP	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698363	2/5	2	2	-	-	1	-	1	1	-	-	7
Dothideomycete sp.1	DOT	Dothideomycetes		KP698360	0/6	-	1	-	-	-	5	-	-	-	-	6
<i>Embellisia leptinellae</i> E.G. Simmons & C.F. Hill	EML	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698337	2/3	-	-	1	-	2	-	-	1	-	1	5
<i>Sporormiella pilosa</i> (Cain) S.I. Ahmed & Cain	SPO	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698330	3/2	-	-	1	1	-	-	-	-	2	1	5
<i>Drechslera</i> sp.1	DR1	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698323	2/2	-	1	-	-	3	-	-	-	-	-	4
<i>Stemphylium solani</i> G.F. Weber	STS	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698333	2/2	-	-	-	-	-	2	-	-	2	-	4
<i>Alternaria</i> sp.2	AL2	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698326	1/2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Chaetosphaeronema</i> sp.2	CP2	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>	KP698370	1/2	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3
<i>Cladosporium</i> sp.3	CL3	Dothideomycetes	Capnodiales	KP698353	1/2	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	3
<i>Davidiella tassiana</i> (De Not.) Crous & U. Braun	DAV	Dothideomycetes	Capnodiales	KP698365	3/0	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	3
<i>Drechslera dictyoides</i> (Drechsler) Shoemaker	DRD	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698362	2/1	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	3
<i>Preussia australis</i> (Speg.) Arx	PRA	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698345	3/0	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
<i>Alternaria</i> sp.1	AL1	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698329	1/1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
<i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallr.) S. Hughes	CCO	Sordariomycetes	<i>Incertae sedis</i>	KP698334	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
<i>Podospira miniglutinans</i> J.H. Mirza & Cain	POM	Sordariomycetes	Sordariales	KP698341	2/0	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
<i>Preussia</i> sp.2	PR2	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698320	2/0	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
<i>Trichoderma gamsii</i> Samuels & Druzhin.	TRG	Sordariomycetes	Hypocreales	KP698343	0/2	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	2
<i>Alternaria</i> sp.5	AL5	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698335	1/0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Aureobasidium proteae</i> (Taylor & Crous) Taylor & Crous	AUP	Dothideomycetes	Dothideales	KP698350	0/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Chaetosphaeronema</i> sp.1	CP1	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>	KP698358	0/1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Colletotrichum cereale</i> Manns	COL	Sordariomycetes	<i>Incertae sedis</i>	KP698357	1/0	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Drechslera nobleae</i> McKenzie & D. Matthews	DRN	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698364	1/0	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1

Tabla 6 (Continuación).

Especie de endófito*	Code†	Clase	Orden	Nº de acceso Genbank	H/T‡	Nº de aislados por dehesa§									Total		
						AB	ET	HA	LB	MA	MO	PI	SE	TA		VA	
<i>Fusarium</i> sp.1	FU1	Sordariomycetes	Hypocreales	KP698348	0/1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	
<i>Mucor fragilis</i> Bainier	MUF	<i>Incertae sedis</i>	Mucorales	KP698373	0/1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	
<i>Penicillium</i> sp.1	PE1	Eurotiomycetes	Eurotiales	KP698321	1/0	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Petriella guttulata</i> G.L. Barron & Cain	PET	Sordariomycetes	Microascales	KP698361	1/0	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
<i>Peyronellaea pinodella</i> (L.K. Jones) Aveskamp, Gruyter & Verkley	PEY	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698356	0/1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	
<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (E. Müll.) Hedjar.	PHN	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698332	1/0	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw. & Hochapfel	PHO	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698371	0/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Pleosporales sp.3	PL3	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698359	1/0	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	
Sordariales sp.1	PD1	Sordariomycetes	Sordariales	KP698346	0/1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Preussia</i> sp.1	PR1	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698367	1/0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Preussia</i> sp.3	PR3	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698342	1/0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Pyrenophora leucospermi</i> Crous & L. Swart	PYL	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698355	0/1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	
<i>Pyrenophora teres</i> Drechsler	PYT	Dothideomycetes	Pleosporales	KP698354	1/0	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
Unidentified sp.2	UN2			KP698372	0/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Ustilago hordei</i> (Pers.) Lagerh.	UST	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	KP698347	0/1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	
Total						430/343	80	86	89	37	88	67	61	82	120	63	773

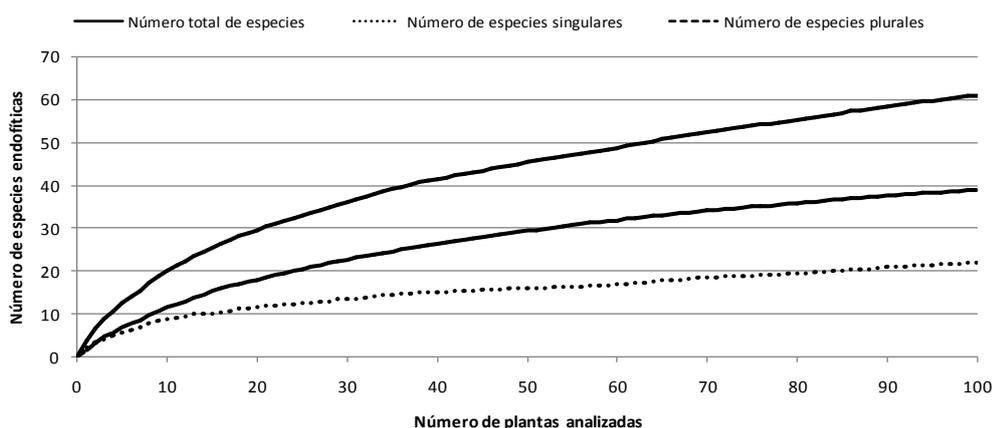
\* Especies afines más cercanas en el Genbank (www.NCBI.nlm.nih.gov) al comparar la secuencia ITS. Una similitud > 97 % se utilizó para la identificación de especies; una similitud > 94 % para la identificación de género; y una similitud < 94 % para las especies no identificadas.

† Nombre abreviado (código) utilizado en las tablas y figuras.

‡ Número de apariciones de cada uno de los hongos en hojas (H) y tallos (T).

§ AB: La Abadía; ET: El Tarro; HA: La Haza; LB: La Barrosa; MA: Mampolín; MO: Moheda de Olalla; PI: La Pizarrilla; SE: San Esteban; TA: La Talanquera y VA: Valdesequera.

Del mismo modo, en *Ornithopus compressus* sólo cuatro especies: *Alternaria* sp.4, *Sordaria fimicola*, *Drechslera biseptata* y *Lewia infectoria* representaron el 56 % del total de aislados, y las diez especies más frecuentes incluyeron más del 75 % de los aislados (Tabla 7). *Alternaria* sp.4 y *Epicoccum nigrum* fueron las únicas especies que se encontraron en todas las dehesas. Del resto, una especie fue aislada de nueve dehesas, dos especies de ocho, dos especies de seis dehesas, cuatro especies de cuatro y 43 especies de tres o menos dehesas. Por lo tanto, sólo 14 especies podrían considerarse que presentan una amplia distribución (como aparecieron en más de cinco lugares), mientras que la mayoría de los grupos taxonómicos, 50 especies de un total de 61, presentaron una distribución restringida o limitada, ya que aparecieron solo en cinco o menos dehesas. En cuanto a los tipos de tejidos, 29 endófitos fueron encontrados en ambos tejidos, pero 17 de ellos mostraron una fuerte preferencia por las hojas, mientras que 15 de ellos mostraron clara preferencia por el tallo. Por otra parte, se aislaron 32 especies en un solo tejido, 17 en hojas y 15 en tallos, aunque todos ellos con una frecuencia de aislamiento baja, que no excedía de seis en el conjunto de las dehesas. Por lo general y al igual que en *Trifolium subterraneum*, las hojas, en comparación con los tallos, fueron el tipo de tejido donde mayor número de aislamientos (451) se obtuvieron en comparación con las obtenidas en tallos, con 275 aislamientos. Sin embargo, ambos tipos de tejidos mostraron un número similar de aislados endofíticos, 44 en hojas y 46 en tallos (Tabla 7). En la figura 9 se representa las curvas acumulativas de las especies, mostrando al igual que en *T. subterraneum* un crecimiento no asintótico para los dos tipos de especies, singulares, plurales, y para el conjunto de todas ellas.



**Figura 9** Curvas acumulativa de especies en *Ornithopus compressus*, muestra la relación entre el número de plantas analizadas y el número total de especies de hongos encontrados, el número de especies singulares (especies representadas por un aislamiento) y el número de especies plurales (especies representadas por dos o más aislamientos).

**Tabla 7** Frecuencia de los aislados endofíticos de *Ornithopus compressus*, zona y tejidos donde fueron recogidos.

Especie de endófito*	Code <sup>†</sup>	Clase	Orden	Nº de acceso Genbank	H/T <sup>‡</sup>	Nº de aislados por dehesa <sup>§</sup>										Total
						AB	ET	HA	LB	MA	MO	PI	SE	TA	VA	
<i>Alternaria</i> sp.4	AL4	Dothideomycete	Pleosporales	KP698349	152/86	7	29	23	37	18	21	10	38	30	25	238
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	SOF	Sordariomycete	Sordariales	KP698327	58/16	1	2	1	-	2	5	34	1	28	-	74
<i>Drechslera biseptata</i> (Sacc. & Roum.) Richardson & Fraser	DRB	Dothideomycete	Pleosporales	KP698352	34/21	-	1	-	17	10	1	5	4	2	15	55
<i>Lewia infectoria</i> (Fuckel) M.E. Barr & E.G. Simmons	LEW	Dothideomycete	Pleosporales	KP698369	28/17	3	1	1	-	8	3	1	5	5	18	45
<i>Fusarium lateritium</i> Nees	FUL	Sordariomycete	Hypocreales	KP698325	11/17	-	1	5	1	2	2	5	6	6	-	28
<i>Alternaria</i> sp.1	AL1	Dothideomycete	Pleosporales	KP698329	14/10	2	-	-	2	1	3	-	2	8	6	24
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	EPI	Dothideomycete	Pleosporales	KP698340	19/4	1	2	5	3	2	5	1	1	1	2	23
<i>Leptosphaerulina australis</i> McAlp.	LEA	Dothideomycete	Pleosporales	KP698328	16/7	1	1	8	-	6	1	-	2	1	3	23
<i>Fusarium</i> sp.3	FU3	Sordariomycete	Hypocreales	KP698324	8/11	4	-	2	3	-	1	4	2	3	-	19
<i>Alternaria</i> sp.3	AL3	Dothideomycete	Pleosporales	KP698322	16/2	5	-	-	1	-	2	-	8	2	-	18
<i>Stemphylium globuliferum</i> (Vestergr.) E.G. Simmons	STG	Dothideomycete	Pleosporales	KP698338	8/5	3	1	1	-	5	1	-	1	-	1	13
<i>Prussia</i> sp.3	PR3	Dothideomycete	Pleosporales	KP698342	8/3	7	-	4	-	-	-	-	-	-	-	11
<i>Cladosporium</i> sp.3	CL3	Dothideomycete	Capnodiales	KP698353	3/7	1	-	3	-	1	1	1	1	-	2	10
<i>Colletotrichum trifolii</i> Bain	COT	Sordariomycete	<i>Incertae sedis</i>	KP698368	4/5	-	-	1	-	3	4	-	1	-	-	9
<i>Podospora anserina</i> (Rabenh.) Niessl	PAN	Sordariomycete	Sordariales	KP698331	8/1	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>Boeremia exigua</i> (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley	BOE	Dothideomycete	Pleosporales	KP698366	4/4	-	1	-	4	-	3	-	-	-	-	8
<i>Davidiella tassiana</i> (De Not.) Crous & U. Braun	DAV	Dothideomycete	Capnodiales	KP698365	2/6	-	2	4	-	-	-	1	-	-	1	8
<i>Podospora mini glutinans</i> J.H. Mirza & Cain	POM	Sordariomycete	Sordariales	KP698341	6/2	1	-	1	-	-	6	-	-	-	-	8
<i>Chaetosphaeronema</i> sp.2	CP2	<i>Incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>	KP698370	1/6	1	1	-	-	-	-	2	3	-	-	7
<i>Embellisia leptinellae</i> E.G. Simmons & C.F. Hill	EML	Dothideomycete	Pleosporales	KP698337	3/4	1	1	1	-	-	2	-	-	-	2	7
<i>Sporormiella pilosa</i> (Cain) S.I. Ahmed & Cain	SPO	Dothideomycete	Pleosporales	KP698330	2/5	3	-	2	-	-	1	-	-	-	1	7
<i>Alternaria</i> sp.2	AL2	Dothideomycete	Pleosporales	KP698326	6/0	-	1	-	-	-	5	-	-	-	-	6
<i>Drechslera</i> sp.1	DR1	Dothideomycete	Pleosporales	KP698323	4/2	-	4	1	-	1	-	-	-	-	-	6
<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw. & Hochapfel	PHO	Dothideomycete	Pleosporales	KP698371	5/0	4	-	-	1	-	-	-	-	-	-	5
<i>Alternaria alternata</i> complex (Fr.) Keissler	ALA	Dothideomycete	Pleosporales	KP698351	2/2	-	2	-	1	-	-	-	-	-	1	4
<i>Drechslera avenae</i> (Eidam) Scharif	DRE	Dothideomycete	Pleosporales	KP899394	3/1	-	2	-	-	1	-	1	-	-	-	4
<i>Podospora decipiens</i> (G. Winter) Niessl	POD	Sordariomycete	Sordariales	KP899391	4/0	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Colletotrichum cereale</i> Manns	COL	Sordariomycete	<i>Incertae sedis</i>	KP698357	0/3	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
<i>Drechslera dictyoides</i> (Drechsler) Shoemaker	DRD	Dothideomycete	Pleosporales	KP698362	0/3	-	-	-	-	1	-	-	2	-	-	3
<i>Microdiplodia hawaiiensis</i> Crous	MIC	Dothideomycete	Botryosphaeriales	KP899392	0/3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	3
<i>Peyronella pinodella</i> (L.K. Jones) Aveskamp, Gruyter & Verkley	PEY	Dothideomycete	Pleosporales	KP698356	1/2	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	3
Pleosporales sp.1	PL1	Dothideomycete	Pleosporales	KP899393	0/3	-	-	2	-	-	-	-	-	-	1	3
<i>Stemphylium solani</i> G.F. Weber	STS	Dothideomycete	Pleosporales	KP698333	2/1	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
<i>Stemphylium vesicarium</i> (Wallr.) E.G. Simmons	STV	Dothideomycete	Pleosporales	KP899396	3/0	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	3
<i>Dendryphiella arenaria</i> Nicot	DEN	Dothideomycete	Pleosporales	KP899426	1/1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2
<i>Mucor fragilis</i> Bainier	MUF	<i>Incertae sedis</i>	Mucorales	KP698373	2/0	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
<i>Podospora communis</i> (Speg.) Niessl	POC	Sordariomycete	Sordariales	KP899407	1/1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Pyrenophora leucospermi</i> Crous & L. Swart	PYL	Dothideomycete	Pleosporales	KP698355	1/1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	2
<i>Trichoderma gamsii</i> Samuels & Druzhin.	TRG	Sordariomycete	Hypocreales	KP698343	2/0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2

Tabla 7 (Continuación).

Especie de endófito*	Code†	Clase	Orden	Nº de acceso Genbank	H/T‡	Nº de aislados por dehesa§										Total	
						AB	ET	HA	LB	MA	MO	PI	SE	TA	VA		
Ascomycota sp.1	ASC			KP899403	0/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Cercospora apii</i> Fresen.	CEA	Dothideomycete	Capnodiales	KP899409	0/1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Ceratobasidiaceae</i> sp.1	CER	Agaricomycetes	Cantharellales	KP899408	1/0	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Chaetomium</i> sp.2	CH2	Sordariomycete	Hypocreales	KP899397	0/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Didymella exitialis</i> (Morini) E. Müll.	DIE	Dothideomycete	Pleosporales	KP899390	1/0	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
Dothideomycete sp.1	DOT	Dothideomycete		KP698360	1/0	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Embellisia</i> sp.1	EM1	Dothideomycete	Pleosporales	KP899389	0/1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.	FUO	Sordariomycete	Hypocreales	KP899395	1/0	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Helotiales</i> sp.1	HE1	Leotiomycete	Helotiales	KP698336	0/1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	MUH	<i>Incertae sedis</i>	Mucorales	KP899388	1/0	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	
<i>Penicillium</i> sp.2	PE2	Eurotiomycete	Eurotiales	KP899386	0/1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	PEC	Eurotiomycete	Eurotiales	KP899406	1/0	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	
<i>Phialophora cyclaminis</i> J.F.H. Beyma	PHC	Eurotiomycete	Chaetothyriales	KP899400	0/1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Phoma medicaginis</i> Malbr. & Roum.	PHM	Dothideomycete	Pleosporales	KP899401	1/0	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	
<i>Phaeosphaeria pontiformis</i> (Fuckel) Leuchtm.	PHP	Dothideomycete	Pleosporales	KP899402	1/0	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
Pleosporales sp.2	PL2	Dothideomycete	Pleosporales	KP899398	0/1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	
<i>Podospora fimiseda</i> (Ces. & De Not.) Niessl	POF	Sordariomycete	Sordariales	KP899404	0/1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Preussia</i> sp.1	PR1	Dothideomycete	Pleosporales	KP698367	1/0	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Preussia australis</i> (Speg.) Arx	PRA	Dothideomycete	Pleosporales	KP698345	1/0	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Septoria dysentericae</i> Brunaud	SEP	Dothideomycete	Capnodiales	KP899399	1/0	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	
<i>Xylariaceae</i> sp.	XYL	Sordariomycete	Xylariales	KP899387	0/1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Zopfiella latipes</i> (N. Lundq.) Malloch & Cain	ZOP	Sordariomycete	Sordariales	KP899405	0/1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Total						451/275	66	57	73	73	64	76	70	82	86	79	726

\* Especies afines más cercanas en el Genbank (www.NCBI.nlm.nih.gov) al comparar la secuencia ITS. Una similitud > 97 % se utilizó para la identificación de especies; una similitud > 94 % para la identificación de género; y una similitud < 94 % para las especies no identificadas.

† Nombre abreviado (código) utilizado en las tablas y figuras.

‡ Número de apariciones de cada uno de los hongos en hojas (H) y tallos (T).

§ AB: La Abadía; ET: El Tarro; HA: La Haza; LB: La Barrosa; MA: Mampolín; MO: Moheda de Olalla; PI: La Pizarrilla; SE: San Esteban; TA: La Talanquera y VA: Valdesequera.

Efecto del ambiente y del tipo de tejido.

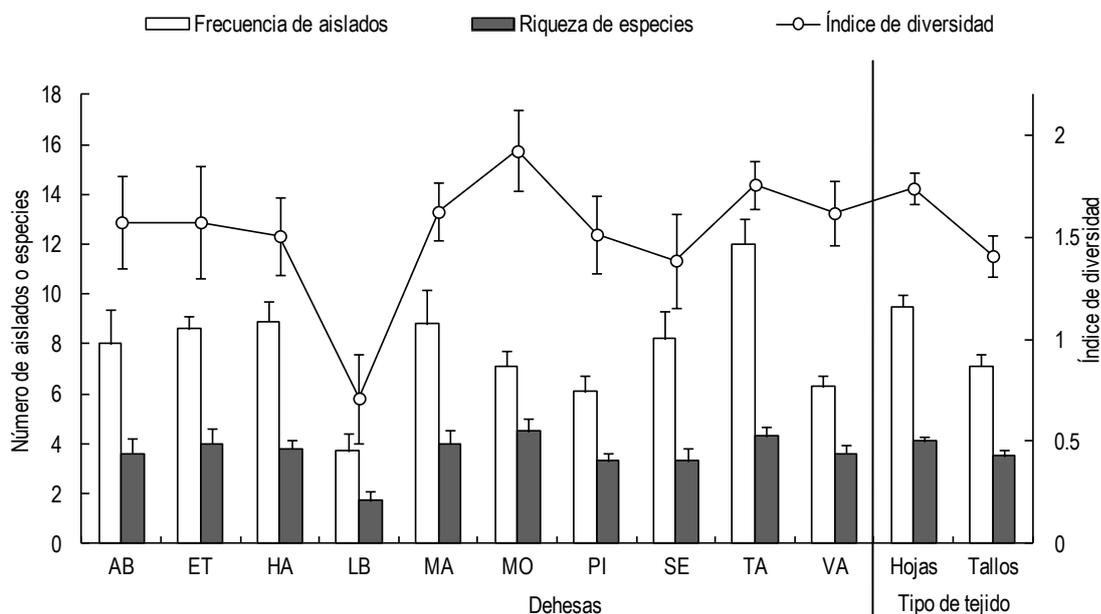
A nivel de planta, en *Trifolium subterraneum* el ANOVA mostró que la variable "Dehesa" afectó significativamente a las tres variables respuesta: frecuencia de los aislados, riqueza de las especies e índice de diversidad de Shannon-Weaver. Por otro lado, el "Tipo de tejido" afectó solamente a la frecuencia de los aislados, mientras que la interacción "Dehesa \* Tejido" no tuvo un efecto significativo en ninguna de las tres variables respuesta (Tabla 8).

**Tabla 8** ANOVA para *Trifolium subterraneum* que muestra el efecto de la dehesa, el tipo de tejido y su interacción en la frecuencia de aislamiento, riqueza de especies y el índice de diversidad de Shannon-Weaver de las especies endofíticas encontradas.

Fuente	Df	Frecuencia de aislamiento	Riqueza de especies	I. Diversidad
Dehesa	9	7,22***	3,27**	2,90**
Tipo de tejido	1	12,47***	1,22	1,33
Dehesa * Tejido	9	1,25	1,14	1,22

Df.: grado de libertad; Valores de F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) se muestran en el resto de las columnas.

En *Trifolium subterraneum* la dehesa "La Talanquera" fue donde se obtuvo una mayor frecuencia de aislados por planta, con un promedio (media  $\pm$  error) de  $12 \pm 1,0$ . Por el contrario la dehesa con menor frecuencia de aislados fue "La Barrosa" ( $3,7 \pm 0,7$ ) al igual que ocurrió con la riqueza de especies con ( $1,7 \pm 0,4$ ) (Figura 10).



**Figura 10** Efecto de la dehesa y tipo de tejido (hojas y tallos) sobre las variables respuesta: frecuencia de aislados, riqueza de especies e índice de diversidad endofítica (Shannon-Weaver) en *Trifolium subterraneum*. Las barras de error indican el error estándar. AB: La Abadía; ET: El Tarro; HA: La Haza; LB: La Barrosa; MA: Mampolín; MO: Moheda de Olalla; PI: La Pizarrilla; SE: San Esteban; TA: La Talanquera y VA: Valdesequera.

En cambio en la finca donde mayor riqueza de endófitos se obtuvo fue "Moheda de Olalla" ( $4,5 \pm 0,5$ ). En cuanto al índice de diversidad hubo una dehesa que fue diferente significativa con todas las demás, "La Barrosa" que tuvo un índice de diversidad muy pequeño con  $0,7 \pm 0,2$ . Por otro lado, aunque de manera no significativa, la finca donde mayor diversidad de endófitos se encontró fue "Moheda de Olalla" con  $1,9 \pm 0,2$  (Figura 10). Respecto al efecto del tipo de tejido en las variables respuesta, las diferencias significativas sólo se observaron en la riqueza de aislados (Tabla 8). En este caso, el número de aislamientos por planta fue mayor en hojas ( $9,5 \pm 0,5$ ) que en tallos ( $7,1 \pm 0,5$ ) (Figura 10).

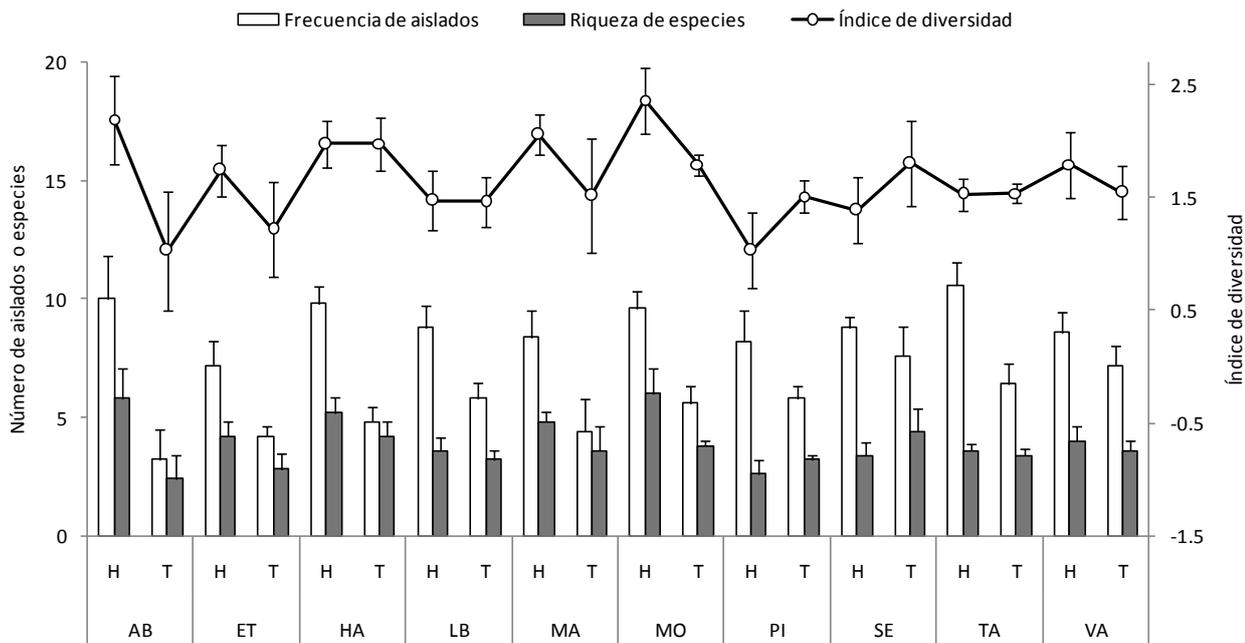
En el caso de *Ornithopus compressus*, el factor "Dehesa" solo afectó a la variable frecuencia de aislados. Por otro lado, el tipo de tejido y la interacción "Dehesas \* Tejido" afectó significativamente a la frecuencia de aislados y a la riqueza de especies. (Tabla 9).

**Tabla 9** ANOVA para *Ornithopus compressus*, que muestra el efecto de la dehesa, el tipo de tejido y su interacción en la frecuencia de aislamiento, la riqueza de especies y el índice de diversidad de Shannon-Weaver de los endófitos encontrados.

Fuente	Df	Frecuencia de aislados	Riqueza de especies	I. Diversidad
Dehesa	9	2,25*	1,55	1,37
Tipo de tejido	1	59,66***	8,45**	2,95
Dehesa * Tejido	9	2,12*	2,20*	1,85

Df.: grado de libertad; Valores de F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) se muestran en el resto de las columnas.

En todas las dehesas la frecuencia de aislados fue mayor en hojas que la obtenida en los tallos (Figura 11). Esta misma tendencia se observó en la riqueza de especies, con excepción de dos dehesas, "La Pizarrilla" y "San Esteban". En general, en hojas el número de aislamientos por planta y número de especies por planta fueron  $9 \pm 0,3$  y  $4,3 \pm 0,2$ , respectivamente; mientras que en tallos, el número de aislamientos por planta y número de especies por planta fueron de  $5,5 \pm 0,3$ , y  $3,5 \pm 0,2$ , respectivamente. También a nivel general, la dehesa "La Talanquera" fue donde se aislaron el mayor número de endófitos por planta (en promedio  $8,5 \pm 0,9$ ), seguido de "La Haza" (en promedio  $8,2 \pm 0,6$ ). Por el contrario, "El Tarro" fue la dehesa con el menor número de especies por planta (en promedio  $5,7 \pm 0,7$ ). Si cada tipo de tejido se analiza por separado, la dehesa "La Talanquera" fue también la dehesa donde se aislaron el mayor número de endófitos en hojas, mientras que el mayor número de endofitos aislados en tallos fue en la dehesa "San Esteban" (Figura 11).



**Figura 11** Efecto de la dehesa y tipo de tejido (H: hojas y T: tallos) sobre las variables respuesta: frecuencia de aislados, riqueza de especies e índice de diversidad endofítica (Shannon-Weaver) en *Ornithopus compressus*. Las barras de error indican el error estándar. AB: La Abadía; ET: El Tarro; HA: La Haza; LB: La Barrosa; MA: Mampolín; MO: Moheda de Olalla; PI: La Pizarilla; SE: San Esteban; TA: La Talanquera y VA: Valdesequera. Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representan los valores sin transformar.

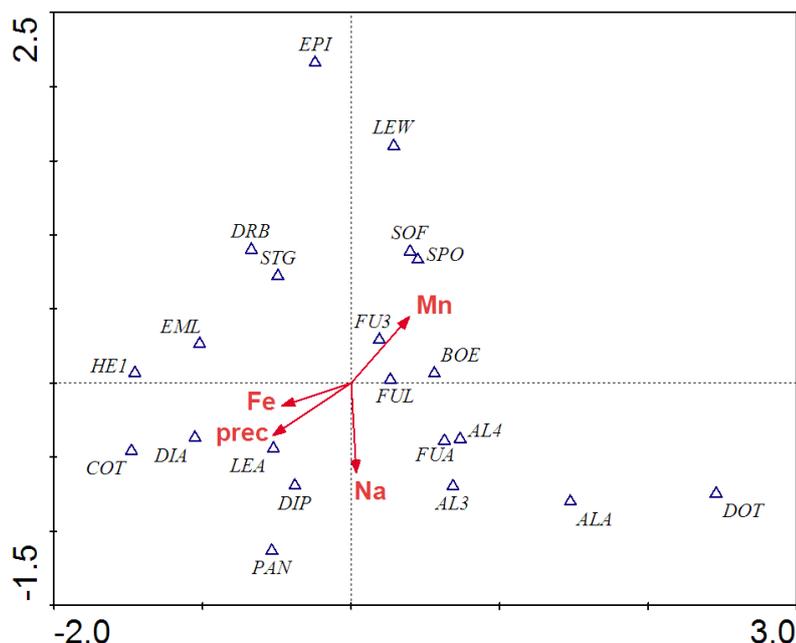
Con el fin de estudiar con más detalle la variable "Dehesa", se estudió la influencia de cada una de las características edafoclimáticas (Tabla 1) sobre la frecuencia de los aislados, la riqueza de especies e índice de diversidad, por medio de regresiones lineales y múltiples. Después de realizar todas las combinaciones posibles, la única variable con una influencia significativa para *Trifolium subterraneum*, fue la concentración de Mg en el suelo sobre el índice de diversidad ( $R^2 = 0,48$ ;  $p$ -valor = 0,016), con un modelo de regresión:  $ID = 2,60 + 0,00162 \text{ Mg}$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). Mientras que para la especie *Ornithopus compressus*, en las regresiones simples el índice de diversidad fue afectada significativamente ( $P < 0,05$ ) y positivamente por la concentración de Ca, K y carbono orgánico ( $C_{\text{org}}$ ), y negativamente por la conductividad eléctrica del suelo (Tabla 10). La riqueza de especies (RE) se vio afectada por los mismos parámetros y de la misma manera que en el caso de la diversidad, además de la precipitación anual, que afectó también positivamente. La frecuencia de aislados sin embargo, sólo se vio afectada por la conductividad eléctrica de una manera positiva. En cuanto a las regresiones múltiples, el índice de diversidad obtuvo el modelo más significativo ( $R^2 = 0,731$ ) con la combinación de K,  $C_{\text{org}}$  y CE del suelo. Para la riqueza de especies (RE), el modelo incluyó Ca, K,  $C_{\text{org}}$ , CE y la precipitación, produciendo un coeficiente de regresión muy elevado ( $R^2 = 0,935$ ) (Tabla 10).

**Tabla 10** Regresiones lineales simples y múltiples significativas en *Ornithopus compressus* entre el índice de diversidad (ID), la riqueza de especies (RE) y la frecuencia de aislamiento (FA) con las variables edafoclimáticas consideradas.

	Variables edafoclimáticas	P-valor	R <sup>2</sup>	Ecuación de regresión	
Regresión simple	DI	Calcio (Ca; mg kg <sup>-1</sup> )	0,041	0,426	DI = 0,90173 + 0,00293*Ca
		Potasio (K; mg kg <sup>-1</sup> )	0,049	0,403	DI = -1,66480 + 0,00873*K
		Carbono organico (C <sub>org</sub> ; g kg <sup>-1</sup> )	0,043	0,419	DI = 2,05818 + 0,10746*C <sub>org</sub>
		Conductividad electrica (CE; dS m <sup>-1</sup> )	0,014	0,550	DI = 5,14783 - 0,29240*CE
	RE	Calcio (Ca; mg kg <sup>-1</sup> )	0,009	0,591	RE = -4,04172 + 0,02879*Ca
		Potasio (K; mg kg <sup>-1</sup> )	0,014	0,550	RE = -28,8919 + 0,08507*K
		Carbono organico (C <sub>org</sub> ; g kg <sup>-1</sup> )	0,031	0,461	RE = 8,48110 + 0,94030* C <sub>org</sub>
		Conductividad electrica (CE; dS m <sup>-1</sup> )	0,002	0,730	RE = 37,2390 - 2,81013*CE
FA	Precipitación anual (Prec; mm)	0,048	0,404	RE = 1,36710 + 0,02472*Prec	
Regresión múltiple	FA	Conductividad electrica (CE; dS m <sup>-1</sup> )	0,019	0,520	FA=45,8582+3,90602*CE
	DI	K + C <sub>org</sub> + CE	0,038	0,731	DI=2,15194+0,00285*K+0,06600* C <sub>org</sub> - 0,18185*CE
		Ca + C <sub>org</sub> + CE	0,047	0,711	DI=3,61843+0,00047*Ca +0,06173* C <sub>org</sub> -0,21311*CE
		C <sub>org</sub> + CE + Prec	0,040	0,726	DI=2,98378+0,07096* C <sub>org</sub> -0,17295*CE +0,000933*Prec
RE	Ca + K + C <sub>org</sub> + CE + Prec	0,017	0,935	RE=-5,03833+0,00681*Ca+0,02978*K+ 0,39123*C <sub>org</sub> - 1,6854*EC-0,00162*Prec	

Dado que los análisis de regresión de las variables edafoclimáticas no fueron del todo concluyentes, especialmente en el caso de *Trifolium subterraneum*, se realizó también un análisis multivariante para analizar la influencia de todas estas variables con más detalle, aunque ahora nos centraremos en la distribución de especies endofíticas como variable respuesta. El Análisis Canónico de Correspondencia (ACC) para *T. subterraneum*, mostró que la variable "Precipitación" fue el único predictor significativo ( $P < 0,05$ ) para la composición de las especies de hongos, a pesar de ello también se detectaron que la concentración de Mn, Na y Fe estaban muy cerca de la significación ( $P < 0,08$ ). Por lo tanto, con estas 4 variables, se realizó un análisis Monte Carlo con 999 permutaciones cuya representación grafica se puede ver en la Figura 12, incluyendo los dos primeros ejes. Los resultados de los eigenvalues ( $\lambda$ ) del modelo fueron: para el eje 1  $\lambda = 0,224$ , para el eje 2  $\lambda = 0,196$ , para el eje 3  $\lambda = 0,133$  y para el eje 4  $\lambda = 0,092$ . La suma canónica total de los  $\lambda$  fue de 0,723. Las variables "Precipitación" y "Mn" parecieron tener la mayor influencia en la distribución de las especies. Se puede observar (Figura 12) que la precipitación y la concentración de Fe en el suelo se correlacionaron con la parte negativa de ambos ejes. En este sentido, la microbiota endofítica que fue influida más positivamente por esas dos variables fueron PAN (*Podospora anserina*), COT (*Colletotrichum trifolii*), DIP (*Didymella phacae*), DIA (*Diaporthe phaseolorum*) y LEA (*Leptosphaerulina australis*). Por el contrario, LEW (*Lewia infectoria*), SOF (*Sordaria fimicola*) y SPO (*Sporormiella pilosa*) parecieron ser las especies endofíticas mejor adaptadas a condiciones de baja precipitación. Las concentración de Na se relacionaron inversamente con el eje 2, siendo los endófitos que más correlacionaron

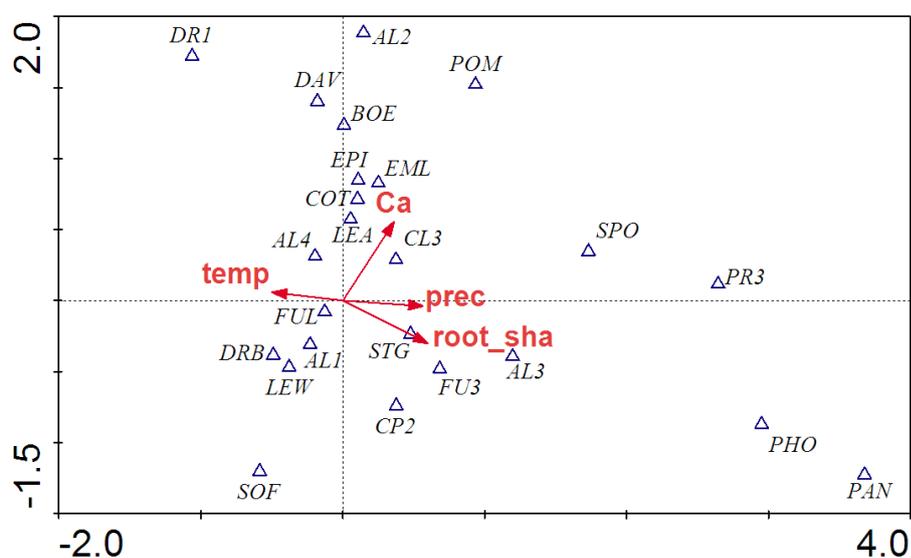
positivamente con la salinidad, PAN (*Podospora anserina*), varias especies de *Alternaria* (*Alternaria alternata*, AL3 y AL4), DOT (*Dothideomycete* sp.1) y DIP (*Didymella phacae*), mientras que EPI (*Epicoccum nigrum*) y LEW (*Lewia infectoria*), fueron las más correlacionadas negativamente. Por último, el Mn estuvo correlacionado con la parte positiva de ambos ejes, es decir, que se correlacionó negativamente con la precipitación y la concentración de Fe (Figura 12).



**Figura 12** Primer y segundo eje del Análisis Canónico de Correspondencias en *Trifolium subterraneum* que muestra las variables ambientales que más influyeron en la composición de la micobiota endofítica. En los análisis sólo se consideraron las especies con frecuencia de aislamiento superior a 4. El nombre completo de las especies de hongos se puede observar en la tabla 6. Prec.: precipitación anual.

Mientras que para *Ornithopus compressus* en el análisis exploratorio de las variables (499 permutaciones) los factores con mayor influencia sobre la distribución de las especies endofíticas fueron (Ca, Root\_shadow, Precipitación y Temperatura). Mientras que para los resultados finales (999 permutaciones) las variables "Ca" y "Root\_shadow" fueron los predictores significativos ( $P < 0,05$ ). Los otros dos factores (precipitación y temperatura) no resultaron predictores significativos en el análisis final, mostrando una significación de  $P = 0,056$  y  $P = 0,208$  respectivamente. La distribución de los endófitos en función de las variables consideradas se pueden ver en la figura 13, representándose también los dos primeros ejes del ACC. Los resultados de los eigenvalores ( $\lambda$ ) del modelo fueron: para el eje 1  $\lambda = 0,320$ , para el eje 2  $\lambda = 0,207$ , para el eje 3  $\lambda = 0,123$  y para el eje 4  $\lambda = 0,086$ . La suma canónica total de los  $\lambda$  fue de 0,737. Se puede decir que la variable "Ca" y "Sombra" fueron las que mayor influencia tuvieron

sobre la distribución de los endófitos, correlacionándose la variable Ca con la parte positiva de ambos ejes, mientras que "Sombra" se correlacionó con la parte positiva del eje 1 y ligeramente con la parte negativa del eje 2. Al respecto, los endófitos con mayor relación positiva con la variable Ca fueron AL2 (*Alternaria* sp.2), POM (*Podospora miniglutinans*) y SPO (*Sporormiella pilosa*); mientras que por el contrario, esta variable se relacionó inversamente con el endófito SOF (*Sordaria fimicola*). Mientras que la variable "Sombra" se relacionó positivamente con PAN (*Podospora anserina*), PHO (*Phoma glomerata*), y negativamente con DR1 (*Drechslera* sp.1), entre otros.



**Figura 13** Primer y segundo eje del Análisis Canónico de Correspondencias en *Ornithopus compressus*, que muestran las variables ambientales que más influyeron en la composición de la microbiota endofítica. En los análisis sólo se consideraron las especies con frecuencia de aislamiento superior a 4. El nombre completo de las especies de hongos se puede observar en la tabla 7. Prec.: precipitación anual, Temp.: temperatura y root-sha.:  $^2\sqrt{\text{sombra}}$ .

## 4.2. INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA ENDOFÍTICA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL PASTO.

### 4.2.1. Efectos sobre la producción de biomasa aérea y radicular.

#### *Trifolium subterraneum*.

La inoculación del endófito, independientemente de la especie, no causó síntomas de enfermedad en las plantas. En el caso del *Trifolium subterraneum* en invernadero, la producción de materia seca del forraje fue afectada significativamente ( $P < 0,05$ ) por los dos factores principales considerados, "Endófito" y "Fecha de siembra", pero no por su interacción (Tabla 11).

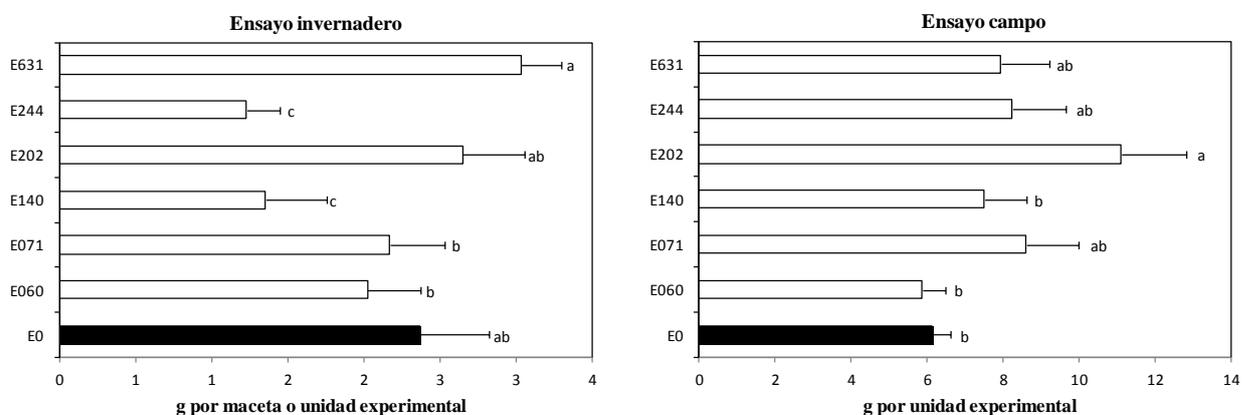
**Tabla 11** ANOVA de dos vías en *Trifolium subterraneum* que muestra el efecto del endófito, fecha de siembra y su interacción sobre la biomasa forrajera (MSA) y radicular (MSR) en ambos ensayos (condiciones de invernadero y campo). En la primera fila se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) de cada una de las variables indicadas.

	Ensayo de invernadero			Ensayo de campo		
	Endófito	Fecha de siembra	Endó * Fecha	Endófito	Fecha de siembra	Endó * Fecha
DF	6	1	6	6	1	6
MSA	6,05***	18,75***	1,50	2,37*	0,43	1,38
MSR	2,50*	3,45	2,28*	--	--	--

MSA: materia seca aérea y MSR: materia seca radicular.

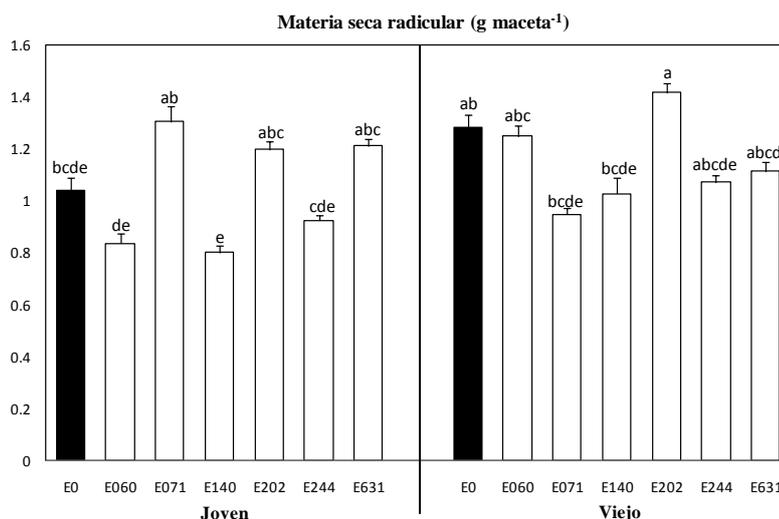
En condiciones de invernadero, la inoculación con E631 (*Epicoccum nigrum*) y E202 (*Chaetosphaeronema* sp.), comparándolo con las plantas control, tuvo una tendencia a incrementar la producción del forraje de *Trifolium subterraneum*, aunque sin diferencias significativas. Por el contrario E244 (Pleosporales sp.) y E140 (*Stemphylium globuliferum*) provocaron una reducción significativa en el rendimiento del forraje en comparación con los controles (Figura 14). En cuanto al efecto "Fecha de siembra", las plantas consideradas como "Viejo" (aquellas sembradas antes) tuvieron una producción de forraje (materia seca aérea) significativamente superior al de las plantas "Joven" (aquellas sembradas más tardíamente) con valores de  $2,57 \pm 0,18$  g maceta<sup>-1</sup> (media  $\pm$  error estándar) y  $1,66 \pm 0,20$  g maceta<sup>-1</sup>, respectivamente. En el ensayo de campo se estudió exclusivamente la materia seca aérea (MSA). En este caso, el test ANOVA mostró una influencia significativa del endófito en la producción de forraje (Tabla 11). En las condiciones de campo, las plantas inoculadas con el E202

(*Chaetosphaeronema* sp.) produjeron una mayor cantidad de materia seca aérea en comparación con cualquier otro tratamiento, incluyendo los controles (Figura 14).



**Figura 14** Contenido en materia secas aerea de *Trifolium subterraneum* para cada endófito inoculado en los ensayos de invernadero (izquierda) y campo (derecha). Las barras horizontales indican las medias mientras que las líneas horizontales el error estándar. Para cada ensayo las mismas letras indican que no hay diferencias significativas en el test LSD con nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. El tratamiento de control fue E0, mientras que E060: *Fusarium lateritium*; E071: *Sordaria fimicola*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp. y E631: *Epicoccum nigrum*.

En el caso de la materia seca radicular, el efecto principal "Endófito" y la interacción entre la "Fecha de siembra \* Endófito" tuvieron una influencia significativa sobre ésta en el ensayo de invernadero (Tabla 11). En este caso, los endófitos E071 (*Sordaria fimicola*), E631 (*Epicoccum nigrum*) y E202 (*Chaetosphaeronema* sp.) aumentaron la producción de raíces en las plantas "jóvenes", es decir aquellas que se sembraron más tarde. Mientras que en las plantas sembradas con anterioridad (consideradas como "Viejo"), de nuevo *Chaetosphaeronema* sp. aumentó la biomasa radicular, aunque sin diferencias significativas con las plantas control (Figura 15).



**Figura 15** Contenido en materia seca radicular en función de la edad de la planta (plantas "joven" y plantas "viejo") en *Trifolium subterraneum* cuando se inocula con cada endófito en condiciones de invernadero. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. El tratamiento de control fue E0, mientras que E060: *Fusarium lateritium*; E071: *Sordaria fimicola*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp. y E631: *Epicoccum nigrum*.

### *Ornithopus compressus*.

Por otra parte, en *Ornithopus compressus* la producción de materia seca del forraje no se vió afectada significativamente ( $P > 0,05$ ) por ninguno de los factores principales ni por la interacción (Tabla 12). El contenido en materia seca aérea por maceta varió entre 0,63 - 1,55 g maceta<sup>-1</sup>, cuando las plantas se inocularon con *Sporormiella pilosa* (E636) y *Sordaria fimicola* (E071), respectivamente.

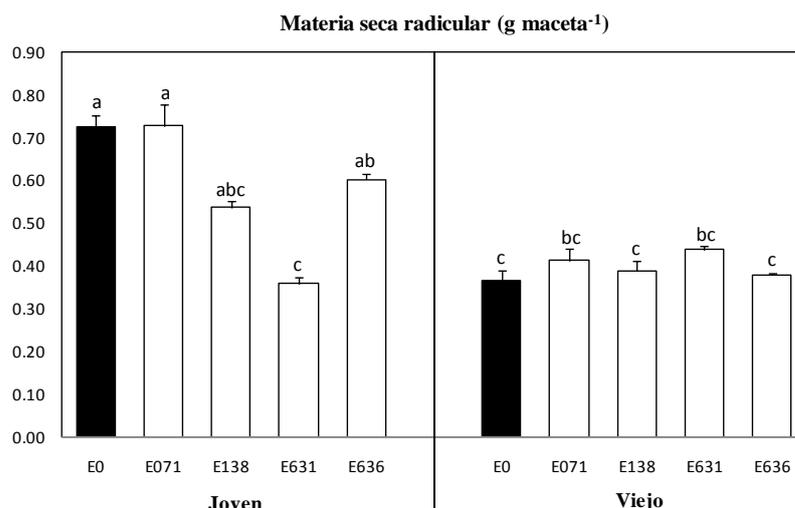
**Tabla 12** ANOVA de dos vías de *Ornithopus compressus* para cada parámetro evaluado. En la segunda columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.

Fuente	DF	MSA	MSR
Endófito	4	2,23	1,40
Fecha de siembra	1	0,34	16,61***
Endó * Fecha	4	1,21	2,94*

MSA: materia seca aérea y MSR: materia seca radicular.

En el caso de la materia seca radicular, la "Fecha de siembra", y la interacción "Endófito \* Fecha de siembra", tuvieron una influencia significativa sobre la biomasa radicular obtenida (Tabla 12). Cuando los datos de los tratamientos se consideraron agrupados, es decir al analizar

el efecto del factor "Fecha de siembra", las plantas más "Jóvenes", aquellas sembradas en último lugar, produjeron significativamente una biomasa radicular más elevada, (media  $\pm$  error estándar)  $0,59 \pm 0,03$  g maceta<sup>-1</sup>, que los obtenidos en las plantas más "Viejas", aquellas sembradas anteriormente,  $0,44 \pm 0,02$  g maceta<sup>-1</sup>. En cuanto a la interacción "Endófito \* Fecha de siembra" se observó (Figura 16) que en el caso de las plantas jóvenes se muestra una clara influencia de *Epicoccum nigrum* (E631) el cual reduce significativamente el contenido de materia seca radicular en un 49 %, respecto al control.



**Figura 16** Contenido en materia seca radicular en función de la edad de la planta en *Ornithopus compressus* cuando se inocula con cada endófito en invernadero. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E138: *Embellisia leptinellae*; E631: *Epicoccum nigrum* y E636: *Sporormiella pilosa*.

### *Poa pratensis*.

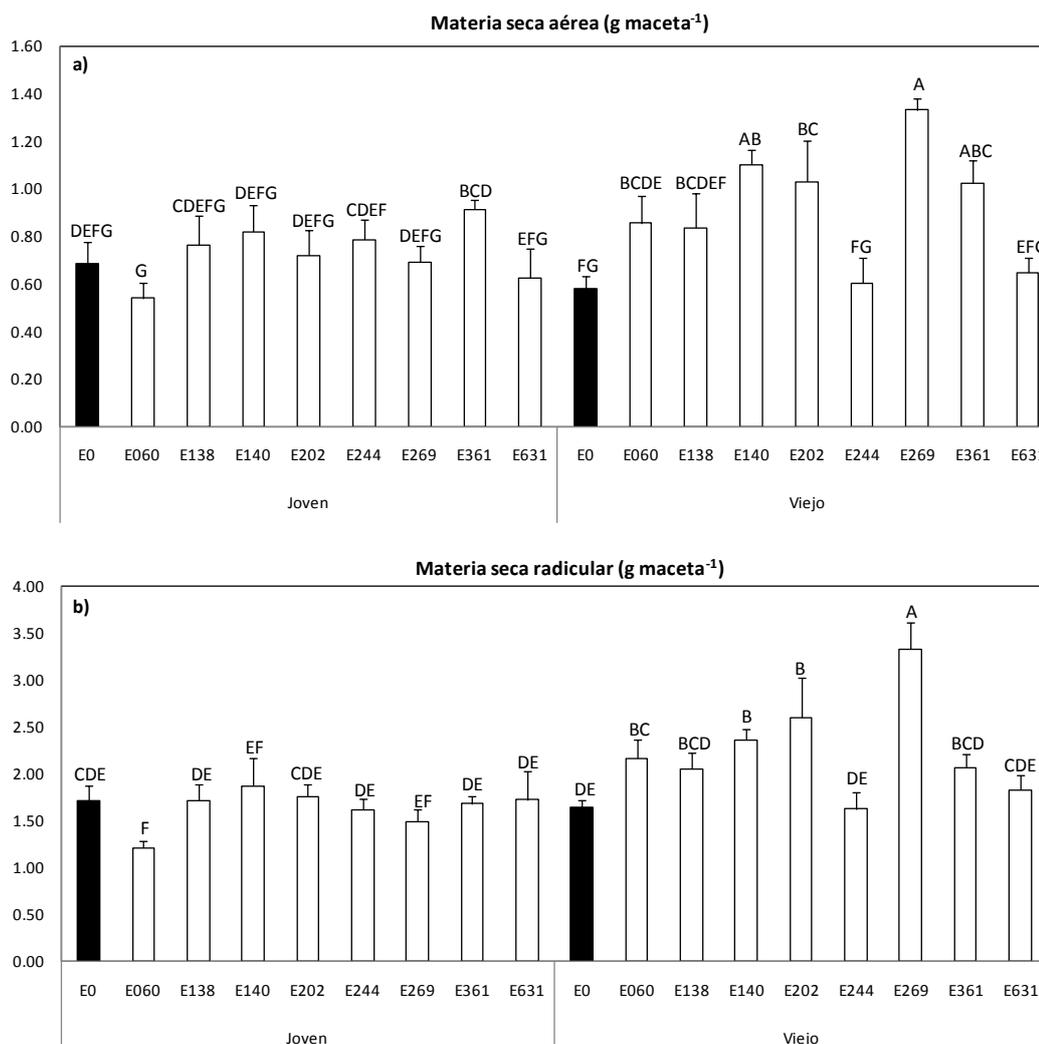
En el caso de *Poa pratensis*, tanto los factores principales como su interacción tuvieron una influencia significativa ( $P < 0,05$ ) en las dos variables respuesta, tanto en la producción de biomasa aérea como en la radicular (Tabla 13).

**Tabla 13** ANOVA de dos vías en *Poa pratensis* para cada parámetro evaluado. En la segunda columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.

Fuente	DF	MSA	MSR
Endófito	8	4,66***	3,84***
Fecha de siembra	1	14,63***	50,80***
Endó * Fecha	8	3,81***	5,51***

MSA: materia seca aérea y MSR: materia seca radicular.

En el caso del efecto principal "Endófito", *Penicillium* sp. (E269) mostró casi un 40 % más de rendimiento en materia seca aérea en comparación con el tratamiento control (1,01 y 0,63 g maceta<sup>-1</sup>, respectivamente). Mientras que los endófitos que menor biomasa aérea produjeron fueron E140 (*Stemphylium globuliferum*), E202 (*Chaetosphaeronema* sp.), y E361 (CODE361). Con respecto a la biomasa radicular, los endófitos E202 (*Chaetosphaeronema* sp.) y E269 (*Penicillium* sp.) produjeron mayor biomasa por maceta en comparación con el tratamiento control, con 2,17 y 2,41 g maceta<sup>-1</sup>, respectivamente, en comparación con 1,67 g maceta<sup>-1</sup> del control. La biomasa aérea y radicular presentaron una gran correlación ( $R^2 = 0,71$ ). Respecto a la interacción "Endófito \* Fecha de siembra", se pudo observar que en el caso de la materia seca aérea (Figura 17 a), en las plantas sembradas más tarde (Jóvenes) no se observó ninguna diferencia significativa entre tratamientos, mientras que en el caso de las plantas viejas (sembradas antes) todos los endófitos excepto Pleosporales sp. (E244), y *Epicoccum nigrum* (E631) aumentaron el contenido de materia seca con un máximo de (1,33 ± 0,05) correspondiente a *Penicillium* sp. (E269) y un mínimo de (0,60 ± 0,11) cuando se inoculaba E138 (*Embellisia leptinellae*) (Figura 17 a). En el caso de la materia seca radicular para las plantas "Jóvenes", el endófito E060 (*Fusarium lateritium*) redujo el contenido de MSR en un 30 %, mientras que en el caso de las plantas más viejas, todas las especies endofíticas excepto Pleosporales sp., CODE361 y *Epicoccum nigrum*, aumentaron el contenido entre un 33 - 103 % de materia seca radicular (Figura 17 b). Cuando comparamos en su conjunto las plantas jóvenes y viejas sin tener en cuenta el endófito inoculado, se observó que la materia seca aérea producida por las plantas viejas era mayor que la de las jóvenes (0,89 y 0,73 g maceta<sup>-1</sup>, respectivamente). Al igual ocurrió con el sistema radicular con 2,18 y 1,64 g maceta<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 17** Efecto de la interacción endófito \* fecha de siembra (plantas "joven": aquellas sembradas más tarde; plantas "viejo": aquellas sembradas en primer lugar) en (a) materia seca aérea y (b) materia seca radicular de *Poa pratensis*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representó los valores sin transformar. E0: Control; E060: *Fusarium lateritium*; E138: *Embellisia leptinellae*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema sp.*; E244: Pleosporales *sp.*; E269: *Penicillium sp.*; E361: CODE361 y E631: *Epicoccum nigrum*.

#### 4.2.2. Efectos sobre el valor nutritivo.

##### *Trifolium subterraneum*.

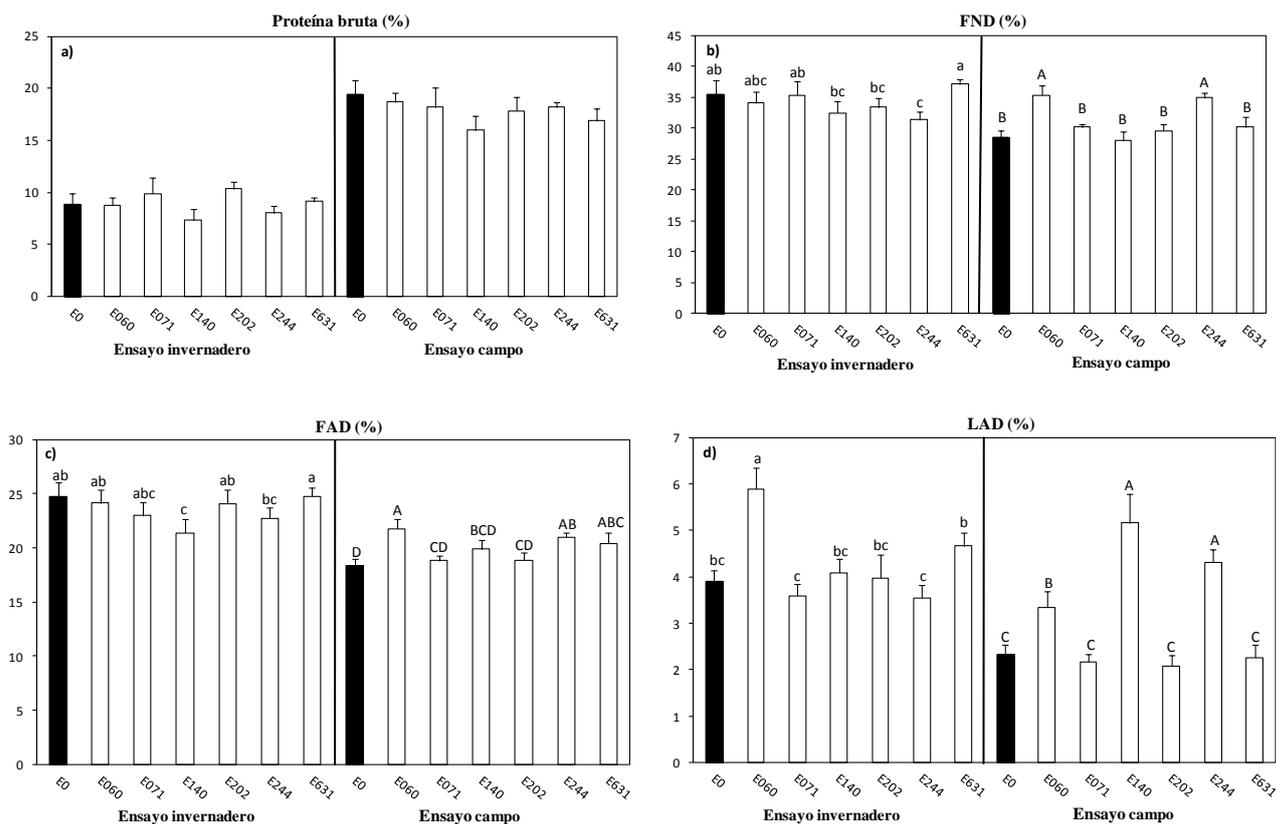
En el ensayo de invernadero de *Trifolium subterraneum*, los factores principales "Endófito" y "Fecha de siembra", tuvieron una influencia significativa ( $P < 0,05$ ) sobre la fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y sobre la lignina ácido detergente (LAD) (Tabla 14). La interacción entre ambos efectos no resultó significativa para ningún parámetro.

**Tabla 14** ANOVA de dos vías de *Trifolium subterraneum* que muestra el efecto del endófito, fecha de siembra y su interacción en cada parámetro evaluado en ambos ensayos (condiciones de invernadero y campo). En la primera fila se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) de cada una de las variables indicadas.

	Ensayo de invernadero			Ensayo de campo		
	Endófito	Fecha de siembra	Endó * Fecha	Endófito	Fecha de siembra	Endó * Fecha
DF	6	1	6	6	1	6
PB	1,30	0,08	0,66	0,81	1,53	0,36
FND	3,15*	39,16***	1,13	7,77***	1,82	1,70
FAD	3,09*	47,42***	0,62	3,99**	2,99	1,51
LAD	8,81***	11,80**	1,13	19,62***	4,72*	0,87

PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente y LAD: lignina ácido detergente.

El contenido de proteína bruta (PB) del forraje en el ensayo de invernadero comprendió entre 10,35 y 7,32 %, aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni fechas de siembra (Figura 18 a). En el caso de la fibra neutro detergente (FND) y de la fibra ácido detergente (FAD), ninguno de los endófitos causó un aumento significativo comparándolo con los controles. Por el contrario, la inoculación con los endófitos E244 (*Pleosporales sp.*) y E140 (*Stemphylium globuliferum*) proporcionó los valores más bajos de FND (31,35 y 32,45 %) y FAD (22,73 y 21,41 %), respectivamente, en comparación con los obtenidos en los controles (Figura 18 b, c). Por el contrario, en el caso de la lignina ácido detergente (LAD), las plantas inoculadas con el endófito E060 (*Fusarium lateritium*) presentaron valores significativamente más elevados que los encontrados en los controles (5,9 y 3,9 %, respectivamente) (Figura 18 d). En cuanto al efecto principal "Fecha de siembra" en condiciones de invernadero, las plantas consideradas como "Viejo" (las sembradas primero), mostraron valores más elevados de FND, FAD y LAD (36,86; 25,39 y 4,60 %, respectivamente) en comparación con las plantas "Jóvenes", sembradas más tarde (31,55; 21,73 y 3,88 %, respectivamente) (Tabla 15). En el ensayo de campo, aunque sin analizar estadísticamente, la proteína bruta mostró valores mucho más elevados que los obtenidos en el ensayo de invernadero ( $17,9 \pm 0,5$  y  $8,9 \pm 0,3$  %, respectivamente) (Figura 18 a).



**Figura 18** Influencia del efecto principal sobre los parámetros de calidad (a) PB: proteína bruta; b) FND: fibra neutro detergente; c) FAD: fibra ácido detergente; d) LAD: lignina ácido detergente) de *Trifolium subterraneum* cuando se inocula con cada endófito en invernadero y campo. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro y ensayo la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras, indica que no fue significativo. E0: Control; E060: *Fusarium lateritium*; E071: *Sordaria fimicola*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp. y E631: *Epicoccum nigrum*.

Con respecto a los valores específicos del ensayo de campo, al igual que en el ensayo en invernadero, ninguno de los factores analizados ("Fecha de siembra", "Endófito" y la interacción de ambos) mostró influencia significativa sobre el contenido de proteína bruta (PB) del forraje (Tabla 15). Los valores de PB en el forraje del ensayo de campo oscilaron entre 19,46 y 16,88 % del tratamiento control y *Epicoccum nigrum* (E631), respectivamente. También al igual que en el ensayo de invernadero, el factor principal "Endófito" tuvo una influencia significativa ( $P < 0,05$ ) sobre la FND, FAD y LAD (Tabla 15).

**Tabla 15** Media  $\pm$  error estándar de los diferentes parámetros medidos en *Trifolium subterraneum* que fueron significativos ( $P < 0,05$ ) para el test LSD para la variable principal "Fecha de siembra" de acuerdo con el resultado obtenido en el test ANOVA de dos vías, realizado en los ensayos de invernadero y campo. Para cada parámetro, las medias con diferente letra son significativamente diferentes según el test de LSD.

	Joven	Viejo
Ensayo de invernadero		
FND (%)	31,55 $\pm$ 0,74 B	36,86 $\pm$ 0,68 A
FAD (%)	21,73 $\pm$ 0,41 B	25,39 $\pm$ 0,45 A
LAD (%)	3,88 $\pm$ 0,22 B	4,60 $\pm$ 0,23 A
Ensayo de campo		
LAD (%)	2,87 $\pm$ 0,2 B	3,32 $\pm$ 0,32 A

FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente y  
LAD: lignina ácido detergente.

La inoculación con ninguno de los endófitos causó una reducción en cualquiera de estos parámetros en el forraje en comparación con los controles. Por el contrario, la inoculación con E060 (*Fusarium lateritium*) y E244 (Pleosporales sp.) proporcionó forrajes con valores más elevados de FND, FAD y LAD que los controles (Figura 18 b, c, d). Además, el endófito E140 (*Stemphylium globuliferum*) produjo forraje con los valores más elevados en LAD (Figura 18 d). La "Fecha de siembra" sólo afectó significativamente a la LAD, cuando del ensayo de campo se trata (Tabla 15). En este caso, las plantas consideradas como "Viejo" tenían una LAD más elevada que las plantas jóvenes (3,32 y 2,87 %, respectivamente).

#### *Ornithopus compressus*.

En el caso de *Ornithopus compressus*, el efecto principal "Endófito" afectó significativamente ( $P < 0,05$ ) a la proteína bruta (PB), cenizas totales y lignina (LAD), aunque en esta última, el efecto fue influenciado también por la "Fecha de siembra" (Tabla 16).

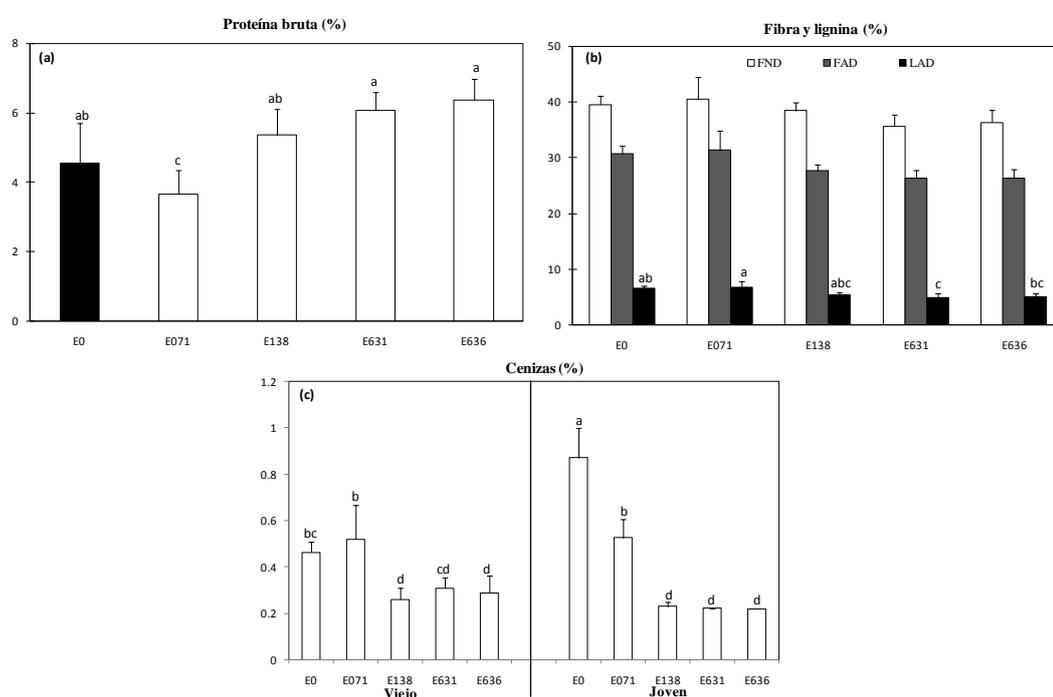
**Tabla 16** ANOVA de dos vías de *Ornithopus compressus* para cada parámetro evaluado. En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.

Fuente	DF	PB	FND	FAD	LAD	Cenizas
Endófito	4	3,01*	1,05	1,95	2,73*	22,60***
Fecha de siembra	1	2,13	8,88**	5,86*	10,86**	0,42
Endó * Fecha	4	0,78	0,55	0,45	0,92	4,91**

PB: proteína bruta, FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente y cenizas totales.

La inoculación con E071 (*Sordaria fimicola*) redujo el contenido de PB comparándolo con los obtenidos con los demás tratamientos (3,66 %) (Figura 19 a). Por el contrario, las plantas

inoculadas con el endófito E631 (*Epicoccum nigrum*) presentaron valores de LAD significativamente más bajos que los encontrados en los controles (4,82 y 6,51 %, respectivamente) (Figura 19 b). En cuanto al contenido total de ceniza (Figura 19 c), para las plantas del grupo "Viejo", aquellas sembradas antes, los endófitos E138 (*Embellisia leptinellae*) y E636 (*Sporormiella pilosa*), mostraron valores inferiores a los obtenidos en los controles. En cuanto a las plantas incluidas dentro del grupo "Joven", aquellas sembradas más tarde, todos los endófitos redujeron el contenido de cenizas del forraje con respecto a las plantas control. En cuanto a las fechas de siembra, únicamente en las plantas control hubo diferencias significativas en este parámetro, claramente a favor de las plantas incluidas en el grupo "Joven" (Figura 19 c).



**Figura 19** Parámetros de calidad (a) PB: proteína bruta; b) FND: fibra neutro detergente; y FAD: fibra ácido detergente; c) LAD: lignina ácido detergente y cenizas) de *Ornithopus compressus* cuando se inocula con cada endófito en condiciones de invernadero. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras, indica que no fue significativo el efecto según ANOVA. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E138: *Embellisia leptinellae*; E631: *Epicoccum nigrum* y E636: *Sporormiella pilosa*.

Como era de esperar, se observó un efecto significativo del efecto principal "Fecha de siembra", en la mayoría de los parámetros de calidad del forraje (FND, FAD y LAD) (Tabla 16). Para los tres parámetros mencionados, los valores más elevados se alcanzaron significativamente en las plantas con mayor edad "Viejo" (media  $\pm$  error estándar)  $38,2 \pm 1,4$ ;  $28,5 \pm 1,2$  y  $5,7 \pm 0,5$

%, en comparación con las plantas "Jóvenes" ( $35,4 \pm 1,6$ ;  $26,6 \pm 1,4$  y  $4,9 \pm 0,5$  %), para los FND, FAD y LAD, respectivamente.

### *Poa pratensis*.

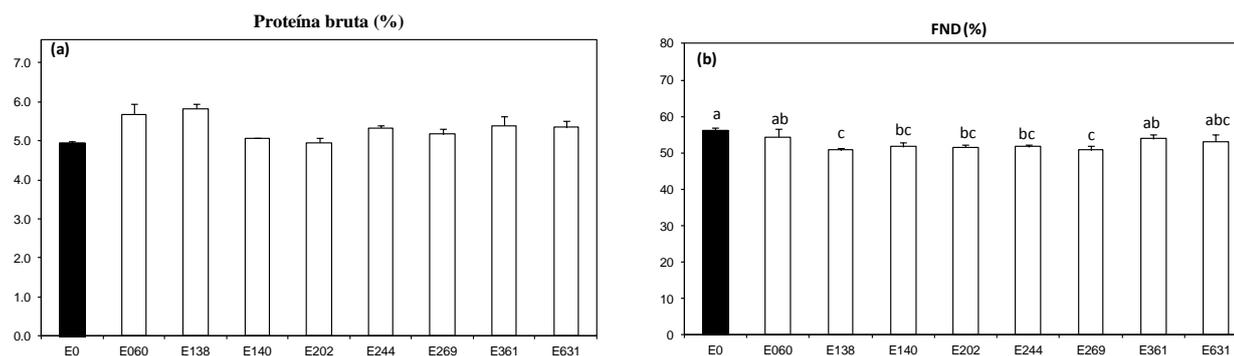
En el caso de *Poa pratensis*, sólo se analizó la influencia del endófito sobre la proteína bruta (PB) y sobre la fibra neutro detergente (FND). En este caso, el efecto del endófito sólo fue significativo sobre la FND (Tabla 17).

**Tabla 17** ANOVA de una vía en *Poa pratensis* para cada parámetro evaluado (PB y FND). En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.

Fuente	DF	PB	FND
Endófito	8	0,92	3,01*

PB: proteína bruta y FND: fibra neutro.

Los valores de PB oscilaron entre 4,96 y 5,82 % (Figura 20 a). Con respecto a la FND, la inoculación con cualquiera de los siguientes endófitos, E138 (*Embellisia leptinellae*), E140 (*Stemphylium globuliferum*), E202 (*Chaetosphaeronema* sp.), E244 (Pleosporales sp.) y E269 (CODE 269), causó una reducción significativa (alrededor del 5 %) en su valor, en comparación con los obtenidos en los controles que mostraron valores próximos a 56 % (Figura 20 b).



**Figura 20** Influencia del efecto endófito en (a) proteína bruta y (b) fibra neutro detergente (FND) en *Poa pratensis*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras, indica que no fue significativo el efecto según ANOVA. E0: Control; E060: *Fusarium lateritium*; E138: *Embellisia leptinellae*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp.; E269: *Penicillium* sp.; E361: CODE361 y E631: *Epicoccum nigrum*.

Ninguno de los endófitos estudiados causó una reducción significativa en proteína bruta, ni un aumento significativo de la FND en comparación con los controles (Figura 20 a, b).

#### 4.2.3. Efecto sobre la acumulación de minerales.

##### *Trifolium subterraneum*.

En el ensayo de invernadero de *Trifolium subterraneum*, la inoculación con los endófitos afectó de manera significativa a la concentración de Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mn, Mo, Na, Pb y Zn, en el forraje de las plantas (Tabla 18).

**Tabla 18** ANOVA de dos vías de *Trifolium subterraneum* que muestra el efecto del endófito, fecha de siembra y su interacción en cada parámetro evaluado en ambos ensayos (condiciones de invernadero y campo). En la primera fila se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) de cada una de las variables indicadas.

	Ensayo de invernadero			Ensayo de campo		
	Endófito	Fecha de siembra	Endó * Fecha	Endófito	Fecha de siembra	Endó * Fecha
DF	6	1	6	6	1	6
Al	12,81***	0,53	3,36*	2,71*	3,63	1,11
B	2,22	1,90	3,15*	2,58*	0,00	0,57
Ca	9,29***	4,91*	0,92	1,54	1,12	0,53
Cd	8,34***	20,10***	2,94*	1,34	0,24	0,31
Cr	3,92**	1,53	1,78	2,23	3,37	0,57
Cu	3,77**	3,97	1,26	3,87**	0,00	0,51
Fe	4,73**	2,01	2,09	2,57*	4,02	1,26
K	2,61*	12,63**	1,74	2,11	0,36	1,22
Li	0,88	13,64**	1,81	2,61*	2,49	1,07
Mg	1,83	5,55*	0,48	0,79	0,50	0,18
Mn	3,41*	9,22**	1,39	0,24	0,34	0,19
Mo	3,47*	2,17	1,20	2,34	0,60	1,85
Na	6,43**	2,22	2,69*	1,40	1,92	0,47
Ni	0,53	0,69	0,70	1,44	2,56	0,31
P	1,56	6,39*	2,39	2,30	0,08	0,63
Pb	76,88***	3,33	0,84	5,22**	1,96	1,13
S	2,26	4,63*	1,29	1,38	1,22	0,56
Zn	2,83*	2,87	1,70	2,65*	0,70	0,74

Las plantas inoculadas con E060 (*Fusarium lateritium*) tuvieron una menor concentración de Al, Cr y Fe (aproximadamente el 66, 82 y 45 % inferior, respectivamente) y una mayor concentración de Pb (más de 3 veces) en comparación con los controles (Tabla 20). Del mismo modo, E140 (*Stemphylium globuliferum*) causó una acumulación mayor de Ca, Cd, Cu, Mn, Pb y Zn (más de 31, 217, 66, 14, 305 y 60 %, respectivamente) y menores concentraciones de Al, Cr y Na (aproximadamente del 73, 88 y 33 % menos, respectivamente) en comparación con los controles (Tabla 20). La concentración de Al fue también menor (un 60

y 73 % menos, respectivamente) en las plantas inoculadas con E202 (*Chaetosphaeronema* sp.) y E244 (Pleosporales sp.) que en los controles. Sin embargo el endófito E244 causó una menor acumulación de Fe (48 %) y una mayor concentración de K y Pb (más de 72 y 225 %) en comparación con los controles (Tabla 20). Finalmente, E631 (*Epicoccum nigrum*) proporcionó forraje con menores concentraciones en Cd, Fe, Mo y Pb (un 100, 43, 82 y 80 % menos, respectivamente) en comparación con las plantas control. También se encontró una influencia significativa de la "Fecha de siembra" en la concentración de minerales (Tabla 18). En todos los casos fue mayor en las plantas "Jóvenes" que en las plantas "Viejas" (Tabla 19).

**Tabla 19** Media  $\pm$  error estándar de los diferentes parámetros medidos en *Trifolium subterraneum* que fueron significativos ( $P < 0,05$ ) para el test LSD para la variable respuesta "Fecha de siembra" de acuerdo con el resultado obtenido en el test ANOVA de dos vías, realizado en los ensayos de invernadero y campo. Para cada parámetro, las medias con diferente letra son significativamente diferentes según el test de LSD ( $\alpha = 0,05$ ). Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar.

	Joven	Viejo
Ensayo de invernadero		
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	21,56 $\pm$ 0,74 A	19,96 $\pm$ 0,82 B
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	0,14 $\pm$ 0,02 A	0,06 $\pm$ 0,02B
K (g kg <sup>-1</sup> )	8,08 $\pm$ 0,70 A	5,42 $\pm$ 0,55 B
Li (mg kg <sup>-1</sup> )	2,30 $\pm$ 0,11 A	1,79 $\pm$ 0,11B
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	5,55 $\pm$ 0,13 A	5,10 $\pm$ 0,15B
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	209,1 $\pm$ 0,14 A	1667 $\pm$ 16,7 B
P (g kg <sup>-1</sup> )	2,29 $\pm$ 0,14 A	1,86 $\pm$ 0,15 B
S (g kg <sup>-1</sup> )	5,98 $\pm$ 0,30 A	5,17 $\pm$ 0,37 B

En el ensayo de campo, sólo en el caso de Al, B, Cu, Fe, Li, Pb y Zn, las concentraciones de minerales se vieron afectadas significativamente por la inoculación con el endófito (Tabla 18). Ni el factor principal fecha de siembra, ni la interacción con el endófito tuvieron influencia significativa sobre ninguno de los minerales analizados (Tabla 18). La inoculación con el endófito E140 (*Stemphylium globuliferum*) proporcionó los valores más elevados de Al, Fe y Li; por el contrario la inoculación con E071 (*Sordaria fimicola*) produjo los valores más bajos, aunque en ambos casos sin diferencias significativas en comparación con las plantas control (Tabla 20). Para los minerales B y Cu, E140 (*Stemphylium globuliferum*) provocó una menor acumulación respecto de los controles, mientras que ningún otro endófito aumentó su acumulación. Además este provocó un aumento del plomo en el forraje. Por último, los valores más elevados de Zn en el forraje fueron proporcionados por E202 (*Chaetosphaeronema* sp.) y los más bajos por E244 (Pleosporales sp.), aunque sin diferencias con los controles (Tabla 20).

**Tabla 20** Concentración (media  $\pm$  error estándar) de los minerales de *Trifolium subterraneum* obtenidos de cada endófito inoculado en cada ensayo (invernadero y campo).

Mineral	Ensayo	E0	E060	E071	E140	E202	E244	E631
Al (g kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	0,15 $\pm$ 0,06 ab	0,05 $\pm$ 0,01 de	0,15 $\pm$ 0,02 a	0,04 $\pm$ 0,00 de	0,06 $\pm$ 0,00 cd	0,04 $\pm$ 0,00 e	0,07 $\pm$ 0,01 bc
	Campo	1,60 $\pm$ 0,39 ABC	1,21 $\pm$ 0,19 BC	0,94 $\pm$ 0,26 C	3,01 $\pm$ 1,00 A	1,73 $\pm$ 0,28ABC	1,03 $\pm$ 0,10 BC	1,99 $\pm$ 0,54 AB
B (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	18,9 $\pm$ 2,3	18,4 $\pm$ 2,8	18,4 $\pm$ 1,9	23,7 $\pm$ 2,4	17,2 $\pm$ 1,9	22,3 $\pm$ 2,6	16,3 $\pm$ 1,2
	Campo	21,3 $\pm$ 0,7 A	20,0 $\pm$ 0,7 AB	21,9 $\pm$ 0,6 A	17,9 $\pm$ 1,2 B	21,1 $\pm$ 0,6 A	19,9 $\pm$ 0,6 AB	21,0 $\pm$ 1,2 A
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	19,9 $\pm$ 1,4 b	21,4 $\pm$ 1,0 b	20,1 $\pm$ 0,7 b	26,1 $\pm$ 1,5 a	16,4 $\pm$ 0,9 c	21,6 $\pm$ 1,2 b	19,9 $\pm$ 0,6 b
	Campo	16,1 $\pm$ 0,6	16,9 $\pm$ 1,1	17,4 $\pm$ 0,9	14,6 $\pm$ 1,0	15,6 $\pm$ 0,9	17,0 $\pm$ 0,9	15,2 $\pm$ 0,7
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	0,06 $\pm$ 0,04 bc	0,11 $\pm$ 0,06 c	0,08 $\pm$ 0,02 ab	0,19 $\pm$ 0,05 a	0,07 $\pm$ 0,03 abc	0,16 $\pm$ 0,04 ab	0,00 $\pm$ 0,00 d
	Campo	0,04 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,02
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	1,28 $\pm$ 0,57 a	0,23 $\pm$ 0,07 bc	1,41 $\pm$ 0,23 a	0,15 $\pm$ 0,07 c	0,99 $\pm$ 0,18 a	0,61 $\pm$ 0,05 ab	1,13 $\pm$ 0,43 ab
	Campo	16,2 $\pm$ 12,2	16,2 $\pm$ 3,1	1,8 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 1,0	34,4 $\pm$ 27,2	5,0 $\pm$ 2,3	54,6 $\pm$ 37,8
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	7,8 $\pm$ 1,4 bc	7,2 $\pm$ 1,3 c	8,5 $\pm$ 1,2 bc	13,0 $\pm$ 1,8 a	7,0 $\pm$ 0,7 c	10,3 $\pm$ 1,4 ab	6,4 $\pm$ 0,5 c
	Campo	10,7 $\pm$ 0,5 ABC	9,9 $\pm$ 0,6 BCD	10,6 $\pm$ 0,7 ABC	9,2 $\pm$ 0,3 D	11,7 $\pm$ 0,4 A	9,7 $\pm$ 0,2 CD	11,2 $\pm$ 0,4 AB
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	139,8 $\pm$ 45,8 ab	76,2 $\pm$ 6,3 c	146,6 $\pm$ 13,7 a	97,6 $\pm$ 10,3 bc	87,8 $\pm$ 3,4 bc	73,1 $\pm$ 9,5 c	79,8 $\pm$ 8,2 c
	Campo	1076 $\pm$ 293 ABC	775 $\pm$ 115 BC	590 $\pm$ 157 C	1817 $\pm$ 589 A	1179 $\pm$ 274 AB	633 $\pm$ 62 BC	1461 $\pm$ 490 AB
K (g kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	5,61 $\pm$ 1,31 bc	7,30 $\pm$ 1,83 abc	5,87 $\pm$ 1,03 bc	8,25 $\pm$ 1,32 ab	5,55 $\pm$ 1,06 bc	9,67 $\pm$ 1,52 a	5,00 $\pm$ 0,39 c
	Campo	23,7 $\pm$ 1,5	22,3 $\pm$ 1,2	25,4 $\pm$ 1,2	22,7 $\pm$ 2,0	24,6 $\pm$ 1,6	24,2 $\pm$ 1,2	19,9 $\pm$ 0,8
Li (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	1,99 $\pm$ 0,37	2,02 $\pm$ 0,20	2,06 $\pm$ 0,17	2,33 $\pm$ 0,29	1,81 $\pm$ 0,27	2,20 $\pm$ 0,27	1,91 $\pm$ 0,11
	Campo	2,04 $\pm$ 0,38 ABC	1,68 $\pm$ 0,23 BC	1,53 $\pm$ 0,28 C	3,26 $\pm$ 0,87 A	2,21 $\pm$ 0,23ABC	1,57 $\pm$ 0,20 C	2,60 $\pm$ 0,44 AB
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	5,18 $\pm$ 0,42	5,34 $\pm$ 0,12	5,13 $\pm$ 0,19	5,92 $\pm$ 0,35	4,84 $\pm$ 0,27	5,33 $\pm$ 0,36	5,53 $\pm$ 0,08
	Campo	2,97 $\pm$ 0,14	3,09 $\pm$ 0,16	3,27 $\pm$ 0,22	2,83 $\pm$ 0,18	3,04 $\pm$ 0,11	3,17 $\pm$ 0,14	3,01 $\pm$ 0,16
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	160,9 $\pm$ 34,0 b	158,2 $\pm$ 17,4 b	178,2 $\pm$ 17,8 b	291,0 $\pm$ 41,0 a	171,4 $\pm$ 24,5 b	198,0 $\pm$ 28,0 b	157,6 $\pm$ 2,8 b
	Campo	218,3 $\pm$ 22,6	218,6 $\pm$ 30,8	198,7 $\pm$ 19,6	222,7 $\pm$ 27,5	211,8 $\pm$ 22,8	218,1 $\pm$ 21,0	237,0 $\pm$ 21,6
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	0,51 $\pm$ 0,17 a	0,30 $\pm$ 0,13 a	0,44 $\pm$ 0,13 a	0,50 $\pm$ 0,16 a	0,26 $\pm$ 0,06 a	0,77 $\pm$ 0,22 a	0,09 $\pm$ 0,06 b
	Campo	0,59 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,25	0,30 $\pm$ 0,08	0,45 $\pm$ 0,15	0,46 $\pm$ 0,14	0,34 $\pm$ 0,21	0,68 $\pm$ 0,12
Na (g kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	6,74 $\pm$ 0,51 a	6,01 $\pm$ 0,40 a	6,05 $\pm$ 0,40 a	4,50 $\pm$ 0,30 b	6,12 $\pm$ 0,29 a	6,49 $\pm$ 0,39 a	6,68 $\pm$ 0,32 a
	Campo	1,51 $\pm$ 0,17	2,47 $\pm$ 0,46	2,00 $\pm$ 0,42	1,62 $\pm$ 0,35	1,70 $\pm$ 0,16	1,96 $\pm$ 0,52	3,00 $\pm$ 0,70
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	1,00 $\pm$ 0,22	0,65 $\pm$ 0,07	0,66 $\pm$ 0,16	0,75 $\pm$ 0,15	0,80 $\pm$ 0,13	0,83 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,31
	Campo	8,44 $\pm$ 4,57	10,10 $\pm$ 1,71	2,99 $\pm$ 0,49	6,00 $\pm$ 0,94	14,75 $\pm$ 9,73	4,95 $\pm$ 0,94	22,31 $\pm$ 13,49
P (g kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	1,61 $\pm$ 0,32	2,22 $\pm$ 0,42	2,07 $\pm$ 0,20	2,44 $\pm$ 0,35	1,96 $\pm$ 0,23	2,38 $\pm$ 0,37	1,85 $\pm$ 0,10
	Campo	1,80 $\pm$ 0,12	1,59 $\pm$ 0,12	1,80 $\pm$ 0,15	1,39 $\pm$ 0,17	1,92 $\pm$ 0,17	1,49 $\pm$ 0,09	1,80 $\pm$ 0,14
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	0,36 $\pm$ 0,07 c	1,18 $\pm$ 0,08 b	0,35 $\pm$ 0,03 c	1,46 $\pm$ 0,14 a	0,37 $\pm$ 0,03 c	1,17 $\pm$ 0,11 b	0,07 $\pm$ 0,02 d
	Campo	1,55 $\pm$ 0,31 BC	2,03 $\pm$ 0,15 B	1,08 $\pm$ 0,20 C	3,85 $\pm$ 0,90 A	1,71 $\pm$ 0,24 BC	2,02 $\pm$ 0,09 B	2,04 $\pm$ 0,55 B
S (g kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	4,80 $\pm$ 0,76	5,93 $\pm$ 0,67	5,32 $\pm$ 0,36	7,01 $\pm$ 0,81	5,03 $\pm$ 0,54	6,29 $\pm$ 0,86	4,66 $\pm$ 0,13
	Campo	1,97 $\pm$ 0,05	1,95 $\pm$ 0,06	2,05 $\pm$ 0,11	1,73 $\pm$ 0,16	2,00 $\pm$ 0,10	1,91 $\pm$ 0,05	2,05 $\pm$ 0,11
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	Invernadero	47,3 $\pm$ 8,3 bc	52,6 $\pm$ 7,7 abc	50,1 $\pm$ 6,1 bc	76,0 $\pm$ 10,7 a	48,4 $\pm$ 8,3 bc	64,3 $\pm$ 6,2 ab	39,7 $\pm$ 0,3 c
	Campo	31,1 $\pm$ 3,1 AB	26,0 $\pm$ 1,1 BC	30,3 $\pm$ 1,4 AB	25,7 $\pm$ 1,6 BC	34,8 $\pm$ 3,5 A	24,3 $\pm$ 1,5 C	31,1 $\pm$ 4,4 AB

Para cada parámetro las medias con la misma letra (minúsculas, ensayo de invernadero y mayúsculas, ensayo de campo) indica que no hay diferencias significativas entre endófitos según test LSD ( $\alpha = 0,05$ ). Aunque el test LSD se realizó en algunos casos con variables transformadas, los valores que se presentan son sin transformar para facilitar la interpretación. E0: Control; E060: *Fusarium lateritium*; E071: *Sordaria fimicola*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema* sp.; E244: Pleosporales sp.; E631: *Epicoccum nigrum*.

*Ornithopus compressus*.

En el caso de *Ornithopus compressus* el test ANOVA mostró que, mientras la inoculación de los endófitos afectó de manera significativa a la concentración de Al, B, Ca, Cu, K, Li, Mg, Mo, Na, P, Pb, Zn y S, la "Fecha de siembra" afectó a la concentración de Al, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, Pb, Zn y S en el forraje (Tabla 21). En este caso, la interacción entre ambos factores tampoco influyó significativamente sobre ninguno de los minerales analizados.

**Tabla 21** ANOVA de dos vías en *Ornithopus compressus* para cada parámetro evaluado. En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.

Fuente	DF	Al	B	Ca	Cu	Fe	K	Li	Mg
Endófito	4	6,55	2,87*	3,05*	3,98*	2,64	3,18*	6,02*	3,53*
Fecha de siembra	1	5,04*	2,15	0,01	9,34**	27,78***	6,26*	3,65	8,63**
Endó * Fecha	4	0,50	0,41	1,26	0,16	0,53	0,50	2,04	1,04
Fuente	DF	Mn	Mo	Na	P	Pb	S	Se	Zn
Endófito	4	2,12	4,61**	3,68*	3,66*	3,51*	4,70**	1,44	2,86*
Fecha de siembra	1	4,19	2,78	53,65***	23,44***	9,30**	13,02**	1,85	8,33**
Endó * Fecha	4	0,93	0,41	2,41	0,54	0,82	0,78	0,44	0,31

El test de comparaciones múltiples realizado sobre el efecto principal endófito mostró como las plantas inoculadas con el endófito E071 (*Sordaria fimicola*) tuvieron una menor concentración de Ca, Li y Pb (aproximadamente un 14, 20 y 27 % menos, respectivamente) en comparación con las plantas control (Tabla 22). El forraje de las plantas inoculadas con E138 (*Embellisia leptinellae*) mostró valores más elevados de B, Cu, Mg, Mo, Na y S (más de un 30, 44, 28, 108, 20 y 36 %, respectivamente) que los encontrados en los controles (Tabla 22). Por el contrario, las plantas inoculadas con *Sporormiella pilosa* (E636) o *Epicoccum nigrum* (E631) presentaron valores similares, con concentración de K, Mo, P, S y Zn más elevada (alrededor de un 44, 140, 33, 42 y 46 % más, respectivamente) que en los controles (Tabla 22). Las únicas diferencias entre los dos endófitos fue que *Sporormiella pilosa* también produjo una mayor concentración de Cu (40 % más alto que en los controles) y *Epicoccum nigrum* proporcionó forraje con una menor concentración de Pb (38 % menos) en relación con los controles.

**Tabla 22** Concentración de minerales (media  $\pm$  error estándar) en *Ornithopus compressus* obtenidos de cada uno de los endófitos inoculados en el ensayo de invernadero.

Mineral	E0	E071	E138	E631	E636
Al (mg kg <sup>-1</sup> )	91,5 $\pm$ 17,0	74,2 $\pm$ 7,8	81,9 $\pm$ 7,8	35,73 $\pm$ 5,3	48,2 $\pm$ 8,2
B (mg kg <sup>-1</sup> )	23,4 $\pm$ 2,0 b	22,0 $\pm$ 3,2 b	30,6 $\pm$ 1,2 a	27,6 $\pm$ 0,7 ab	26,5 $\pm$ 0,6 ab
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	15,5 $\pm$ 0,8 a	13,3 $\pm$ 1,1 b	16,3 $\pm$ 0,4 a	14,7 $\pm$ 0,3 ab	14,6 $\pm$ 0,6 ab
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	5,0 $\pm$ 0,5 c	5,6 $\pm$ 0,8 bc	7,2 $\pm$ 0,3 a	6,1 $\pm$ 0,4 abc	7,0 $\pm$ 0,3 ab
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	112,5 $\pm$ 17,2	98,5 $\pm$ 15,5	128,1 $\pm$ 17,2	70,7 $\pm$ 10,0	91,1 $\pm$ 15,7
K (g kg <sup>-1</sup> )	13,3 $\pm$ 2,3 c	13,4 $\pm$ 3,0 bc	15,8 $\pm$ 1,1 abc	20,1 $\pm$ 1,3 a	18,3 $\pm$ 1,6 a
Li (mg kg <sup>-1</sup> )	3,4 $\pm$ 0,2 ab	2,7 $\pm$ 0,3 c	3,9 $\pm$ 0,1 a	3,1 $\pm$ 0,3 bc	3,6 $\pm$ 0,3 ab
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	4,5 $\pm$ 0,3 b	4,4 $\pm$ 0,7 b	5,8 $\pm$ 0,2 a	5,1 $\pm$ 0,4 ab	5,1 $\pm$ 0,1 ab
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	223,8 $\pm$ 28,4	240,4 $\pm$ 38,9	318,3 $\pm$ 8,7	262,6 $\pm$ 19,3	278,1 $\pm$ 6,2
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	1,05 $\pm$ 0,3 c	1,46 $\pm$ 0,3 bc	2,18 $\pm$ 0,2 ab	2,36 $\pm$ 0,2 a	2,55 $\pm$ 0,1 a
Na (g kg <sup>-1</sup> )	6,2 $\pm$ 0,5 b	6,5 $\pm$ 0,8 ab	7,5 $\pm$ 0,6 a	5,9 $\pm$ 0,9 b	6,0 $\pm$ 0,4 b
P (g kg <sup>-1</sup> )	4,2 $\pm$ 0,8 bc	3,9 $\pm$ 0,8 c	5,3 $\pm$ 0,4 ab	5,5 $\pm$ 0,6 a	5,7 $\pm$ 0,4 a
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	2,6 $\pm$ 0,4 a	1,9 $\pm$ 0,2 b	2,0 $\pm$ 0,1 ab	1,6 $\pm$ 0,3 b	2,0 $\pm$ 0,2 ab
S (g kg <sup>-1</sup> )	8,2 $\pm$ 1,0 b	8,2 $\pm$ 1,7 b	11,2 $\pm$ 0,7 a	11,3 $\pm$ 1,3 a	12,0 $\pm$ 0,6 a
Se (mg kg <sup>-1</sup> )	0,52 $\pm$ 0,1	0,48 $\pm$ 0,1	0,84 $\pm$ 0,1	0,68 $\pm$ 0,1	0,57 $\pm$ 0,1
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	66,0 $\pm$ 11,3 c	70,1 $\pm$ 16,0 bc	90,8 $\pm$ 5,0 abc	88,2 $\pm$ 6,0 ab	96,4 $\pm$ 5,1 a

Para cada parámetro, las medias con la misma letra indican que no hay diferencias significativas según test LSD a un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó en algunos casos con variables transformadas, los valores que se presentan son sin transformar para facilitar la interpretación. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E138: *Embellisia leptinellae*; E631: *Epicoecum nigrum* y E636: *Sporeormiella pilosa*.

Con respecto al efecto de la "Fecha de siembra" sobre la acumulación de minerales en el forraje, las plantas "Viejas" mostraron concentraciones más elevadas de Al, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, Pb, S y Zn que en el forraje "Joven" (Tabla 23).

**Tabla 23** Concentraciones de cada uno de los minerales (media  $\pm$  error estándar) para el efecto principal "Fecha de siembra" (viejo: fecha de siembra temprana; joven: fecha de siembra tardía) en *Ornithopus compressus*. Los valores que se muestran aquí son los que fueron afectados significativamente ( $P < 0,05$ ) según ANOVA. Aunque el test LSD se realizó en algunos casos con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar.

	Viejo	Joven
Al (mg kg <sup>-1</sup> )	77,0 $\pm$ 9,9	58,0 $\pm$ 7,0
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	6,4 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,4
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	108,7 $\pm$ 12,7	76,1 $\pm$ 6,0
K (g kg <sup>-1</sup> )	16,7 $\pm$ 1,0	14,3 $\pm$ 1,3
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	5,2 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,3
Na (g kg <sup>-1</sup> )	6,9 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,2
P (g kg <sup>-1</sup> )	5,2 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,3
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	2,1 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1
S (g kg <sup>-1</sup> )	10,5 $\pm$ 0,6	8,8 $\pm$ 0,7
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	87,8 $\pm$ 5,3	72,6 $\pm$ 6,1

*Poa pratensis*.

Para *Poa pratensis* la concentración de: Al, B, Ca, Cr, Fe, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Se, Sr, Ti y Zn, se vio afectada significativamente por la inoculación del endófito de acuerdo con el ANOVA (Tabla 24).

**Tabla 24** ANOVA de una vía en *Poa pratensis* para cada parámetro evaluado. En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.

Fuente	DF	Al	B	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Li
Endófito	8	7,67***	3,30*	3,98***	8,90***	1,46	24,98***	1,94	3,73**
Fuente	DF	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P	Pb	S
Endófito	8	4,39**	3,40*	2,87*	1,86	7,19***	5,26**	2,02	2,40
Fuente	DF	Se	Sr	Ti	Zn				
Endófito	8	4,90**	5,51**	8,58***	3,64*				

Cuando se inoculó el endófito E631 (*Epicoccum nigrum*), el forraje presentó una mayor concentración de Al, Mo y Ti (aproximadamente cinco veces mayor en el caso de Al y Ti y dos veces más para Mo) en comparación con los otros tratamientos, y una mayor concentración de B, Fe, Li y Ni (un 20, 64, 22 y 28 % más, respectivamente) en comparación con el tratamiento control (Tabla 25). El endófito E361 (CODE361) también aumentó la acumulación de B, Ca, Mg, Ni y Sr en el forraje en comparación con el tratamiento control (un 20, 12, 15, 27 y 15 % más, respectivamente) (Tabla 25). Por el contrario, E244 (Pleosporales sp.) causó un descenso en la concentración de Ca, Cr, Ni, P, Se y Zn acumulado en el forraje, en comparación con los controles (Tabla 25). El forraje de las plantas inoculadas con *Embellisia leptinellae* (E138) mostraron valores inferiores de Cr, Mn, P y Se que los encontrados en los controles (alrededor de un 65, 11, 18 y 51 % menos, respectivamente) (Tabla 25). La inoculación con E140 (*Stemphylium globuliferum*) produjo una mayor acumulación en planta de Ca, Mg y Sr que la observada en las plantas control (0,90 g kg<sup>-1</sup>, 0,36 g kg<sup>-1</sup>, 77,68 mg kg<sup>-1</sup> y 0,78 g kg<sup>-1</sup>, 0,31 g kg<sup>-1</sup> y 68,07 mg kg<sup>-1</sup> más, respectivamente). También causó una concentración significativamente menor de Cr y Se (2,70 y 1,12 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente) que en las plantas no infectadas (6,37 y 1,73 mg kg<sup>-1</sup>) (Tabla 25).

**Tabla 25** Concentración de los minerales (media  $\pm$  error estándar) en el forraje de *Poa pratensis* obtenidos de cada uno de los endófitos inoculados en invernadero.

	<b>E0</b>	<b>E060</b>	<b>E138</b>	<b>E140</b>	<b>E202</b>	<b>E244</b>	<b>E269</b>	<b>E361</b>	<b>E631</b>
Al (mg kg <sup>-1</sup> )	25,76 $\pm$ 6,41bc	52,17 $\pm$ 16,28b	25,14 $\pm$ 4,23bc	34,47 $\pm$ 2,58bc	25,67 $\pm$ 5,57bc	18,54 $\pm$ 2,14c	30,10 $\pm$ 3,19bc	42,58 $\pm$ 13,81bc	161,26 $\pm$ 65,49a
B (mg kg <sup>-1</sup> )	9,14 $\pm$ 0,41bcd	9,27 $\pm$ 1,16bcd	9,71 $\pm$ 0,51abcd	10,91 $\pm$ 0,33ab	8,84 $\pm$ 0,61cd	8,16 $\pm$ 0,12d	10,44 $\pm$ 0,83abc	11,34 $\pm$ 0,60a	11,30 $\pm$ 1,44a
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	0,78 $\pm$ 0,05b	0,78 $\pm$ 0,05b	0,81 $\pm$ 0,05ab	0,90 $\pm$ 0,03a	0,75 $\pm$ 0,06bc	0,67 $\pm$ 0,04c	0,80 $\pm$ 0,03ab	0,88 $\pm$ 0,02a	0,84 $\pm$ 0,02ab
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	6,37 $\pm$ 1,35ab	8,62 $\pm$ 0,48a	2,21 $\pm$ 0,55d	2,70 $\pm$ 0,08cd	4,41 $\pm$ 0,65bc	2,69 $\pm$ 0,69cd	4,49 $\pm$ 0,39bc	6,47 $\pm$ 0,66ab	7,01 $\pm$ 2,40ab
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	5,23 $\pm$ 0,39	6,05 $\pm$ 0,41	5,01 $\pm$ 0,50	5,69 $\pm$ 0,73	5,14 $\pm$ 0,27	4,38 $\pm$ 0,70	4,98 $\pm$ 0,36	5,05 $\pm$ 0,39	5,62 $\pm$ 0,51
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	69,65 $\pm$ 12,98cd	100,86 $\pm$ 13,23b	49,06 $\pm$ 3,73d	64,2 $\pm$ 1,08d	64,09 $\pm$ 9,46d	45,97 $\pm$ 4,97d	71,29 $\pm$ 3,10cd	93,56 $\pm$ 11,50bc	190,99 $\pm$ 21,02a
K (g kg <sup>-1</sup> )	1,07 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,02	1,10 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,13	1,17 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,05	1,25 $\pm$ 0,08
Li (mg kg <sup>-1</sup> )	2,15 $\pm$ 0,35bcd	2,12 $\pm$ 0,12bcd	2,19 $\pm$ 0,03bc	2,65 $\pm$ 0,12ab	2,05 $\pm$ 0,07cd	1,62 $\pm$ 0,16d	1,99 $\pm$ 0,17cd	2,54 $\pm$ 0,04abc	2,77 $\pm$ 0,51a
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	0,37 $\pm$ 0,01bc	0,33 $\pm$ 0,03ab	0,31 $\pm$ 0,01bc	0,36 $\pm$ 0,01a	0,30 $\pm$ 0,02bc	0,28 $\pm$ 0,02c	0,31 $\pm$ 0,01bc	0,36 $\pm$ 0,01a	0,32 $\pm$ 0,01ab
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	352,91 $\pm$ 10,94abc	354,98 $\pm$ 21,02ab	314,09 $\pm$ 11,70d	353,44 $\pm$ 3,26abc	311,44 $\pm$ 7,24d	320,97 $\pm$ 19,85bcd	317,05 $\pm$ 18,47cd	378,02 $\pm$ 15,41a	330,38 $\pm$ 21,24bcd
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	0,38 $\pm$ 0,06bc	0,41 $\pm$ 0,02b	0,31 $\pm$ 0,04bc	0,41 $\pm$ 0,10bc	0,31 $\pm$ 0,03bc	0,34 $\pm$ 0,07bc	0,23 $\pm$ 0,02c	0,33 $\pm$ 0,02bc	0,66 $\pm$ 0,22a
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,14 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	1,73 $\pm$ 0,26cd	2,54 $\pm$ 0,09a	1,44 $\pm$ 0,07de	1,68 $\pm$ 0,11cd	1,66 $\pm$ 0,18cd	1,12 $\pm$ 0,08e	1,97 $\pm$ 0,12bc	2,37 $\pm$ 0,26ab	2,39 $\pm$ 0,47ab
P (g kg <sup>-1</sup> )	0,40 $\pm$ 0,03a	0,38 $\pm$ 0,01ab	0,33 $\pm$ 0,02cd	0,37 $\pm$ 0,01abc	0,31 $\pm$ 0,03d	0,34 $\pm$ 0,02bcd	0,30 $\pm$ 0,01d	0,39 $\pm$ 0,02ab	0,38 $\pm$ 0,02ab
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	1,77 $\pm$ 0,13	1,88 $\pm$ 0,21	1,40 $\pm$ 0,06	1,64 $\pm$ 0,22	1,32 $\pm$ 0,28	1,52 $\pm$ 0,30	1,78 $\pm$ 0,21	2,15 $\pm$ 0,34	2,18 $\pm$ 0,42
S (g kg <sup>-1</sup> )	0,40 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,03
Se (mg kg <sup>-1</sup> )	1,73 $\pm$ 0,30ab	1,91 $\pm$ 0,13a	0,85 $\pm$ 0,06d	1,12 $\pm$ 0,10cd	1,42 $\pm$ 0,09abc	0,97 $\pm$ 0,12cd	1,32 $\pm$ 0,09bc	1,86 $\pm$ 0,31ab	1,71 $\pm$ 0,49ab
Sr (mg kg <sup>-1</sup> )	68,07 $\pm$ 2,33cdef	71,93 $\pm$ 4,66bcde	73,71 $\pm$ 2,52abcd	77,68 $\pm$ 2,15ab	65,29 $\pm$ 3,65ef	62,86 $\pm$ 4,09f	66,29 $\pm$ 3,11def	79,88 $\pm$ 2,48a	74,96 $\pm$ 0,78abc
Ti (mg kg <sup>-1</sup> )	1,07 $\pm$ 0,26cd	2,37 $\pm$ 0,70b	1,82 $\pm$ 0,42bcd	2,13 $\pm$ 0,08bc	1,25 $\pm$ 0,18bcd	0,94 $\pm$ 0,07d	1,53 $\pm$ 0,13bcd	2,02 $\pm$ 0,69bcd	8,04 $\pm$ 3,05a
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	45,11 $\pm$ 1,88b	53,53 $\pm$ 3,68a	41,85 $\pm$ 1,57bc	47,36 $\pm$ 2,09ab	44,04 $\pm$ 3,03bc	37,83 $\pm$ 3,83c	44,06 $\pm$ 1,87bc	46,12 $\pm$ 3,31b	47,16 $\pm$ 2,43ab

Para cada parámetro, las medias con la misma letra indica que no hay diferencias significativas según test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó en algunos casos con variables transformadas, los valores que se presentan son sin transformar para facilitar la interpretación. Cuando en algún parámetro no aparecen letras de significación es que no hubo influencia significativa del endófito según ANOVA. E0: Control; E060: *Fusarium lateritium*; E138: *Embellisia leptinellae*; E140: *Stemphylium globuliferum*; E202: *Chaetosphaeronema sp.*; E244: Pleosporales sp.; E269: *Penicillium sp.*; E361: CODE361 y E631: *Epicoccum nigrum*.

### 4.3. INFLUENCIA SOBRE PATÓGENOS FÚNGICOS.

#### 4.3.1. Efecto del filtrado de la microbiota endofítica sobre el crecimiento y esporulación de los patógenos seleccionados.

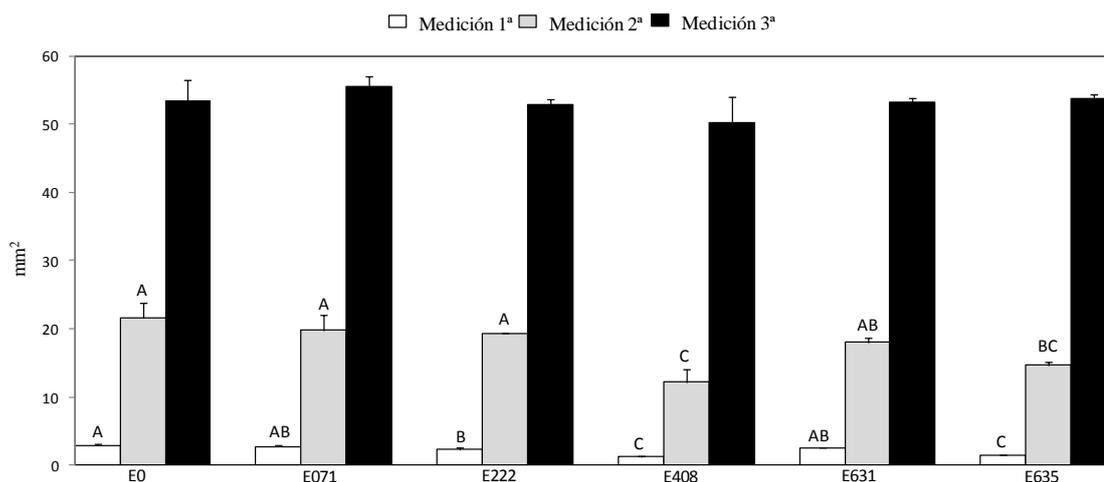
##### Efecto sobre los filtrados.

En el caso de *Biscogniauxia mediterranea*, el filtrado tuvo un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) en el crecimiento del patógeno según el ANOVA en el caso de la primera y segunda medición como se ve en la tabla 26.

**Tabla 26** ANOVA de una vía para evaluar la influencia del filtrado sobre el crecimiento del patógeno *Biscogniauxia mediterranea* en tres mediciones diferentes (una cada día). En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.

Fuente	DF	Medicion 1°	Medicion 2°	Medicion 3°
Endófito	5	23,40***	7,58**	0,96

En la primera medición (un día después de la siembra) se observó una disminución significativa del crecimiento de *Biscogniauxia mediterranea* cuando fue incorporado al medio de cultivo los filtrados de los hongos endófitos E222 (*Trichoderma gamsii*), E408 (*Paecilomyces variotii*) y E635 (*Penicillium chrysogenum*), un 20,5; 56,71 y 51,68 % menos, respectivamente, comparado con los controles (Figura 21). Dicho descenso en el crecimiento se mantuvo en la segunda medición (dos días después de la siembra) para los dos últimos hongos, E408 (*Paecilomyces variotii*) y E635 (*Penicillium chrysogenum*), en los que se redujo un 43,58 y 32,12 %, respectivamente en comparación con los controles. Esta reducción en el crecimiento no se mantuvo sin embargo en la tercera medición, al no haber diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 21).



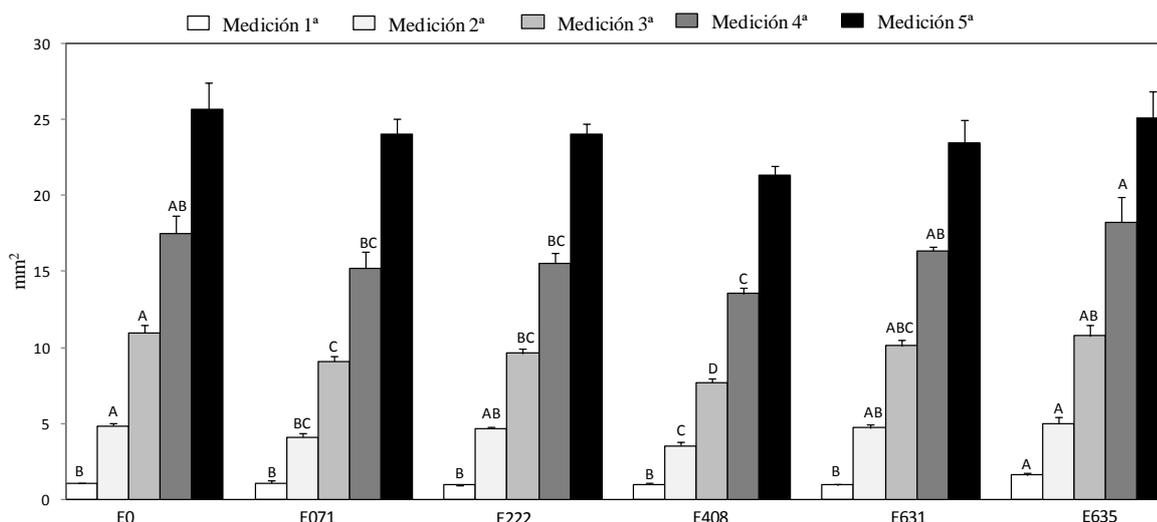
**Figura 21** Crecimiento en mm<sup>2</sup> del patógeno *Biscogniauxia mediterranea*, creciendo en presencia de los filtrados de los diferentes endófitos considerados. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada medición la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras indica que ese parámetro no fue significativo según ANOVA. El valor que se expresa se refiere a la cantidad en mm<sup>2</sup> crecido en: medición 1ª (un día después de la siembra), medición 2ª (segundo día después de la siembra) y medición 3ª (tercer día después de la siembra).

Para *Fusarium moniliforme* se realizaron seis mediciones. El test ANOVA mostró que el filtrado del endófito tuvo una influencia significativa sobre el crecimiento del patógeno en las primeras cuatro mediciones (Tabla 27).

**Tabla 27** ANOVA de una vía para evaluar el crecimiento del patógeno *Fusarium moniliforme* sobre el filtrado de los endófitos. En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado.

Fuente	DF	Medición 1º	Medición 2º	Medición 3º	Medición 4º	Medición 5º	Medición 6º
Endófito	5	7,98**	6,34**	9,74***	4,30*	1,99	2,76

En la primera medición, ningún de los filtrados de endofitos redujo el crecimiento con respecto al control; por el contrario, el filtrado del endófito *Penicillium chrysogenum* (E635) lo incrementó (Figura 22).



**Figura 22** Crecimiento en  $\text{mm}^2$  del patógeno *Fusarium moniliforme*, creciendo en presencia de los filtrados de los diferentes endófitos considerados. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada medición la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras indica que ese parámetro no fue significativo según ANOVA. El valor que se expresa se refiere a la cantidad en  $\text{mm}^2$  crecido en: medición 1ª (un día después de la siembra), medición 2ª (segundo día después de la siembra), medición 3ª (tercer día después de la siembra), medición 4ª (cuarto día después de la siembra), medición 5ª (quinto día después de la siembra) y medición 6ª (sexto día después de la siembra).

En la segunda medición, el filtrado de dos endófitos, *Sordaria fimicola* (E071) y *Paecilomyces variotii* (E408), logró reducir significativamente el crecimiento de *Fusarium moniliforme* en un 15,46 y un 27,42 % respectivamente, con respecto a los controles. El filtrado de estos dos mismos endófitos, y también el de *Trichoderma gamsii* (E222), consiguió reducir el crecimiento del patógeno en la tercera medición un 17,09, 29,59 y 12,06 % respectivamente en comparación con los controles. Por último en la cuarta medición, sólo *Paecilomyces variotii* (E408) mantuvo el efecto negativo significativo sobre el crecimiento de *Fusarium moniliforme* en un 22,69 % con respecto a los controles (Figura 22).

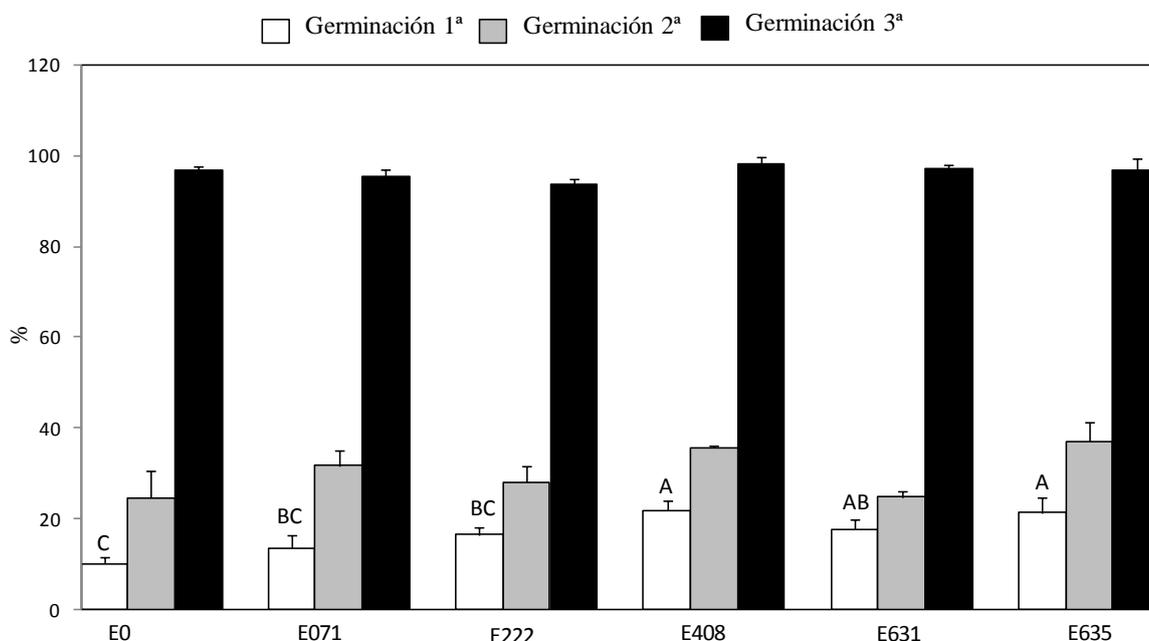
#### Efecto sobre la germinación esporal.

En cuanto al efecto de los filtrados sobre la germinación esporal, solo se evaluó sobre *Fusarium moniliforme*. Los resultados indicaron que el filtrado del endófito sólo tuvo influencia significativa ( $P < 0,05$ ) sobre la germinación esporal en la primera medición de la germinación (a las 24 h) (Tabla 28).

**Tabla 28** ANOVA de una vía para evaluar el crecimiento del patógeno *Fusarium moniliforme* sobre el filtrado de los endófitos. En la primera columna se muestra el grado de libertad (DF) y en las demás el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ) del parámetro analizado. En el periodo de 24 h (Germinación 1ª), 36 h (Germinación 2ª) y a las 48 h (Germinación 3ª) después de la siembra de esporas.

Fuente	DF	Germinación 1º	Germinación 2º	Germinación 3º
Endófito	5	3,65*	1,59	1,83

Ninguno de los filtrados fue capaz de inhibir o reducir significativamente la germinación de *Fusarium moniliforme*. Incluso en el caso de la primera medición, que fue la única en la que el efecto del filtrado del endófito fue significativo, los filtrados de tres endófitos, E408 (*Paecilomyces variotii*), E631 (*Epicoccum nigrum*) y E635 (*Penicillium chrysogenum*), no sólo no tuvieron un efecto negativo sobre la germinación, sino que incluso la favorecieron (Figura 23).



**Figura 23** Porcentaje de germinación esporal de *Fusarium moniliforme*, creciendo en presencia de los filtrados de los diferentes endófitos considerados. E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada germinación la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . La ausencia de letras indica que ese parámetro no fue significativo según ANOVA. El valor que se expresa, porcentaje de esporas germinadas (longitud del tubo germinativo supera la longitud de la espora) en el periodo de 24 h (Germinación 1ª), 36 h (Germinación 2ª) y a las 48 h (Germinación 3ª) después de realizar la siembra.

### 4.3.2. Efecto de la asociación endófito-patógeno sobre la patogenicidad, producción de forraje y calidad de éste en *Lolium rigidum*.

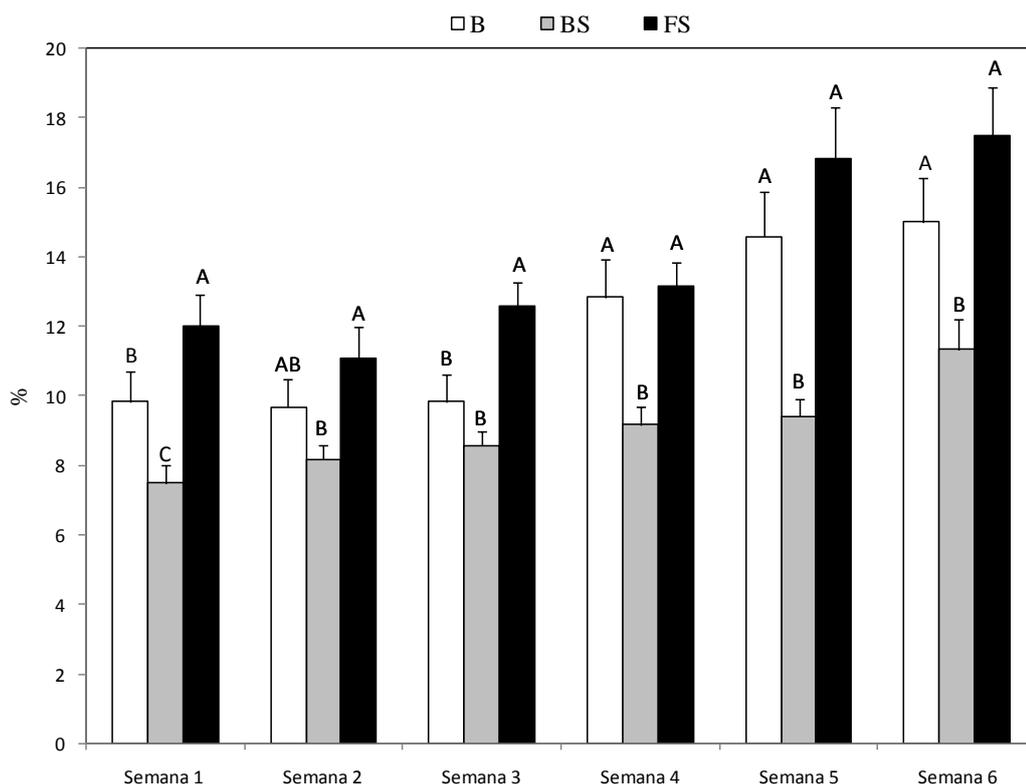
#### Efecto sobre la patogenicidad.

En este ensayo se midió semanalmente (durante seis semanas) la patogenicidad (mediante el denominado índice de severidad) provocada por los patógenos *Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme* en plantas de dos edades de *Lolium rigidum* al ser inoculados junto con uno de los endófitos E0: control, E071: *Sordaria fimicola*, E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. El ANOVA de tres vías realizado mostró como el efecto principal "Patógeno" influyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en la patogenicidad en las seis semanas analizadas (Tabla 29). Además, la interacción "Patógeno \* Endófito" también tuvo una influencia significativa en la patogenicidad en la medición de las semanas 1ª, 5ª y 6ª. La interacción "Grupo de edad de las plantas (fecha de siembra) \* Patógeno" también fue significativa en la quinta semana, al igual que la interacción triple "Grupo de edad de las plantas (fecha de siembra) \* Patógeno \* Endófito" en la sexta semana de medición (Tabla 29).

**Tabla 29** ANOVA de tres vías que muestra el efecto de la fecha de siembra (grupo de edad de las plantas; dos grupos), patógeno (control, *Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme*), endófito (E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*) y sus interacciones en cada una de las mediciones semanales de patogenicidad para *Lolium rigidum* en condiciones de invernadero, partiendo como primera medición la fecha (18/03/2014) y finalizando el (23/04/2014). En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ).

Fuente	DF	Med. 1ª	Med. 2ª	Med. 3ª	Med. 4ª	Med. 5ª	Med. 6ª
Fecha de siembra	1	1,88	0,56	0,37	0,00	1,24	0,37
Patógeno	2	9,68***	4,27*	10,55***	7,94***	13,43***	7,87***
Endófito	5	1,31	1,68	1,40	0,92	1,96	2,25
Pato. * Endó.	10	2,40*	1,84	1,72	1,25	2,38**	1,96*
Fecha * Endó.	5	0,96	1,17	1,02	0,65	2,00*	1,28
Fecha * Pató.	2	1,93	1,68	2,49	0,58	0,08	0,37
Fecha * Pató. * Endó.	10	1,10	1,53	1,77	1,65	2,95	2,93**

En el figura 24 se muestra el test de comparaciones múltiples realizado para la patogenicidad sobre el efecto principal "Patógeno" en las seis mediciones efectuadas.

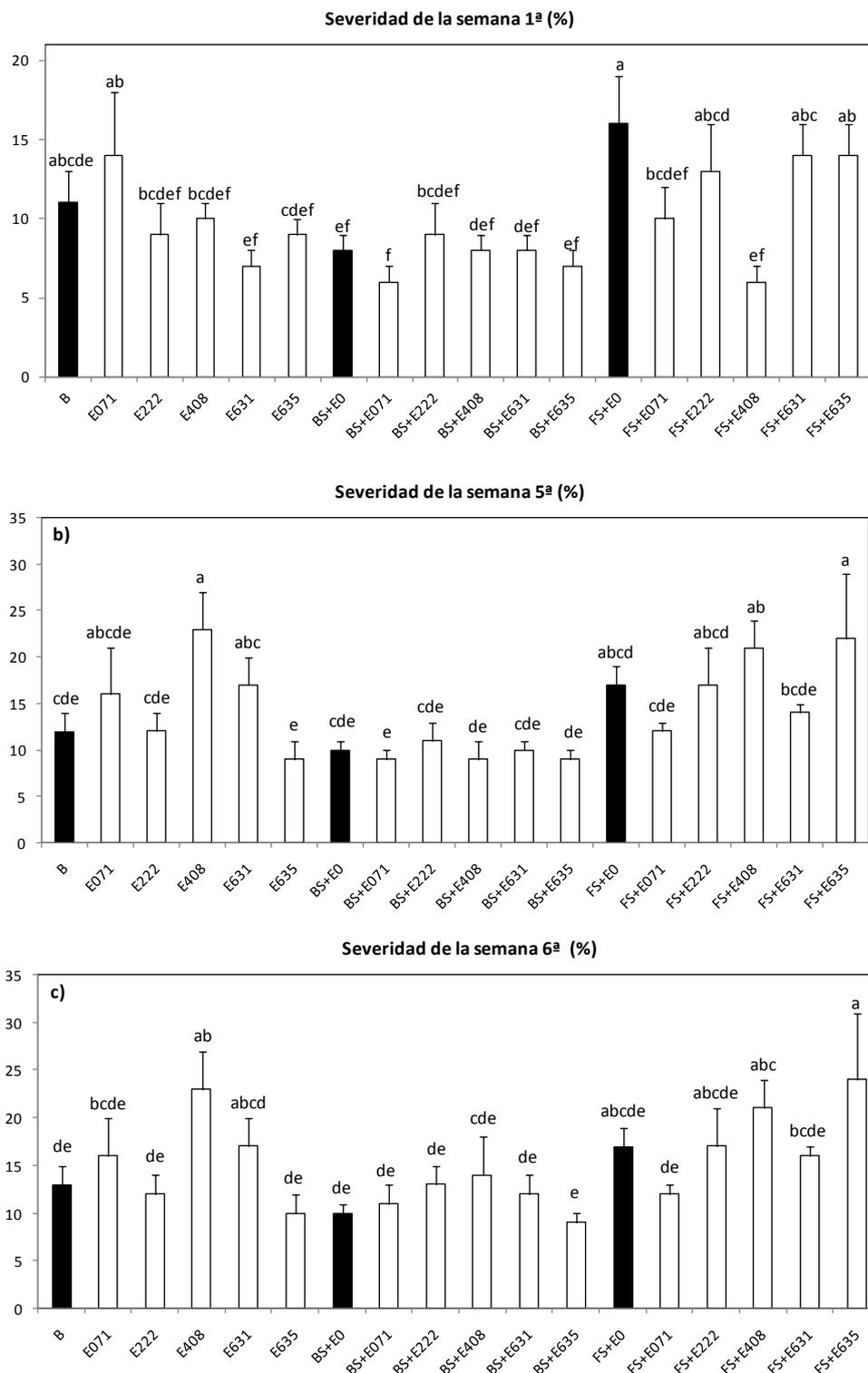


**Figura 24** Índice de severidad en cada semana de medición para el efecto principal "Patógeno" (B: control, BS: *Biscogniauxia mediterranea* y FS: *Fusarium moniliforme*) sobre *Lolium rigidum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada semana, la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test de comparaciones múltiples LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

Dicho test mostró que únicamente uno de los dos hongos, *Fusarium moniliforme*, resultó patógeno sobre el hospedante analizado, puesto que presentó valores de índice de severidad mayores a los observados en los controles. No obstante, dicha patogenicidad no resultó muy importante, puesto que sólo fue significativa en la primera y tercera semanas. El otro hongo "a priori patógeno", *Biscogniauxia mediterranea*, no sólo no causó daño en las plantas, sino que pareció protegerlas puesto que en la mayor parte de las mediciones, el índice de patogenicidad en las plantas inoculadas con este hongo presentó valores significativamente menores que los observados en los controles (Figura 24).

El ANOVA también mostró (Tabla 29) que la interacción de los factores "Patógeno \* Endófito" tuvo una influencia significativa sobre el índice de severidad en las mediciones 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>, por lo que para estas mediciones también se llevó a cabo el test LSD de dicha interacción (Figura 25 a, b y c). En este test se muestra que en la primera medición, ninguno de los endófitos resultó patógeno, ya que el índice de severidad causado por ellos cuando se inoculaban sólo (sin patógeno), no fue significativamente mayor que el observado en los controles. Sin embargo, en

la medición 5ª y 6ª, uno de los endófitos, *Paecilomyces variotii* (E408), provocó en las plantas un índice de severidad mayor que el observado en los controles cuando fue él sólo inoculado. Al analizar ahora el efecto del patógeno sobre el índice de severidad cuando no era inoculado ningún endófito, observamos que ninguno de los patógenos, ni *Biscogniauxia mediterranea* ni *Fusarium moniliforme*, resultó patógeno sobre las plántulas de *Lolium rigidum* en ninguna de las mediciones (Figura 25 a, b y c). Si que se observó una cierta tendencia por parte de *F. moniliforme* a tener mayor patogenicidad que *B. mediterranea*, pero sin ser ésta significativa. Con respecto a las inoculaciones dobles, en el caso de la primera medición, dos de los endófitos, *Sordaria fimicola* (E071) y *Paecilomyces variotii* (E408), redujeron la severidad con respecto a las plantas que fueron inoculadas solamente con *F. moniliforme* (Figura 25 a). En las otras dos mediciones (3ª y 5ª), ninguno de los endófitos redujo el índice de severidad en las plantas con respecto a sus controles inoculados sólo con el patógeno. Curiosamente, el único de los endófito que produjo un aumento del índice de severidad en las plantas cuando era inoculado él sólo (*Paecilomyces variotii*; E408), dejó de hacerlo cuando además eran inoculados alguno de los dos *a priori* patógenos (Figura 25 a, b y c).



**Figura 25** Índice de severidad de las plantas en las diferentes mediciones que fueron significativas (a: severidad en la semana 1ª; b: severidad en la semana 5ª y c: severidad en la semana 6ª) para la interacción "Endofito \* Patógeno" (B: control, BS: *Biscogniauxia mediterranea* y FS: *Fusarium moniliforme*) y los endófitos E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum* sobre *Lolium rigidum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada semana, la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test de comparaciones múltiples LSD con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

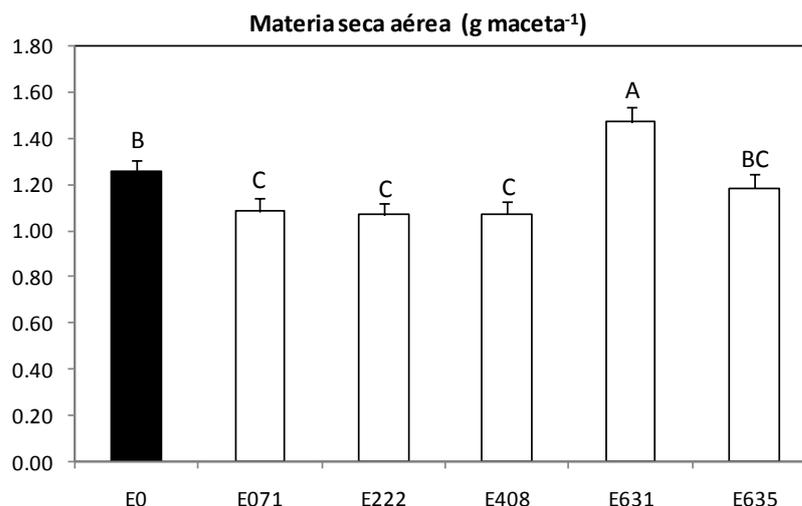
Efecto sobre la producción y calidad del forraje.

La patogenicidad que un hongo puede mostrar en un hospedante no sólo puede ser observada por una sintomatología en la planta, sino que también puede afectar al crecimiento y desarrollo de ésta y por tanto afectar a sus parámetros productivos. En este sentido, en las plantas de *Lolium rigidum* en las que se realizaron las inoculaciones dobles patógeno-endófito también se analizó la producción de forraje y diversos parámetros de calidad de éste. El ANOVA de tres vías realizado mostró que la materia seca forrajera producida se vió significativamente afectada por el efecto principal "Endófito" y para la interacción "Fecha de siembra \* Endofito", mientras que la materia seca radicular, fue signitivamente influenciada por los tres efectos principales ("Patógeno", "Endófito" y "Fecha de siembra" (grupo de edad de las plantas), así como por la interacción "Fecha de siembra \* Endofito" y "Patógeno \* Endófito" (Tabla 30).

**Tabla 30** ANOVA de tres vías que muestra el efecto del grupo de edad de las plantas (dos grupos), el patógeno (control, *Biscogniauxia mediterranea* y *Fusarium moniliforme*), el endófito (E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*) y sus interacciones sobre la producción de materia seca aérea (MSA) y materia seca radicular (MSR) en plantas de *Lolium rigidum* en condiciones de invernadero. En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ).

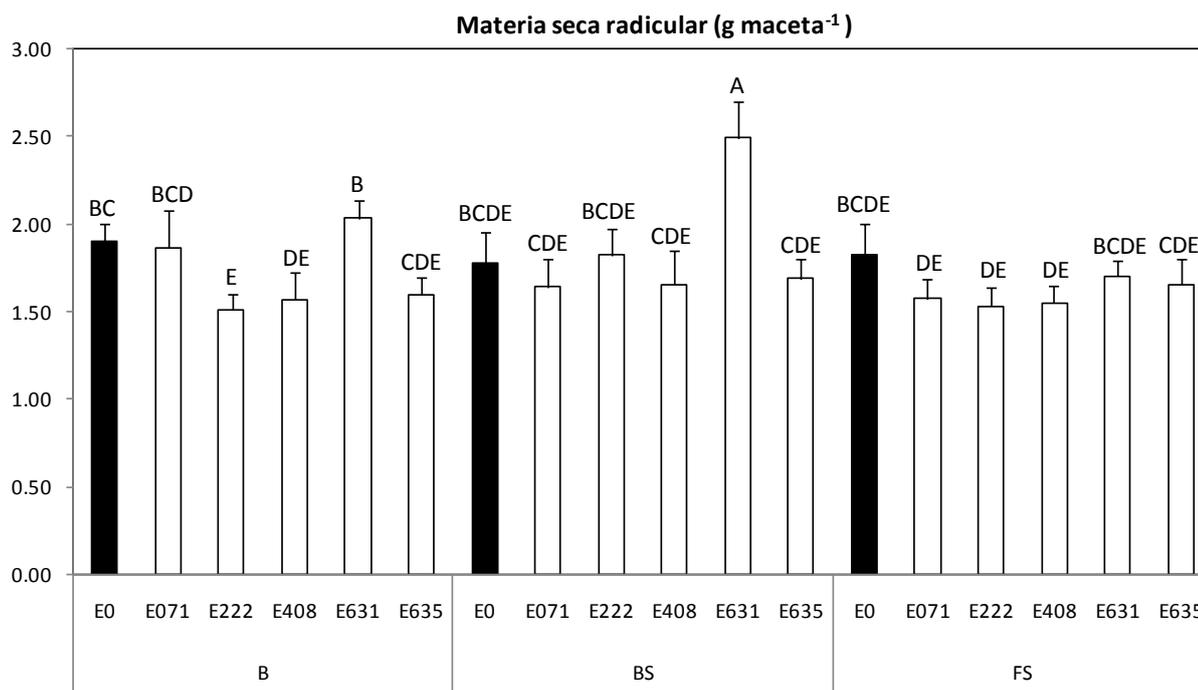
Fuente	DF	MSA	MSR
Fecha de siembra	1	3,66	21,52***
Patógeno	2	1,34	3,59*
Endófito	5	8,03***	3,04*
Pató. * Endó.	10	0,73	0,59*
Fecha * Endó.	5	2,72*	3,00*
Fecha * Pató.	2	0,05	1,17
Fecha * Pató. * Endó.	10	1,11	0,30

En el caso de la materia seca aérea, el único endófito cuya inoculación fue capaz de aumentarla significativamente en las plantas de *Lolium rigidum* fue el hongo (E631) *Epicoccum nigrum* (Figura 26). En el caso de la interacción "Fecha de siembra \* Endofito", para las plantas que fueron sembradas antes (aquellas denominadas como "Viejo"), la inoculación con *Epicoccum nigrum* produjo la mayor acumulación de materia seca en las plantas con  $1,56 \pm 0,11$  g maceta<sup>-1</sup>, mientras que la inoculación con el endófito *Sordaria fimicola* (E071), produjo la menor con  $0,93 \pm 0,08$  g maceta<sup>-1</sup>. En el caso de las plantas "Jovenes" (aquellas sembradas más tarde), los valores oscilaron entre  $1,38 \pm 0,07$  y  $1,04 \pm 0,06$  g maceta<sup>-1</sup> registrados en *Epicoccum nigrum* (E631) y *Trichoderma gamsii* (E222), respectivamente.



**Figura 26** Materia seca aérea (MSA) en g maceta<sup>-1</sup> afectada por el efecto principal "Endófito". E0: Control; E071: *Sordaria fimicola*; E222: *Trichoderma gamsii*; E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*. Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. La misma letra indica que no hay diferencias significativas según test LSD de Fisher con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar.

Del mismo modo, para la materia seca radicular se observó el mismo incremento de ésta al ser inoculada con el endófito *Epicoccum nigrum* (E631), pero sólo cuando era inoculada junto a *Biscogniauxia mediteranea*, no así cuando se inoculó sólo o junto a *Fusarium moniliforme* (Figura 27). Ninguno de los patógenos redujo la biomasa radicular con respecto a los controles cuando eran inoculados ellos sólo. En el caso de los endófitos cuando eran inoculados sólo, dos de ellos, *Trichoderma gamsii* (E222) y *Paecilomyces variotii* (E408), redujeron la biomasa radicular de *Lolium rigidum* al ser inoculados en las plantas, aunque no se produjo dicha reducción cuando además era inoculado alguno de los patógenos (Figura 27). Con respecto al efecto principal "Fecha de siembra" las plantas jóvenes presentaron una mayor biomasa radicular, con 1,39 g maceta<sup>-1</sup> que las plantas consideradas como viejas que produjeron 1,23 g maceta<sup>-1</sup> de biomasa radicular.



**Figura 27** Materia seca radicular (MSR) en g maceta<sup>-1</sup> afectada por la interacción "Endófito \* Patógeno". Patógeno (B: control, BS: *Biscogniauxia mediterranea* y FS: *Fusarium moniliforme*. Endofitos (E0: control, E071: *Sordaria fimicola*, E222: *Trichoderma gamsii*, E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicocum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*). Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. La misma letra indica que no hay diferencias significativas según test LSD de Fisher con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Aunque el test LSD se realizó con las variables transformadas, para facilitar la interpretación de la figura se representaron los valores sin transformar.

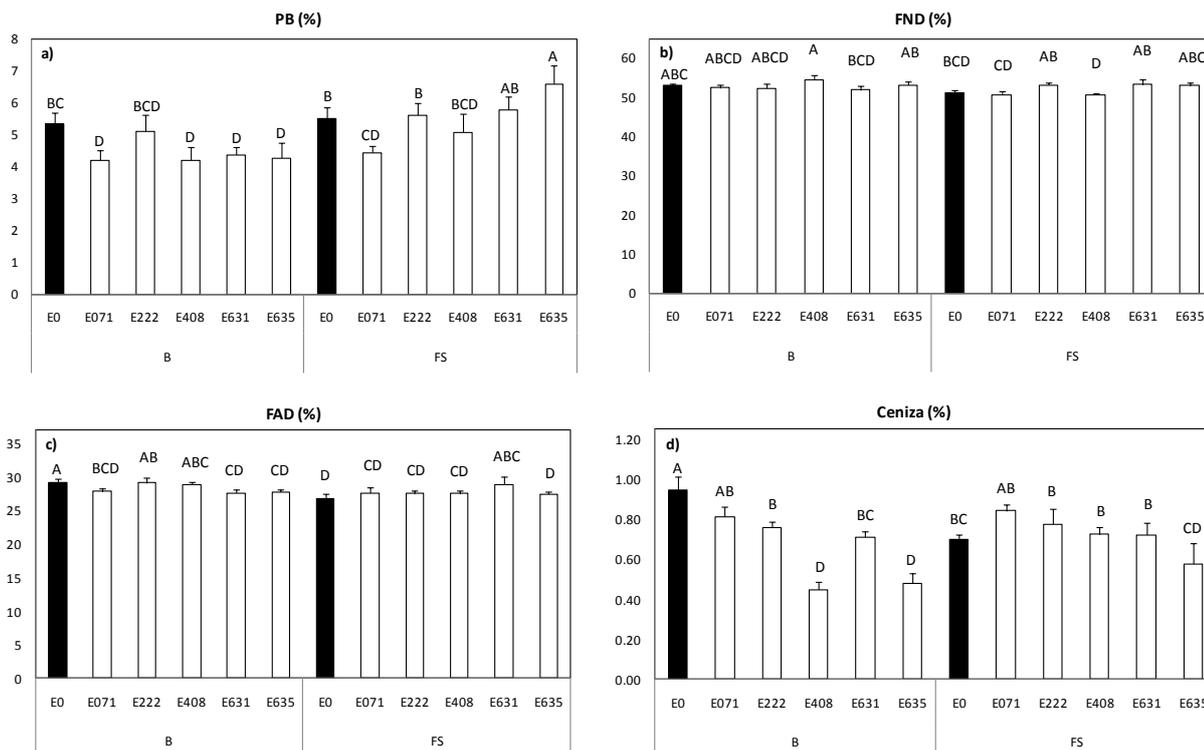
Con respecto a los parámetros de calidad del forraje, como se vió que el patógeno *Biscogniauxia mediterranea* no se comportaba realmente como patógeno, se decidió determinarlos sólo para el patógeno *Fusarium moniliforme*, que aunque tampoco tuvo un comportamiento muy severo en *Lolium rigidum*, en algún parámetro si que mostró algo de actividad patogénica. El análisis del ANOVA (Tabla 31) mostró que la proteína bruta (PB) se vió afectada por los tres efectos principales (patógeno, endófito y fecha de siembra) y por las interacciones "Patógeno \* Endófito" y "Fecha de siembra \* Patógeno \* Endófito". En el caso de la fibra neutro detergente (FND), las variables con influencia significativa sobre ésta fueron: "Patógeno", "Patógeno \* Endófito" y "Fecha de siembra \* Patógeno". La fibra ácido detergente (FAD) fue afectada significativamente por los mismos efectos e interacciones que la FND, y además por el efecto principal fecha de siembra. Por otra parte, mientras la lignina ácido detergente (LAD) no fue influenciada por ninguna variable, el contenido en cenizas fue afectada por la variable "Endófito" y la interacción "Patógeno \* Endófito" (Tabla 31).

**Tabla 31** ANOVA de tres vías que muestra el efecto de la fecha de siembra (grupo de edad de las plantas; dos grupos), del patógeno (control y *Fusarium moniliforme*), del endófito (E0: control, E071: *Sordaria fimicola*, E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*) y sus interacciones en cada uno de los parámetros de calidad analizados del forraje de *Lolium rigidum* en condiciones de invernadero. En la primera columna se muestran los grados de libertad (DF) y en las demás se muestra el valor F, incluyendo el nivel de significación (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ).

Fuente	DF	PB	FND	FAD	LAD	Ceniza
Fecha de siembra	1	4,80*	0,13	15,08***	0,07	0,21
Patógeno	1	22,10***	4,05*	7,33**	1,28	0,96
Endófito	5	3,87**	0,82	0,80	2,12	12,08***
Pató. * Endó.	5	3,08*	2,97*	3,50**	0,56	5,49***
Fecha * Endó.	5	0,72	0,52	0,48	0,22	0,67
Fecha * Pató.	1	1,59	5,80*	9,23**	0,11	0,21
Fecha * Pató. * Endó.	5	3,92**	0,66	1,65	0,98	0,66

PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente, FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente

En el caso de la proteína bruta (Figura 28 a), cuando los endófitos fueron inoculados solos, la gran mayoría de ellos (*Sordaria fimicola* (E071), *Paecilomyces variotii* (E408), *Epicoccum nigrum* (E631) y *Penicillium chrysogenum* (E635)) redujeron significativamente el contenido de proteína bruta del forraje, llegando a un 21,16 % inducido por *Paecilomyces variotii* (E408). Por otro lado cuando el patógeno (*Fusarium moniliforme*) fue inoculado sólo, éste no causó ningún efecto sobre el contenido proteico del forraje. Por el contrario, cuando ambos organismos (patógeno y endófito) fueron inoculados juntos en las mismas plantas, la asociación *Fusarium moniliforme* + E635 (*Penicillium chrysogenum*), produjo un incremento del 19,63 % en el contenido de proteína en el forraje de *Lolium rigidum* con respecto a los controles. En el resto de asociaciones, ninguna con la excepción de *Fusarium moniliforme* + E071 (*Sordaria fimicola*), redujo el contenido de proteína en dichas plantas (Figura 28 a). Al analizar el efecto principal patógeno, en general las plantas inoculadas con *Fusarium moniliforme*, con independencia de si tenían endófito o no, mostraron valores más elevados de PB que las plantas que no ( $5,49 \pm 0,19$  y  $4,59 \pm 0,16$ , respectivamente). Con respecto a la variable principal "Fecha de siembra" se observó que el contenido en PB en el forraje de las plantas "Jovenes" fue mayor, con un 5,25 %, que en las plantas sembradas antes (denominadas como "Viejas"), que fue 4,83 %. Con respecto al contenido de fibra neutro detergente (FND) (Figura 28 b), ni el patógeno (*F. moniliforme*), ni ninguno de los endófitos causaron una variación de la FND del forraje de *Lolium rigidum* cuando eran inoculados solos en comparación con los controles. La única diferencia significativa en este parámetro se produjo cuando el endófito E408 (*Paecilomyces variotii*) era inoculado.



**Figura 28** Parámetros de calidad (PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente) contenidos en cenizas afectadas por la interacción "Patógeno \* Endófito" en plantas de *Lolium rigidum* cuando se inocula el patógeno (B: control, FS: *Fusarium moniliforme*) y endófito (E0: control, E071: *Sordaria fimicola*, E222: *Trichoderma gamsii*, E408: *Paecilomyces variotii*, E631: *Epicoccum nigrum* y E635: *Penicillium chrysogenum*). Las barras verticales indican la media, mientras que las líneas verticales el error estándar. Para cada parámetro, la misma letra indica que no hay diferencias significativas en el test LSD con un nivel de nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

En este caso, el contenido en FND del forraje fue significativamente menor cuando fue inoculado en asociación con *Fusarium moniliforme* en comparación a cuando fue inoculado sólo (Figura 28 b). Con respecto al efecto principal "Patógeno", el contenido en FND el forraje fue menor en las plantas que tenían inoculado *F. moniliforme* con respecto a las plantas sin el patógeno inoculado ( $51,95 \pm 0,36$  y  $52,90 \pm 0,35$  respectivamente). En el caso de la fibra ácido detergente, FAD, (Figura 28 c), tres de los endófitos, E071 (*Sordaria fimicola*), E631 (*Epicoccum nigrum*) y E635 (*Penicillium chrysogenum*), redujeron el contenido en FAD del forraje con respecto a las plantas control cuando fueron inoculados sólo. El patógeno (*F. moniliforme*) también redujo el contenido en FAD del forraje con respecto a los controles cuando fue inoculado él sólo (Figura 28 c). Cuando *F. moniliforme* fue inoculado en asociación con el endófito E631 (*Epicoccum nigrum*) se observaron valores de FAD en el forraje significativamente mayores que cuando se inoculó el patógeno él sólo (Figura 28 c). Con respecto a la influencia de la fecha de siembra, se observó que las plantas consideradas como "Viejo" (aquellas sembradas primero) tuvieron mayor contenido de FAD (28,54 %) en el forraje,

que las plantas "Jóvenes" (aquellas sembradas más tarde) con un 27,45 %. Por último para finalizar el análisis de calidad, en cuanto al contenido en ceniza (Figura 28 d), cuando no se inoculó al patógeno, todos los endófitos, con excepción del E071 (*Sordaria fimicola*), redujeron su contenido en el forraje al ser inoculados, mientras que la inoculación sólo con el patógeno, redujo significativamente el contenido de ceniza con respecto a los controles. Ninguno de los endófitos modificó el efecto causado por *Fusarium moniliforme* al ser co-inoculados con éste (Figura 28 d).



## **5. DISCUSIÓN**



## 5.1. DIVERSIDAD ENDOFÍTICA EN ESPECIES DE PASTO.

### 5.1.1. Micobiota endofítica asociada a *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*.

En el presente estudio se ha demostrado que *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*, en condiciones mediterráneas, albergan una gran riqueza de hongos endófitos (54 y 61 taxones respectivamente). En general, la distribución de especies fue la siguiente: un número pequeño de especies cuya frecuencia de aislamiento fue muy alta y aparecieron en la mayor parte de los sitios, y un gran número de especies con una frecuencia de aparición mucho más pequeña y cuya presencia se limitaba a pocos sitios. En este sentido, la mayoría de las especies identificadas (57 y 56 %, respectivamente) pueden ser consideradas como raras ya que se aislaron solo tres o menos veces. Por el contrario, sólo diez especies representaron el 80 y 75 % de los aislamientos obtenidos respectivamente para *T. subterraneum* y *O. compressus*. Éstas tuvieron una amplia distribución, ya que se aislaron en al menos la mitad de las diez zonas muestreadas. Por lo tanto la micobiota endofítica en *T. subterraneum* y *O. compressus* está formada principalmente por muy pocas especies predominantes (con una gran prevalencia), supuestamente mucho mejor adaptadas a vivir en diferentes condiciones, y un numeroso grupo de especies raras con una distribución mucho más limitada, dependiendo de la ubicación y las condiciones ambientales. El estudio de la diversidad de endófitos fúngicos es un proceso que depende mucho del método utilizado para su aislamiento e identificación (Santamaría y Diez, 2005; Ek-Ramos *et al.*, 2013), puesto que su identidad y abundancia están altamente influenciados por diversas variables experimentales que pueden afectar la comparabilidad de los resultados. Por lo tanto, las comparaciones con otros trabajos deberían ser llevadas a cabo con estudios que hayan utilizado un procedimiento similar. Así, cuando comparamos con estudios que también utilizaron el aislamiento en cultivo con medio sintético y la identificación mediante secuenciación de la región ITS, los resultados obtenidos en el presente trabajo en cuanto a la riqueza de especies encontradas fueron ligeramente más elevados que los constatados en otros huéspedes, como *Brassica napus* L., con 40 especies (Zhang *et al.*, 2014), ligeramente inferior a la obtenida en *Gossypium hirsutum* L., con 69 taxones diferentes (Ek-Ramos *et al.*, 2013), o considerablemente más bajos que en los estudios realizados sobre *Dactylis glomerata* L., con 91 especies diferentes (Sánchez Márquez *et al.*, 2007).

La menor riqueza obtenida en el presente estudio, en comparación con otras especies herbáceas hospedantes, podría ser explicada por la menor intensidad del muestreo en nuestro estudio, en lugar de una menor capacidad de *T. subterraneum* y *O. compressus* de albergar

hongos endófitos. Esto se ve apoyado por las curvas de rarefacción o de acumulación de especies del apartado 4.1.1. (Figuras 8 y 9), en las que se observó que no llegaron a estabilizarse para ninguno de los grupos analizados (número total de especies, número de especies plurales y número de especies singulares), lo que sugiere que si hubiésemos aumentado el número de plantas muestreadas, se hubiera producido también un aumento de las especies aisladas. Por otra parte, debido al método de aislamiento llevado a cabo en el presente estudio, los biotrofos obligados, o los hongos que no crezcan bien en medio de cultivo sintético podrían no haber sido aislados. Debido a esto, el número real de especies endofíticas en una muestra pudo haber sido subestimado. Sin embargo, aunque las diferencias debido al procedimiento puedan haber afectado de alguna forma la comparabilidad de los resultados con otros estudios, como el medio de cultivo utilizado y el procedimiento de aislamiento e identificación aplicados fueron los mismos en todas las muestras recogidas en el presente estudio, nuestras propias comparaciones entre dehesas y tipos de tejido resultarían perfectamente válidas y no afectadas por errores debido a diferencias procedimentales. En cualquier caso, la diversidad específica que se encontró fue lo suficientemente grande para poder llevar a cabo el resto de objetivos propuestos en el presente trabajo.

Es importante comentar también, que en el presente estudio las muestras fueron recogidas en abril, momento en el que las plantas estaban en plena floración. Diversos estudios que han tratado también el tema de la diversidad endofítica, aunque en otras especies de planta (Collado *et al.*, 1999; Gore y Bucak, 2007), han indicado que el momento del año en la recogida de muestras puede afectar a las especies endofíticas aisladas. Sin embargo, en estudios realizados en regiones climáticas similares a la nuestra, la diversidad más elevada se obtuvo en primavera, probablemente debido a la mayor pluviometría y suaves temperaturas que caracterizan a esta época. Por lo tanto, en las regiones templadas del hemisferio norte, la primavera parece ser la mejor época para obtener el mayor número de aislados y especies endofíticas. Del mismo modo, la riqueza de especies y la diversidad de los endófitos aumentan con la edad de la planta, ya que según va pasando más tiempo, la exposición a nuevas infecciones aumenta (Arnold y Herre, 2003). De acuerdo con este hecho, para nuestras condiciones climáticas, la recogida de muestras a mediados/finales de la primavera también sería la mejor época, ya que el ciclo de vida de los pastos analizados, *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*, estaría próximo a finalizar, por lo que supuestamente, sería el momento en que las plantas albergarían una mayor diversidad endofítica.

Para el análisis a nivel de especie en hongos, la mayoría de los estudios de diversidad utilizan información de la región ITS (Sánchez Márquez *et al.*, 2007; Botella y Diez, 2011; Ek-Ramos *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014), que ha demostrado ser un *locus* muy útil para este propósito. Este hecho es claramente confirmado por Schoch *et al.* (2012) que propusieron a la región ITS como el marcador universal del ADN para la identificación de hongos. Esto lo establecen puesto que comparando la región ITS con otras regiones comúnmente utilizadas, tal como la región LSU ("Large Sub-Unit", la subunidad grande del ARN ribosómico), la región SSU ("Small Sub-Unit", la subunidad pequeña del ARN ribosómico), o la región RPB1 (la subunidad mayor del ARN polimerasa II), la ITS proporcionó mejores resultados. Sin embargo, otros estudios han evidenciado la relativamente baja resolución de la secuenciación de la región ITS, y la dificultad de alinear las secuencias, lo que limita su utilidad para la reconstrucción filogenética, especialmente en hongos basidiomicetos (Frøslev *et al.*, 2005). Además, en estudios que han usado la región ITS han evidenciado errores en la identificación de varios grupos de hongos, especialmente en géneros con una gran riqueza en especies y con secuencias cortas, tales como *Cladosporium*, *Penicillium* o *Fusarium* (O'Donnell y Cigelnik 1997; Schubert *et al.*, 2007). En este estudio, se puede decir que dicho procedimiento ha funcionado razonablemente bien, ya que los endófitos que esporularon, y que fueron identificados mediante claves morfológicas, coincidieron con las identificaciones obtenidas mediante la secuenciación de la región ITS. Aún así, conociendo los problemas en la identificación derivados de incluir un único *locus*, y el gran número de ambigüedades que se producen al comparar las secuencias nuestras con las del GenBank, se ha optado por tomar un criterio conservador a la hora de asignar especies a los genotipos obtenidos, llegando al máximo nivel taxonómico que permitiera resolver dichas ambigüedades.

La micobiota encontrada para ambas especies estaba dominada por el *phylum* de los Ascomicetes. La predominancia de este grupo en estudios de diversidad endofítica ha sido también observada por numerosos autores (Arnold, 2007; Dudeja *et al.*, 2012), con independencia del procedimiento de aislamiento o el método de identificación utilizado. Además, la mayor parte de las especies predominantes en el presente estudio pertenecen a géneros ubiquistas y conocidos como muy comunes en otros hospedantes y condiciones, tales como *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Sordaria* y *Trichoderma*; y no solo en herbáceas sino también en hospedante leñosos (Santamaría y Diez 2005; Zhang *et al.*, 2014). Sin embargo, sin tener en cuenta estos géneros ubiquistas, los hongos endófitos encontrados en el presente estudio en ambas especies fueron

más diferentes a los encontrados en otros trabajos, según el grupo botánico del hospedante analizado iba estando menos emparentado al que nosotros estudiamos. En este sentido, nuestra micoflora endofítica fue completamente diferente a la que habitualmente se encuentra en plantas leñosas (Bills, 1996; Botella y Diez 2011), y presentó ciertas similitudes, aunque también diferencias, con respecto a la micoflora endofítica encontrada en especies herbáceas de gramíneas (Sánchez Márquez *et al.*, 2007; Wearn *et al.*, 2012). Con respecto a plantas hospedantes del grupo de las leguminosas, el número de estudios que han tratado la diversidad de la micoflora endofítica no es muy alto (Dudeja *et al.*, 2012), y se restringe fundamentalmente a cultivos herbáceos extensivos más que a especies pratenses, tal como el cacahuete (Ferreira de Souza *et al.*, 2014) o la soja (Impullitti y Malvick, 2013). También existe algún trabajo en el que se ha estudiado la micoflora endofítica en leguminosas silvestres de dunas (Seena y Sridar, 2004). En estos estudios, en conjunto los hongos encontrados fueron bastante diferentes a los aparecidos en el nuestro, probablemente debido a la gran diferencia en el manejo del cultivo, que especialmente en el caso de la soja y del cacahuete se utilizan prácticas más intensivas, tales como la aplicación de productos químicos, que son mucho más agresivas con el desarrollo de diversos microorganismos.

Para leguminosas pratenses, la mayoría de estudios han sido realizados sobre el género *Trifolium*. Por ejemplo, en *Trifolium subterraneum* hay un estudio que trata sobre la diversidad de micoflora endofítica (Mukasa Mugerwa *et al.*, 2013), pero en este caso sólo está enfocado en los hongos negros u oscuros asociados al sistema radicular. Con respecto al sistema radicular, otros estudios han identificado también los hongos en *T. subterraneum*, pero en este caso refiriéndose únicamente a las micorrizas vesículo-arbusculares (Jakobsen *et al.*, 1992). También existen estudios en los que se aislaron endófitos de *Trifolium arvense* L. y *Trifolium dubium* Sibth. Sin embargo no con el fin de analizar la micoflora endofítica, sino de buscar metabolitos secundarios con diversas aplicaciones (Schulz *et al.*, 2008). Entre las dos especies estudiadas en el presente trabajo, *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*, se debe recordar que las plantas para el muestreo fueron tomadas en la misma época y en el mismo lugar. Cabe decir que 31 de las especies endofíticas encontradas (aproximadamente un 54 %) fueron comunes en ambos hospedantes. Este hecho sugiere que, bajo condiciones ambientales similares, y siguiendo el mismo procedimiento metodológico de aislamiento e identificación, una gran parte de la micoflora endofítica sería común en grupos botánicos emparentados (al menos a nivel de familia), aunque otra parte importante de los endófitos sería específica de cada hospedante, indicando una clara preferencia y especificidad por éste.

Mención aparte merecen los estudios llevados a cabo sobre hongos en leguminosas, pero en este caso sobre los que producen síntomas de enfermedad, es decir sobre los patógenos. En este sentido, se encuentran estudios de enfermedades fúngicas en *Trifolium subterraneum* (Barbetti y Sivasithamparam 1986; Jakobsen *et al.*, 1992; Simpson *et al.*, 2011) o *Medicago* spp. (Tivoli *et al.*, 2006). Interesantemente, muchos de los patógenos identificados como causantes de daños en los trabajos anteriormente citados, coinciden con muchas de las especies obtenidas en este estudio. Entre las especies encontradas en el presente trabajo, y que han sido citadas en algún momento sobre algún hospedante tenemos: *Alternaria* spp., *Aureobasidium proteae* (Sin. *Kabatiella proteae* Taylor & Crous), *Boeremia exigua*, *Cercospora apii*, *Colletotrichum* spp., *Didymella exitialis*, *Davidiella tassiana* (Sin. *Mycosphaerella tassiana* (De Not.) Johanson), *Diaporthe phaseolorum*, *Didymella phacae*, *Drechslera* spp, *Embellisia leptinellae* (Sin. *Alternaria leptinellae* (Simmons & Hill) Woudenberg & Crous), *Fusarium* spp., *Leptosphaerulina australis*, *Lewia infectoria* (Tel. *Alternaria infectoria* Simmons), *Peyronellaea pinodella*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Phaeosphaeria pontiformis*, *Phoma glomerata*, *Peyronellaea pinodella*, *Pyrenophora leucospermi*, *Pyrenophora* spp., *Phoma* spp., *Septoria* spp., *Stemphylium solani* y *Ustilago hordei*.

En base a este resultado, se puede establecer la hipótesis de que la mayoría de las especies incluidas en la micoflora endofítica de un hospedante dado, no mantienen un efecto simbiótico con la planta huésped, sino que serían patógenos latentes, en su mayoría agentes patógenos de debilidad. Estos hongos estarían en estado latente, como endófitos, a la espera de que la planta hospedante se encuentre debilitada por la razón que sea, y sus defensas bajen para aprovechar y colonizar los tejidos vegetales. El hecho de encontrarse ya dentro le supondría a estos hongos una ventaja a la hora de colonizar los tejidos frente a otros hongos que se encuentren en el exterior. Esta hipótesis se contrasta con el hecho de que en estudios similares con otros hospedantes, también una parte importante de las especies identificadas en la cohorte endofítica corresponden con hongos conocidos como patógenos (Sánchez Márquez *et al.*, 2007), lo cual demuestra que sería una estrategia común de estos hongos con independencia del hospedante o de las condiciones ambientales. Los anteriormente citados como patógenos de debilidad fueron muy abundantes en la micoflora de *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*, no sólo en términos de riqueza de especies, 57 y 43 % respectivamente, sino también en número de aislamientos, con 73 y 70 %, respectivamente.

Además de estas especies descritas previamente con algún grado de patogenicidad, en el presente estudio, para ambas especies de pastos analizadas, también se encontró un grupo de

endófitos en los que la bibliografía previa indica que muestran alguna característica interesante y con claras aplicaciones en la producción vegetal, al producir efectos beneficiosos en su planta hospedante. Al respecto, varias especies han mostrado aptitud para poder ser utilizadas como agentes de control biológico, puesto que mostraron respuestas antagónicas frente a varios patógenos fúngicos, tales como *Sordaria fimicola* (Manoch *et al.*, 2008), *Fusarium lateritium* (McMahan *et al.*, 2001), *Epicoccum nigrum* (Hashem y Ali, 2004), *Trichoderma gamsii*, el anteriormente conocido como *Trichoderma viride* Pers. (Rinu *et al.*, 2014) o *Chaetomium* sp. (Van Thiep y Saytong, 2015). Otros endófitos han demostrado ser promotores del crecimiento de plantas, tales como los ya citados *Epicoccum nigrum* (Lima Fávoro *et al.*, 2012) o *Trichoderma gamsii* (Rinu *et al.*, 2014). De acuerdo con esta información, los aislados de estas especies encontradas en el presente trabajo merecerían ser investigados en mayor profundidad, tanto en condiciones *in vitro* como en planta, con el objetivo de intentar mejorar el sistema productivo de *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus*.

En el presente estudio, la frecuencia de aislamiento de especies endofíticas, su riqueza de especies y el índice de diversidad de Shannon-Weaver en *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus* se vieron afectados significativamente por la zona de muestreo, expuesto en el apartado 4.1.1. (Tablas 6 y 7). Este hecho podría indicar que las diferentes condiciones ambientales darían lugar a diferentes cohortes de hongos endófitos, como ya fue indicado por Botella y Diez (2011). Sin embargo, cuando se estudiaron los diferentes parámetros ambientales con el fin de evaluar su efecto sobre la microbiota, pocas variables tuvieron una influencia significativa y ésta no fue de gran relevancia. Este hecho puede significar que las diferencias entre la microbiota de las distintas dehesas muestreadas podrían no ser debidas a las diferentes condiciones ambientales, al menos no en gran medida, sino al propio patrón de distribución de las especies observadas en los diferentes sitios; es decir, pocas especies predominantes fueron encontradas muy frecuentemente, independientemente de las condiciones ambientales y muchas especies raras con una distribución muy específica. Un caso especial en trébol subterráneo supuso la finca "La Barrosa", en la que se encontraron grandes diferencias en su frecuencia de aislados, riqueza y diversidad endofítica con respecto a las demás dehesas. No obstante, estas diferencias fueron debidas, como bien se citó en la metodología, a que en esta dehesa por diversas circunstancias se tomaron un menor número de especímenes de *T. subterraneum*, y ya se ha comentado la gran importancia del número de muestras en el número de especies que se pueden encontrar, al menos hasta que la curva de acumulación de especies tiendan a estabilizarse.

Las únicas variables ambientales con una influencia significativa en las comunidades endofíticas encontradas en *Trifolium subterraneum* fueron la concentración de Mg en el suelo sobre el índice de diversidad, y la precipitación anual en la distribución de la composición (riqueza y frecuencia) de especies endofíticas. Con respecto al Mg, su concentración en el suelo se correlacionó positivamente con la diversidad endofítica. Para explicar este hecho, es importante tener en cuenta que el Mg tiene un gran número de funciones clave en las plantas. Entre ellas, el Mg está vinculado a la morfología y conductancia estomática (Hao y Papadopoulos, 2002). Por tanto, una mayor concentración de Mg en la planta podría causar un aumento considerable en el tamaño de los estomas (Putra *et al.*, 2012), lo que podría favorecer la penetración de los hongos en la planta a través de ellos. En nuestro estudio, la concentración de Mg solamente se midió en el suelo y no en los tejidos vegetales. Sin embargo muchos estudios (Griffiths, 2006; Staugaitis y Rutkaukiene, 2012) han evidenciado que el contenido de Mg en el forraje es clara y positivamente correlacionada con la concentración de Mg en suelo. Por otra parte, la influencia de la precipitación en la composición de las especies de hongos fue un resultado esperado, ya que es perfectamente conocido el vínculo entre el desarrollo de los hongos y la humedad. De acuerdo con esto, el Análisis Canónico de Correspondencias (ACC) mostró que existía una correlación bastante positiva entre las especies endofíticas y la precipitación.

En el caso de *Ornithopus compressus*, las variables edafoclimáticas que mostraron un efecto significativo y consistente sobre la microbiota endofítica fueron el contenido de carbono orgánico del suelo, la concentración de Ca y K, (todos ellos afectaron positivamente a la diversidad y la riqueza de especies), y la conductividad eléctrica (que afectó negativamente). El calcio parece estar implicado en el proceso de reconocimiento entre células vegetales y los hongos endófitos para establecer la asociación (Harper y Harmon, 2005). Así, con niveles altos de calcio en las células vegetales parece que se mejoran las interacciones endófito-planta, que resultan en un mejor desarrollo vegetativo de la planta (Vadassery y Oelmuller, 2009). Por tanto, teniendo en cuenta que una mayor concentración de Ca en el suelo puede resultar en una mayor concentración de Ca en los tejidos vegetales, este hecho podría explicar porqué el Ca favoreció la diversidad endofítica y la riqueza de especies.

Por otra parte, el potasio tiene varias funciones clave en las plantas. Entre ellas, el K ha sido reconocido por tener un papel importante en la apertura de los estomas (Humble y Raschke, 1971). De acuerdo con este hecho, una alta concentración de K en el suelo, podría dar lugar a una elevada concentración en los tejidos vegetales (Mosquera-Losada *et al.*, 2004), pudiendo provocar un aumento considerable en el tamaño de los estomas, lo que podría favorecer la

penetración de los hongos en la planta, de un modo similar al que se vió en el caso del Mg para *Trifolium subterraneum*. Este hecho podría explicar la relación positiva y significativa entre la concentración de K con la diversidad endofítica y la riqueza de especies. Por otra parte, la gran influencia que puede tener la fertilidad del suelo sobre la composición de las comunidades de hongos endófitos foliares, ya ha sido indicada en estudios previos, aunque en otros hospedantes (Eschen *et al.*, 2010). La precipitación, al igual que en *T. subterraneum* también tuvo una influencia significativa y en su mayoría positiva en la riqueza de especies y la diversidad, aunque no de manera tan consistente. Por último, la influencia de la conductividad eléctrica del suelo (es decir, la salinidad) en hongos endófitos, también se ha puesto de manifiesto en trabajos previos (Macia-Vicente *et al.*, 2012). Según esos trabajos, bajo condiciones de salinidad del suelo, la diversidad de hongos endófitos y la riqueza de especies presentes en las plantas que allí crecen tienden a ser cada vez menores, a medida que aumenta el gradiente de salinidad, porque el número de especies de hongos con capacidad de crecer en esas condiciones disminuye.

En cuanto al tipo de tejido, en *Trifolium subterraneum*, éste sólo tuvo una influencia significativa en la frecuencia de aislados, mientras que en *Ornithopus compressus* la influencia fue significativa tanto para la frecuencia de aislamiento como para la riqueza de especies. En ambos casos, las hojas albergaron un mayor número de aislados, en comparación con los tallos. Esta mayor infección en las hojas ha sido ya observada en otros estudios (Santamaría y Diez, 2005; Sánchez Márquez *et al.*, 2007) y podría ser atribuida a la mayor densidad estomática y el menor contenido en fibra de las hojas en comparación con los tallos, pudiendo así favorecer la infección por el endófito. Aunque en *T. subterraneum* no se encontraron diferencias entre los tipos de tejidos a nivel de riqueza de especies, 27 especies de hongos (en torno al 50 % del total) fueron aisladas de un solo tejido, y del resto, diez especies también mostraron una clara preferencia por uno de los tipos de tejido. Mientras que para *O. compressus*, 32 especies endofíticas (más 50 % del total) fueron obtenidas de un solo tejido, y del resto, 11 especies mostraron esa misma preferencia por uno de los tipos de tejido. Esto podría estar relacionado con un alto grado de especificidad en cuanto al tipo de tejido vegetal, como ha sido demostrado anteriormente en otros hospedantes (Wu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

## 5.2. INFLUENCIA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL PASTO.

### 5.2.1. Influencia de la micobiota endofítica sobre la producción de biomasa, calidad y acumulación de minerales en *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus* y *Poa pratensis*.

La falta de síntomas de enfermedad en las plantas inoculadas, indicó que los hongos endófitos utilizados en nuestro estudio no eran patogénicos, al menos durante la duración del experimento. Esto es importante y básico para una eventual aplicación del endófito en campo, ya que si los endófitos hubieran tenido efectos fitotóxicos en nuestras especies objetivo, tendrían que haber sido descartados para su utilización directa, con independencia del efecto provocado. Todas las especies de endófitos inoculadas fueron posteriormente re-aisladas en su mismo hospedante, con excepción de *Embellisia leptinellae* en *Ornithopus compressus* y *Embellisia leptinellae*, *Penicillium* sp. y el endófito E361 en *Poa pratensis*. El fallo de re-aislamiento de esos tres endófitos posiblemente fue debido a la eficiencia limitada de los métodos en sí de re-aislamiento (Prior *et al.*, 2014), más que por una inoculación deficiente. Esto pudo ser así, porque todos los endófitos, incluso los que no fueron re-aislados, afectaron de manera significativa ( $P < 0,05$ ), al menos uno de los parámetros evaluados. Esto sugiere que el método de inoculación fue suficientemente eficiente para lograr la infección, ya que no se esperaría que una inoculación fallida diera lugar a un efecto significativo. Eso sí, los efectos significativos observados en el presente estudio podrían ser el resultado del crecimiento interno o externo del endófito sobre la planta o como resultado de los metabolitos producidos por éste. Aun así, los resultados obtenidos para los endófitos que no fueron re-aislados deben ser considerados con cierta cautela hasta que la inoculación sea confirmada en experimentos posteriores.

La influencia de la micobiota endofítica sobre la producción de biomasa aérea y radicular ya ha sido demostrado por diversos autores en varias especies hospedante (Hesse *et al.*, 2005; Thom *et al.*, 2013; Mahendra *et al.*, 2014). Sin embargo, la mayoría de esos experimentos se llevaron a cabo bajo ciertas limitaciones para el crecimiento de la planta: estrés hídrico, déficit en nutrientes, toxicidad del suelo, infecciones de plagas o enfermedades, etc. Por lo tanto, parece estar claro que, dado que el endófito puede dar un mayor valor adaptativo al hospedante, el efecto de la interacción microorganismo-planta puede ser más evidente en condiciones de estrés para las plantas. Este hecho puede explicar por qué en nuestro estudio (llevado a cabo en buenas condiciones para el crecimiento vegetal), no se observó ninguna influencia del endófito sobre la producción de biomasa de *Ornithopus compressus*. Además, también se ha demostrado

(Ahlholm *et al.*, 2002), que se debe de dar la combinación adecuada de especie endofítica, hospedante y condiciones ambientales, para que el eventual efecto positivo del endófito tenga lugar. Esto también es lo que pudo pasar en nuestro trabajo para este hospedante, que no se produjera la combinación adecuada. Este hecho se manifiesta en otros estudios, a pesar de haber sido realizados bajo condiciones de estrés (Zabalgogazcoa *et al.*, 2006; Faeth *et al.*, 2010), en los que el endófito no tuvo influencia, o incluso esta fue negativa, sobre la producción de biomasa.

Sin embargo en el caso de *Poa pratensis* y *Trifolium subterraneum* si se vio un efecto sobre el rendimiento del forraje. Para *P. pratensis*, los endófitos E269 (*Penicillium* sp.), E361 (CODE 361), E140 (*Stemphylium globuliferum*) o E202 (*Chaetosphaeronema* sp.) produjeron un mayor rendimiento en la biomasa herbácea, comparándolo con los controles. Y para *T. subterraneum*, en condiciones de campo, se observó que las plantas inoculadas con el endófito E202 (*Chaetosphaeronema* sp.) produjeron un 80 % más de forraje que en su correspondiente control. Sin embargo, en el ensayo de invernadero con *T. subterraneum*, aunque las plantas inoculadas con este endófito también mostraron una alta producción de forraje, no hubo diferencias con las plantas control. Para explicar las diferencias entre el ensayo de campo y el de invernadero en el caso de *T. subterraneum*, hay que tener en cuenta que el mayor valor adaptación que los endófitos pueden conferir a sus plantas hospedante (Malinowski y Belesky, 2000), haría que en los ambientes menos favorables, como las condiciones de campo en comparación con las de invernadero, es donde un eventual efecto beneficioso del endófito sobre la planta se hiciera más evidente. Por este motivo, muchos de los estudios llevados a cabo en condiciones no limitantes para el crecimiento vegetativo de la especie hospedante (Fritz y Collins 1991; Faeth *et al.*, 2010) han mostrado un efecto neutro o negativo del endófito en el rendimiento de biomasa.

Para intentar explicar las razones de los efectos beneficiosos del endófito sobre el crecimiento (y por tanto sobre la producción de materia seca), se puede tener en cuenta los estudios de Zabalgogazcoa *et al.* (2006), en los que se estableció que hongos endófitos, aunque del tipo clavicipitáceos, pueden alargar el periodo vegetativo del hospedante, lo que conllevaría un aumento del periodo efectivo de acumulación de biomasa, lo que explicaría a su vez el mayor rendimiento de forraje en las plantas infectadas. No obstante, como en nuestro trabajo hemos utilizado especies no clavicipitáceas, que tienen ciertas características diferentes a las clavicipitáceas, se deberían realizar estudios posteriores para comprobar si efectivamente estas especies también afectan a la duración de la etapa de crecimiento en el hospedante. Por otra

parte, Assuero *et al.* 2006 sugirieron que los endófitos pueden promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de sustancias similares a las hormonas vegetales que retrasan el ciclo del crecimiento de la raíz en plantas, o fomentan el crecimiento radicular, lo cual aportaría a la planta hospedante una mayor capacidad de aumentar su absorción de agua y minerales. En el caso de *Trifolium subterraneum*, en nuestro estudio esta hipótesis no se vió fuertemente apoyada, ya que no hubo diferencias significativas entre la biomasa radicular de las plantas inoculadas con los endófitos que produjeron las mayores producciones de forraje y los controles, aunque si se observó una cierta tendencia a presentar un sistema radicular mayor en esas plantas infectadas.

En el caso de *Ornithopus compressus* los endófitos que produjeron las mayores cantidades de biomasa aérea, también tuvieron esa tendencia a producir mayores sistemas radiculares en las plantas infectadas, aunque como en el caso de *Trifolium subterraneum*, las diferencias con los controles tampoco fueron significativas. Por el contrario, en *Poa pratensis* si que se constató dicha hipótesis de manera significativa, ya que gran parte de los endófitos inoculados que produjeron una mayor contenido en biomasa aérea (con la excepción del endófito CODE361) presentaron también un mayor sistema radicular. Se podría establecer una tercera hipótesis para explicar este aumento de crecimiento causado por los endófitos, en base a varios estudios que han constatado como varios hongos endófitos afectan a la fotosíntesis y a la fijación de CO<sub>2</sub> (Newman *et al.*, 2003; Spiering *et al.*, 2006), es decir, a la tasa de crecimiento en las plantas infectadas. No obstante, se deberían diseñar nuevos experimentos para comprobar si los endófitos de nuestro trabajo tienen dicha capacidad.

Con respecto a la calidad del forraje, en la bibliografía se pueden encontrar numerosos estudios centrados en hongos endofíticos que producen metabolitos secundarios en las plantas hospedantes, tales como lolitrem B, ergovalina y peramina, causantes de enfermedades en los animales que se alimentan de ellas (Oliveira *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2013; Thom *et al.*, 2013). Sin embargo pocos estudios se han centrado en los efectos del endófito sobre los parámetros bromatológicos del forraje, tales como contenido en proteína bruta (PB), fibra (ácido detergente/FAD y neutro detergente/FND) y lignina ácido detergente (LAD). Teniendo en cuenta que la calidad del forraje en términos de valor nutritivo es directamente proporcional al contenido de proteína y digestibilidad (este último a su vez correlacionado inversamente con la cantidad de fibra y lignina), en el caso de *Tifolium subterraneum* ninguno de los endófitos fue capaz de mejorar en general la calidad del pasto en comparación con los controles. Se encontraron, varios efectos positivos sobre la calidad del pasto tras la inoculación con endófitos, pero estos no fueron consistentes a lo largo de los ensayos (Tabla 32). Por ejemplo, en el ensayo

de invernadero, el endófito E244 (Pleosporales sp.) fue capaz de reducir el contenido de fibra neutro detergente (FND) del forraje, pero este efecto no fue observado en el ensayo de campo. También en el ensayo de invernadero, el endófito E140 (*Stemphylium globuliferum*) redujo el contenido en fibra ácido detergente (FAD), lo cual aumentaría la digestibilidad del forraje, pero en campo este hongo proporcionó valores más elevados de lignina (LAD), lo cual reduciría dicha digestibilidad. Al menos, el endófito más interesantes en el ensayo de campo, desde el punto de vista del rendimiento forrajero, que fue *Chaetosphaeronema* sp. (E202), no causó deterioro de la calidad del forraje (proteína, fibra y lignina), siendo ésta similar a los controles en invernadero y campo (Tabla 32). Por tanto, este hongo merecería ser estudiado en más profundidad, ya que consiguió aumentar la producción de biomasa herbácea del forraje en *Trifolium subterraneum*, sin disminuir su calidad bromatológica.

**Tabla 32** Resumen de los efectos causados por cada endófito inoculado sobre *Trifolium subterraneum* en los diferentes parámetros evaluados (MSA: materia seca aérea; MSR: materia seca radicular; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente y el estado mineral) en los ensayos de invernadero (Inv.) y de campo (Camp.). (+) (-) Indica si el endófito aumentó o redujo dicho parámetro respetivamente, comparándolos con el control. ( $P = 0,05$ ).

Parámetro	E060		E071		E140		E202		E244		E631	
	Inv.	Camp.										
MSA	-	-	-	-	(-)	-	-	(+)	(-)	-	-	-
MSR	-	**	-	**	-	**	-	**	-	**	-	**
PB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FND	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(-)	(+)	-	-
FAD	-	(+)	-	-	(-)	-	-	-	(+)	(+)	-	(+)
LAD	(+)	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-
Al	(-)	-	-	-	(-)	-	(-)	-	(-)	-	-	-
B	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-
Ca	-	-	-	-	(+)	-	(-)	-	-	-	-	-
Cd	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	(-)	-
Cr	(-)	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
Cu	-	-	-	-	(+)	(-)	-	-	-	-	-	-
Fe	(-)	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	(-)	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
Li	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mn	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
Mo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-
Na	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
Ni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pb	(+)	-	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(-)	-
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	(-)	-	-

\*\* La materia seca radicular solo fue determinada en condiciones de invernadero.

E060: *Fusarium lateritium*, E071: *Sordaria fimicola*, E140: *Stemphylium globuliferum*, E202: *Chaetosphaeronema* sp., E244: Pleosporales sp. y E631: *Epicocum nigrum*.

En el caso de *Ornithopus compressus* la inoculación con los endófitos E636 (*Sporormiella pilosa*) y E631 (*Epicoccum nigrum*) proporcionó forrajes con un valor nutritivo mayor que el obtenido en los controles. Estos dos endófitos produjeron un aumento de la proteína bruta y una menor concentración de lignina (Tabla 33). En el caso de *Epicoccum nigrum*, este hongo ha mostrado en anteriores trabajos su aptitud para aumentar el crecimiento de la raíz en algunos cultivos en los que está presente, como en la caña de azúcar (Lima Fávoro *et al.*, 2012). Este aumento del sistema radicular podría a su vez dotar a la raíz de una mayor capacidad para absorber nutrientes, entre ellos el N, que podría explicar el mayor contenido de proteína en la planta, puesto que el N es el principal componente de las proteínas.

**Tabla 33** Resumen de los efectos de cada endófito sobre *Ornithopus compressus* en los diferentes parámetros evaluados (MSA: materia seca aérea; MSR: materia seca radicular; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente y el estado mineral) en los ensayos de invernadero. (+) (-) Indica si el endófito aumentó o redujo dicho parámetro respectivamente, comparándolos con el control. ( $P = 0,05$ ).

Parametro	E071	E138	E631	E636
MSA	-	-	-	-
MSR	-	-	-	-
PB	(-)	-	-	-
FND	-	-	-	-
FAD	-	-	-	-
LAD	-	-	(-)	-
Al	-	-	-	-
B	-	(+)	-	-
Ca	(-)	-	-	-
Cu	-	(+)	-	(+)
Fe	-	-	-	-
K	-	-	(+)	(+)
Li	(-)	-	-	-
Mg	-	(+)	-	-
Mn	-	-	-	-
Mo	-	(+)	(+)	(+)
Na	-	(+)	-	-
P	-	-	(+)	(+)
Pb	(-)	-	(-)	-
S	-	(+)	(+)	(+)
Se	-	-	-	-
Zn	-	-	(+)	(+)

E071: *Sordaria fimicola*, E138: *Embellisia leptinellae*, E631: CODE631 y E636: *Epicoccum nigrum*.

No obstante en nuestro caso no parece ser este el motivo, ya que en el caso de *Ornithopus compressus*, ninguna de las especies aumentó el crecimiento radicular en comparación con los controles. Otra explicación, podría venir del hecho, como ya se comentó anteriormente, de que los hongos endófitos pueden provocar en sus plantas hospedante un retraso en su maduración, alargando por tanto el periodo vegetativo. Y como es bien sabido, la fibra y lignina aumentan sus

valores, mientras que los valores de proteína disminuyen, a lo largo del ciclo de vida de las plantas (Santamaría *et al.*, 2014). Por lo tanto un retraso en el ciclo vegetativo provocado por los endófitos mencionados, podría explicar ese aumento de proteína y descenso de lignina del forraje de las plantas infectadas observado en el presente estudio. Sin embargo para confirmar la hipótesis, será necesario realizar ensayos posteriores diseñando los experimentos de manera específica para evaluar este hecho.

Por último, en *Poa pratensis* ningún endófito mostró resultados que afectaran al contenido de proteína bruta total del pasto, lo cual está en consonancia con otros trabajos, como lo expuesto por Oliveira *et al.* (2004) para infecciones de endófitos en *Lolium perenne*, que tampoco observaron influencia de los endófitos en este parámetro. En cambio si se observó que ciertos endófitos, como E138 (*Embellisia leptinellae*), E140 (*Stemphylium globuliferum*), E202 (*Chaetosphaeronema* sp.), E244 (Pleosporales sp.) y E269 (*Penicillium* sp.), redujeron el contenido de FND del pasto (Tabla 34). En este sentido, Zabalgogazcoa *et al.* (2006) observaron un descenso significativo de la FND en el forraje de una gramínea infectada con una especie del endófito *Epichloë*. En otro estudio, se observó que el contenido en FND en heces de animales que habían sido alimentados con forraje de plantas infectadas con endófitos fue menor que cuando habían sido alimentados con forraje sin endófito (Cripps y Edwards, 2013). Este descenso en los valores de fibra observados en nuestro trabajo y en los comentados por otros autores, podría ser debido a la producción de enzimas hemicelulósicas por algunas especies endofíticas, tal y como ha sido demostrado para el hongo *Acremonium zeae* en maíz (Bischoff *et al.*, 2009). Además de esta explicación, la ya comentada hipótesis de un retraso en el ciclo vegetativo de la planta provocado por el endófito (Zabalgogazcoa *et al.*, 2006), también podría explicar este descenso en los contenidos de fibra. No obstante, este retraso en la madurez de la planta, debería haber conllevado también un incremento en los contenidos de proteína bruta en el forraje, cosa que no fue observada en este caso. Por tanto, se necesitan ensayos posteriores que clarifiquen las razones del descenso de los valores de fibra en el forraje de plantas infectadas con ciertos endófitos.

La falta de consistencia entre los resultados obtenidos en el presente estudio para las diferentes especies hospedante analizadas, y entre los diferentes hongos endófitos utilizados, se pone también de manifiesto en los dispares resultados obtenidos en los diferentes estudios encontrados en la bibliografía (Newman *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004; Zabalgogazcoa *et al.*, 2006; Cripps y Edwards, 2013). Esta falta de consistencia podría deberse a las diferentes condiciones en las que fueron desarrolladas los experimentos. Con frecuencia se ha informado

que los efectos significativos de los hongos endófitos podrían ocurrir sólo bajo condiciones particulares, tales como estrés por sequía (Hesse *et al.*, 2005) o condiciones con exceso en nutrientes (Newman *et al.*, 2003), o que sólo se produciría mediante la combinación adecuada de hongo endófito, genotipo del hospedante y condiciones ambientales (Ahlholm *et al.*, 2002).

**Tabla 34** Efectos de cada endófito inoculado sobre *Poa pratensis* en los diferentes parámetros de producción y calidad evaluados (MSA: materia seca aérea; MSR: materia seca radicular; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente y el estado mineral) en los ensayos de invernadero. El símbolo positivo (+) indica si el endófito aumentó y el negativo (-) redujo dichos parámetros respectivamente, comparándolos con el control. ( $P = 0,05$ ).

Parámetro	E060	E138	E140	E202	E244	E269	E361	E631
MSA	-	-	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-
MSR	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-
PB	-	-	-	-	-	-	-	-
FND	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-
Al	-	-	-	-	-	-	-	(+)
B	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
Ca	-	-	(+)	-	(-)	-	(+)	-
Cr	-	(-)	(-)	-	(-)	-	-	-
Cu	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)
K	-	-	-	-	-	-	-	-
Li	-	-	-	-	-	-	-	(+)
Mg	-	-	(-)	-	-	-	(-)	-
Mn	-	(-)	-	(-)	-	-	-	-
Mo	-	-	-	-	-	-	-	(+)
Na	-	-	-	-	-	-	-	-
Ni	(+)	-	-	-	(-)	-	(+)	(+)
P	-	(-)	-	(-)	(-)	(-)	-	-
Pb	-	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-	-
Se	-	(-)	(-)	-	(-)	-	-	-
Sr	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-
Ti	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)
Zn	(+)	-	-	-	(-)	-	-	-

E060: *Fusarium lateritium*, E138: *Embellisia leptinellae*, E140: *Stemphylium globuliferum*, E202: *Embellisia leptinellae* *Chaetosphaeronema* sp., E244: Pleosporales sp., E361: CODE361 y E631: *Epicocum nigrum*.

En cuanto a la concentración de minerales contenidos en el forraje, en el caso de *Trifolium subterraneum* también hubo una falta de consistencia entre los resultados obtenidos en invernadero y campo (Tabla 32), lo que podría explicarse en parte por las diferentes concentraciones de los minerales contenidos en el sustrato utilizado en invernadero y el suelo de campo. Dicha falta de consistencia no se mostró en la misma medida en todos los minerales ni para todos los endófitos. Con respecto al Al, como los valores eran mucho más elevados en campo (suelo) que en invernadero (sustrato), la concentración de Al en plantas también fue mayor en las condiciones de campo. El aluminio no es esencial para las plantas ni animales. Las altas concentraciones de Al en el suelo se producen principalmente por un pH bajo (como la

encontrada en nuestro estudio). Este elemento, en función de su concentración puede ser tóxico para las plantas, que podrían reducir la absorción de P y Ca (Huang *et al.*, 1992) y podría tener efectos negativos sobre la apetencia en corderos (Krueger *et al.*, 1985). Por consiguiente, en esas condiciones, una reducción de la absorción y acumulación de Al sería altamente deseable. Los endófitos que fueron capaces de reducir las concentraciones de Al en el ensayo de invernadero fueron el E140 (*Stemphylium globuliferum*), E202 (*Chaetosphaeronema* sp.) y E631 (*Epicoccum nigrum*), aunque no produjeron el mismo efecto en campo. Por tanto, estas especies no serían completamente las más adecuadas para este propósito al no existir esa consistencia en los resultados. Sin embargo, hubo dos especies, el endófito E060 (*Fusarium lateritium*) y el E244 (Pleosporales sp.), que fueron capaces de reducir la concentración de Al en ambos ensayos (aunque en condiciones de campo, los resultados no fueron significativos respecto al control, pero sí que se observa dicha tendencia). Por tanto, estos dos endófitos merecerían ser estudiados en más profundidad, diseñando ensayos adicionales específicos, para ver cómo influyen diferentes concentraciones de Al en el suelo en la capacidad de absorción de la planta cuando el endófito se encuentra en el interior del hospedante. Con respecto al Al, en el caso de *Poa pratensis* también se observó un aumento significativo en el contenido de este elemento en el forraje causado por *Epicoccum nigrum* (Tabla 34).

El ya citado endófito *Fusarium lateritium* (E060) también provocó una menor acumulación de Cr y Fe en el forraje de las plantas de *Trifolium subterraneum*. Esta especie ha sido descrita previamente como endófito en gramíneas silvestres (Azliza *et al.*, 2014), pero también como patógeno en varios cultivos leñosos, como manzano y fresno (Przybył, 2002; Weber y Dralle, 2013; Yun *et al.*, 2013). Aunque en nuestro estudio, la inoculación con esta especie no causó ningún síntoma de enfermedad, su carácter patogénico, podría haberse evidenciado de alguna forma mediante esta menor acumulación de Cr y Fe en las plantas de *T. subterraneum*. No obstante en *Poa pratensis*, este hongo produjo un aumento en el contenido de Fe, Ni, Zn y Ti en el forraje en un 31, 32, 16 y 121 %, respectivamente, en comparación con los controles. Todos estos minerales son considerados esenciales para los animales (Underwood, 1981), por lo que su aumento en los cultivos forrajeros sería deseable. Por ejemplo, el aumento en el forraje en el contenido de Ni, mejoraría en gran medida el metabolismo ruminal de los rumiantes (Suttle, 2010).

La concentración de Fe en el forraje también fue aumentado por el hongo E631 (*Epicoccum nigrum*) en *Poa pratensis* (además del ya citado *Fusarium lateritium*). Un incremento en la absorción del Fe por plantas infectadas por endófitos ya ha sido constatado por

otros autores, tal como Bartholdy *et al.* (2001) para *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox y Johnson *et al.* (2013) para *Epichloë/Neotyphodium*. Este incremento en la absorción de Fe podría ser debido a la producción de sideróforos, compuestos capaces de ligarse fuertemente al  $Fe^{3+}$ , por parte de los endófitos. Johnson *et al.* (2013) mostraron como los hongos del género *Epichloë/Neotyphodium* contienen un gen no ribosómico (sidN) que codifica una sintetasa de sideróforos. Por tanto, estos dos hongos de nuestro estudio, E060 (*Fusarium lateritium*) y E631 (*Epicoccum nigrum*), es posible que fueran capaces también de producir sideróforos. No obstante, se necesitarían estudios posteriores para confirmarlo, ya que hasta la fecha no hay constancia de ello. *E. nigrum* es una Ascomycete que generalmente se asocia con procesos de descomposición primaria de las plantas, aunque también se ha mostrado en numerosas ocasiones como endófito en diversas especies vegetales, siendo muy poco específica su relación con ellas, al ser capaz de colonizar plantas pertenecientes a grupos taxonómicos muy diversos (Martini *et al.*, 2009). También este hongo ha sido encontrado como patógeno de varias especies de plantas, tal como la catalpa (*Catalpa bignonioides* Walter.) (Mahadevakumar *et al.*, 2014), pero es especialmente conocida su actividad como agente de control biológico contra diversos patógenos (Li *et al.*, 2013). Este hongo, a pesar de haber sido bastante referenciado tal como se ha indicado, según nuestro conocimiento, es la primera vez que se le encuentra causando efectos sobre la acumulación de diversos minerales en la planta.

Este mismo endófito *Epicoccum nigrum* también tuvo un efecto positivo adicional; tanto en *Ornithopus compressus* como en el ensayo de invernadero en *Trifolium subterraneum*, este hongo produjo un descenso en la concentración de plomo en el forraje. Este efecto podría tener aplicaciones interesantes ya que el plomo es una de las causas más frecuentes de intoxicación en los animales, siendo el vacuno el tipo de ganado comúnmente más afectado (Suttle, 2010). En consecuencia, en áreas contaminadas con plomo, por ejemplo debido a la actividad minera, una reducción en su absorción y posterior acumulación en el forraje puede ser muy deseable. Este mismo efecto también fue producido por el endófito *Sordaria fimicola* en plantas de *O. compressus*. Con un efecto opuesto, es decir que produjeron un aumento significativo en la acumulación de plomo en el forraje, tenemos el endófito E140 (*Stemphylium globuliferum*), tanto en invernadero como en campo, así como Pleosporales sp. (E244) y el ya citado *Fusarium lateritium* en el ensayo de invernadero, los tres en *T. subterraneum*. Este efecto sería claramente negativo si esta biomasa herbácea se utilizase con un propósito de alimentación animal. Sin embargo tal efecto podría tener aplicaciones positivas, como por ejemplo, la limpieza de plomo de zonas contaminadas mediante programas de fitorremediación. En este caso, plantas con el

endófito podrían ser hiperacumuladoras de plomo, de tal forma que luego mediante su eliminación, fueran poco a poco reduciendo el contenido de plomo del suelo. No obstante, la idoneidad y el potencial real de esta aplicación deben ser contrastadas e investigadas en zonas contaminadas con plomo o mediante ensayos diseñados específicamente incluyendo tratamientos con diferentes concentraciones de plomo.

Tanto en el caso de *Poa pratensis*, como en el de *Trifolium subterraneum*, otro aspecto interesante con respecto a la influencia de *Stemphylium globuliferum* (E140) fue el aumento de la acumulación de zinc en el forraje. El zinc, es un micronutriente esencial para los seres humanos y los animales. Debido a la poca concentración de Zn en el suelo de muchas áreas, se toma de manera insuficiente en aproximadamente el 30 % del mundo (Hotz y Brown, 2004). Los suelos con concentraciones de zinc inferiores a  $25 \text{ mg kg}^{-1}$ , como los del presente estudio, se consideran inadecuados para proporcionar cultivos con suficiente zinc para cumplir los requerimientos de mínima ingesta (Alloway, 2009). Bajo estas condiciones, el uso de hongos endófitos que pudieran aumentar la concentración de zinc en el forraje, podría ser una estrategia muy prometedora para solventar dicha deficiencia, por lo que merecería la pena seguir investigando este aspecto. En nuestro estudio con respecto a *T. subterraneum*, el efecto positivo de la acumulación de zinc debido a *Stemphylium globuliferum* sólo se observó en el ensayo de invernadero, pero no en campo. Esto podría ser explicado por la concentración de Zn en el suelo del ensayo de campo, tres veces mayor que la encontrada en el substrato en el ensayo de invernadero.

En el caso de *Ornithopus compressus*, al inocular *Embellisia leptinellae* se produjo una mayor concentración de B, Cu, Mg, Mo, Na y S en el forraje que la encontrada en los controles. Sin embargo, como se indicó anteriormente, debido a la falta de re-aislamiento de este hongo, estos resultados deben tomarse con cautela hasta que ensayos adicionales pueden confirmar que la infección fue eficaz. El aumento de la concentración de cobre en el forraje también se observó cuando las plantas se inocularon con *Sporormiella pilosa*. El cobre es un oligoelemento esencial, que participa en al menos diez enzimas que catalizan reacciones de tipo oxidasa en plantas y animales. Teniendo en cuenta que las necesidades de las ovejas son  $6 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  de materia seca, y del vacuno son  $7 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  de materia seca para cubrir sus necesidades (Hosking *et al.*, 1986), la inoculación de este hongo sobre *O. compressus*, conseguía alcanzar tales concentraciones. Este efecto también fue encontrado cuando el endófito *Stemphylium globuliferum* fue inoculado sobre *Trifolium subterraneum*.

Por tanto, a la vista de lo anterior, parece claro que en función del efecto que se vaya buscando, el hongo que se debería utilizar sería distinto, ya que cada uno produce beneficios en aspectos diferentes. No obstante, hay que resaltar que estos son ensayos iniciales para detectar el efecto, y ahora para todos los casos se requieren estudios posteriores para constatar la consistencia de dicho efecto y para obtener la mejor forma de implementarlo. También cabe volver a destacar, que para una aplicación futura de los endófitos en campo, los agricultores *a priori* podrían ser reacios a la utilización de hongos, que incluso algunos han sido referenciados como patógenos en otros estudios. Por lo que hay que seguir estudiando la ausencia de efectos fitotóxicos por parte de estos hongos. Además, un requisito básico adicional, y que no ha sido determinado en el presente trabajo, es que los endófitos no produzca forrajes tóxicos para el ganado. Este hecho se debe investigar con varias asociaciones de hongos endófitos-plantas hospedantes, y es que en algunos casos si que se ha constatado la producción de metabolitos secundarios que pueden causar enfermedades en los animales (Fuchs *et al.*, 2013; Thom *et al.*, 2013).

### 5.3. INFLUENCIA SOBRE PATÓGENOS FÚNGICOS.

#### 5.3.1. Efecto del filtrado sobre el crecimiento y la germinación esporal de los patógenos considerados.

Con estos ensayos se pretendió evaluar a los endófitos como agentes de control biológico, ya que se ha demostrado en múltiples trabajos (Felber *et al.*, 2015; Larran *et al.*, 2016) que, dentro de los beneficios que los endófitos pueden conferir a sus plantas hospedante, se encuentra su carácter protector frente a diversos patógenos fúngicos al mostrar antagonismo frente a ellos. De los patógenos evaluados, con respecto a *Biscogniauxia mediterranea*, hongo xylaráceo que afecta a una amplia gama de hospedantes leñosos, en particular al género *Quercus* (Vannini *et al.*, 2009), causando chancro carbonoso en encinas y alcornoques, varios de los endófitos fueron capaces de disminuir su desarrollo. Uno de ellos fue *Paecilomyces variotii*, hongo que se encuentran comúnmente en el suelo, y asociado en la descomposición de productos alimenticios y cosméticos (Wang *et al.*, 2005). En nuestro caso, este endófito fue capaz de reducir de forma significativa en la primera y segunda medición (primer y segundo día después de la siembra) el crecimiento de *B. mediterranea in vitro*, disminuyéndolo en un 43 y 56 % respectivamente. Esto puede ser debido a la capacidad antifúngica del hongo demostrada en estudios previos (Takahashi *et al.*, 1994; Steiner *et al.*, 2013). Así, también se ha evidenciado su utilización para el control de *Fusarium* sp. en el cultivo del tomate (Wahid *et al.*, 2001). Haneishi *et al.* (1988) y Takahashi *et al.* (1994) demostraron que dicho endófito también presentaba una capacidad herbicida tanto a nivel foliar como edáfico, ya que produce un compuesto fitotóxico, la cornexistina.

*Penicillium chrysogenum* también fue capaz de reducir el crecimiento de *Biscogniauxia mediterranea* tanto en la primera medición como en la segunda (primer y segundo día después de la siembra), disminuyendo éste en un 52 y 65 % respectivamente con respecto a los controles. En este caso, esto pudo ser debido a que este hongo produce una proteína con propiedades antifúngicas que según Delgado *et al.* (2015) controla a los hongos indeseados en alimentos secos curados de origen cárnico, con la ventaja de ser una proteína resistente al proceso de esterilización que se lleva a cabo en esos alimentos. Además de esta capacidad antifúngica, presenta también propiedades antibacterianas, como la observada contra *Bacillus subtilis* Ehrenberg, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Escherichia coli* Ehrenberg y *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter. Esta actividad es mayor contra bacterias tipo Gram<sup>+</sup>, en comparación con las bacterias Gram<sup>-</sup> (Dubey *et al.*, 2015). La capacidad antimicrobiana de *P. chrysogenum* puede

provocar la eliminación de ciertas bacterias de la planta hospedante que puede potenciar el crecimiento del hospedante, como ocurre en otros estudios (Riedlinger *et al.*, 2006). No obstante, el efecto de este endófito frente a bacterias no ha sido estudiado en el presente trabajo, pero podría ser un aspecto muy interesante y merecedor de posteriores estudios.

A pesar de los buenos resultados obtenidos por esos dos endófitos en las primeras mediciones, dicho efecto no se mantuvo de manera consistente en la tercera medición. Por tanto, parece ser que la capacidad antagonista de los metabolitos producidos por los endófitos sólo se produciría en los estadios iniciales del crecimiento del patógeno. Una vez superada esta fase inicial, el patógeno o bien se habitúa a crecer en ese medio, o bien lo transforma, inactivando o degradando los metabolitos secundarios del endófito. Así, en este caso en concreto, la aplicación directa de los metabolitos no nos serviría para controlar el patógeno, ya que en seguida se perdería su efecto. Otra cosa diferente sería la utilización del organismo vivo del endófito, que pudiera producir de manera continua el metabolito, ya que en este caso el control podría ser más constante y duradero. Esto se vió apoyado por el pre-ensayo que se realizó de confrontación *in vitro* en ambos organismos (datos no mostrados) en los que se observó una inhibición del crecimiento del patógeno al crecer junto al endófito de esas dos especies. No obstante, se deberían diseñar nuevos experimentos utilizando el organismo vivo, para evaluar las posibilidades reales de uso de estos endófitos como agentes de control biológico frente a este y a otros patógenos.

En el caso del patógeno *Fusarium moniliforme*, es un conocido patógeno que tiene la capacidad de producir una gran cantidad de micotoxinas, que afectan negativamente a productos agrícolas y cereales de granos cuando infecta la planta. Debido a esto, resulta de gran interés encontrar hongos endófitos que en cierta manera sean capaces de reducir su proliferación en planta, para que a su vez se limite la producción de sus micotoxinas, entre ellas la moniliformina (Colé *et al.*, 1973), que afecta al entorno del metabolismo de los glúcidos, inhibiendo el mecanismo base de las enzimas y atacando a la Vitamina B (tiamina) (Soriano del Castillo, 2007), todo lo cual puede provocar cáncer en el ganado (García Martínez, 2002). Varios de los hongos endófitos utilizados en el presente trabajo mostraron algún grado de antagonismo frente a este patógeno. Uno de ellos fue *Sordaria fimicola*, caracterizado por ser un hongo que naturalmente se encuentra en estiércoles de animales herbívoros (Bell, 1983). En nuestro ensayo, este hongo fue capaz de reducir el crecimiento miceliar de *F. moniliforme* en la segunda y tercera medición en un 15,46 e 17,09 %, respetivamente. Su capacidad antifúngica ya ha sido demostrada en anteriores trabajos (Dewan *et al.*, 1994; Jeamjitt, 2007). Así, ha mostrado su

capacidad para inhibir más del 50 % el crecimiento del micelio de *Pestalotiopsis guepinii* Desm., *Colletotrichum capsici* Syd., *Cochliobolus lunatus* Nelson & Haasis, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* (Jeamjitt *et al.*, 2007). Dewan *et al.* (1994) estudiaron que *Sordaria fimicola* fomentó el crecimiento vegetal y redujo la mortalidad de plantas de trigo y centeno después de la inoculación del patógeno *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Estos autores lo achacaron a que *S. fimicola* en medio de cultivo PDB (caldo de patata y dextrosa) es capaz de producir ácido indolacético y triacantanol, compuestos capaces de contribuir al crecimiento de la planta y reducir varias enfermedades. No obstante, el efecto que se vió en el presente trabajo sobre la reducción del crecimiento miceliar del patógeno, no se mantuvo de manera consistente en otros parámetros, como en la germinación esporal, en la que no se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles. Por tanto la capacidad antifúngica de la cepa utilizada en el presente trabajo parece limitada, aunque nuevos ensayos podrían clarificar los resultados obtenidos no del todo concluyentes.

Por otro lado *Trichoderma gamsii* redujo el crecimiento miceliar de *Fusarium moniliforme* en un 12,06 % en la tercera medición. El antagonismo que presenta este hongo frente a diversos patógenos ya fue citada por otros estudios (Zhang *et al.*, 2015), que muestran los mecanismos de antibiosis de *Trichoderma afroharzianum* y *Trichoderma gamsii* contra hongos procedentes del suelo y patógenos en plantas. Dicha capacidad de este hongo como agente de control biológico también ha sido indicado por Jin-Lian *et al.* (2015) para el caso de la raíz de *Panax notoginseng* Burk. Autores como Sarrocco *et al.* (2013) también demuestran la capacidad antagonista, micoparásita y competidora de *T. gamsii* frente a *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* en sustratos naturales. En ese caso, *T. gamsii* redujo la severidad de la fusariosis de la espiga en un 57 %. A pesar de la multitud de estudios que han constatado el claro antagonismo que esta especie tiene frente a diversos patógenos, en nuestro trabajo dicho efecto no fue tampoco muy consistente, ya que sólo se produjo en una de las mediciones, y no se observó reducción significativa en la germinación esporal. Por tanto, o bien la cepa utilizada no es muy activa en comparación con las utilizadas en los otros estudios, o bien el aislado de *F. moniliforme* utilizado puede suprimir o limitar los efectos antagonista del endófito. Por último, frente a *F. moniliforme*, el efecto mayor detectado en la reducción del crecimiento miceliar del patógeno lo produjo el endófito *Paecilomyces variotii*, que fue capaz de reducir el crecimiento del patógeno en la segunda, tercera y cuarta medición (hasta un máximo de 29,59 % en la tercera medición). Este hecho, sumado a su buen comportamiento también frente a *Biscogniauxia mediterranea*, y a su capacidad como antagonista frente a otros patógenos mostrada en la

bibliografía y ya indicada anteriormente, le confieren un cierto interés y merecería ser estudiado en más detalle, tanto él mismo como los metabolitos secundarios que pueda producir.

### **5.3.2. Efecto de la asociación del endófito-patógeno sobre la patogenicidad y calidad de *Lolium rigidum*.**

El estado sanitario de las plantas de *Lolium rigidum* cultivadas en el invernadero dependió principalmente del patógeno inoculado, presentando un mayor índice de severidad aquellas en las que se inoculó *Fusarium moniliforme*. Esto puede ser debido a que este patógeno está mucho más especializado en afectar a especies herbáceas de gramíneas, mientras que *Biscogniauxia mediterranea* es un patógeno que afecta sobre todo a especies arbóreas del género *Quercus* (Vannini *et al.*, 2009). Aún así, hay que precisar que *F. moniliforme* tampoco tuvo un comportamiento especialmente patogénico en las plantas de *L. rigidum*. Por tanto, este hongo parece mostrar un cierto grado de especificidad o preferencia por el hospedante, ya que la vista de los resultados, en otro hospedante diferente al suyo de origen, aunque también gramínea, su grado de severidad disminuyó mucho, y prácticamente no tuvo efectos negativos sobre la producción de biomasa aérea y radicular, ni sobre los parámetros de calidad de esta especie vegetal.

La falta de patogenicidad de *Biscogniauxia mediterranea* se pudo deber a que el aislado utilizado en el presente trabajo fue obtenido creciendo como endófito en la especie de pasto de dehesa *Biserrula pelecinus*. Por tanto, se podría pensar que su patogenicidad se muestra sólo en sus hospedantes específicos y que en el resto de especies actúa como endófito, funcionando como reservorio que iría transmitiéndose así por toda la dehesa, esperando que un determinado hospedante susceptible, en condiciones desfavorables permita su infección, y sea colonizado. Ya son conocidos algunos modos de dispersión que presenta este patógeno, como la dispersión vertical, a través de semillas infectadas de plantas infectadas (Henriques *et al.*, 2015), o a través de un vector, como el coleóptero *Platypus cylindrus* Fab., que es capaz de transportar al hongo (Inácio *et al.*, 2012). En este sentido, *B. mediterranea* no sólo no se comportó como patógeno, sino que además pareció mejorar el estado vegetativo de las plantas o de protegerlas de alguna forma ya que a partir de la cuarta semana, las plantas inoculadas con este hongo presentaron valores del índice de severidad menores incluso que en los controles. Esto nos indicaría que esta especie cuando se comporta como endófito protegería a la planta frente a otros agentes bióticos o

abióticos, en línea con la hipótesis establecida por Barklund y Unestam (1988) y Ranta *et al.* (1995), de que los hongos endófitos formarían parte del sistema defensivo de su hospedante.

También se encontró que el endófito influía en el índice de severidad causado por los patógenos en las plantas cuando ambos organismos eran inoculados, de tal forma que la interacción "Patógeno \* Endófito" resultó significativa en la primera, quinta y sexta medición. En la primera medición el hongo endófito que más redujo el índice de severidad causado por *F. moniliforme* fue *Paecilomyces variotii* (E408), que lo redujo en un 62,5 %. Esto puede ser debido a su conocida capacidad antagónica frente a especies del género *Fusarium* (Wahid *et al.*, 2001). Este efecto en planta confirma por tanto los resultados *in vitro* realizados, en los que este hongo redujo el crecimiento micelial de ambos patógenos. No obstante, es importante indicar que si bien este hongo mostró un efecto protector en los primeros momentos (1ª semana) frente a *Fusarium* en planta, a partir de la quinta medición (5ª y 6ª medición) este efecto se limitó, si bien es cierto que en esas dos semanas *F. moniliforme* tampoco produjo un mayor índice de severidad. Curiosamente, se observó que cuando los endófitos eran inoculados sólo, el índice de severidad provocado por *P. variotii* iba siendo mayor, y mayor que en los controles, según avanzaba la semana. Este efecto sin embargo no fue apreciado cuando además era inoculado alguno de los patógenos.

Para intentar explicar este hecho, hay que tener en cuenta que, en anteriores trabajos (Haneishi *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1994), *Paecilomyces variotii* ha demostrado también tener actividad herbicida frente a varios hospedantes. Por tanto, se podría hipotetizar que cuando esta especie se inoculó sólo, no tendría competencia con otros hongos, pudiendo desarrollarse más y por tanto evidenciando de una mayor forma ese carácter herbicida. Cuando además se inoculaba otro hongo, la competencia intraespecífica entre ambas especies produciría un menor desarrollo en *P. variotii*, disminuyendo así su capacidad herbicida. Por tanto este hongo, en su actividad metabólica secundaria, podría modificar la asignación de recursos o bien a la producción de compuestos con actividad fungicida o bien a la producción de compuestos con actividad herbicida, en función de sus necesidades. No obstante, para confirmar esta hipótesis se necesitaría realizar nuevos experimentos con un diseño experimental específicamente planteado a ese objetivo.

No sólo es importante evaluar el efecto de un patógeno, y la influencia de un endófito sobre la patogenicidad de éste, sobre el índice de severidad que cause sobre la planta, sino también sobre parámetros productivos y de calidad del forraje de la planta hospedante. Al respecto, ninguno de los patógenos causó reducción significativa en la biomasa forrajera ni

radicular producida. Por tanto, esto nos indica que a pesar de cierta sintomatología de enfermedad provocada sobre todo por *Fusarium moniliforme*, dicha patogenicidad no se vió refrendada en descenso productivo del forraje. Es frecuente encontrar en la bibliografía referencias que asocian daños provocados por patógenos fúngicos con disminuciones de producción (Eyal *et al.*, 1987; Nganje *et al.*, 2004). Así, el hecho de no encontrar tal asociación en el presente trabajo nos indicaría una virulencia débil, en el caso de *F. moniliforme* y nula en el caso de *Biscogniauxia mediterranea*, sobre *Lolium rigidum*, la especie hospedante estudiada.

Lo que si que se observó fue un efecto del endófito en la producción de pasto. En este caso, el hongo endófito *Epicoccum nigrum* (E631) aumentó significativamente la producción de materia seca aérea del forraje. Dicho hongo también produjo un incremento de la materia seca radicular, especialmente cuando *Biscogniauxia mediterranea* era también inoculada, lo cual podría explicar la mayor capacidad de esas plantas para absorber más nutrientes, y poder así incrementar la producción de forraje. En los resultados del anterior capítulo, en el que se estudió el efecto de varios endófitos sobre la producción y calidad de otras tres especies de pasto, *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus* y *Poa pratensis*, este hongo, *E. nigrum* no causó un aumento significativo en la producción de biomasa, ni aérea ni radicular, en ninguna de ellas. En *T. subterraneum* si que se observó cierta tendencia por parte de este endófito de aumentar la producción de forraje, pero esta no fue significativa. Por tanto, parece claro que dicho efecto no es consistente y que claramente depende de la especie hospedante, tal y como ya ha sido establecido que para que se produzca un determinado efecto, se tiene que dar la combinación adecuada de "hongo endófito", "planta hospedante" y "condiciones ambientales" (Ahlholm *et al.*, 2002).

Por otro lado en cuanto a la calidad del pasto (proteína bruta, fibra neutro y ácido detergente, lignina ácido detergente y contenido en cenizas), se sabe que ésta muy ligado al desarrollo fenológico de las plantas, de tal forma que cuanto más avanzado sea éste, peor calidad presenta el forraje, con valores menores de proteína y de digestibilidad (que está inversamente correlacionada con los valores de fibra) (Santamaría *et al.*, 2014). Por tanto, cualquier cambio en estos parámetros de calidad debido a la inoculación de un hongo (ya sea endófito o patógeno) podría pensarse que es debido a los cambios en el estadio fenológico producidos por éstos, tal y como ha sido discutido en el anterior capítulo. En este sentido, una planta cuando está sometida a cualquier tipo de estrés, sea biótico o abiótico, tiende a acelerar su ciclo vital, para fructificar cuanto antes y poder asegurar su descendencia. Por tanto, los hongos que produjeran descensos de la calidad del forraje, en principio podrían ser calificados como negativos para la planta y

viceversa. Asumiendo este argumento, cuando los hongos fueron inoculados solos, *F. moniliforme* no tuvo ningún efecto sobre los parámetros de calidad, mientras que de los endófitos, cuatro de ellos, *Sordaria fimicola* (E071), *Paecilomyces variotii* (E408), *Epicocum nigrum* (E631) y *Penicillium chrysogenum* (E635) redujeron significativamente el contenido de proteína bruta del forraje.

De estos cuatro, *P. variotii* ya ha sido indicado en la presente discusión como inductor de sintomatología patogénica en las plantas, por lo que se confirmaría su actividad herbicida ya propuesta en anteriores trabajos (Haneishi *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1994). Los otros tres hongos sin embargo, no han mostrado comportamiento fitopatógeno ni en el presente trabajo, ni de manera consistente en trabajos de otros autores. En estos casos se podría contemplar la hipótesis indicada por Assuero *et al.* (2006) de que ciertos endófitos pueden producir sustancias similares a las hormonas vegetales que pueden acelerar o ralentizar su ciclo vital. Aun así, esta hipótesis de cambios en el estadio fenológico en las plantas por parte de los hongos hay que tomarla con cierta cautela, puesto que los descensos en el contenido proteico no se vieron refrendados por aumentos en los contenidos de fibra en el forraje, aspectos ambos que suelen ir aparejados en cambios de esa naturaleza. En cualquier caso, lo cierto es que los descensos en el contenido en proteína bruta producidos por esos hongos endófitos al ser inoculados solos, desaparecieron cuando además era inoculado el patógeno, *Fusarium moniliforme*.

Por tanto, sea cual sea la razón de dicho descenso, ésta no se produjo en presencia del otro microorganismo, quizá como ya se comentó anteriormente porque el hongo en este caso tiene que dedicar más recursos a ocuparse de la competencia con esa otra especie y menos a su propio desarrollo. Esto fue así, excepto para el caso de *Sordaria fimicola*, que incluso cuando *Fusarium moniliforme* era también inoculado, seguía causando dicho descenso en los contenidos de proteína, lo cual indicaría que esta especie no se vio tan afectada por la competencia con el patógeno. Caso aparte fue el endófito *Penicillium chrysogenum*, que cuando fue inoculado junto a *F. moniliforme* aumentó el contenido proteico del forraje, es decir que la asociación de ambos hongos tuvo un efecto completamente distinto a cuando ambos fueron inoculados por separado. Sin realizar nuevos ensayos, sería demasiado especulativo indicar alguna hipótesis para justificar este hecho, pero parece que se produjo algún tipo de interacción entre ambas especies; si bien es cierto que dicha interacción no se vio reflejada en el resto de parámetros analizados.

Con respecto a la fibra, el único aspecto reseñable es que el patógeno cuando fue inoculado sólo, produjo un descenso en el contenido de FAD con respecto a los controles. Algunas especies endofíticas, como *Acremonium zeae* en maíz, se han mostrado capaces de

producir enzimas hemicelulósicas capaces de degradar la fibra (Bischoff *et al.*, 2009). Sin embargo, como este aspecto no ha sido indicado en la bibliografía para especies del género *Fusarium*, parece demasiado aventurado atribuir este hecho como causa de dicho descenso sin realizar ensayos posteriores. Cuando se inoculaba además alguno de los endófitos, también se apreció algún efecto sobre la fibra. Sin embargo como éste no fue consistente no merece mayor análisis. Por último en cuanto al contenido en minerales de la materia seca aérea (medido a través de su contenido en cenizas), varios de los hongos o varias de las asociaciones de hongos produjeron diferencias en su contenido en el forraje. Estas diferencias debido a la inoculación de los hongos, podrían ser atribuidas a dos aspectos: o bien que produjeran cambios en la capacidad de absorción del sistema radicular de la planta, o bien que hicieran una utilización más o menos activa para su propio metabolismo. Con respecto al primer aspecto, cabe decir que, al menos a nivel de materia seca radicular, no hubo una correspondencia evidente entre las diferencias en el contenido en ceniza del forraje y la producción de materia seca por parte de los diferentes tratamientos. Por tanto esta hipótesis podría ser descartada, al menos a nivel de una menor producción de raíces producida por los hongos. Habría que hacer nuevos ensayos para determinar si dichos hongos pudieran haber interferido de alguna otra forma en los mecanismos o en las rutas de absorción de las raíces.

Con respecto al segundo aspecto, es decir el de una utilización más o menos activa de dichos minerales por parte de los hongos, si que es cierto al menos que en todos los casos (aunque no en todos de manera significativa) el contenido en minerales del forraje de las plantas inoculadas con al menos un organismo era menor que en las plantas sin inocular. Se podría pensar que a mayor número de hongos implicados, mayor utilización del contenido mineral, pero esto no fue así de manera generalizada, y los menores contenidos de ceniza se dieron en plantas inoculadas con un solo hongo. Una vez más, la competencia entre especies implicadas produciría un menor desarrollo y actividad de cada especie que haría que su utilización real no fuera mayor que al inocular un hongo sólo. Nuevos análisis, con la determinación concreta de cada mineral, podría aportarnos más información sobre la utilización de éstos por parte de los hongos estudiados, o bien sólo, o bien en asociación entre ellos.



## **6. CONCLUSIONES**



## Conclusiones

- *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus compressus* presentaron una gran abundancia (773 y 726 aislamientos) y riqueza (54 y 61 especies) de hongos endófitos respectivamente, la mayoría de ellos pertenecientes al *phylum Ascomycota*. Las clases más ricas y abundantes fueron Dothideomycetes y Sordariomycetes.
- En la diversidad y riqueza de la micoflora endofítica de un determinado hospedante, tanto la zona muestreada como el tipo de tejido analizado (hojas y tallos) tienen un papel importante para su evaluación. Esto es así, ya que muchas especies presentaron una distribución muy específica además de mostrar una clara especificidad frente al tejido (alrededor de un 75 % de los endófitos tenía una clara preferencia por un tipo de tejido tanto para *Trifolium subterraneum*, como para *Ornithopus compressus*).
- En *Trifolium subterraneum*, *Chaetosphaeronema* sp. fue la especie con mejor comportamiento a la hora de aumentar la producción del forraje. Con respecto al contenido en minerales del forraje, mientras que los endófitos *Fusarium lateritium*, *Epicoccum nigrum* o E244 (Pleosporales sp.) produjeron un descenso en las concentraciones de Al o Pb, *Stemphylium globuliferum* fue el hongo que más aumentó la concentración de Zn, nutriente esencial para plantas y animales, al ser inoculados.
- Para *Ornithopus compressus*, *Sporormiella pilosa* fue la especie que más consiguió mejorar el valor nutritivo (proteína bruta o digestibilidad) de su forraje. La inoculación en planta de este mismo hongo, al igual que con *Embellisia leptinellae* produjo un aumento significativo de un gran número de nutrientes esenciales para plantas y animales. La inoculación con *Epicoccum nigrum* y *Sordaria fimicola* provocó un descenso en la concentración de Pb del forraje.
- Para *Poa pratensis*, la inoculación con *Stemphylium globuliferum*, *Chaetosphaeronema* sp., *Penicillium* sp.; y CODE361 fue con la que obtuvo las mejores producción de biomasa. La inoculación con estos hongos (excepto E361), además de *Embellisia leptinellae* y E244 (perteneciente al orden Pleosporales), produjo también un forraje de mayor calidad y mayor concentración de nutrientes esenciales para plantas y animales.
- Por tanto, el uso de hongos endófitos puede ser una estrategia interesante para la mejora de la producción vegetal, para hacer frente a posibles deficiencias de nutrientes o problemas de toxicidad, ya que una gran parte de los endófitos estudiados presentaron un efecto positivo sobre alguno de los parámetros productivos o de calidad nutritiva del forraje sobre alguna de las especies de pasto de dehesa analizadas, *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus*

## Conclusiones

y *Poa pratensis*, al ser éstos inoculados. Dicho efecto dependió de la especie de endófito, de la especie de hospedante y de las condiciones ambientales. Por tanto en función del efecto buscado, la especie endofítica más conveniente será diferente en cada caso.

- Los hongos endófitos se pueden comportar como antagonistas de hongos patógenos afectando a alguna de sus características fisiológicas y fitopatógenas, tal como el crecimiento micelial *in vitro*. Así, el crecimiento de *Fusarium moniliforme* fue limitado por *Sordaria fimicola* y *Paecilomyces variotii*, y el de *Biscogniauxia mediterranea* por los endófitos *Paecilomyces variotii*, *Trichoderma gamsii* y *Penicillium chrysogenum*.
- Con respecto al papel de los endófitos como agentes de control biológico frente a esos patógenos en planta, éste no pudo ser evaluado con precisión puesto que ninguno de los dos patógenos evaluados se comportaron con un elevado nivel patogénico en el hospedante estudiado, *Lolium rigidum*. Aún así los efectos producidos sobre la producción y calidad del forraje fueron distintos en función de si los hongos eran inoculados sólo o en asociación patógeno-endófito.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Ahlholm, J.U.; Helander, M.; Lehtimäki, S.; Wäli, P.; Saikkonen, K. (2002).** Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos* 99: 173-183.
- Alloway, B.J. (2009).** Zn in the soils and crop nutrition. International Zn Association. IZA and IFA Brussels, Belgium and Paris, France.
- Anonymous (2001).** Serradella. Agfact P2.5.23. 2th edn. Department of Primary Industries Agriculture. Available from: [www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/pastures/pastures-and-rangelands/species-varieties/factsheets/serradella](http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/pastures/pastures-and-rangelands/species-varieties/factsheets/serradella).
- AOAC (2006).** Official methods of analysis, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- Arnold, A. E. (2007).** Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*. 21: 51-66.
- Arnold, A.E.; Herre, E.A. (2003).** Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological patterns and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*. 95: 388-398.
- Arnold, A.E.; Lutzoni, F. (2007).** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?. *Ecology*. 88: 541-549.
- Arnold, A.E.; Maynard, Z.; Gilbert, G.S.; Coley, P.D.; Kursar, T.A. (2000).** Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. *Ecology Letters*. 3: 267-274.
- Arnold, A.E.; Mejia, L.C.; Kylo, D.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Robbins, N.; Herre, E.A. (2003).** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 15649-15654.
- Assuero, S.G.; Tognetti, J.A.; Colabelli, M.R.; Agnusdei, M.G.; Petroni, E.C.; Posse, M.A. (2006).** Endophyte infection accelerates morpho-physiological responses to water deficit in tall fescue. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 49: 359-370.
- Ates, S.; Lucas, R.J.; Edwards, G.R. (2013).** Effects of stocking rate and closing date on subterranean clover populations and dry matter production in dryland sheep pastures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 56: 22-36.

## Bibliografía

- Azliza, I.N.; Hafizi R.; Nurhazrati M.; Salleh, B. (2014).** Production of major mycotoxins by *Fusarium species* isolated from wild grasses in Peninsular Malaysia. *Sains Malays.* 43: 89-94.
- Bacon, C.W.; Hinton D.M. (1996).** Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Canadian Journal of Botany.* 74: 1195-1202.
- Baeta Neves, C.M. (1948).** A investigação científica e os problemas da protecção do sobreiro no Ribatejo. *Boletim Junta nacional da Cortiça.* 116: 386-389.
- Baeta Neves, C.M. (1949).** A seca dos sobreiros. *Gazeta das Aldeias.* 2168: 730-733.
- Baeta Neves, C.M. (1954).** A morte dos sobreiros. *Gazeta das Aldeias.* 2284: 568-570.
- Barba, L.; Carretero, J. M.; García, A.; García, J.; López, A. (2008).** Plan Español de Dehesas. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, España, Madrid.
- Barbetti, M.J.; Sivasithamparam, K. (1986).** Fungal foliar diseases of subterranean clover. *Review of Plant Pathology.* 65: 513-521.
- Barklund, P.; Unestam, T. (1988):** Infection experiments with *Gremmeniella abietina* on seedlings of Norway spruce and Scots pine. *European Journal of Forest Pathology.* 18: 409-420.
- Bartholdy, B.A.; Berreck, M.; Haselwandter, K. (2001).** Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *BioMetals.* 14: 33-42.
- Baura, G.; Szaro, T.M.; Bruns, T.D. (1992).** *Gastrospuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. *Mycologia.* 84: 175-184.
- Bazely, D.R.; Vicari, M.; Emmerich, S.; Filip, L.; Lin, D.; Inman, A. (1997).** Interactions between herbivores and endophyte-infected *Festuca rubra* from the Scottish islands of St. Kilda, Benbecula and Rum. *Journal of Applied Ecology.* 34: 847-860.
- Bell, A. (1983).** Dung fungi: an illustrated guide to coprophilous fungi in New Zealand. Victoria University Press, Wellington, New Zealand.
- Bernardi-Wenzel, J.; García, A.; Celso, J. R.; Prioli, A.J.; Pamphile, J. A. (2010).** Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biological Research.* 43: 375-384.

## Bibliografía

- Bernstein, M.E.; Carroll, G.C. (1977).** Internal fungi in old-growth *Douglas fir* foliage. *Canadian Journal of Botany-revue Canadienne De Botanique*. 55: 644-653.
- Bills, G.F. (1996).** Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: Endophytic fungi in grasses and woody plants, 31-65. Eds: Erdlin, S.C. and Carris, L.M. APS Press, United States.
- Bills, G.F.; Polishook, J.D. (1994).** Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia*. 86: 187-198.
- Bischoff, J.F.; White, J.F. (2005).** The fungal community: Its organization and role in the ecosystem, 3th end. Eds: Dighton, J.; White, J.F.; Oudemans, P. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, United States.
- Bischoff, K.M.; Wicklow, D.T.; Jordan, D.B.; de Rezende, S.T.; Liu, S.; Hughes, S.R.; Rich, J.O. (2009).** Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*. *Microbial*. 58: 499-503.
- Bolger, T.P.; Turner, N.C.; Leach, B.J. (1993).** Water use and productivity of annual legume-based pasture systems in the south-west of Western Australia. The XVII International Grassland Congress. Eds.: Baker, M.J. New Zealand Grassland Association, Palmerston North. 274-275.
- Bolland, M.D.A.; Gladstones, J.S. (1987).** Serradella (*Ornithopus* spp.) as a pasture legume in Australia. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*. 53: 5-10.
- Bonos, S.A.; Wilson, M.M.; Meyer, W.A.; Funk, C.R. (2005).** Suppression of red thread in fine fescues through endophyte-mediated resistance. *Applied Turfgrass Science*. 25: 1-7.
- Bordallo, J.J.; López-Llorca, L.V.; Jansson, H.B.; Salinas, J.; Persmark, L.; Asensio, L. (2002).** Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode trapping fungi. *New Phytologist*. 154: 491-499.
- Botella, L.; Diez, J.J. (2011).** Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*. 47: 9-18.
- Bousquet, J.; Simon, L.; Lalonde, M. (1990).** DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forest Research*. 20: 254-257.

- Brathen, K.A.; Jahiri, X.; Herranz, J.G.; Soininen, E.M.; Jensen, J.B. (2015).** Fungal endophyte diversity in tundra grasses increases by grazing. *Fungal Ecology*. 17: 41-51.
- Breen, J.P. (1994).** *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology*. 39: 401-423.
- Bremner, J.M. (1996).** Nitrogen total. In: *Methods of Soil Analysis-Chemical Methods*, 3: 1085-1121. Ed: Sparks, D.L. Madison, Wisconsin, United States.
- Bruns, T.D.; Fogel, R.; Taylor, J.W. (1990).** Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia*. 82: 175-184.
- Bullitta, R. (1976).** Un nuovo loglio animale autoriseminante. *L'informatore agrario*. 36: 23945-23947.
- Camilo-Alves, C.; Esteves da Clara, M.I.; Cabra de Almeida, N.M. (2013).** Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review. *European Journal of Forest Research*. 132: 411-432.
- Carroll, G.C. (1986).** The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: *Microbiology of the Phyllosphere*, 205-222. Cambridge University Press, Cambridge.
- Carroll, G.C. (1995).** Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany*. 73: 1316-1324.
- Chapman, H.D. (1965)** Cation-exchange capacity. In: *Methods of Soil Analysis-Chemical and Microbiological Properties*, 9: 891-901. Ed: Black, C.A. Madison, Wisconsin, United States.
- Clarke, B.B.; White, J.F.; Hurley, H.; Torres, M.S.; Sun, S.; Huff, D.R. (2006).** Endophyte mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease*. 90: 994-998.
- Clay, K. (1988).** Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*. 69: 10-16.
- Clay, K.; Schardl, C. (2002).** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*. 160: 99-127.
- Clay, K.; Shearin, Z.R.C.; Bourke, K.A.; Bickford, W.A.; Kawalski, K.P. (2016).** Diversity of fungal endophytes in non-native *Phragmites australis* in the Great Lakes. *Biological Invasions*. doi: 10.1007/s10530-016-1137-y.

## Bibliografía

- Cole, R.J.; Kirksey, J.W.; Cutler, H.G.; Doupnik B.L.; Peckham, J.C. (1973).** Toxin from *Fusarium moniliforme*: effects on plants and animals. *Science*. 179: 1324-1326.
- Collado, I.G.; Aleu, J.; Hernández-Galán, R.; Durán-Patrón, R. (2000).** *Botrytis* species: an intriguing source of metabolites with a wide range of biological activities. Structure chemistry and bioactivity of metabolites isolated from *Botrytis* species. *Current Organic Chemistry*. 4: 1261-1286.
- Collado, J.; Platas, G.; González, I.; Peláez, F. (1999).** Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist*. 144: 525-532.
- Colwell, R.K. (2013).** Estimates: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9.1. User's Guide. Available from: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Colwell, R.K.; Coddington, J.A. (1994).** Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. 345: 101-118.
- Conning, S.A.; Renton, M.; Ryan, M.H.; Nichols, P.G.H. (2011).** *Biserrula* and subterranean clover can co-exist during the vegetative phase but are out-competed by capeweed. *Crop and Pasture Science*. 62: 236-247.
- Cripps, M.G.; Edwards, G.R. (2013).** Fungal endophytes of a forage grass reduce faecal degradation rates. *Basic and Applied Ecology*. 14: 146-154.
- Croce, P.; De Luca, A.; Mocioni, M.; Volterrani, M.; Beard, J.B. (2001).** Warm season turfgrass species and cultivar characterizations for a Mediterranean climate. *International Turfgrass Society Research Journal*. 9: 855-859.
- Cullings, K.W.; Szaro, T.; Bruns, T.D. (1996).** Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal epiparasites. *Nature*. 7: 63-66.
- De Bary, A. (1866).** Morphologie und physiologie der pilze, flechten und Myxomyceten. Ed: Hofmeister, W. Engelmann, Leipzig.
- De Battista, J.P.; Boston, J.H.; Bacon, C.W.; Siegel, M.R. (1990).** Rhizome and herbage production of endophyte-removed tall fescue clones and populations. *Agronomy Journal*. 82: 651-654.

- Delgado, J.; Acosta, R.; Rodríguez-Martín, A.; Bermúdez, E.; Núñez, F.; Asensio, M.A. (2015).** Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 205: 23-29.
- Del Pozo, A.; Ovalle, C. (2009).** Productivity and persistence of yellow serradella (*Ornithopus compressus* L.) and biserrula (*Biserrula pelecinus* L.) in the Mediterranean climate region of central Chile. *Chilean Journal Agricultural Research*. 69: 340-349.
- Dennis, S.B.; Allen, V.G.; Saker, K.E.; Fontenot, J.P.; Ayad, J.Y.M.; Brown, C.P. (1998).** Influence of *Neotyphodium coenophialum* on copper concentration in tall fescue. *Journal of Animal Science*. 76: 2687-2693.
- Devarajan, P.T.; Suryanarayanan, T.S. (2006).** Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes. *Fungal Diversity*. 23: 111-119.
- Dewan, M.M.; Ghisalberti, E.L.; Rowland, C.; Sivasithamparan, K. (1994).** Reduction of symptoms of take-all of wheat and rye-grass seedlings by the soil-borne fungus *Sordaria fimicola*. *Applied Soil Ecology*. 1: 45-51.
- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. (1995).** Basic plant pathology methods, 2th edn. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Dubey, S.; Patil, K.; Sharma, P.; Tandon, G. D. (2015).** *Penicillium piceum*: A Potential Source for Antimicrobial Agents and Beta-lactamase Inhibitors. *Biologia*. 70: 19-26.
- Dudeja, S.S.; Giri, R.; Saini, R.; Suneja-Madan, P.; Kothe, E. (2012).** Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of Basic Microbiology*. 52: 248-260.
- Dürr, G.H.; Kunelius, H.T.; Drapeau, R.; McRae, K.B.; Fillmore, S.A.E. (2005).** Herbage yield and composition of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) cultivars under two harvest systems. *Canadian Journal of Plant Science*. 85: 631-639.
- Ek-Ramos, M.J.; Zhou, W.; Valencia, C.U.; Antwi, J.B.; Kalns, L.L.; Morgan, G. D.; Kerns, D. L.; Sword, G. A. (2013).** Spatial and temporal variation in fungal endophyte communities isolated from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*). *PLoS ONE*. 8: e66049.
- Eschen, R.; Hunt, S.; Mykura, C.; Gange, A.C.; Sutton, B.C. (2010).** The foliar endophytic fungal community composition in *Cirsium arvense* is affected by mycorrhizal colonization and soil nutrient content. *Fungal Biology*. 114: 991-998.

## Bibliografía

- Eyal, Z.; Sharen, A.L.; Prescott, J.M.; van Ginkel, M. (1987).** The *Septoria* diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico
- Faeth, S.H.; Gardner, D.R.; Hayes, C.J.; Jani, A.; Wittlinger, S.K.; Jones, T.A. (2006).** Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of Chemical Ecology*. 32: 307-324.
- Faeth, S.H.; Hayes, C.J.; Gardner, D.R. (2010).** Asexual endophytes in a native grass: tradeoffs in mortality, growth, reproduction, and alkaloid production. *Microbial Ecology*. 60: 496-504.
- Faeth, S.H.; Sullivan, T.J. (2003).** Mutualistic, asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *American Naturalist*. 161: 310-325.
- Fearon, C.H.; Hayward, M.D.; Lawrence, M.J. (1983).** Self incompatibility in ryegrass. V. Genetic control in diploid *Lolium multiflorum*. *Heredity*. 50: 35-45.
- Felber, A.C.; Orlandelli, R.C.; Rhoden, S.A.; Garcia, A. ; Costa A.T.; Azevedo, J.L.; Pamphile, J.A. (2015).** Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. *Annals of Microbiology*. 66: 765-775.
- Fernández, P.; Porras, C.J. (1998).** La dehesa. Algunos aspectos para la regeneración del arbolado. Informaciones técnicas 58/98. Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Servicio de publicaciones y divulgación, España, Sevilla.
- Ferreira de Souza, G.; Galerani Mossini, S.A.; Arrotéia, C.C.; Kimmelmeier, C.; Machinski Junior, M. (2014).** Evaluation of the mycoflora and aflatoxins from the pre-harvest to storage of peanuts: a case study. *Acta Scientiarum*. 36: 27-33.
- Fisher, P.J.; Graf, F.; Petrini, L.E.; Sutton, B.C.; Wookey, P.A. (1995).** Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high polar semidesert and from the Swiss Alps. *Mycologia*. 87: 319-323.
- Fisher, P.J.; Petrini, O. (1992).** Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist*. 120: 137-143.
- Frame, J. (2006).** Publishers book Grasslands: Developments Opportunities Perspectives with S.G. Reynolds. Available from: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000489.htm>.

- Frame, J.; Charlton, J.F.L.; Laidlaw, A.S. (1998).** Temperate forage legumes. CAB International, Wallingford. *The Journal of Agricultural Science*. 131: 497-498.
- Freeman, E.M. (1904).** The seed-fungus of *Lolium temulentum* L. the Darnel. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 196: 1-27.
- Fritz, J. O.; Collins, M. (1991).** Yield, digestibility, and chemical composition of endophyte free and infected tall fescue. *Agronomy Journal*. 83: 537-541.
- Fröhlich, J.; Hyde, K.D.; Petrini, O. (2000).** Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*. 104: 1202-1212.
- Frøslev, T.G.; Matheny, P.B.; Hibbett, D.S. (2005).** Lower level relationships in the mushroom genus *Cortinarius* (Basidiomycota, Agaricales): A comparison of RPB1, RPB2, and ITS phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37: 602-618.
- Fuchs, B.; Krischke, M.; Mueller, M.J.; Krauss, J. (2013).** Peramine and lolitrem B from endophyte-grass associations cascade up the food chain. *Journal of Chemical Ecology*. 39: 1385-1389.
- Gallery, R.; Dalling, J.W.; Arnold, A. E. (2007).** Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with neotropical *Cecropia*. *Ecology*. 88: 582-588.
- Gange, A.C.; Dey, S.; Currie, A.F.; Sutton, B.C. (2007).** Site-and species specific differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants. *Journal of Ecology*. 95: 614-622.
- García-Ciudad, A.; García-Criado, B.; Rico Rodríguez, M.; García-Criado, L. (1985).** Composición química y digestiva de cultivares de tréboles subterráneos. *Pastos* 15:41-52.
- García-Criado, L.; Rico Rodríguez, M.; García-Ciudad, A.; García-Criado, B. (1986).** Introducción de cultivares de trébol subterráneo, producción y calidad. *Anuario del centro de edafología y biología aplicada (CSIC Salamanca)*. 13: 247-260.
- García-López, E.; Mora-Aguilera J.A.; Nava-Díaz, C. (2016).** First report of *Fusarium pseudocircinatum* causing mango malformation disease in Dominican Republic. *Plant Disease*. 98: 1456-1466.
- García Martínez, J.D. (2002).** Micotoxinas en rumiantes. Un problema pasado o presente. Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria. Eds: Alonso Díez, A.J.; González Montaña, J.R.; Rejas López, J. Universidad de León, España. 66-81.

## Bibliografía

- Gazis, R.; Chaverri, P. (2010).** Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology*. 3: 240-254.
- Gherbawy, Y.A.; Yaser, M. (2003).** Fungicides and some biological controller agents effects on the growth of *Fusarium oxysporum* causing paprika wilt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 36: 235-245.
- Giauque, H.; Hawkes, C.V. (2013).** Climate affects symbiotic fungal endophyte diversity and performance. *American Journal of Botany*. 100: 1435-1444.
- Gilbertson, R.L.; Rojas, M.R.; Russell, D. R.; Maxwell, D.P. (1991).** Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *Journal of General Virology*. 72: 2843-2848.
- Girlanda, M.; Ghignone, S.; Luppi, A.M. (2002).** Diversity of sterile root-associated fungi of two Mediterranean plants. *New Phytologist*. 155: 481-498.
- Gladys, A.; Lori, S. M.; Wolcan. C. I. (1999).** Monaco "*Fusarium moniliforme*". Nuevo patógeno de los cultivares asiáticos de "*Lilium*". *Investigación agraria: Producción y protección vegetales*. 14: 117-130.
- Goering, H.K.; Van Soest, P.J. (1970).** Forage fiber analysis. Agricultural Handbook No. 379. USDA-ARS, Washington.
- Göre, M.E.; Bucak, C. (2007).** Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. *Forest Pathology*. 37: 281-288.
- Granda, M.; Prieto, P.M. (1991).** Efecto de la carga, fertilización fosfórica, introducción de especies y laboreo en pastos naturales semiáridos. *Investigación Agraria: Producción y Protección vegetal*. 6: 81-92.
- Griffiths, T.W. (2006).** Studies on the magnesium status of grassland herbage and its possible significance in animal health. *Grass and Forage Science*. 14: 199-205.
- Guo, L.D.; Hyde, K.D.; Liew, E.C.Y. (2000).** Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist*. 147: 617-630.

- Hamby, R.K.; Zimmer, E.A. (1988).** Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family (*Poaceae*). *Plant Systematics and Evolution*. 160: 29-37.
- Hamilton, C.E.; Bauerle, T.L. (2012).** A new currency for mutualism? Fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought. *Fungal Divers*. 54: 39-49.
- Hammer, T.J.; Van, B.; Sunshine A. (2015).** An endophyte-rich diet increases ant predation on a specialist herbivorous insect. *Ecological Entomology*. 40: 316-321.
- Haneishi, T.; Nakajima, M.; Koi, K.; Furuya, K.; Iwado, S.; Sato, S. (1988).** Manufacture of cornexistin herbicide with *Paecilomyces*. European Patent.
- Hao, X.; Papadopoulos, A.P. (2002).** Effects of calcium and magnesium on growth, fruit yield and quality in a fall greenhouse tomato crop grown on rockwool. *Canadian Journal of Plant Science*. 83: 903-912.
- Harper, J.F.; Harmon, A. (2005).** Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6: 555-566.
- Hashem, M.; Ali, E. (2004).** *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root-rot of cotton seedlings. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 37: 283-297.
- Hata, K.; Sone, K. (2008).** Isolation of endophytes from leaves of *Neolitsea sericea* in broadleaf and conifer stands. *Mycoscience*. 49: 229-232.
- Hawksworth, D.L. (1988).** The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 96: 3-20.
- Hay, R.K.M.; Heide, O.M. (1983).** Specific photoperiodic stimulation of dry matter production in a high latitude cultivar of *Poa pratensis*. *Physiol Plant*. 57: 135-142.
- Helmes, K.; Muller, W.J.; Waterhouse, Peter. (1993).** National survey of viruses in pastures of subterranean clover. I. Incidence of four viruses assessed by ELISA. *Australian Journal of Agricultural Research*. 44: 1837-1862.
- Henneberg, W. (1985).** Die Salzmünder Fütterungsversuche. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 47: 19-47.
- Henriques, J.; Nóbrega, F.; Sousa, E.; Lima, A. (2015).** Morphological and genetic diversity of *Biscogniauxia mediterranea* associated to *Quercus suber* in the Mediterranean Basin. *Revista de Ciências Agrárias*. 38: 166-175.

- Hesse, U.; Schöberlein, W.; Wittenmayer, L.; Förster, K.; Warnstorff, K.; Diepenbrock, W.; Merbach, W. (2005).** Influence of water supply and endophyte infection (*Neotyphodium* spp.) on vegetative and reproductive growth of two *Lolium perenne* L. genotypes. *European Journal of Agronomy*. 22: 45-54.
- Higgins, K.L.; Arnold, A.E.; Miadlikowska, J.; Sarvate, S.D.; Lutzoni, F. (2006).** Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42: 543-555.
- Hodge, A. (2004).** The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytol* 162: 9-24.
- Holman, J.D.; Hunt, C.; Thill, D. (2007).** Structural composition, growth stage, and cultivar affects on Kentucky bluegrass forage yield and nutrient composition. *Agronomy Journal*. 99: 195-202.
- Hosking, W.J.; Caple, I.W.; Halpin, C.G.; Brown, A.J.; Paynter, D.I.; Conley, D.N.; North-Coombes, P.L. (1986).** Trace elements for pastures and animals in Victoria. Department of Agriculture and Rural Affairs, Victorian Government Printing Office, Melbourne, Victoria.
- Hotz, C.; Brown, K.H. (2004).** Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull*. 25: 91-204.
- Huang, J.W.; Grunes, D.L.; Kochian, L.V. (1992).** Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta*. 188: 414-421.
- Humble, G.D.; Raschke, K. (1971).** Stomatal opening quantitatively related to potassium transport: evidence from electron probe analysis. *Plant Physiol*. 48: 447-453.
- Humphry, J.B.; Coffey, K.P.; Moyer, J.L.; Brazle, F.K.; Lomas, L.W. (2002).** Intake, digestion and digestive characteristics of *Neotyphodium coenophialum*-infected and uninfected fescue by heifers offered hay diets supplemented with *Aspergillus oryzae* fermentation extract or laidlomycin propionate. *Journal of Animal Science*. 80: 225-234.
- Impullitti, A.E.; Malvick, D.K. (2013).** Fungal endophyte diversity in soybean. *Journal of Applied Microbiology*. 114: 1500-1506.

- Inácio, M. L.; Henriques, J.; Guerra-Guimarães, L.; Gil Azinheira, H.; A. Lima, A.; Sousa, E. (2012).** *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera: Platypodidae) transports *Biscogniauxia mediterranea*, agent of cork oak charcoal canker. *Boletín de sanidad vegetal, plagas*. 37: 181:186.
- Jakobsen, I.; Abbott, L.K.; Robson, A.D. (1992).** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist*. 120: 509-516.
- Jeamjitt, O. (2007).** Diversity of coprophilous fungi, antagonism against plant pathogenic fungi, and secondary metabolites of *Ascodesmis macrospora* and *Sordaria fimicola*. Thesis of Graduate School, Kasetsart University, Thailand.
- Jeamjitt, O.; Manoch, L.; Visarathanonth, N.; Chamswarnng, C.; Pikulklin, S. Book. (2007).** Coprophilous fungi and antagonistic effect of *Sordaria fimicola* against plant pathogenic fungi *in vitro*. The 45th Kasetsart University Annual Conference. Bangkok, Thailand. 593-600.
- Jin-Lian, C.; Shi-Zhong, S.; Cui-Ping, M.; Kai W.; You-Wei, C.; Li-Hua, X.; Hui-Lin, G.; Li-Xing, Z. (2015).** Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*. doi: 10.1016/j.jgr.2015.09.006.
- Johnson, L.J.; Koulman, A.; Christensen, M.; Lane, G.A.; Fraser, K.; Forester, N.; Johnson, R.D.; Bryan, G.T.; Rasmussen, S. (2013).** An extracellular siderophore is required to maintain the mutualistic interaction of *Epichloë festucae* with *Lolium perenne*. *PLoS Pathogens*. 9: e1003332
- Jones, R.A.C. (1992).** Further studies on losses in productivity caused by infection of annual pasture legumes with three viruses. *Australian Journal of Agricultural Research*. 43: 1229-1241.
- Jorgensen, R.A.; Cluster, P.D. (1988).** Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 75: 1238-1247.
- Jumpponen, A.; Trappe, J.M. (1998).** Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*. 140: 295-310.

- Kedera, C.J.; Leslie, J.F.; Claflin, L.E. (1994).** Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology*. 84: 603-607.
- Kiffer, E.; Morelet, M. (1999).** The Deuteromycetes, mitosporic fungi: classification and generic keys. Enfield, NH : Science Publishers, United States.
- Kingsbury, J.M. (1964).** Poisonous plants of the United States and Canada. *Science*. 145: 1425-1426.
- Kiss, L.; Nakasone, K.K. (1998).** Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of powdery mildew fungi. *Current Genetics*. 33: 362-367.
- Krueger, G.L.; Morris, T.K.; Suskind, R.R.; Widner, E.M. (1985).** The health effects of aluminum compounds in mammals. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 13: 1-24.
- Kyriazopoulos, A.P.; Abraham, E.M.; Parissi, Z.M.; Koukoura, Z. Nastis, A.S. (2012).** Forage production and nutritive value of *Dactylis glomerata* and *Trifolium subterraneum* mixtures under different shading treatments. *Grass and Forage Science*. 68: 72-82.
- Large, E.C. (1940).** The advance of the fungi. Dover Publications, Nueva York.
- Larran, S.; Simónb, M.R.; Morenoc, M.V.; Santamarina Siuranae, M.P.; Perellóa, A. (2016).** Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control*. 92: 17-23.
- Legendre, P.; Legendre, L. (1998).** Numerical ecology, 2th ed. Elsevier. Amsterdam.
- Le Houerou, H.N. (1975).** Bioclimatología de la región mediterránea. Seminario La Orden, CRIDA 08. España, Badajoz.
- Leuchtman, A.; Bacon, C.; Schardl, C.; White, J.F.; Tadych, M. (2014).** Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*. 106: 202-2015.
- Li, G.; Zhang, K.; Xu, J.; Dong, Y. (2007).** Nematicidal substances from fungi. *Recent Patents on Biotechnology*. 1: 212-233.
- Li, Y.; Xia, L.Q.; Wang, Y.N.; Liu, X.Y.; Zhang, C.H.; Hu, T.L; Cao, K.Q. (2013).** The inhibitory effect of *Epicoccum nigrum* strain XF1 against *Phytophthora infestans*. *Biol Control*. 67: 462-468.
- Likar, M.; Regvar, M. (2013).** Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant Soil*. 370: 593-604.

- Lima Fávoro, L.C.; Souza, F.L.; Arau, W.L. (2012).** *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS ONE*. 7: e36826.
- Ma, L.J.; Catramis, C.M.; Rogers, S.O.; Starmer, W.T. (1997).** Isolation and characterisation of fungi entrapped in glacial ice. *Inoculum*. 48: 23-24.
- Maciá-Vicente, J.G.; Ferraro, V.; Burruano, S.; Lopez-Llorca, L.V. (2012).** Fungal assemblages associated with roots of halophytic and non-halophytic plant species vary differentially along a salinity gradient. *Microbial Ecology*. 64: 668-679.
- Maciá-Vicente, J.G.; Jansson, H.B.; Mendgen, K.; López-Llorca, L.V. (2008).** Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Canadian Journal of Microbiology*. 54: 600-609.
- Mahadevakumar, S.; Jayaramaiah, K.M.; Janardhana, G.R. (2014).** First report of leaf spot disease caused by *Epicoccum nigrum* on Lablab purpureus in India. *Plant Disease*. 98: 284-284.
- Mahendra, R.; Dnyaneshwar, R.; Gauravi, A.; Mudasir, D.; Brestic, M.; Pastore, G.M.; Marostica Junior, M.R. (2014).** Fungal growth promotor endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. *Symbiosis*. 62: 63-79.
- Malinowski, D.P.; Belesky, D.P. (1999).** Tall fescue aluminum tolerance is affected by *Neotyphodium coenophialum* endophyte. *Journal of Plant Nutrition*. 22: 1335-1349.
- Malinowski, D.P.; Belesky, D.P. (2000).** Adaptations of endophyte-infected coolseason grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*. 40: 923-40.
- Malinowski, D.P.; Belesky, D.P.; Hill, N.S.; Baligar, V.C.; Fedders, J.M. (1998).** Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *Plant Soil*. 198: 53-61.
- Mandyam, K.; Jumpponen, A. (2005).** Abundance and possible functions of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*. 53: 173-190.
- Manoch, L.; Jeamjitt, O.; Dethoup, T.; Kokaew, J.; Eamvijarn, A.; Visarathanonth, N.; Chamswarng, C. (2008).** Biological control of plant pathogenic fungi using *Talaromyces flavus*, *Sordaria fimicola* and some endophytic fungi. *Phytopathology*. 98: 97-97.

## Bibliografía

- Martín-Bellido, M.; Espejo, M.; Plaza, J.; López, T. (1986).** Metodología para la determinación de la carga ganadera de pastos extensivos. Monografías INIA 57. España, Madrid.
- Martín-García, J.; Müller, M.; Diez, J. (2012).** ITS-based comparison of endophytic mycota in twigs of native *Populus nigra* and cultivated *P. x euramericana* (cv. I-214) stands in Northern Spain. *Annals of Forest Science*. 69: 49-57.
- Martini, M.; Musetti, R.; Grisan, S.; Polizzotto, R.; Borselli, S.; Pavan, F.; Osler, R. (2009).** DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoecum nigrum*. *Plant Disease*. 93: 993-998.
- Martinuz, A.; Zewdu, G.; Ludwig, N.; Grundler, F.; Sikora, R.A.; Schouten, A. (2014).** The application of *Arabidopsis thaliana* in studying tripartite interactions among plants, beneficial fungal endophytes and biotrophic plant-parasitic nematodes. *Planta*. 241: 1015-1025.
- McMahan, G.; Yeh, W.; Marshall, M.N.; Olsen, M.; Sananikone, S.; Wu, J.Y.; Block, D.E.; Vander Gheynst, J.S. (2001).** Characterizing the production of a wild-type and benomyl-resistant *Fusarium lateritium* for biocontrol of *Eutypa lata* on grapevine. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26: 151-155.
- Monnet, F.; Vaillant, N.; Vernay, P.; Coudret, A.; Sallanon, H.; Hitmi, A. (2001).** Relationship between PSII activity, CO<sub>2</sub> fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *Australian Journal of Plant Physiology*. 158: 1137-1144.
- Mosquera-Losada, M.R.; González-Rodríguez, A.; Rigueiro-Rodríguez, A. (2004).** Fertilization with nitrogen and potassium on pastures in temperate areas. *Journal of Range Management*. 57: 280-290.
- Mukasa Mugerwa, T.T.; Saleeba, J.A.; McGee, P.A. (2013).** A variety of melanised root-associated fungi from the Sydney basin form endophytic associations with *Trifolium subterraneum*. *Fungal Ecology*. 6: 70-82.
- Müller, M.M.; Valjakka, R.; Suokko, A.; Hantula, A. (2001).** Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Molecular Ecology*. 10: 1801-1810.

- Muneera A.; El-Naggar, M.A.; Omer, S.A.; Eman, M.; Abedl-Kareem; Ammar, M.I. (2011).** Effect of toxic *Fusarium moniliforme* on some biochemical component of some date palm cultivars. *American Journal of Food Technology*. 6: 730-741.
- Murphy, W.M.; Silman, J.P.; McCrory, L.E.; Flack, S.E.; Schmitt, A.L.; Mzamane, N.M. (1997).** Management of natural Kentucky bluegrass-white clover pasture. *American Journal of Alternative Agriculture*. 12: 140-142.
- Nestler, A. (1898).** Ueber einen in der Frucht von *Lolium temulentum* L. vorkomenden Pilz. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 16: 207-214.
- Neubauer, H.; Remer, C. (1902).** Über die von A. Vogl entdeckte Pilzschicht in *Lolium fruchten*. *Zentralblatt fuer Bakteriologie Supplement*. 9: 652-653.
- Newman, J.A.; Abner, M.L.; Dado, R.G.; Gibson, D.J.; Brooking, A.; Parsons, A.J. (2003).** Effects of elevated CO<sub>2</sub>, nitrogen and fungal endophyte-infection on tall fescue: growth, photosynthesis, chemical composition and digestibility. *Global Chang Biol*. 9: 425-437.
- Nganje, W.E.; Kaitibie, S.; Wilson, W.W.; Leistritz, F.L.; Bangsund, D.A. (2004).** Economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley: 1993-2001. In: *Agribusiness and Applied Economics Report 528*. Agricultural Experiment Station North Dakota State University, Fargo.
- Nichols, P.G.H.; Revell, C.K.; Humphries, A.W.; Howie, J.H.; Hall, E.J.; Sandral, G.A.; Ghamkhar, K.; and Harris, C.A. (2012).** Temperate pasture legumes in Australia - their history, current use, and future prospects. *Crop & Pasture Science*. 63: 691-725.
- Ninyerola, M.; Pons, X.; Roure, J.M. (2005).** Atlas climático digital de la Península Ibérica. Barcelona, España: Bellaterra, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Oberhofer, M.; Gusewell, S.; Leuchtman, A. (2014).** Effects of natural hybrid and non-hybrid *Epichloë* endophytes on the response of *Hordelymus europaeus* to drought stress. *New Phytol*. 201: 242-253.
- O'Donnell, K. (1992).** Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicari*). *Current Genetics*. 22: 213-220.
- O'Donnell, K.; Cigelnik, E. (1997).** Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 7: 103-116.

## Bibliografía

- Olea, L.; López-Bellido, R.J.; Poblaciones, M.J. (2005).** Europe types of silvopastoral systems in the Mediterranean area: dehesa. Silvopastoralism and sustainable land management. International congress on silvopastoralism and sustainable management. Eds.: Mosquera-Losada, M.R.; McAdam, J.; Rigueiro-Rodríguez, A. Lugo, Spain. 4: 30-36.
- Olea, L.; Paredes, J. (1997).** Influencia de la superficie disponible y tamaño del rebaño de los pastos mejorados en la producción de la dehesa en el S.O. de España. *Pastos*. 27: 219-247.
- Olea, L.; Paredes, J.; Verdasco, P. (1986).** Influencia de los factores edafo-climatológicos en la producción de pastos mejorados. XXVI Reunión científica de la Sociedad Española para el estudio de los pastos, SEEP. 1: 383-402.
- Olea, L.; Paredes, J.; Verdasco, P. (1987).** Mejora de los pastos de la dehesa. En: Conservación y desarrollo de las dehesas portuguesa y española, 1: 87-110. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España, Madrid.
- Olea, L.; Paredes, J.; Verdasco, P. (1991).** Características y producción de los pastos de las dehesas del S.O. de la Península Ibérica. *Pastos*. 20-21: 131-156.
- Olea, L.; Poblaciones, M.J.; Viguera, F.J.; Olea, B. (2004).** Distribución de la oferta de bellota (cantidad y calidad) de encina (*Quercus ilex Lam. ssp. ballota*) en montanera en dehesas del SO de Extremadura. XLIV Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, SEEP. Eds.: García, B.; Vázquez, B. R.; Zabalgogezcoa, I. Salamanca, España. 751-756.
- Olea, L.; San Miguel-Ayanz, A. (2006).** The Spanish dehesa. A traditional Mediterranean silvopastoral system linking production and nature conservation. 21st General Meeting of the European Grassland Federation. Eds.: Lloveras, J.; González-Rodríguez, A.; Vázquez-Yáñez, O.; Piñeiro, J.; Santamaría, O.; Olea, L.; Poblaciones, M.J. Badajoz, Spain. 11: 1-13.
- Oliveira, J.A.; González, E.; Castro, P.; Costal, L. (2002).** Producción de materia seca y calidad nutritiva de dos genotipos de raigrás inglés infectados con una cepa de hongo endofítico en el tercer año de ensayo en Galicia. XLII Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, SEEP. Lleida, España. 1: 321-325.

- Oliveira, J.A.; González, E.; Castro, P.; Costal, L. (2004).** Effects of endophyte infection on dry matter yield, persistence and nutritive value of perennial ryegrass in Galicia (north-west Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2: 558-563.
- Oliveira, J.A.; López, J.E. (1999).** Caracterización de poblaciones españolas de *Lolium rigidum* Gaud., para caracteres agro-morfológicos e isoenzimáticos. *Investigación Agraria Producción y Protección Vegetales*. 14: 453-463.
- Oliveira, J.A.; Rottinghaus, G.E.; 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.
- Olsen, S.; Cole, C.; Watanabe, F.; Dean, L. (1954).** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. In: Issued also as Colorado Agricultural Experiment Station Scientific Journal, 418: 18-19. United States Department of Agriculture, Washington.
- Osorio, E. (1972).** Organización de laboratorios y establecimiento de servicios analíticos. Informe: FAO-INIA. España, Badajoz.
- Ovalle, C.; Arredondo, S.; Romero, O. (2006).** Serradela amarilla (*Ornithopus compressus*) y Serradela rosada (*O. sativus*): dos nuevas especies de leguminosas forrajeras anuales para la Zona Mediterránea de Chile. *Agricultura Técnica*. 66: 196-209.
- Paterson, A.H.; Lin, Y.; Li, Z.; Schertz, K.F.; Doebley, J.F.; Pinson, S.R.M.; Liu, S.; Stansel, J.W.; Irvine, J.E. (1995).** Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. *Science*. 269: 1714-1718.
- Pearson, W. R. (1990).** Rapid and sensitive sequence comparison with PASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*. 183: 63-98.
- Peraica, M.; Radica, B.; Lucica, A.; Pavlovic, M. (1999).** Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*. 77: 754-766.
- Pérez-Sierra, A.; López-García, C.; León, M.; García-Jiménez, J.; Abad-Campos, M.; Jung, T. (2013).** Previously unrecorded low-temperature *Phytophthora* species associated with *Quercus* decline in a Mediterranean forest in eastern Spain. *Forest Pathology*. 43: 331-339.
- Petrini, O.; Fisher, P.J. (1990).** Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycological Research*. 94: 1077-1080.

## Bibliografía

- Petrini, O.; Stone, J.; Carroll, F.E. (1982).** Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. *Canadian Journal of Botany*. 60: 189-796.
- Polishook, J.D.; Bills, G.F.; Lodge, D.J. (1996).** Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. *Journal of Industrial Microbiology*. 17: 284-289.
- Porrás-Alfaro, A.; Herrera, J.; Sinsabaugh, R. L.; Odenbach, K. J.; Lowrey, T.; Natvig, D. O. (2008).** Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 2805-2813.
- Powles S. (1995).** Multiple herbicide resistance in *Lolium rigidum*. Actas International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides. Córdoba.
- Prior, R.; Görges, K.; Yurkov, A.; Begerow, D. (2014).** New isolation method for endophytes based on enzyme digestion. *Mycological Progress*. 13: 849-856.
- Promptuttha, I.; Lumyong, S.; Dhanasekaran, V.; McKenzie, E.H.C.; Hyde, K.D.; Jeewon, R. (2007).** A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*. 53: 579-590.
- Przybył, K. (2002).** Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology*. 32: 387-394.
- Putra, E.T.S.; Zakaria, W.; Abdullah, N.A.P.; Saleh, G.B. (2012).** Stomatal morphology, conductance and transpiration of *Musa* sp. cv. Rastali in relation to magnesium, boron and silicon availability. *American Journal of Plant Physiology*. 7: 84-96.
- Quesada-Moraga, E.; Carrasco-Díaz, J. A.; Santiago-Álvarez, C. (2006).** Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep. Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*. 130: 442-452.
- Ranghoo, V.M.; Hyde, K.D.; Liew, E.C.Y.; Spatafora, J.W. (1999).** Family placement of *Ascotaiwania* and *Ascolacicola* based on DNA sequences from the large subunit rRNA gene. *Fungal Diversity*. 2: 159-168.
- Ranta, H.; Neuvonen, S.; Ylimartimo, A. (1995).** Interactions of *Gremmeniella abietina* and endophytic fungi in shoots of Scots pine trees treated with simulated acid rain. *Journal of Applied Ecology*. 32: 67-75.
- Reader, R.J.; Wilson, S.D.; Belcher, J.W.; Wisheu, I.; Keddy, P.A.; Tilman, D.; Morris, E.C.; Grace, J.B.; McGraw, J.B.; Olf, H.; Turkington, R.; Kelin, E.; Leung, Y.;**

- Shupley, B.; van Hulst, R.; Johansson, M.E.; Nilsson, C.; Gurevitch, J.; Grigulis, K.; Beisner, B.E. (1994).** Plant competition in relation to neighbor biomass: an intercontinental study with *Poa pratensis*. *Ecology*. 75: 1753-1760.
- Redman, R.S.; Dunigan, D.D.; Rodriguez, R.J. (2001).** Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologist*. 151: 705-716.
- Rheeder, J.P.; Marasas, W.F.O.; Thiel, P.G.; Sydenham, E.W.; Shepard, G.S.; van Schalkwyk, D.J. (1992).** *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in transkei. *Phytopathology*. 82: 353-357.
- Riedlinger, J.; Schrey, S.D.; Tarkka, M.T.; Hampp, R.; Kapur, M.; Fiedler, H. (2006).** Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505. *Applied and environmental microbiology*. 72: 3550-3557.
- Rinu, K.; Sati, P.; Pandey, A. (2014).** *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): A newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain. *Journal of Basic Microbiology*. 54: 408-417.
- Rodrigues, K.F. (1994).** The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*. 86: 376-385.
- Rodrigues, K.F. (1996).** Fungal endophytes of palms. In: Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology and evolution. Eds.: S.C. Redlin and L.M. Carris. APS Press; Saint Paul, Minnesota, USA.
- Rodrigues, K.F.; Samuel, G.T. (1999).** Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology*. 39:131-135.
- Rodriguez, R.J.; Henson, J.; Van Volkenburgh, E.; Hoy, M.; Wright, L.; Beckwith, F.; Kim, Y.; Redman, R.S. (2008).** Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society of Microbial Ecology*. 2: 404-416.
- Rodríguez, R.J.; Redman, R.S. (2008).** More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 59: 1109-1114.
- Rollo, F.; Sassaroli, S.; Ubaldi, M. (1995).** Molecular phylogeny of the fungi of the Iceman's grass clothing. *Current Genetics*. 28: 289-297.

- Saikkonen, K.; Helander, M.; Faeth, S.H.; Schulthess, F.; Wilson, D. (1999).** Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia*. 121: 411-420.
- Saikkonen, K.; Ion, D.; Gyllenberg, M. (2002).** The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 269: 1397-1403.
- Sánchez, M.E.; Caetano, P.; Ferraz, J.; Trapero, A. (2002).** *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in south-western Spain. *Forest Pathology*. 32: 5-18.
- Sánchez-Márquez, M.S. (2009).** Estudio de la microbiota endofítica asociada a las gramíneas *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. Tesis Doctoral de la Universidad de Salamanca, España.
- Sánchez-Márquez, S.; Bills, G.F.; Zabalgoagezcoa, I. (2007).** The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*. 27: 171-195.
- Sandoval, M.A.; Celis, J.E.; Morales, P. (2011).** Structural remediation of an alfisol by means of sewage sludge amendments in association with yellow serradela (*Ornithopus compressus* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 11: 68-78.
- San Miguel-Ayanz, A. (1994).** La dehesa española: origen, tipología, características y gestión. Solitario, España, Madrid.
- Santamaría, O.; Diez, J.J. (2005).** Fungi in leaves, twigs and stem bark of *Populus tremula* from northern Spain. *Forest Pathology*. 35: 95-104.
- Santamaría, O.; González, M.A.; Pajares, J.A.; Diez, J.J. (2007).** Effect of fungicides, endophytes and fungal filtrates on *in vitro* growth of Spanish isolates of *Gremmeniella abietina*. *Forest Pathology*. 37: 251-262.
- Santamaría, O.; Pajares, J. A.; Diez, J. J. (2004).** Physiological and morphological variation of *Gremmeniella abietina* from Spain. *Forest Pathology*. 34: 395-495.
- Santamaría, O.; Rodrigo, S.; Poblaciones, M.J.; Olea, L. (2014).** Fertilizer application (P, K, S, Ca and Mg) on pasture in calcareous dehesas: effects on herbage yield, botanical composition and nutritive value. *Plant Soil and Environment*. 60: 303-308.

- Santamaría, O.; Smith, D.R.; Stanosz, G.R. (2012).** Interaction between *Diplodia pinea* or *Diplodia scrobiculata* and fungal endophytes isolated from pine shoots. *Canadian Journal of Forest Research*. 42: 1819-1826.
- Sarrocco, S.; Matarese, F.; Moncini, L.; G. Pachetti, A. Ritieni, Moretti A.; Vannacci, G. (2013).** Biocontrol of *Fusarium* head blight by spike application of *Trichoderma gamsii*. *Journal of Plant Pathology*. 95: 19-27.
- Saul, G.R.; Kearney, G.A.; Flinn, P.C.; Lescun, C.L. (1999).** Effects of superphosphate fertiliser and stocking rate on the nutritive value of perennial ryegrass and subterranean clover herbage. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50: 537-545.
- Schardl, C.L.; Florea, S.; Pan, J.; Nagabhyru, P.; Bec, S.; Calie, P.J. (2013).** The *Epichloae*: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology*. 16: 480-488.
- Schirrmann, M.K.; Leuchtmann, A. (2015).** The role of host-specificity in the reproductive isolation of *Epichloë* endophytes revealed by reciprocal infections. *Fungal Ecology*. 15: 29-38.
- Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J.L.; Levesque, C.A.; Chen, W.; Fungal Barcoding Consortium. (2012).** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 6241-6246.
- Schubert, K.; Groenewald, J.Z.; Braun, U.; Dijksterhuis, J.; Starink, M.; Hill, C.F.; Zalar, P.; de Hoog, G.S.; Crous, P.W. (2007).** Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology*. 58: 105-156.
- Schulz, B.; Boyle, C. (2005).** The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109: 661-686.
- Schulz, B.; Draeger, S.; de la Cruz, T.E.; Rheinheimer, J.; Siems, K.; Loesgen, S.; Bitzer, J.; Schloerke, O.; Zeeck, A.; Kock, I.; Hussain, H.; Dai, J.; Krohn, K. (2008).** Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitats. *Botanica Marina*. 51: 219-234.
- Schulz, B.; Wanke, U.; Drager, S.; Aust, H.J. (1993).** Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*. 97: 1447-1450.

## Bibliografía

- Seena, S.; Sridar K.R. (2004).** Endophytic fungal diversity of two sand dune wild legumes from the southwest coast of India. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 1015-1021.
- Selosse, M.A.; Vohník, M.; Chauvet, E. (2008).** Out of the rivers: are some aquatic hyphomycetes plant endophytes?. *New Phytologist*. 178: 3-7.
- Shamoun, S.F.; Sieber, T.N. (1993).** Isozyme and protein patterns of endophytic and disease syndrome associated isolates of *Melanconium apiocarpum* and *Melanconium marginale* collected from alder. *Mycotaxon*. 49: 151-166.
- Sharples, J.M.; Chambers, S.M.; Meharg, A.A.; Cairney, J.W.G. (2000).** Genetic diversity of root-associated fungal endophytes from *Calluna vulgaris* at contrasting field sites. *New Phytologist*. 148: 153-162.
- Simon, L.; Lalonde, M.; Bruns, T.D. (1992).** Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 291-295.
- Simpson, R.J.; Richardson, A.E.; Riley, I.T.; McKay, A.C.; McKay, S.F.; Ballard, R.A.; Ophel-Kelle, K.; Hartley, D.; O'Rourke, T.A.; Li, H.; Sivasithamparam, K.; Ryan, M.H.; Barbetti, M.J. (2011).** Damage to roots of *Trifolium subterraneum* L. (Subterranean clover), failure of seedlings to establish and the presence of root pathogens during autumn–winter. *Grass and Forage Science*. 66: 585-605.
- Smith, D.R.; Stanosz, G.R. (1995).** Confirmation of two distinct populations of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States using RAPDs. *Phytopathology*. 85: 699-704.
- Soldevilla, C.; Vázquez, C.; Patiño, B.; Jurado, M.; González-Jaén, M. T. (2005).** Hongos toxicogénicos asociados a trigos y cebadas de Castilla y León. *Boletín de sanidad vegetal, plagas*. 31: 519-529.
- Soriano del Castillo, J.M. (2007).** Micotoxinas en alimentos. Díez de Santos, España, Madrid.
- Soto-Barajas, M.C.; Zabalgoeazcoa, I.; Gómez-Fuertes, J.; González-Blanco, V.; Vázquez de Aldana, B.R. (2015).** *Epichloë* endophytes affect the nutrient and fiber content of *Lolium perenne* regardless of plant genotype. *Plant and Soil*. doi: 10.1007/s11104-015-2617-z.

- Spiering, M.J.; Greer, D.H.; Schmid, J. (2006).** Effects of the fungal endophyte, *Neotyphodium lolii*, on net photosynthesis and growth rates of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) are independent of in planta endophyte concentration. *Annals of Botany*. 98: 379-387.
- Staugaitis, G.; Rutkauskiene, R. (2012).** Effect of magnesium fertiliser on Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) in different types of soil with different carbonate content levels. *Agriculture*. 99: 347-356.
- Steiner, B.; Aquino, V. R.; Paz, A.A.; da Rocha Silla, L.; Zavascki, A.; Goldani, L.Z. (2013).** *Paecilomyces variotii* as an emergent pathogenic agent of pneumonia. In: Case Report in Infectious Diseases, 2013. Eds.: Ghate, M.; Horrocks, P.; Talhari, S. Case Reports in Infectious Diseases. New York, United States.
- Stone, J. K.; Polishook, J. D.; White, J. F. (2004).** Endophytic fungi. In: Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods, 241-270. Eds.: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. Elsevier Academic Press, United States.
- Sutherland, B.L.; Hume, D.E.; Tapper, B.A. (1999).** Allelopathic effects of endophyte infected perennial ryegrass extracts on white clover seedlings. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 42: 19-26.
- Suttle, N.F. (2010).** Mineral nutrition of livestock, 4th edn. CABI Publishing, Wallingford.
- Sutton, B.C. (1980).** The coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Tadych, M.; Bergen, M.; Dugan, F.M.; White, J.F.JR. (2007).** Evaluation of the potential role of water in spread of conidia of the *Neotyphodium* endophyte of *Poa ampla*. *Mycological Research*. 111: 466-472.
- Takahashi, S.; Nakajima, M.; Kinoshita, T. (1994).** Natural and engineered pest management agents. Eds.: Hedin, A.P.; Menn, J.J.; Hollingworth, M.R. American Chemical Society, Michigan, United States.
- Takamatsu, S.; Hirata, T.; Sato, Y. (1998).** Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). *Mycoscience*. 39: 441-453.

- Taylor, P.A.; Greenhalgh, F.C. (1987).** Significance, causes and control of root rot disease of subterranean clover. In: Temperate pastures: their production, use and management, 249-251. Eds.: Wheeler, J.L.; Pearson, C.J.; Robards, G.E. Melbourne, Australia.
- Ter Braak, C. J. F.; Smilauer, P. (2002).** CANOCO Reference Manual and CANODRAW for User's Guide version 4.5. Ithaca, New York, United States.
- Terrel, E.E. (1968).** A Taxonomic Revision of the Genus *Lolium*. In: Technical Bulletin 1392. United States, Department of Agriculture, Washington.
- Thom, E.R.; Popay, A.J.; Waugh, C.D.; Minneé, E.M.K. (2013).** Impact of novel endophytes in perennial ryegrass on herbage production and insect pests from pastures under dairy cow grazing in northern New Zealand. *Grass Forage Science*. 69: 191-204.
- Timper, P.; Gates, R.N.; Bouton, J.H. (2005).** Response of *Pratylenchus* spp. in tall fescue infected with different strains of the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Nematology*. 7: 105-110.
- Tivoli, B.; Barange, A.; Sivasithamparam, K.; Barbetti, J. (2006).** Annual *Medicago*: from a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the nature of disease resistance. *Annals of Botany*. 98: 1117-1128.
- Torres, J. (1985).** El *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Mill, y su comportamiento en los encinares y alcornoques andaluces. *Boletín del Servicio de Plagas*. 11: 185-191.
- Umali, T.E.; Quimio, T.H.; Hyde, K.D. (1999).** Endophytic fungi in leaves of *Bambusa tuldoides*. *Fungal Science*. 14: 11-18.
- Underwood, E.J. (1981).** The mineral nutrition of livestock, 2nd edn. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal.
- USDA. (2006).** Soil taxonomy. United States Department of Agriculture, United States.
- Vadassery, J.; Oelmüller, R. (2009).** Calcium signaling in pathogenic and beneficial plant microbe interactions. *Plant Signaling and Behavior*. 4: 1024-1027.
- Vannini, A.; Lucero, G.; Anselmi, N.; Vettraino, A.M. (2009).** Response of endophytic *Biscogniauxia mediterranea* to variation in leaf water potential of *Quercus cerris*. *Forest Pathology*. 39: 8-14.
- Van Thiep, N.; Soyong, K. (2015).** *Chaetomium* spp. as biocontrol potential to control tea and coffee pathogens in Vietnam. *Journal of Agricultural Technology*. 11: 1381-1392.

- Vasiliauskas, R.; Menkis, A.; Finlay, R.D.; Stenlid, J. (2007).** Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. *New Phytologist*. 174: 441-446.
- Vázquez de Aldana, B.R.; García-Ciudad, A.; Pérez-Corona, M.E.; García-Criado, B. (2000).** Nutritional quality of semiarid grassland in western Spain over a 10-year period: changes in chemical composition of grasses, legumes and forbs. *Grass and Forage Science*. 55: 209-220.
- Vázquez de Aldana, B.R.; Soto-Barajas, M.C.; Zabalgogezcoa, I. (2015).** Hongos endófitos *Epichloë* en pastos de la península ibérica. *Revista Pastos*. 45: 6-18.
- Vázquez de Aldana, B.R.; Zabalgogezcoa I.; Garcia-Ciudad A.; Garcia-Criado, B. (2013)** An *Epichloë* endophyte affects the competitive ability of *Festuca rubra* against other grassland species. *Plant and Soil*. 362: 201-213.
- Vieira Natividade, J. (1950).** Subericultura. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, DGF. Lisboa.
- Vogler, D.R.; Bruns, T.D. (1998).** Phylogenetic relationships among the pine stem rust fungi (*Cronartium* and *Peridermium* spp.). *Mycologia*. 90: 244-257.
- Wahid, O.A.A.; Moustafa, A.F.; Ibrahim, M.E. (2001).** Integrated of tomato *Fusarium*-wilt through implementation of soil solarization and filamentous fungi. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 108: 345-355.
- Waller, F.; Achatz, B.; Baltruschat, H.; Fodor, J.; Becker, K.; Fischer, M.; Heier, T.; Hückelhoven, R.; Neumann, C.; von Wettstein, D.; Franken, P.; Kogel, K. H. (2005).** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 13386-13391.
- Wang, R.Y.; Gao, B.; Li, X.H.; Ma, J.; Chen, S.L. (2014).** First report of *Fusarium solani* causing fusarium root rot and stem canker on storage roots of sweet potato in China. *Plant Disease*. 98: 160-160.
- Wang, F.W.; Jiao, R.H.; Cheng, A.B.; Tan, S.H.; Song, Y.C. (2007).** Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 79-83.

- Wang, S.; Shieh, C.; Liu, C. (2005).** Successful treatment of *Paecilomyces variotii* splenic abscesses: a rare complication in a previously unrecognized chronic granulomatous disease child. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 53: 149-152.
- Wearn, J.A.; Sutton, B.C.; Morley, N.J.; Gange, A.C. (2012).** Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *Journal of Ecology*. 100: 1085-1092.
- Weber, R.W.S.; Dralle, N. (2013).** Fungi associated with blossom-end rot of apples in Germany. *European Journal of Horticultural Science*. 78: 97-105.
- Wen-Jing, W.; Xiao-Liang, W.; Yi, L.; Sheng-Rong, X.; Ryan, M. K.; Yi-Jian, Y. (2012).** Molecular and morphological studies of *Paecilomyces sinensis* reveal a new clade in clavicipitaceous fungi and its new systematic position. *Systematics and Biodiversity*. 10: 1-12.
- West, C.P.; Izekor, E.; Oosterhuis, D.M.; Robbins, R.T. (1988).** The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant and Soil*. 112: 3-6.
- Wille, P.A.; Aeschbacher, R.A.; Boller, T. (1999).** Distribution of fungal endophyte genotypes in doubly infected host grasses. *The Plant Journal*. 18: 349-358.
- Wilson, D. (1995).** Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*. 73: 274-275.
- Wu, L.S.; Han, T.; Li, W.C.; Jia, M.; Xue, L.M.; Rahman, K.; Qin, L.P. (2013).** Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. *Current Microbiology*. 66: 40-48.
- Yun, H.Y.; Lee, Y.W.; Kim, Y.H. (2013).** Stem canker of giant dogwood (*Cornus controversa*) caused by *Fusarium lateritium* in Korea. *Plant Disease*. 97: 1378-1378.
- Zabalgozcoa, I. (2008).** Fungal endophytes and their interactions with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6: 138-146.
- Zabalgozcoa, I.; García-Ciudad, A.; Vázquez de Aldana, B. R.; García-Criado, B. (2006).** Effects of the infection by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in the growth and nutrient content of *Festuca rubra*. *European Journal of Agronomy*. 24: 374-384.

## Bibliografía

- Zabalgogezcoa, I.; Oleaga, A.; Pérez, R. (2008).** Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology*. 158: 336-343.
- Zervakis, G.I.; Moncalvo, J.; Vilgalys, R. (2004).** Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology*. 150: 715-726.
- Zhang, Q.; Zhang, J.; Yang, L.; Zhang, L.; Jiang, D.; Chen W.; Li, G. (2014).** Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*. 72: 98-108.
- Zhang, W.; Wendel, J.F.; Clark, L.G. (1997).** Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: *Bambusoideae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 8: 205-217.
- Zhang, X.; Harvey, P.; Stummer, E.; Warren, R.; Zhang, G.; Gou, K.; Li, J.; Yang, H. (2015).** Antibiosis functions during interactions of *Trichoderma afroharzianum* and *Trichoderma gamsii* with plant pathogenic *Rhizoctonia* and *Pythium*. *Functional & Integrative Genomics*. 15: 599-610.



**Universidad de Extremadura**

**Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal**