

## Tesis de Licenciatura

# Caracterización isoenzimática de los endofitos fúngicos aislados de gramíneas autóctonas no tóxicas de la República Argentina

Gentile, Agustina

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gentile, Agustina. (). Caracterización isoenzimática de los endofitos fúngicos aislados de gramíneas autóctonas no tóxicas de la República Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000713\\_Gentile](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000713_Gentile)

Cita tipo Chicago:

Gentile, Agustina. "Caracterización isoenzimática de los endofitos fúngicos aislados de gramíneas autóctonas no tóxicas de la República Argentina". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000713\\_Gentile](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000713_Gentile)

**EXACTAS**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

"Caracterización isoenzimática de los endofitos fúngicos aislados de  
gramíneas autóctonas no tóxicas de la República Argentina"

Autora  
Agustina Gentile

Director de tesis  
Dr. Daniel Cabral

Codirectora de tesis  
Dra. Beatriz Saidman

FCEN, UBA-PRHIDEB, Departamento de Micología, Lab. 15.

Noviembre de 1999

713-7



A toda mi familia.

## AGRADECIMIENTOS

A mi director Dr. Daniel Cabral, por luchar conmigo ante este desafío y ayudarme durante todos los inconvenientes surgidos. Aprendí mucho y me enseñó como se investiga y se analizan las cosas.

A los Sres miembros del jurado.

A mis padres, que sin su ayuda jamás hubiera podido estudiar esto que me ha hecho muy feliz; por su apoyo incondicional y por estar siempre a mi lado, aunque físicamente se encontraran lejos.

A mis hermanos y a toda mi familia, por extrañarme y por darme esa fuerza necesaria para continuar estudiando y trabajando. Lamento haberme perdido parte de sus vidas.

A mis amigas del alma bahienses, Sole y Lily, por estar conmigo en diferentes momentos de mi vida, pero estar. Aunque compartimos pocos días juntas, sabemos que siempre seguiremos estando unidas.

A mis amigas del alma porteñas, Lau y Pau, por compartir conmigo toda mi carrera, los días de estudio, la vida y los momentos más difíciles de este Buenos Aires, y por hacerme muy feliz. Tanto ellas como cada una de sus respectivas familias me hicieron sentir que aunque uno llegue del interior no está solo.

A mis amigos, Santi y Darío, porque fueron unos pilares muy importantes y aprendí de cada uno de ellos lo importante y lo simple de las cosas. Son gente maravillosa.

A mis amigas Marisa y Marina, que me acompañaron en momentos bárbaros y en unos muy difíciles. Gracias por las charlas, los encuentros y los días de estudio juntas a morir, como así también todos los momentos de simbiosis que tuvimos.

A Fer, por hacerme muy feliz y demostrarme que la vida puede ser muy linda cuando es de a dos. Gracias por bancarme las histerias de estos últimos tiempos y por ser un compañero de vida maravilloso.

A mi ahijado Martín, por haberse bancado tener a su madrina muy lejos y por haberme demostrado que el amor no se olvida, aunque se tenga cada tanto.

A mi codirectora, la Dra. Beatriz Saidman, por su apoyo y por la ayuda en la interpretación de los geles.

A la Dra. Nora Maidana, por su ayuda en el manejo de la compu como así también por ser una muy buena consejera y compañera de los mates matutinos.

A mis compañeros del laboratorio: Vicky, Leo, Fabián y Gustavo, por compartir conmigo momentos de tensión y de mucha alegría. Gracias por su ayuda y por permitirme pasara muy bien acá.

A los miembros del Lab. 8 : Flavia, Oscar, Luis, Ramiro, Marcela, Diana, etc., por prestarme cada cosa que me hacía falta. Me divertí mucho en las charlas de pasillo mientras queríamos cambiar el mundo. Gracias Oscar por la ayuda con los mapas.

A la gente de la facu: Matías, Javier, Leo, Coco, Lau Asseo, Mariana, July, Gaby, Poly, Agata, Marian Tanuz, Tere, Pau E., etc., por el estudio compartido y las salidas y festejos entre todos.

A los del Lab.5: Andrea, Vero, Ceci, Belén y Silvia por sus consejos y por preocuparse por lo que iba pasando con mis geles.

A la Sra Mercedes por su constante alegría y por su ayuda.

## INDICE

### **1- Introducción**

1.1) Endofitos fúngicos: generalidades	1
1.2) Ciclo de vida, clasificación y sistemática	5
1.3) Antecedentes en Argentina	9
1.4) Electroforesis de isoenzimas	11

### **2- Objetivos**

14

### **3- Hipótesis**

15

### **4- Materiales y métodos**

4.1) Cepas utilizadas en el estudio	16
4.2) Relevamiento y colección de gramíneas colonizadas	17
<b>4.3) Electroforesis de isoenzimas</b>	
4.3.1- Preparación de muestras	22
4.3.2- Preparación de geles	23
4.3.3- Siembra y corrida electroforética	24
4.3.4- Revelado, fijación y preservación de geles	25
4.3.5-Características y condiciones experimentales de los sistemas isoenzimáticos	26
4.4) Análisis de datos	31

## **5- Resultados**

5.1 ) Detección, aislamiento e identificación de endofitos	32
5.2 ) Descripción de los patrones electroforéticos	38
5.3 ) Análisis estadístico	53

## **6- Discusión**

57

## **7- Conclusiones**

61

## **8- Bibliografía**

63

## **RESUMEN**

## RESUMEN

Se caracterizaron morfológica e isoenzimáticamente los endofitos de 21 cepas de gramíneas no tóxicas de Argentina, con el objeto de compararlos con resultados previos donde se analizaron cepas aisladas de tres gramíneas tóxicas establecidas como un único taxón: *Neotyphodium tembladereae* Cabral et al., 1999) y con endofitos de hospedantes del hemisferio norte. Los aislamientos corresponden a *Festuca magellanica*, *Poa rigidifolia*, *Phleum commutatum*, *Melica stuckertii* y *Bromus setifolius*.

Como en el caso de las gramíneas tóxicas, todos los endofitos aislados se ubicaron por sus características macro y micromorfológicas en el género anamórfico *Neotyphodium*. Las escasas diferencias impiden ubicarlos en una especie en particular.

El estudio macro y micromorfológico reveló escasas diferencias entre las cepas, con excepción de cuatro de las aisladas de *M.stuckertii* y dos de *B.setifolius*.

Para el análisis se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida de 6 sistemas enzimáticos: esterasas (EST), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH), superóxido dismutasa (SOD), leucil amino peptidasa (LAP) y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

El fenograma de los electromorfos muestra que los endofitos asexuales de plantas nativas, conforman un grupo con similitudes mayores al 67 %. La excepción la conforman 4 de las 5 cepas estudiadas de *Melica stuckertii*, que se separan en un grupo independiente.

## Resumen

---

El único endofito del hemisferio norte que tiene una similitud superior al 50 % con el grupo es *Epichloë amarillans* (anamorfo *N.tiphynum*).

Se registran diferencias poblacionales entre los endofitos de *Bromus setifolius* de las poblaciones de Mendoza y Santa Cruz.

Los resultados apoyan la hipótesis de que:

1. Los endofitos que colonizan gramíneas nativas son entidades diferentes a las estudiadas en el hemisferio norte.
2. Los endofitos de diferentes hospedantes son muy similares entre si, lo que presupone una colonización por una o pocas formas sexuales o asexuales provenientes del hemisferio norte.

Se desestima la hipótesis de que:

3. Los endofitos de plantas no tóxicas son diferentes a los de las plantas tóxicas. Forman un grupo con un 67% de similitud. Algunos de los endofitos podrían ser considerados dentro de la variabilidad de la nueva especie *N.tebладerae* de plantas tóxicas.

Se especula sobre la posible colonización de *M. stuckertii* por más de un tipo de endofito.

# **INTRODUCCION**

## 1-INTRODUCCION

### 1.1) Generalidades:

Se conoce como endofitos fúngicos a aquellos hongos relacionados íntimamente con los tejidos aéreos de las plantas. Se encuentran presentes en casi todo el espectro de plantas superiores, algas y briofitas. Un grupo particular es el de los endofitos de pastos donde el crecimiento es usualmente sistémico, lento, pero produciendo una biomasa considerable de micelio. Estos endofitos invaden los óvulos del hospedante y son transmitidos por la semilla (White, 1987). La relación entre el hospedante y el hongo se conoce como mutualismo constitutivo (Carroll, 1988).

Estas asociaciones gramíneas-endofitos son las más conocidas y estudiadas en la actualidad (White, 1987; White, 1994). Esto es consecuencia de su capacidad de influir sobre la interacción planta-herbívoro. Se ha demostrado que los endofitos de los pastos pueden conferir propiedades antiherbívoro (mamíferos e insectos) y posiblemente antipatógenos a sus hospedantes (Christensen & Latch, 1985; Clay, 1991). Sin embargo, esto trae como consecuencia que muchos pastos con endofitos sean tóxicos para el ganado.

También se los ha podido relacionar con el incremento del tamaño de la planta, peso seco y fotosíntesis como así también con una mayor resistencia a nemátodos y sequías (Clay, 1988; Cheplick & Clay, 1988).

Las plantas de *Festuca arundinacea* Schreb infectadas con el hongo endofítico *Neotyphodium coenophialum* Glenn, Bacon & Hanlin

(=*Acremonium coenophialum* Morgan-Jones et Gams) tienen altas tasas de supervivencia y producen más biomasa que aquellas no infectadas. Se demostró que los cariopsis con endofitos germinan más rápido y en mayor proporción, y como contienen altas concentraciones de alcaloides son menos seleccionados por vertebrados e invertebrados que se alimentan de ellos (Clay, 1990).

Los alcaloides producidos por los endofitos dentro del tejido de la planta son en parte los responsables del envenenamiento de los herbívoros y de la resistencia por parte de la planta a insectos. Los pastos infectados contienen una variedad de alcaloides que no presentan sus coespecíficos no infectados, entre ellos los alcaloides del ergot, lolinas, lolitremas y peraminas (Clay, 1990). Los primeros causan diversos síntomas en el ganado: fiebre, falta de apetito, necrosis de tejidos grasos, vasoconstricción, gangrena y finalmente la muerte. Los temblores característicos de los animales que pastorearon *Neotyphodium lolii* Latch, Christensen et Samuels (endofito de *Lolium perenne* L.) son producidos por los lolitremas (Schardl, 1996).

Dentro de la subdivisión Ascomycotina, orden Clavicipitales, familia Clavicipitaceae se diferencian tres tribus: Clavicepeae, Balansieae y Cordycipeae. Los últimos incluyen patógenos de insectos y hongos, mientras que los de la primera tribu involucran solamente especies del género *Claviceps*, que son parásitos especializados de las flores del hospedante, en donde reemplazan los óvulos del huésped con esclerocios fúngicos (Schardl et al., 1991).

En cambio, dentro de la tribu Balansieae se reconocen dos grupos de endofitos en las gramíneas, aquellos con ciclo completo (sexual y asexual) que se ubican taxonómicamente en diferentes géneros, y los de ciclo incompleto (asexual) que se incluyen en el género-forma

*Neotyphodium* Glenn, Bacon et Hanlin de los Deuteromycetes. Las fases asexuales de los organismos con ciclo completo tienen características morfológicas que permiten ubicarlos también como pertenecientes al género *Neotyphodium*. El primer grupo forma un estroma que determina una infección típicamente patogénica, conocida como "choke disease". En el segundo grupo, la planta no muestra ningún síntoma externo de infección durante su ciclo de vida, pero los cariopsis producidos se encuentran infectados con micelio.

Se considera que los endofitos con ciclo de vida incompleto son estados anamórficos de la forma perfecta *Epichloë* (Fr) que perdieron la capacidad de reproducirse sexualmente. Estudios moleculares de ADN ribosomal, demuestran una alta afinidad entre las formas sexuales y los anamorfos, sugiriendo que podrían haber derivado de las formas que presentan estroma (White, 1994).

Los primeros trabajos sobre la biología de estos hongos datan de los años '30 y '40 (Sampson, 1933; Neill, 1940; 1941). Hacia final de la década del '70 vuelven a recibir atención cuando son relacionados con enfermedades del ganado de gran importancia económica, como la festucosis y el temblequeo del *loli* (*l. lolium* (Bacon et al., 1977; Fletcher & Harvey, 1981). Bacon y colaboradores en 1977 estudiaron el hongo endofítico *N.coenophialum* en cultivos de *F.arundinacea* tóxica para el ganado. La aparente relación entre la frecuencia del endofito en la planta y la toxicidad del pasto, sugirieron la posibilidad de involucrar al hongo con esa afección hacia el ganado.

Estas asociaciones (*Festuca arundinacea*- endofito y *Lolium perenne*-endofito) se han estudiado con profundidad y se los ha considerado modelos de simbiosis mutualista. Una vez que la asociación se ha

---

establecido, el hongo y el pasto no se vuelven a separar, por ello se los describe como **mutualistas obligados** (Bacon & Hill, 1996).

Las hifas de estos hongos no producen alteraciones en las células vegetales, ya que las mismas penetran solo en el apoplasto del hospedante. Aparentemente no generan una respuesta defensiva en la planta. No se ha registrado penetración en las paredes celulares (Koga et al., 1993). Se asume que el hongo se nutre de las macro y micromoléculas que circulan en la matriz intercelular, aunque podría haber mecanismos desconocidos que aporten nutrientes al apoplasto de manera más activa (Lindstrom, 1994).

Como podemos observar, estos hongos mantienen diferentes grados de interacción con sus hospedantes, desde el "antagonismo" al mutualismo. En el primer caso se podría pensar que se trata de hongos oportunistas o patógenos en estado latente, que reducen la aptitud relativa del hospedante, como el caso de miembros de la tribu Balansieae del orden Clavicipitales, que suprimen la producción de semillas (Clay, 1990). Sin embargo, aún en estos casos se ha podido comprobar una interacción mutualista. La pérdida de la reproducción sexual en las plantas derivaría la energía hacia el aumento del crecimiento, el tamaño y la supervivencia de los hospedantes. De esta manera, los endofitos de pastos abarcan un amplio rango de interacciones, pero donde siempre parece haber un componente altamente beneficioso para la planta. Por lo tanto pueden ser considerados mutualistas en sentido amplio (Clay, 1990).

Las investigaciones de esta interacción gramínea-endofito se orientan en la actualidad hacia la prevención de la toxicosis que pueden producir la infección de las plantas al ganado que las consume, o hacia el manejo de estas interacciones para obtener, por métodos biotecnológicos,

pasturas de mejor calidad y resistencia a factores bióticos y abióticos (Leuchtmann & Clay, 1990; Bacon & White, 1994).

Con este fin se han intentado inoculaciones de cepas de endofitos no tóxicos en pasturas comerciales y naturales (Latch & Christensen, 1985; Johnson et al., 1986). Las propiedades de resistencia a herviboría, junto con la tolerancia a sequías que aportan los endofitos a los pastos inoculados, son altamente deseadas para aquellos utilizados con fines no pastoriles (pastos para canchas de tenis y golf, pistas de turf, etc).

#### 1.2) Ciclo de vida:

Las infecciones de los endofitos de ciclo completo como las del género *Epichloë* son de larga duración y sistémicas. Persisten durante todo el ciclo de vida de la planta. Este cuenta con una fase sexual y otra asexual (Fig 1).

En el ciclo sexual el hongo se desarrolla intercelularmente de manera asintomática y emerge en forma de estroma que rodea a la inflorescencia inmadura, interrumpiendo la reproducción sexual de la planta. Sobre el estroma se desarrollan espermacios y al ser organismos haploides, heterotálicos bipolares, la fertilización se produce por la transferencia de éstos sobre la cepa compatible. Esto se realiza mediante la mosca *Phorbia phrenione* Seguy (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1974). El resultado final es la formación de peritecios en el estroma donde se producen ascosporas filiformes que se expulsan al medio ambiente para infectar nuevas plantas. Se cree que las mismas germinan produciendo ciclos de conidiación y estos conidios infectarían las inflorescencias en desarrollo y posteriormente los cariopses (Tsai et al., 1994).

Durante el ciclo asexual las hifas también crecen intercelularmente en el parénquima del hospedante e invaden los meristemas florales para colonizar por último el cariopse. De esta manera el hongo tiene asegurada su transferencia a la siguiente generación. En este ciclo de vida reducido el hongo es estrictamente endofítico, su transmisión es vertical y se transmite exclusivamente a través del hospedante. Este sistema es muy eficiente, encontrándose hasta un 100 % de las semillas de la planta infectadas (Siegel et al., 1984). El hospedante sostiene el gasto energético de su reproducción como así también la del hongo asociado.

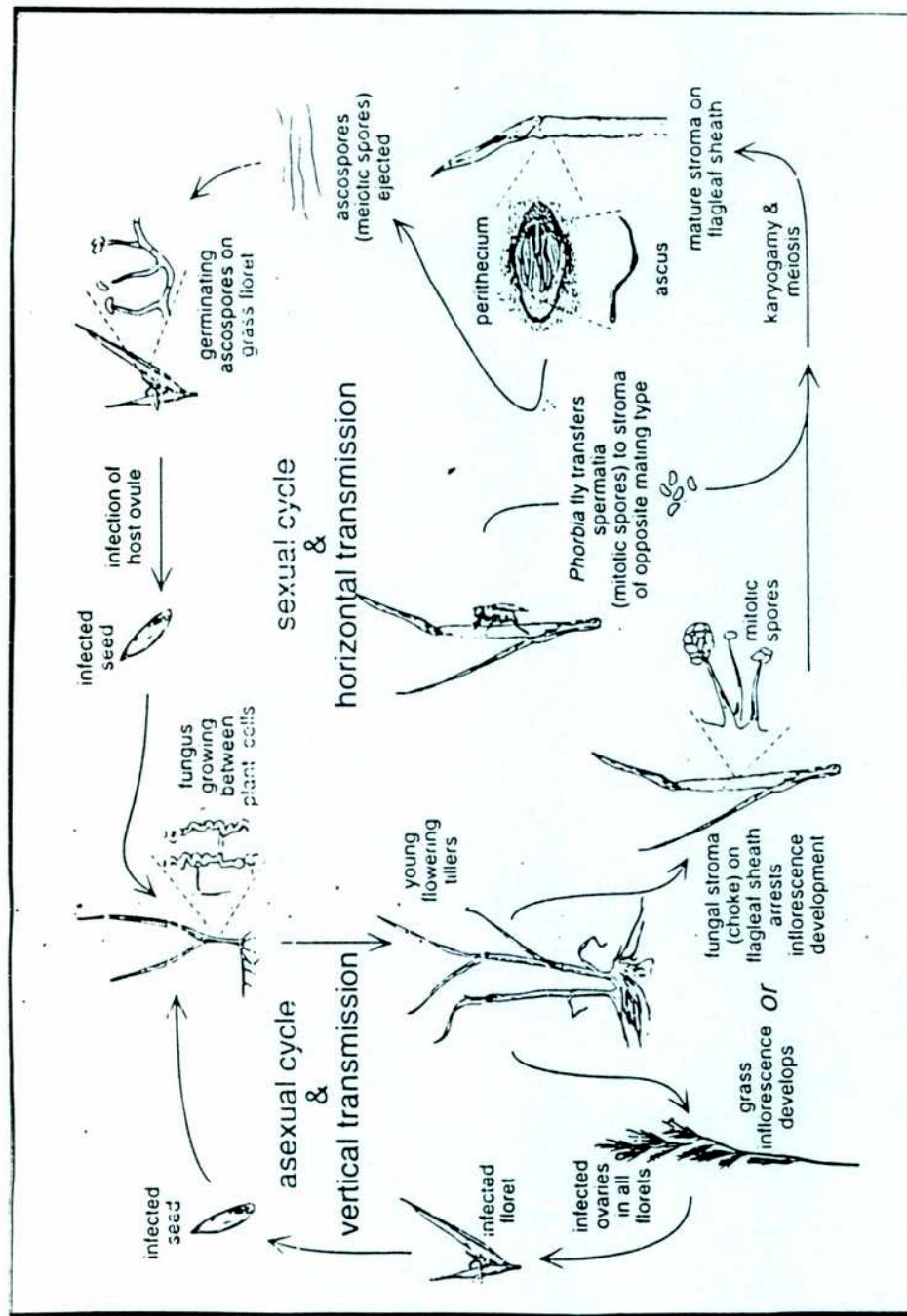


Figura 1: esquema del ciclo de vida completo de *Epichloë festucae*.

Clasificación y sistemática:

Morgan-Jones & Gams (1982) describen las especies de endofitos anamórficos utilizando la morfología de las colonias, de los conidios y de las células conidiógenas, creando la nueva sección Albo-lanosa Morgan-Jones & Gams para ubicarlos en el género *Acremonium* Link. Reconocen 7 especies: *Acremonium chisorum* White et Morgan-Jones, *A. huerfanum* White, Cole et Morgan-Jones, *A. starri* White et Morgan-Jones, *A. typhinum* White et Morgan-Jones, *A. uncinatum* Gams, Petrini et Schmidt, *A. lolii* Latch, Christensen et Samuels y *A. coenophialum* Morgan-Jones et Gams.

Recientemente, Glenn et al., 1996, transfirieron estas especies anamórficas al nuevo género *Neotyphodium* Glenn, Bacon & Hanlin, basándose en análisis cladístico de secuencias de ADN ribosomal 18s.

En un estudio realizado por Morgan-Jones et al. en 1990 reconocen que todas las especies de *Neotyphodium* descriptas hasta el momento, excepto *N. uncinatum*, presentan conidios pequeños, que van desde la forma elipsoide a alantoide y cuyos tamaños se superponen, demostrando que en algunos casos es imposible observar diferencias morfológicas. Estos autores sugieren que la macromorfología de la colonia es también un carácter inconsistente pues la apariencia y la tasa de crecimiento varían con las condiciones de cultivo.

En los últimos años, los avances en las técnicas moleculares y bioquímicas han permitido estudios de carácter evolutivo y sistemático. La posibilidad de estudiar las proteínas y el ADN aumenta la cantidad de caracteres disponibles a evaluar y permite realizar estudios poblacionales y establecer relaciones filogenéticas con mayor precisión.

Leutchmann (1994) utilizando análisis de isoenzimas identifica seis grupos de endofitos aislados de 12 especies de *Festuca*. Tres de los grupos correspondieron a especies descriptas previamente.

Schardl & Leutchmann (1999) establecen tres nuevas especies de *Epichloë* simbióticas con pastos de Norteamérica, basándose en estudios de interfertilidad y secuenciación del gen de la  $\beta$ -tubulina.

### 1.3 ) Antecedentes en Argentina:

El conocimiento de la existencia de gramíneas tóxicas para el ganado data de mucho tiempo atrás, pero la relación de la misma con un hongo se puso en evidencia recién a principios de este siglo. En un boletín de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de La Plata se publicó un trabajo referente a las posibles causas de una enfermedad del ganado, producida por la ingesta de *Festuca hieronymi* Hackel, conocida como tembladera (Rivas y Zanolli, 1909).

Esta es una enfermedad tóxica de los herbívoros, caracterizada por manifestaciones nerviosas particulares que constituyen los primeros síntomas. Los autores identificaron de manera errónea al endofito presente en esta planta, denominándolo *Endoconidium tembladerae*. Sin embargo fueron los primeros en el mundo en relacionar este tipo de enfermedades con un endofito fúngico. Este descubrimiento permaneció en el olvido hasta que Bacon et al. en 1977 llegan a la misma conclusión en relación a la festucosis producida por la ingestión de *F. arundinacea* por el ganado.

Durante los últimos diez años se estudian en el laboratorio de Micología del Depto de Cs. Biológicas de la FCEyN y PRHIDEB-CONICET

---

los endofitos de gramíneas autóctonas. Se lleva a cabo el reconocimiento e identificación de estas interacciones y de los organismos que las forman (Bertoni et al., 1993). Hasta el presente se han reconocido 33 pastos autóctonos asociados a endofitos fúngicos (Lugo et al., 1998; Cabral et al., 1999)

Esto dio como resultado el aislamiento de cepas de diferentes gramíneas tóxicas (*Festuca argentina* (Speg.) Parodi, *F. hieronymi* Hack. y *Poa huecu* Parodi) (Cabral & Bertoni, 1991; Cabral & Lugo, 1993) y de otras de las que no se tiene registro de toxicidad como *Poa rigidifolia* Steud., *Festuca magellanica* Lam. y *Melica stuckertii* Hack. entre otras (Cabral & Lugo, 1994; White et al, 1996). Todos los organismos aislados hasta el presente muestran las características micromorfológicas y de cultivo que permiten incluirlos en el género *Neotyphodium*. En ningún caso se registró la presencia de formas teleomórficas tanto en especies nativas como introducidas.

Como en el caso de los endofitos del hemisferio norte, las características macro y micromorfológicas resultaron escasas y dudosas para decidir si se trataba de especies ya descriptas. Para resolver este problema realizaron un estudio preliminar aplicando técnicas isoenzimáticas y moleculares a los endofitos de las tres gramíneas tóxicas, comparándolos con endofitos del hemisferio norte. Los resultados indicaron que los tres estaban alejados filogenéticamente de los de las gramíneas del hemisferio norte y que eran muy similares entre sí. Concluyen considerando que todos los aislamientos corresponden a una nueva especie, que denominaron *Neotyphodium tembladerae* Cabral et White (Cabral et al., 1999).

Paralelamente se realizó un estudio químico del endofito de *Poa huecu*, donde se identificó al compuesto letal como de naturaleza

---

glicopeptídica (Acher, 1995). Esto coincidió con estudios previos realizados en el Departamento de Química Orgánica de la FCEyN de la UBA, realizados directamente sobre la planta (Pomilio et al., 1989). Estos resultados apoyan la hipótesis de que los endofitos de las gramíneas tóxicas son entidades diferentes a las del hemisferio norte.

En el laboratorio de Micología se cuenta con una colección de más de 70 aislamientos de endofitos pertenecientes al género *Neotyphodium*, que en su mayoría fueron aislados de pastos sin registro de toxicidad para el ganado. Muchos son componentes importantes de pasturas naturales y de la dieta del ganado patagónico.

La mayoría de los endofitos del género *Neotyphodium* no forman estroma y no se los conoce como productores de ningún otro tipo de estructuras reproductivas en los pastos. Por esta razón se ha creído que la transmisión vertical es la única forma de diseminación de estos endofitos asintomáticos. Pero, en un estudio realizado por White et al., en 1996 informan la ocurrencia de micelio con células conidiógenas y conidios en la superficie de las hojas en dos especies diferentes de gramíneas; una del hemisferio norte (*Agrostis hiemalis*) y otra sudamericana (*Poa rigidifolia*). Esta evidencia podría indicar que la transmisión de estos hongos no se produce solamente por la transferencia a través de las semillas, sino que podría ocurrir una transmisión de tipo horizontal.

#### 1.4 ) Electroforesis de isoenzimas:

La identificación de especies fúngicas está generalmente basada en diferencias morfológicas observables, pero especies y poblaciones

---

pueden ser genéticamente diferentes aunque no puedan ser diferenciadas de manera morfológica. Técnicas bioquímicas y genéticas, como el análisis isoenzimático, han sido de utilidad para diferenciar taxas que tienen morfología similar en cultivo (Bonde et al., 1993).

El análisis de isoenzimas por medio de las técnicas de electroforesis horizontal en poliacrilamida ha sido utilizado para estudios de diferenciación y de variabilidad genética dentro y entre las especies fúngicas (Micales et al., 1992). Además ha sido efectivo en revelar la extensa variación en diversas poblaciones de hongos de numerosos hospedantes (Leuchtmann & Clay, 1990).

Existen trabajos recientes donde se aplican métodos isoenzimáticos como herramienta para la identificación de endofitos del hemisferio norte, que permiten una mas clara separación de las entidades (Leuchtmann & Clay, 1990; Christensen et al., 1993; Leuchtmann, 1994; Naffaa et al., 1998). Las mismas técnicas, junto a estudios moleculares, de formas teleomórficas y anamórficas, han permitido obtener datos sobre el origen, evolución y dispersión de las mismas. Se ha mantenido un especial énfasis en los anamorfos, cuyos teleomorfos son desconocidos, que forman los sistemas mutualistas de mayor interés económico, especialmente en pasturas comerciales.

La técnica de electroforesis permite separar proteínas por peso y carga eléctrica cuando son sometidas en un campo eléctrico. Puede ser llevada a cabo en diversos soportes, como geles de almidón o poliacrilamida. Esta última ofrece un alto grado de resolución y flexibilidad en el espectro de pesos moleculares a separar, ya que se puede regular el tamaño del poro del gel alterando el porcentaje de acrilamida. Para detectar su actividad específica *in situ* se realiza una tinción histoquímica específica.

Las **isoenzimas** (Markert & Muller, 1959) son distintas formas moleculares de una misma enzima que catalizan una misma reacción (codificadas por diferentes loci), aunque pueden diferir en sus propiedades cinéticas. También se estableció el término **alozima** en referencia a las variantes proteicas producidas por diferentes formas alélicas del mismo locus. Las distintas bandas que aparecen sobre el gel luego de la tinción histoquímica se denomina **Zimograma**. El patrón de bandas resultante para cada individuo es el **fenotipo electroforético**.

El papel biológico de las isoenzimas sería mediar reacciones en diferentes compartimentos celulares o tejidos, o bajo distintas condiciones metabólicas u ontogenéticas.

Para lograr una muestra aleatoria y representativa del genoma deben elegirse sistemas isoenzimáticos que cubran todo el espectro metabólico, desde las enzimas involucradas en el metabolismo energético, usualmente menos variables, hasta las enzimas no específicas del metabolismo periférico, en donde la ocurrencia de variación es un fenómeno frecuente.

## **OBJETIVOS**

## **2- OBJETIVOS**

- Analizar las características morfológicas de los endofitos aislados de gramíneas autóctonas no tóxicas de Argentina.
- Caracterizar los mismos endofitos por el método de electroforesis de isoenzimas.
- Comparar los resultados morfológicos e isoenzimáticos con los de los endofitos de hospedantes del hemisferio norte y con aquellos aislados y caracterizados previamente a partir de gramíneas tóxicas.
- Reconocer las posibles variaciones morfológicas e isoenzimáticas entre especies y entre algunas poblaciones de endofitos aislados de diferentes hospedantes.

## HIPOTESIS

### 3-HIPOTESIS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente (Cabral et al., 1999),

- ➡ Los endofitos asociados con pastos nativos no tóxicos de Argentina representan entidades diferentes a los estudiados en otras partes del mundo, y en particular a las conocidas en el hemisferio norte.
- ➡ También mostrarán diferencias con *N. tembladera* estudiado previamente en tres gramíneas tóxicas nativas.

La ausencia de formas teleomórficas en Argentina y posiblemente en Sudamérica, podría tener dos explicaciones: El género teleomórfico *Epichloë* evolucionó en el hemisferio norte y Sudamérica fue colonizada por una o pocas cepas de endofitos anamórficos, transmitidos por semillas, que no tenían la capacidad de formar estromas. Esta hipótesis presupone cierta dificultad en la colonización, que quizás ocurrió cuando Norteamérica y Sudamérica se encontraban separadas.

- ➡ Bajo estas condiciones todos los endofitos en Sudamérica habrán desarrollado de una o muy pocas cepas ancestrales y se espera que tengan menor diferenciación que las del hemisferio norte, ya que el tiempo de divergencia es menor.

Una hipótesis alternativa, es que diferentes especies de *Epichloë* alguna vez existieron en Sudamérica, pero se extinguieron debido a condiciones climáticas adversas u otros factores.

- ➡ Bajo estas condiciones los endofitos anamórficos del género *Neotyphodium* en Sudamérica mostrarán diferencias, que indicarían su evolución de diferentes especies teleomórficas.

## MATERIALES Y METODOS

#### 4- MATERIALES Y METODOS

##### 4.1) Cepas utilizadas en el estudio.

Se analizaron un total de 37 cepas de endofitos fúngicos de gramíneas. De ellas, 21 corresponden a cinco gramíneas autóctonas no tóxicas: *Festuca magellanica* Lam., *Poa rigidifolia* Steud., *Phleum commutatum* Gaudin, *Melica stuckertii* Hack.y *Bromus setifolius* Presl. En todos los casos las características macro y micromorfológicas permiten ubicarlos en el género *Neotyphodium* sp.

Cuatro cepas provienen del hemisferio norte, tres corresponden a formas teleomórficas y una a la forma anamórfica *Neotyphodium coenophialum*.

Se reanalizaron 12 cepas de tres gramíneas tóxicas autóctonas estudiadas previamente, descriptas como *N.tembladerae* (Cabral et al., 1999). Los datos de cada cepa se muestran en la Tabla 1 y la distribución de las especies y poblaciones de las gramíneas estudiadas asociadas con endofitos en territorio argentino, en la Figura 2.

Las cepas del hemisferio norte fueron proporcionadas por los Dres. J. F. White (Jr. Rutgers University, New Jersey, Estados Unidos) y A. Leutchmann (Geobotanisches Institut, Zurich, Suiza).

La casi totalidad de las cepas de gramíneas autóctonas habían sido aisladas con anterioridad y se encontraban depositadas en la colección BAFC cult.

Se colaboró en el aislamiento e identificación del endofito de *Bromus setifolius* Presl según se detalla a continuación.

**4.2) Relevamiento y colección de gramíneas colonizadas.**

Durante el mes de Febrero de 1996 se realizó un relevamiento en la Provincia de Mendoza con el objeto de identificar poblaciones de pastos autóctonos asociados a endofitos fúngicos y colecciónar ejemplares vivos. Con el mismo objeto, del 10 al 22 de Diciembre del mismo año, se realizó una campaña al extremo sur de la Provincia de Santa Cruz.

Se relevaron pastos de invierno miembros de la subfamilias Poideae y Meliaceae, donde se registra el mayor número de asociaciones con endofitos.

Las plantas de cada población se inspeccionaron visualmente, con el objeto de detectar la presencia de estromas sexuales y/o estructuras anamórficas.

Se recolectaron 2-3 plantas enteras de cada población seleccionada, desenraizándolas con una pala, y conservándolas en una bolsa de plástico.

Se realizó una inspección microscópica de cada planta, tomándose muestras de tallos y vainas, de las que se extrajo tejido parenquimático con ayuda de un bisturí. El material se tiñó con una gota de solución acuosa de azul de anilina 0,1 % y se observó bajo microscopio óptico la presencia de hifas de endofitos (White et al. , 1995).

Posteriormente se llevó a cabo el muestreo definitivo de aquellas poblaciones en las cuales se había registrado la presencia de endofitos y se tomaron muestras de las plantas vivas. Se colecciónaron entre 5-10 ejemplares de cada población. Se mantuvieron en bolsas plásticas para su traslado al vivero de la F.C.E. y N.

### Aislamiento e identificación

Los tallos y vainas de cada planta se lavaron cuidadosamente en agua corriente, y se cortaron trozos de aproximadamente 2 cm. Se los esterilizó superficialmente sumergiéndolos sucesivamente en una solución de etanol 50 % durante 1 minuto, y en una solución de hipoclorito de sodio 50 % (lavandina comercial y agua corriente 1:1) durante 10 minutos. Luego se enjuagaron en etanol 70 % durante 1 minuto.

Una vez esterilizados, los fragmentos se sembraron en cajas de Petri con medio Agar-Papa-Glucosa (APG) (extracto de papa 300 g/l, agar 20 g/l, glucosa 10 g/l).

Las cajas se sellaron con papel parafinado y se colocaron en cámara de cultivo, en oscuridad, a 23° C hasta que se observaron hifas que emergieron de los extremos de los trozos sembrados.

De cada planta se seleccionó una sola cepa y, luego de ser repicadas a tubos en *pico de flauta* con medio APG, se dejaron desarrollar y se incorporaron a la colección BAFC cult.

Para la identificación se sembró cada cepa en placa con medio APG agarizado y se utilizaron como criterios los caracteres micromorfológicos y de cultivo. Para analizar el primer tipo de caracteres se estudió cada cepa bajo microscopio óptico de fluorescencia (Zeiss, Axioskope) con tinción de calcofluor white. Se analizó el tamaño de los conidios, el largo de las fiálide, la intensidad de fluorescencia y la morfología de las hifas. Para el caso de las diferencias de cultivo se hizo una inspección a ojo desnudo de su morfología, de su

tasa de crecimiento y se observó la difusión o no de pigmentos en el medio.

#### Comparación de caracteres morfológicos

Tomando en cuenta los datos preexistentes, junto con los obtenidos de *Bromus setifolius*, se realizó una tabla comparativa de las características macro y microscópicas de todas las cepas aisladas a partir de gramíneas autóctonas. Se volcaron los datos de la tasa de crecimiento, el color del reverso de la colonia y la difusión de pigmentos al medio de cultivo entre las macroscópicas. Entre las microscópicas la longitud y el ancho (en  $\mu\text{m}$ ) y la intensidad de la fluorescencia de los conidios, bajo luz UV y tinción con calcofluor white.

También fueron incluidos en el análisis cepas de los endofitos provenientes de hospedantes del hemisferio norte, para detectar posibles diferencias de carácter micromorfológico y de cultivo, con los aislados a partir de pastos autóctonos.

Hospedante	Provincia	Población	BAFC	Endof. aislado
<i>Phleum commutatum</i>	T. del Fuego	Cabo Domingo (p1)	654	<i>Neotyphodium sp</i>
	T. del Fuego	Lago Escondido (p2)	680	
	T. del Fuego	Cabo Domingo (p1)	682	
<i>Poa rigidifolia</i>	T. del Fuego	Paso Garibaldi (p3)	641	
	T. del Fuego		700	
	T. del Fuego		668	
	T. del Fuego	Lago Yehuin (p4)	673	
	T. del Fuego	Ea Los Flamencos (p5)	642	
	T. del Fuego		687	
<i>Festuca magellanica</i>	Santa Cruz	Cabo Vírgenes (p6)	650	<i>N. tembladera</i>
	Santa Cruz	Cabo Domingo (p7)	659	
	T. del Fuego		630	
<i>Melica stuckertii</i>	Córdoba	Capilla del Monte (p8)	803	
	Córdoba	Ea El Rosario (p9)	1204	
	Córdoba	Copinas (p10)	1206	
	Córdoba	Capilla del Monte (p8)	1205	
	Córdoba	Ea. El Rosario (p9)	1202	
<i>Bromus setifolius</i>	Santa Cruz	Lago Roca (p11)	816	<i>N. tembladera</i>
	Santa Cruz	Ea Alice (p12)	893	
	Mendoza	Ruta 222 (p13)	896	
	Mendoza		861	
<i>Poa huecu</i>	Neuquén	El Huecú (p14)	2184	
	Neuquén		2180	
	Neuquén		2181	
	Neuquén		2175	
	Neuquén		2176	
	Neuquén	Cajón Almanza (p15)	1209	<i>N. tembladera</i>
	Neuquén	Tafí del Valle (p16)	1210	
<i>F. hieronymi</i>	Tucumán		65	
	Tucumán		76	
<i>F. argentina</i>	Neuquén	Aluminé (p17)	1351	<i>N. tembladera</i>
	Neuquén	Bariloche (p18)	1031	
	Río Negro		53	
<i>Dactylis glomerata</i>	2301	Suiza	2142	<i>Epichloë typhina</i>
<i>F. rubra</i>	2390	EEUU (N.J.)	797	<i>E. festucae</i>
<i>Agrostis hiemalis</i>	2275	EEUU	2470	<i>E. amarillans</i>
<i>F. arundinacea</i>	2299	Suiza	2167	<i>N. coenophialum</i>

Tabla N° 1: hospedante, provincia y población, N° de BAFC cult. e identificación del endofito aislado.

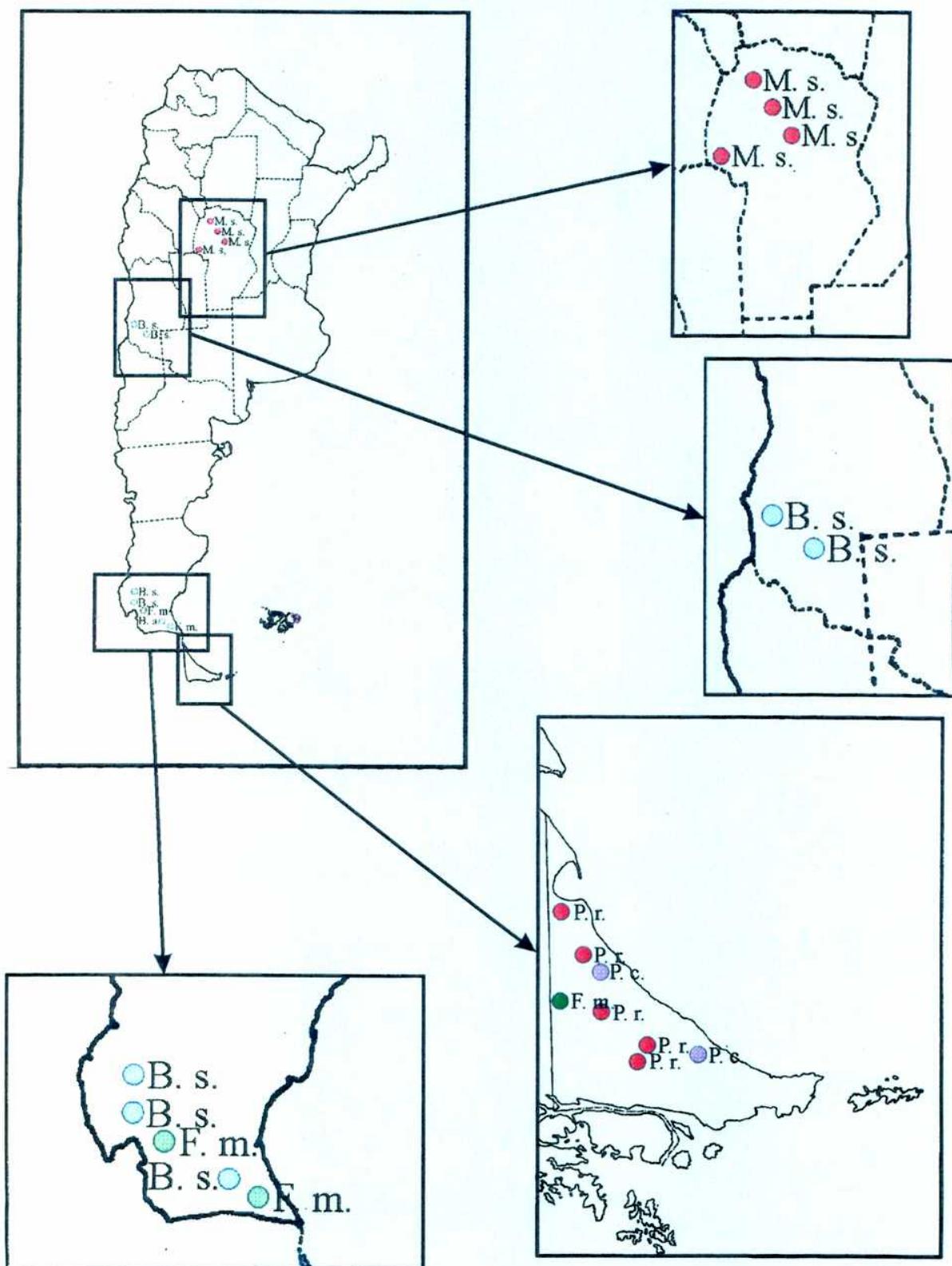


Figura N° 2: Distribución de las especies y poblaciones de gramíneas asociadas con endofitos en territorio argentino. Abreviaturas: M.s: *Melica stuckertii*; B.s: *Bromus setifolius*; P.c: *Phleum commutatum*; F.m: *Festuca magellanica*; P.r: *Poa rigidifolia*.

#### 4.3) Electroforesis de isoenzimas.

##### 4.3.1- Preparación de las muestras.

Se hicieron crecer las cepas en medio líquido V-8: jugo comercial V-8 centrifugado 100 ml, glucosa 10 g, monohidrato de L-asparagina 2 g, fosfato de potasio monobásico 1 g, sulfato de magnesio 0.5 g, cloruro de potasio 0.25 g, cloruro férrico anhidro 0.01 g, agua destilada hasta completar 1 litro y con ajuste a pH 6 (Leutchmann, 1994).

Los cultivos se mantuvieron en agitación a 120 r.p.m en oscuridad a 23 °C durante 15-21 días que fue el intervalo de tiempo en donde se había detectado crecimiento máximo (Cafaro, 1997).

##### Método de extracción de isoenzimas.

Luego del filtrado al vacío del micelio, se realizaron distintos tratamientos:

- Enfriado en baño de hielo a 0° C y utilizado inmediatamente en la extracción.
- Congelado a -70° C durante 72 hs. , liofilizado y triturado a temperatura ambiente en mortero de cerámica, y almacenado hasta su utilización a -20° C .

La extracción resultó más eficiente cuando el micelio se congeló a -70° C durante 72 hs. A continuación se lo liofilizó y se lo trituró en el mortero. Luego de la resuspensión en el buffer de extracción, fue conveniente congelar el homogenato a -20° C, para completar la liberación de enzimas. Este segundo proceso de congelamiento optimizó la ruptura de las hifas. La evaluación de los resultados fue cualitativa, y

se obtuvo por comparación de las mismas cepas bajo los diferentes tratamientos.

Se colocaron 40 mg de micelio en un tubo Ependorff y se agregaron aproximadamente 2 ml de buffer de extracción (Tris- HCl 0.1 M pH 7.1; PVP 40000 -4 a 20 p/v; 0.01 M MgCl<sub>2</sub>. 6 H<sub>2</sub>O; 0.01 M KCl; 0.001 M EDTA; 0.1% v/v β- mercaptoetanol). Este proceso se realizó en recipientes a 0°C enfriados con hielo y se trituró cada muestra con una varilla de vidrio. Se absorbió cada homogenato en papel Wattman 3 MM de 2 mm de ancho por 4 mm de largo.

#### 4.3.2- Preparación de los geles.

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 7 % cuya preparación es la siguiente:

Buffer	100 ml
Acrilamida	7.00 g
Bis- acrilamida	0.16 g
TEMED (diamina de N,N,N,N'-Tetrametiletileno)	0.10 ml
Persulfato de Amonio	punta de espátula.

Los buffers difieren según el sistema isoenzimático analizado (Tabla Nº 2).

Una vez finalizada su preparación, la solución se vertió en una cubeta de vidrio de 17cm de largo x 15cm de ancho x 2mm de espesor. La polimerización se produjo en ausencia de aire, lo que se logró cubriendo la cubeta con una placa de vidrio evitando la formación de burbujas. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente entre 3 y 14 hs.

#### 4.3.3- Siembra y corrida electroforética.

La electroforesis horizontal se realizó en geles de poliacrilamida. Se practicaron orificios en el gel con un peine de acero inoxidable con 20 dientes de 4 mm de ancho x 2 cm de espesor espaciados regularmente. En cada orificio se insertó papel de filtro Wattman embebido en el homogenato. Por tratarse de bandas de migración anódicas, las muestras se sembraron aproximadamente a 4 cm del extremo del cátodo. Se utilizaron unas gotas de solución de azul de bromofenol como marcador de frente a fin de estimar la posición de las enzimas y como referencia para estimar la velocidad de migración relativa (Rf).

Para calcular la velocidad de migración relativa se utilizó la siguiente fórmula:

$$Rf. = (d/a) * 100$$

donde  $a$  representa la distancia que migró el colorante con respecto al lugar de siembra, y  $d$  es la distancia de migración de la banda con respecto al mismo punto.

Los geles con los papeles de filtro Wattman embebidos en los homogenatos fueron colocados en las cubas electroforéticas que contenían los buffers correspondientes a cada sistema enzimático (Tabla N° 2). Los geles fueron puestos en contacto con la solución buffer mediante paños esponja de 16 x 10 cm.

Se los cubrió con papel autoadherente para evitar la evaporación y se los tapó con vidrios. Luego se sometieron a un campo eléctrico a voltaje constante (120 V) y a amperaje variable, tratando de no superar los 35

mA, dentro de una cámara a 5° C a fin de evitar el calentamiento y consecuente desnaturalización de las proteínas. La corrida electroforética se detuvo cuando el frente migró 10-12 cm desde el punto de siembra. La velocidad de migración depende de las soluciones buffer utilizadas en los geles y cubas electroforéticas, por lo cual el tiempo de corrida fue variable de acuerdo al sistema utilizado. Una vez finalizada la corrida electroforética, se realizó el revelado de los distintos sistemas enzimáticos por medio de tinciones histoquímicas específicas.

Tabla N° 2. Características de los buffers utilizados en las corridas electroforéticas.

Buffer	Composición	Autor
II	0.223 M Tris, 0.069 M ácido cítrico, ajuste a pH 7.2.	Soltis et al. , 1983.
III	0.135 M Tris, 0.032 M ácido cítrico, ajuste a pH 8.	Soltis et al. , 1983.
R	<b>Solución A:</b> 0.03 M LiOH, 0.2 M ácido bórico, ajuste a pH 8.2 . <b>Solución B:</b> 0.05 M Tris, 0.0083 M ácido Cítrico, ajuste a pH 8.2.	Selander et al., 1969. Modificado por Ridgway et al., 1970

#### 4.3.4- Revelado, fijación y preservación de geles.

Los buffers y protocolos de tinción se realizaron según Wendel & Weeden (1989), Soltis et al. (1983) y Shaw & Prasad (1970). Se seleccionaron 6 sistemas cuyos procedimientos de tinción y buffers se detallan en 4.3.5.

Todos los geles se fijaron en una solución agua, metanol y ácido acético (5:5:1), se fotografiaron aquellos que presentaban la mejor resolución y se envolvieron en bolsas de plástico con la medida necesaria, selladas por calor para su preservación. Se rotularon y se almacenaron en cajas de cierre hermético a temperatura ambiente.

4.3.5- Características y condiciones experimentales de los sistemas enzimáticos.

Las abreviaturas de esta sección se encuentran en la página 31.

1- *Esterasas*

<u>Buffer de corrida:</u>	III
<u>Buffer gel:</u>	III dilución 67 ml/l.
<u>Tinción:</u>	
acetato de $\alpha$ -naftilo ( $\alpha$ NA)	0.03 g
acetato de $\beta$ -naftilo ( $\beta$ NA)	0.03 g
Fast blue RR Salt (FBRRs)	0.05 g
Acetona	2 ml
Buffer Tris-Hcl 0.1M pH 6	50 ml

Las esterasas son consideradas hidrolasas ya que participan de la hidrólisis de las uniones ésteres. Pertenecen a un grupo complejo y heterogéneo de enzimas de amplia especificidad por sustratos artificiales.

Se revelaron los geles con dos sustratos diferentes: por un lado con el  $\alpha$ NA y por el otro con el  $\beta$ NA. Esto se realizó a fin de mejorar el revelado de las bandas, ya que se logró mayor nitidez y resolución. Se

disolvió por separado el acetato de naftilo con acetona, y el colorante (FBRRs) con el buffer de tinción. Luego esta solución se filtró y se vertió sobre el gel, que se incubó a 40°C en oscuridad hasta que aparecieron bandas de color marrón oscuro en el caso de esterasas  $\alpha$  y bandas de color rojo en el caso de esterasas  $\beta$ .

2- *Glucosa 6 fosfato deshidrogenas*

Buffer de corrida: II

Buffer gel: II dilución 35 ml/l.

<u>Tinción:</u>	Glucosa 6 fosfato. Na <sub>3</sub>	0.03 g
	NADP	0.01 g
	NBT	0.01 g
	PMS	0.003 g
Buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.5		50 ml

Se incubó a 37°C en oscuridad hasta que aparecieron bandas de color azul en el gel.

3- *Isocitrato deshidrogenasa*

Buffer de corrida: III

Buffer gel: III dilución 67 ml/l.

<u>Tinción:</u>	Acido isocítrico	0.05 g
	MgCl <sub>2</sub>	0.02 g
	NADP	0.005 g
	MTT	0.01 g

PMS 0.0025 g

Bufer Tris-HCl 0.1M pH 8 50 ml

Esta enzima es una oxidoreductasa que requiere magnesio para catalizar la reacción. En presencia de PMS y NADPH, el NBT se convierte en formazán, compuesto que precipita y da lugar a la formación de bandas color azul.

Se disolvieron los reactivos en el buffer indicado y se volcó la solución sobre el gel. Este se dejó incubando a 37°C en oscuridad hasta que se observaron las bandas de color.

#### 4- Leucil aminopeptidasa

Buffer de corrida: III

Buffer gel: III dilución 67 ml/l.

Tinción: Clorhidrato de β-naftilamida de L-leucina 0.02 g

Black K salt 0.05 g

N, N dimetilformamida 5 ml

Buffer fosfato pH 6 50 ml

Se disolvió por separado el Clorhidrato de β-naftilamida de L-leucina en la N, N dimetilformamida y el colorante con el buffer. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad hasta que aparecieron bandas de color violeta oscuro en el gel.

#### 5- Malato deshidrogenasa

---

<u>Buffer de corrida:</u>	III
<u>Buffer gel:</u>	III dilución 67 ml/l.
<u>Tinción:</u>	
Acido málico 2M pH 10	5 ml
NAD	0.01 g
MTT	0.01 g
PMS	0.0025 g
Buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.5	50 ml

Es una oxidoreductasa capaz de interconvertir el oxalacetato en malato, cualquiera sea su localización. En presencia de PMS y NADH, el MTT se convierte en formazán, compuesto que precipita y da lugar a la formación de bandas color azul.

Se incubó a 37°C en oscuridad hasta que aparecieron bandas de color en el gel.

#### 6- Superóxido dismutasa

<u>Buffer de corrida:</u>	RSc A
<u>Buffer gel:</u>	R (1:9) Sc A y Sc B
<u>Tinción:</u>	
EDTA	0.15 g
NADH	0.01 g
NBT	0.01 g
MTT	0.01 g
PMS	0.003 g
Bufer Tris-HCl 0.05M pH 8.5	50 ml

Estas enzimas se hallan presentes en gran número de individuos aeróbicos y parecen desempeñar un papel esencial en la defensa contra la toxicidad del oxígeno molecular. Son metaloproteínas que catalizan la reacción en la que dos radicales superóxido producen peróxido de hidrógeno y oxígeno.

En presencia de luz y PMS, el MTT se convierte en formazán originando un precipitado azul y produciendo oxígeno. Las zonas donde se produce la reacción se observan como bandas claras sobre un fondo azul.

Se disolvieron los reactivos en el buffer de tinción y se colocó el gel en una bolsa plástica con la solución y se incubó bajo una lámpara de 100 W hasta que el gel se coloreó de azul y aparecieron bandas blancas.

#### 4.4) Análisis de datos.

Las bandas obtenidas se ingresaron como caracteres binarios de presencia/ausencia en una matriz fenética, asignándoles 1 ó 0 respectivamente. Las columnas de la matriz representan las unidades taxonómicas operativas (OTU), en este caso los aislamientos, y las filas son los caracteres considerados, Nº de bandas (Tabla 5). Los datos no fueron analizados como frecuencias alélicas, debido a que se trata de formas anamórficas y no es posible realizar cruzamientos controlados para asignar alelos.

Se construyó un fenograma representativo de las similitudes entre las cepas analizadas, utilizando el método de agrupamiento pareado por medias no ponderadas (UPGMA) y se probaron diferentes coeficientes de similitud: Nei & Li (Nei & Li, 1979), Jaccard, Simple Matching y Sorensen (Crisci & L. Armengol, 1983). El análisis se realizó con el programa MultiVariate Statistical Package (MVSP) (Kovack, 1993).

#### Abreviaturas:

EDTA	ácido etilen diamino tetra acético.
MTT	bromuro de dimetiltiazol-2-il difeniltetrazolio.
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido (oxidado).
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido (reducido).
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato.
NBT	Nitro Blue tetrazolio.
PMS	Metasulfato de fanazina.

## RESULTADOS

## 5-RESULTADOS

### 5.1) Detección, aislamiento e identificación de los endofitos.

Tanto *in situ* como en el laboratorio no se registraron formas teleomórficas en las estructuras aéreas de las plantas examinadas.

El endofito de *Bromus setifolius* se observó como delgadas hifas poco ramificadas que crecen de manera intercelular a lo largo del parénquima del hospedante y que puede ser visualizado mediante la tinción con azul de anilina.

Durante el aislamiento, el micelio tardó aproximadamente un mes enemerger de las cañas sembradas en medio agarizado.

Se aislaron 14 cepas de 6 poblaciones de la provincia de Mendoza y 11 de 5 poblaciones de la provincia de Santa Cruz.

Los resultados de la identificación de las dos poblaciones de *B.setifolius* demostraron que la de Santa Cruz es estéril no presentando ni fiálides ni conidios, mientras que las cepas estudiadas provenientes de Mendoza presentan fiálides con conidios que varían entre 6-9  $\mu\text{m}$  de longitud, semejantes a los demás aislamientos de gramíneas autóctonas (Fig 4b, c). Además se observó que el reverso de las colonia es diferente para cada población, siendo de color castaño amarillento para las cepas de Santa Cruz y castaño grisáceo en el caso de los aislamientos de Mendoza. Las cepas de las diferentes poblaciones también se diferencian en la tasa de crecimiento en medio agarizado. La colonia de los aislamientos de Santa Cruz es de color blanco-amarillenta con micelio aéreo liso, chato y afelpado y con una tasa de crecimiento de 40 mm en 30 días. Las colonias de las cepas de Mendoza son de color

blanco, con borde liso, con aspecto ligeramente cerebroide y con reverso de color castaño-grisáceo claro (Fig. 3). La tasa de crecimiento es menor que la de la otra población alcanzando 16 mm en 30 días.

El examen micro y macromorfológico de los cultivos permitió ubicar las cepas aisladas de la población de Mendoza como pertenecientes al género *Neotyphodium*. Las características macroscópicas de los cultivos de la población de Santa Cruz indicarían que también se trata del mismo género.

#### Comparación de las características morfológicas

Los resultados del análisis comparativo de los caracteres morfológicos se muestran en la Tabla 3. Se evidencian diferencias en el tamaño de los conidios entre las cepas de los endofitos de *Melica stuckertii* (excepto la cepa 803) con respecto a los demás aislamientos de gramíneas autóctonas y también con los del hemisferio norte. Su longitud es menor y fluorescen débilmente bajo la luz UV con clacofluor (Fig. 4a). Estas diferencias micromorfológicas también tienen su contrapartida en las diferencias observadas en cultivo, donde el endofito de *Melica stuckertii* tiene una tasa de crecimiento mayor que los demás aislamientos de gramíneas autóctonas, similar al de las especies de *Epichloë*. Por otra parte, resultó ser la única que presenta difusión de pigmentos castaños al medio de cultivo y reverso de la colonia de color castaño rojizo oscuro (Fig. 3). Es de destacar que estas diferencias se evidenciaron en 4 de las 5 cepas encontradas en *M.stuckertii*. En tanto que la quinta (803) mostró características similares al resto de los endofitos provenientes de otros hospedantes.

También se observan diferencias en los cultivos de *Bromus setifolius* de las dos poblaciones estudiadas (Mendoza y Santa Cruz). Estas se especificaron en la sección anterior donde se hizo referencia a la identificación.

Las características morfológicas mostraron diferencias con respecto a los endofitos del hemisferio norte, tanto en la longitud de los conidios como en la tasa de crecimiento.

De las 12 cepas de endofitos de gramíneas autóctonas tóxicas que se reanalizaron, se observó que concuerdan con lo previamente descripto (los datos no se incluyen en la tabla). No mostraron diferencias macro ni micromorfológicas marcadas con los endofitos de *Poa rigidifolia*, *Festuca magellanica* ni con la población de Mendoza de *B. setifolius*. La única diferencia observable es la tasa de crecimiento de *Phleum commutatum* y la de la población de *B.setifolius* de Santa Cruz, que resultaron superiores a la de los demás aislamientos de gramíneas autóctonas.

CEPA	ORIGEN	CRECIMIENTO	LONGITUD CONIDIOS (μm)	REVERSO COLONIA	DIFUSION DE PIGMENTOS	FLUORESCENCIA DE LOS CONIDIOS
B.r 816	Santa Cruz	++	ESTERIL	Castaño amarillento	NO	+++
B.r 893	Santa Cruz	++	ESTERIL	Castaño amarillento	NO	+++
B.r 896	Mendoza	+	6-9	Castaño grisáceo	NO	+++
B.r 861	Mendoza	+	6-10	Castaño grisáceo	NO	+++
M.s 1204	Córdoba	+++	3-5	Castaño rojizo oscuro	SI	+
M.s 1206	Córdoba	+++	2-5	Castaño rojizo oscuro	SI	+
M.s 1205	Córdoba	+++	3-5	Castaño rojizo oscuro	SI	+
M.s 1202	Córdoba	+++	3-5	Castaño rojizo oscuro	SI	+
M.s 803	Córdoba	+	6-9	Castaño amarillento	NO	++
P.r 641	Tierra del Fuego	+	6-8	Castaño claro	NO	+++
P.r 700	Tierra del Fuego	+	6-8	Castaño claro	NO	+++
P.r 668	Tierra del Fuego	+	6-8	Castaño claro	NO	+++
P.r 663	Tierra del Fuego	+	6-8	Castaño claro	NO	+++
P.r 673	Tierra del Fuego	+	6-8	Castaño claro	NO	+++
P.r 642	Tierra del Fuego	+	6-8	Castaño claro	NO	+++
P.r 687	Tierra del Fuego	+	6-8	Castaño claro	NO	+++
P.r 684	Tierra del Fuego	+	6-8	Castaño claro	NO	+++
F.m 630	Tierra del Fuego	+	6-9	Castaño claro	NO	++
F.m 659	Santa Cruz	+	6-9	Castaño claro	NO	++
F.m 650	Santa Cruz	+	6-9	Castaño claro	NO	++
P.c 654	Tierra del Fuego	++	6-8	Castaño grisáceo	NO	+++
P.c 680	Tierra del Fuego	++	6-8	Castaño grisáceo	NO	+++
P.c 682	Tierra del Fuego	++	7-9	Castaño grisáceo	NO	+++
N.c 2167	Suiza	++	12-14	Castaño oscuro	NO	+++
E.t 2142	Suiza	++++	5-6	Castaño amarillento	NO	+++
E.f 797	E.E.U.U	+++	4-5	Castaño rojizo claro	NO	++
E.a 2470	E.E.U.U	+++	5-8	Castaño rojizo claro	NO	++

Tabla N° 3: Características macro y micromorfológicas de las diferentes cepas. Abreviaturas: B.r.: *Bromus setifolius*; P.r.: *Poa rigidifolia*; M.s.: *Melica stuckeitii*; P.c.: *Phleum commutatum*; F.m.: *Festuca magellanica*; N.c.: *Neotyphodium coenophialum*; E.t.: *Epiichioë typhina*; E.f.: *E. festucae*; E.a.: *E. amarillans*.

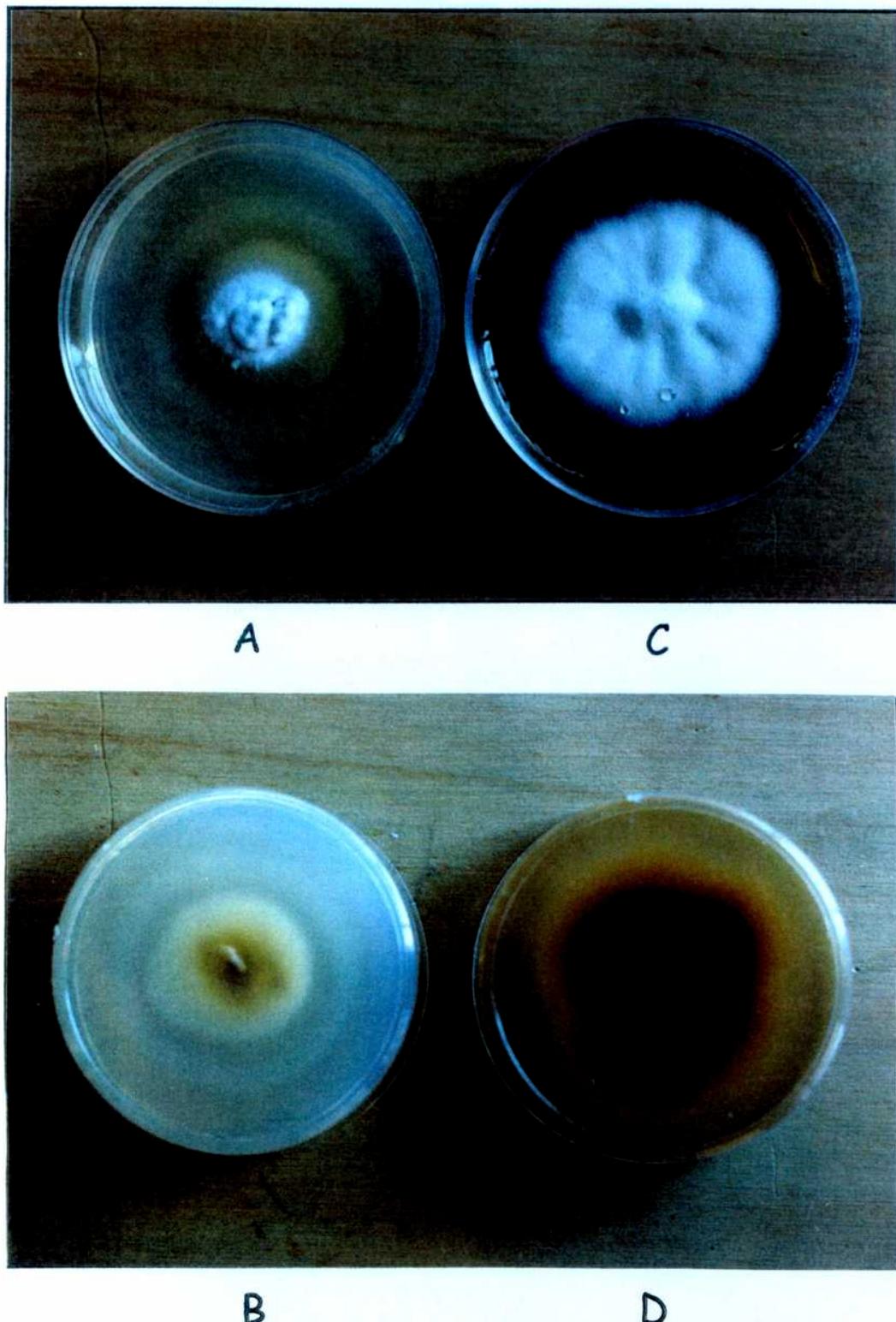


Figura N° 3: fotografías de los cultivos en medio agarizado de *Bromus setifolius* (A: frente, B: reverso) y *Melica stuckertii* (C:frente, D:reverso).

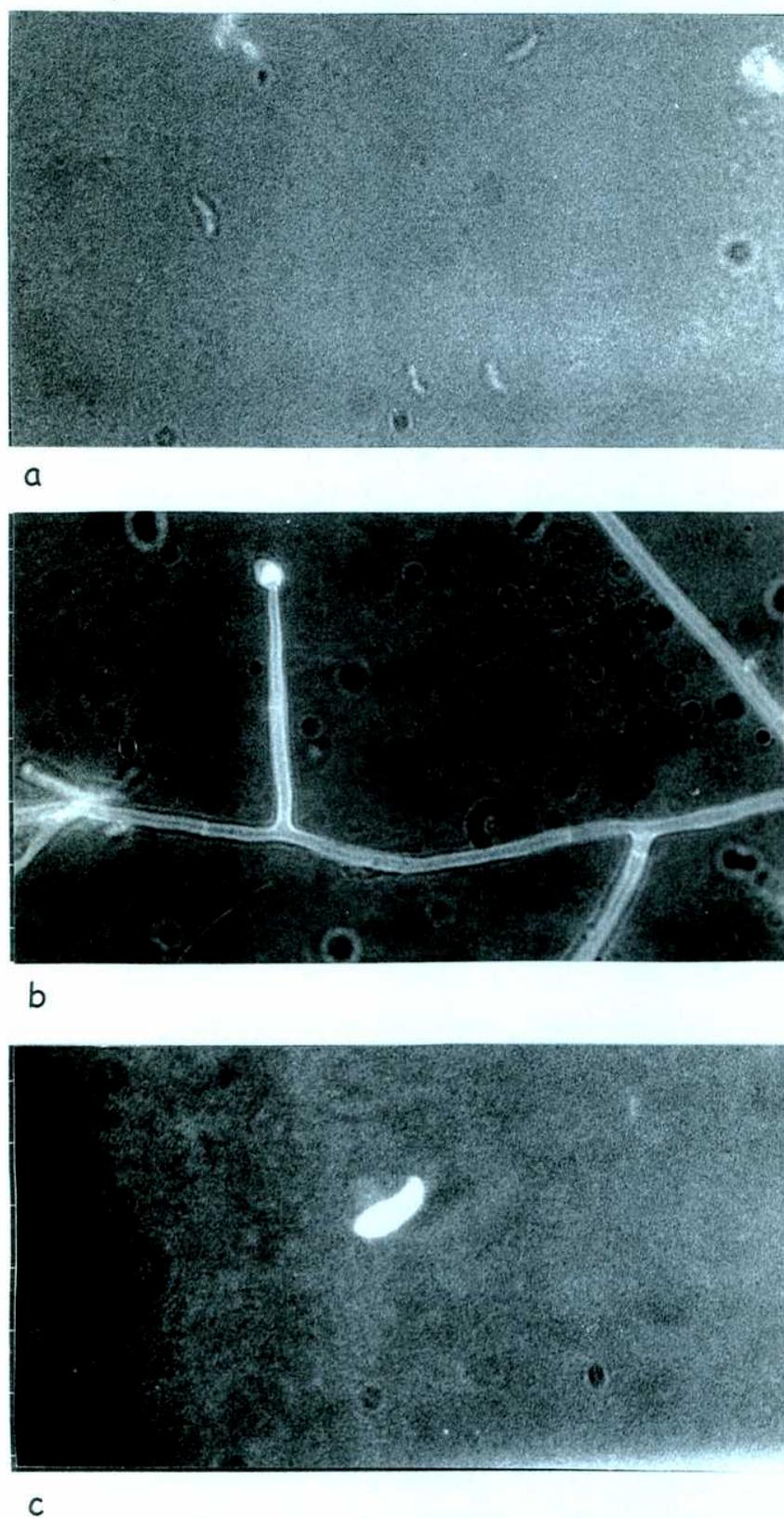


Figura 4: a- Conidios de *Melica stuckertii*; b y c- Fiáldes y conidios de *Bromus setifolius* de la población de Mendoza.

### 5.2) Patrones electroforéticos.

Para este estudio se analizaron 21 cepas de endofitos de gramíneas autóctonas no tóxicas. El trabajo se inició con un mayor número de cepas, sin embargo, algunas de ellas se descartaron, ya que en ciertos sistemas los patrones electroforéticos no eran constantes.

Se encontraron un total de 33 electromorfos diferentes, con sistemas que van desde 4 como en LAP hasta algunos sistemas como EST con 8 patrones distintos de bandas. En la mayor parte de los aislamientos los sistemas LAP y G-6PDH mostraron una sola banda, excepto para *Melica stuckertii* que presentó 2 bandas en ambos sistemas, una de ellas, característica o diagnóstica.

Se denomina banda característica o diagnóstica a aquella que permite la diferenciación de una cepa en particular, ya que no es compartida por ningún otro aislamiento.

#### ESTERASAS

Se observaron 8 diferentes patrones isoenzimáticos, designados como A, B, C, D, E, F, G y H (Fig. 5). Los patrones C, D, G y H correspondieron a cepas de endofitos del hemisferio norte (Hn) y las restantes, A, B, E y F al hemisferio sur (Hs). Las primeras sólo compartieron algunas bandas con los endofitos aislados del Hs.

El electromorfo D corresponde a la cepa de *E. typhina* (Hn) que presentó 5 bandas, de las cuales 3 son características de ésta, dos de movilidad rápida (Rf.70 y 67) y una de movilidad intermedia (Rf.32). La banda de Rf.26 es compartida con las cepas aisladas de las gramíneas

---

autóctonas (**A**, **E** y **F**) y con la **C** perteneciente a *Neotyphodium coenophialum* (Hn), mientras que la banda restante (Rf.21) es compartida con el electromorfo **G** de *E. festucae* (Hn). El electromorfo **H** es el correspondiente al aislamiento de *E. amarillans* (Hn) que tiene 4 bandas, una diagnóstica (Rf.13) y las 3 restantes compartidas por la mayoría de las cepas aisladas de gramíneas nativas (Rf.48, 40 y 36).

Los electromorfos **A**, **B**, **E** y **F** representan las cepas aisladas de las gramíneas autóctonas. El electromorfo **A** corresponde a los aislamientos de *Poa rigidifolia*, *Festuca argentina*, *F. hieronymi*, *P. huecu* y *F. magellanica*; mientras que el electromorfo **B** corresponde a los endofitos de *Phleum commutatum*. Ambos electromorfos constan de 5 bandas y comparten sólo dos (Rf.48 y 42). El **A** tiene una banda característica (Rf.10) y el **B** la de Rf.52. El resto de las bandas son compartidas con algunos de los otros aislamientos. El electromorfo **E** corresponde al aislamiento de *Melica stuckertii* y el **F** al de *Bromus setifolius*. Estos últimos comparten 3 bandas de Rf.48, 42 y 26 y no presentan bandas diagnósticas.

Este sistema permitió diferenciar las cepas autóctonas de aquellas aisladas de gramíneas del Hn; además se observaron en los electromorfos **A** y **B** bandas diagnósticas que las diferencian del resto de los endofitos analizados.

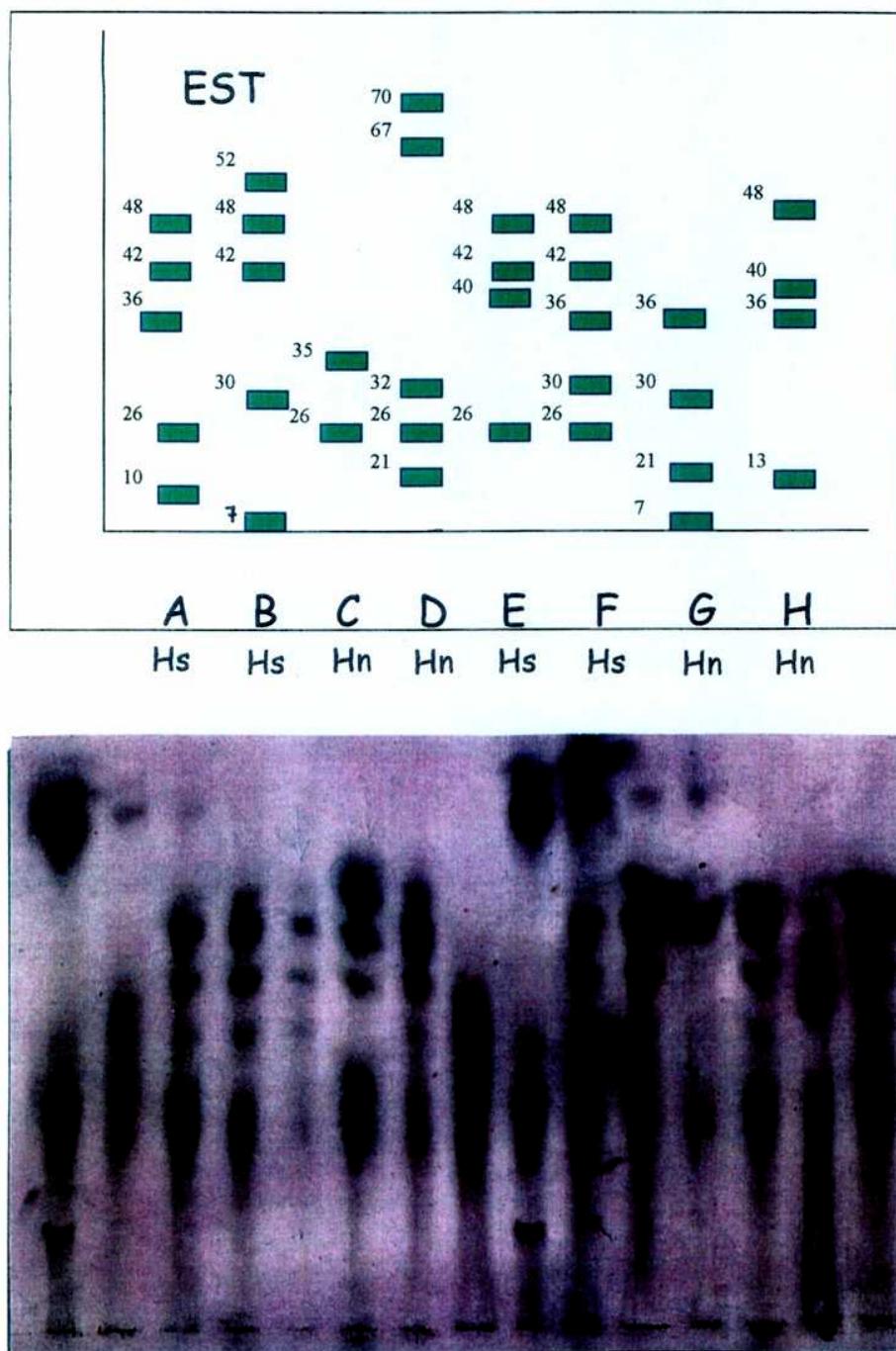


Figura N° 5: Esquema y fotografía del gel de EST.

A-H: electromorfos de las distintas cepas.

Hn: hemisferio norte; Hs: hemisferio sur

### LEUCIL AMINOPEPTIDASA

En este sistema sólo se presentaron 4 electromorfos, 3 de una sola banda (**A**, **B** y **C**) y el restante de dos (**D**) (Fig. 6). Los patrones se nombraron en forma creciente: **A** (Rf.37), **B** (Rf.40), **C** (Rf.42) y **D** (Rf.40 y 45).

El electromorfo **A** se presentó en los endofitos de *E. typhina* (Hn) y *Bromus setifolius* (Santa Cruz) (Hs), mientras que el **C** lo comparten *N. coenphialum* (Hn) y *Phleum commutatum* (Hs). El electromorfo **D** se presenta sólo en *Melica stuckertii*, con dos bandas de Rf.40 y 45. El patrón **B** es compartido por todas las restantes cepas estudiadas.

Este sistema no permite reconocer las cepas del Hn con respecto a las del Hs, ni tampoco las del hemisferio sur entre sí, a excepción de *M. stuckertii* que se diferencia claramente del resto por tener un patrón característico.

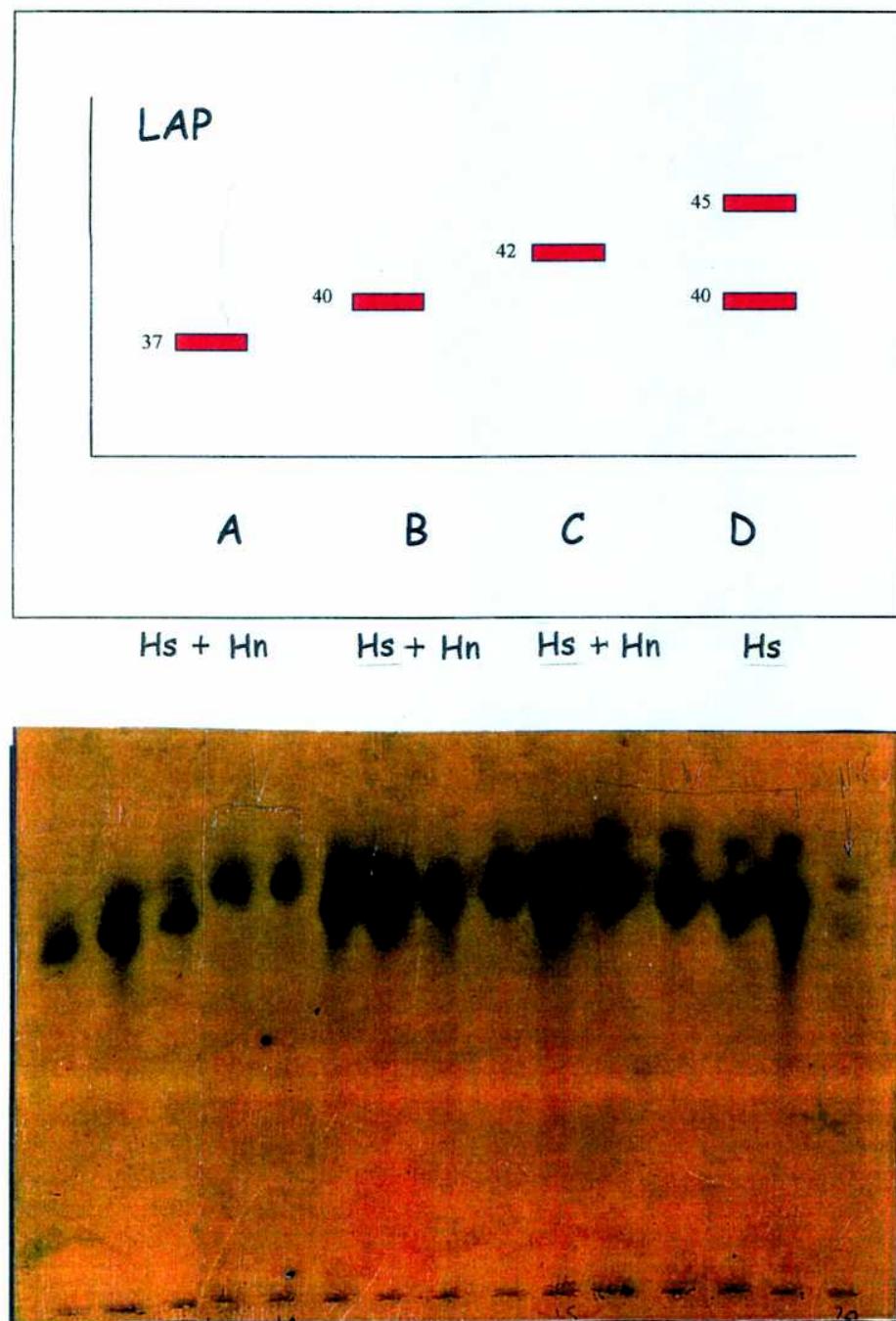


Figura N° 6: esquema y fotografía del gel de LAP.

A-D: electromorfos de las distintas cepas

Hn: hemisferio norte; Hs: hemisferio sur

## SUPEROXIDO DISMUTASA

Se reconocieron 5 electromorfos (**A-E**) (Fig. 7). El **A** común a todas las cepas de endofitos aislados de gramíneas autóctonas tanto tóxicas como no tóxicas, excepto a las cuatro cepas del endofito de *Melica stuckertii* que se encuentra representado por el patrón **D**. Estas cepas tienen las bandas Rf.50 y Rf.45 que le son características. Las bandas de Rf.31, Rf.18 y Rf.4 son compartidas con el **A**.

Los restantes electromorfos corresponden a cepas del hemisferio norte; el **B** a *E. typhina* (Rf.31,4), el **C** a *N. coenophialum* y *E. festucae* (Rf.31,25) y por último el **E** que corresponde a *E. amarillans* (Rf.31,25 y 4). El electromorfo de los endofitos de gramíneas autóctonas (**A**) consta de 5 bandas, de las cuales 4 son compartidas con diferentes endofitos de gramíneas del hemisferio norte pero consta de una banda (Rf.12) que le es característica. La banda de movilidad rápida (Rf.31) es compartida con los electromorfos **B**, **C**, **D** y **E**. La banda de Rf.25 es compartida con **C** y con **E**. La banda de Rf.18 la comparte con el **D**.

Este sistema también permitió reconocer diferencias entre los aislamientos del Hn y del Hs; además de separar nuevamente a *M.stuckertii* del resto.

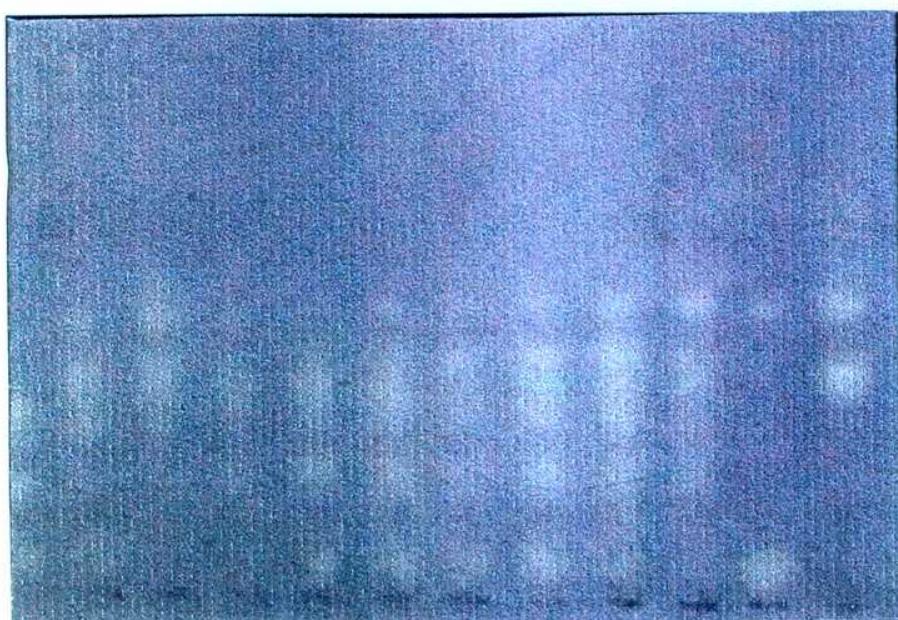
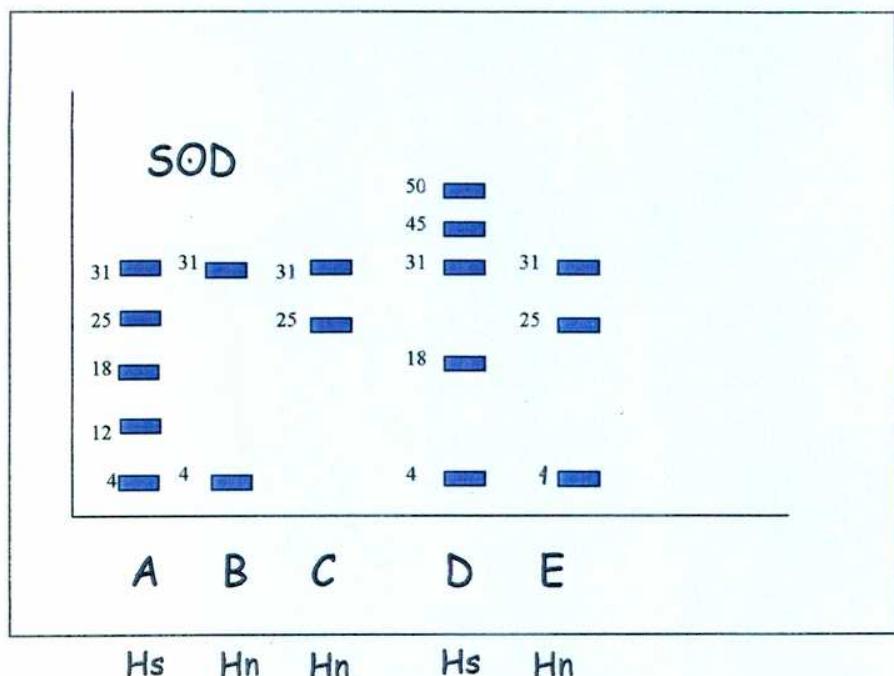


Figura N° 7: esquema y fotografía del gel de SOD.

A-E: electromorfos de las distintas cepas

Hn: hemisferio norte; Hs: hemisferio sur

## MALATO DESHIDROGENASA

Se reconocieron 5 patrones isoenzimáticos diferentes (Fig. 8). El **A** es compartido por todas las cepas aisladas de las gramíneas autóctonas, con excepción del aislamiento de *F. magellanica* que se representa por el electromorfo **D**. El patrón **A** consta de tres bandas, una de Rf.52, otra de Rf.40 y una última de menor movilidad de Rf.22. En cambio el patrón **D**, correspondiente a *Festuca magellanica*, presenta dos bandas (Rf.36,28). Los demás corresponden a aislamientos del hemisferio norte (Hn).

El electromorfo **B** corresponde a *N. coenophialum* y presenta 2 bandas, una compartida con el **A** (Rf.40) y la otra (Rf.36) compartida con los patrones **C**, **D** y **E**.

El electromorfo **C** corresponde a *E. amarillans*. Este tiene en común una banda (Rf.22) con el patrón **A**.

Por último el patrón **E** que pertenece a *E. festucae*, posee una única banda (Rf.36) compartida con los aislamientos provenientes del Hn (**B**, **C**) y con los del Hs (**D**).

Este sistema permite reconocer y diferenciar las entidades pertenecientes al Hn con respecto a aquellas del Hs. Diferencia a las cepas de plantas autóctonas del resto por la banda diagnóstica de Rf.52. Sin embargo, salvo *F. magellanica*, las demás del Hs no se diferencian entre sí.

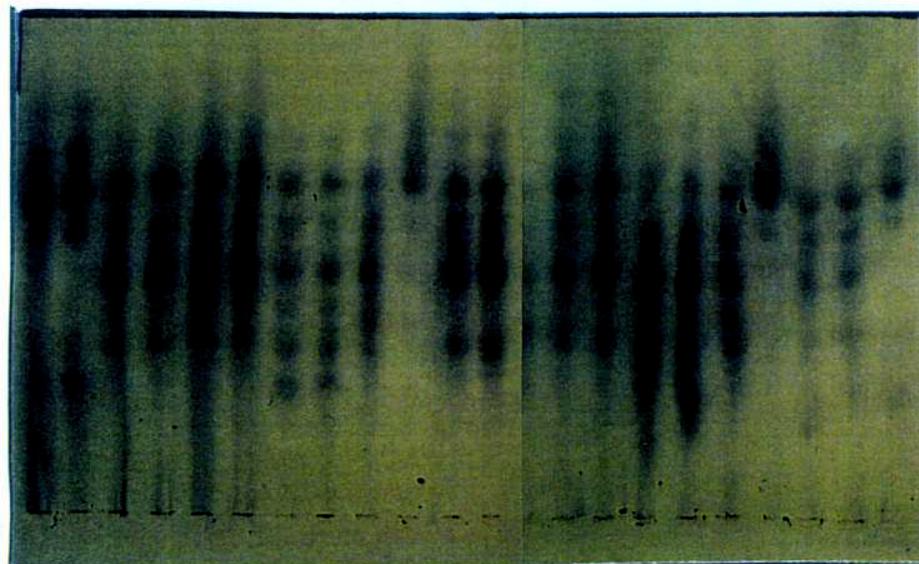
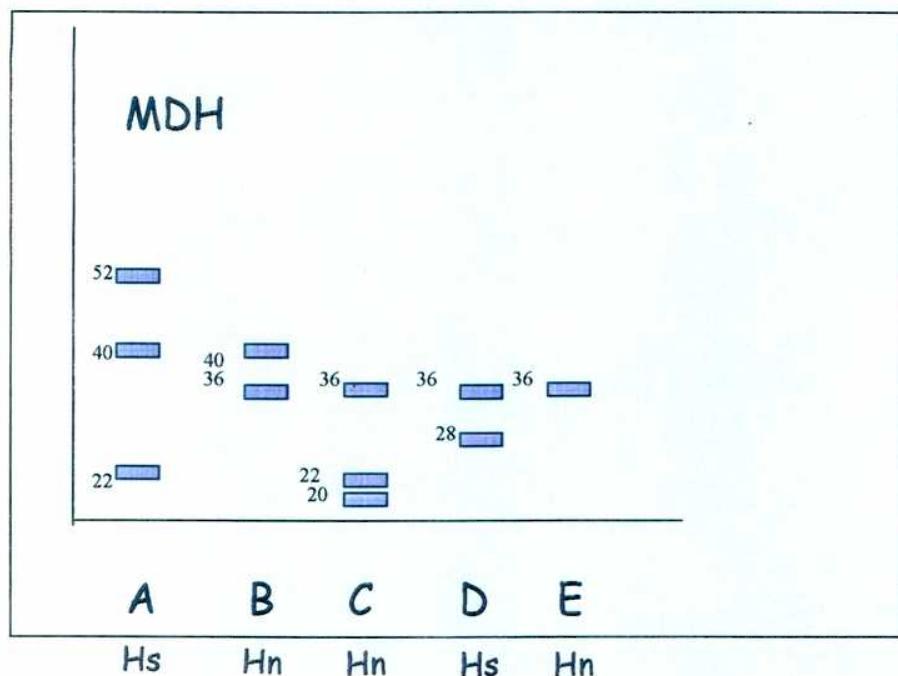


Figura N° 8: esquema y fotografía del gel de MDH.

A-E: electromorfos de las distintas cepas

Hn: hemisferio norte; Hs: hemisferio sur

### GLUCOSA 6 P-DESHIDROGENASA

Se encontraron 5 electromorfos, A, B, C, D y E (Fig. 9). Los A, B y C presentan solamente una banda, mientras que los D y E presentan dos. El patrón A corresponde a *N. coenophialum* (Hn) y presenta una banda (Rf.20). El electromorfo D corresponde al endofito aislado de *Melica stuckertii*, que presenta dos bandas de Rf.16 y 20, esta última compartida por el patrón A.

El electromorfo E corresponde a *E. amarillans* y presenta dos bandas una de Rf.4 y otra de Rf.25. Los electromorfos B y C, Rf.22 y Rf.25 respectivamente, son compartidos tanto por cepas aisladas de plantas autóctonas como por las cepas de *E. typhina* y *E. festucae* provenientes de aislamientos del Hn.

Este sistema no permite separar las entidades provenientes del Hs con respecto a aquellas aisladas a partir de hospedantes del Hn. Solamente se pudo utilizar para diferenciar a *M.stuckertii* del resto.

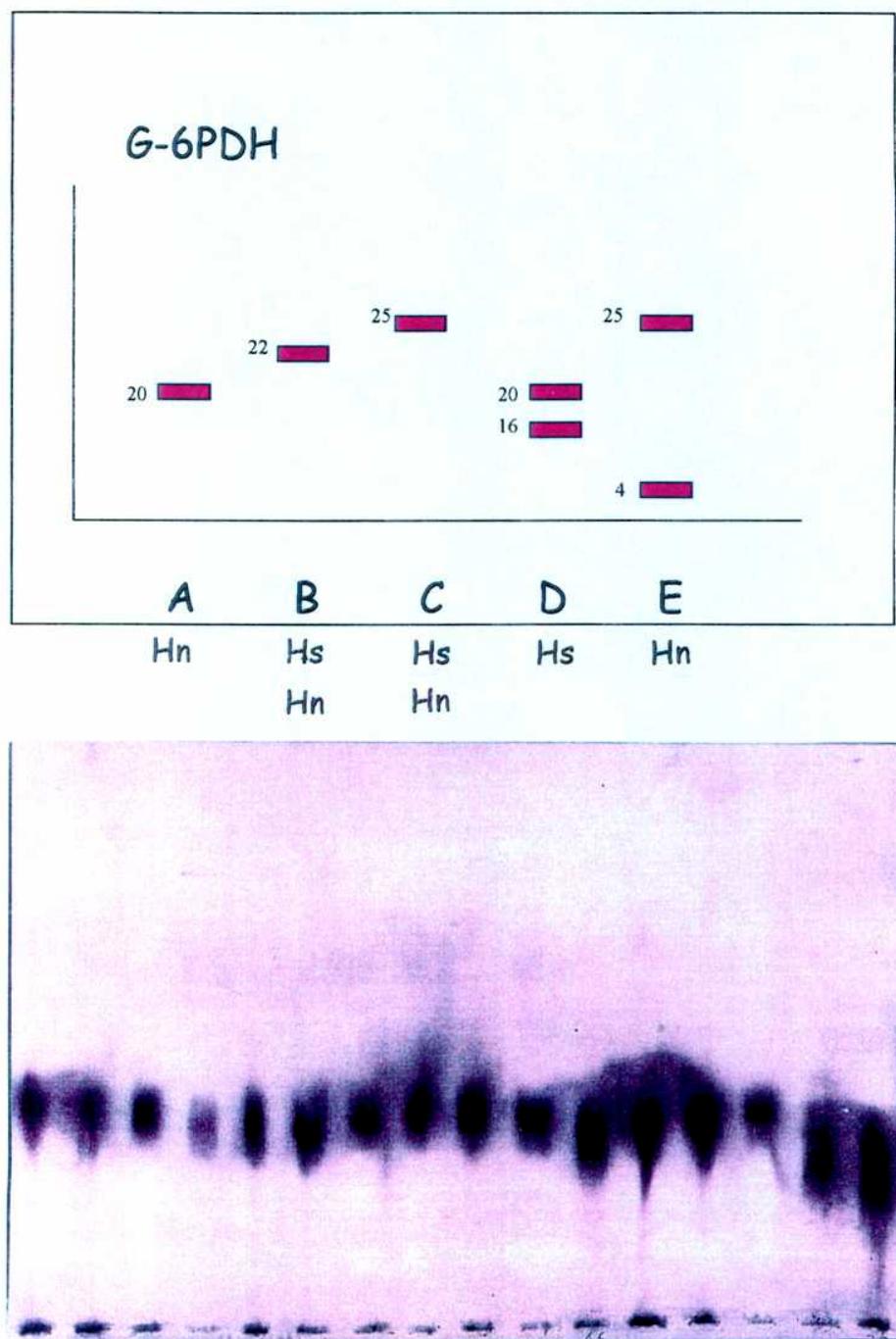


Figura N° 9: esquema y fotografía del gel de *G-6PDH*.

**A-E:** electromorfos de las distintas cepas

**Hn:** hemisferio norte; **Hs:** hemisferio sur

### ISOCITRATO DESHIDROGENASA

Se presentaron 6 patrones isoenzimáticos diferentes (Fig. 10). El patrón A corresponde únicamente a la cepa de *E. typhina* (Hn) y presenta dos bandas que no comparte con ningún otro aislamiento, Rf.64 y Rf.20. El electromorfo B fue asignado tanto a *N. coenophialum* (Hn) como a *B. setifolius* de Santa Cruz, que presentan dos bandas con movilidad electroforética muy cercana de Rf.23 y 25. La primera es compartida por C, D y F, siendo la de Rf.25 característica de este grupo. El C, que se encontró en los demás aislamientos de plantas autóctonas no tóxicas como *F. magellanica*, *P. commutatum*, *P. rigidifolia* y *B. setifolius* de Mendoza, presenta además otra banda más rápida de Rf.26. El electromorfo D fue encontrado en los aislamientos de *E. festucae* (Hn). El F, correspondiente a *E. amarillans*, comparte la Rf.26 con C, teniendo además una banda diagnóstica de Rf.6. El patrón E sólo fue asignado a *Melica stuckertii*, que presenta dos bandas diferentes y no compartidas con ningún otro aislamiento: Rf.30 y 33.

Nuevamente el endofito aislado de *M. stuckertii* se distingue con un patrón muy característico; sin embargo no es posible separar aquellas provenientes del Hn del Hs en todos los casos, ya que una cepa del Hs presenta un patrón semejante a *N. coenophialum*.

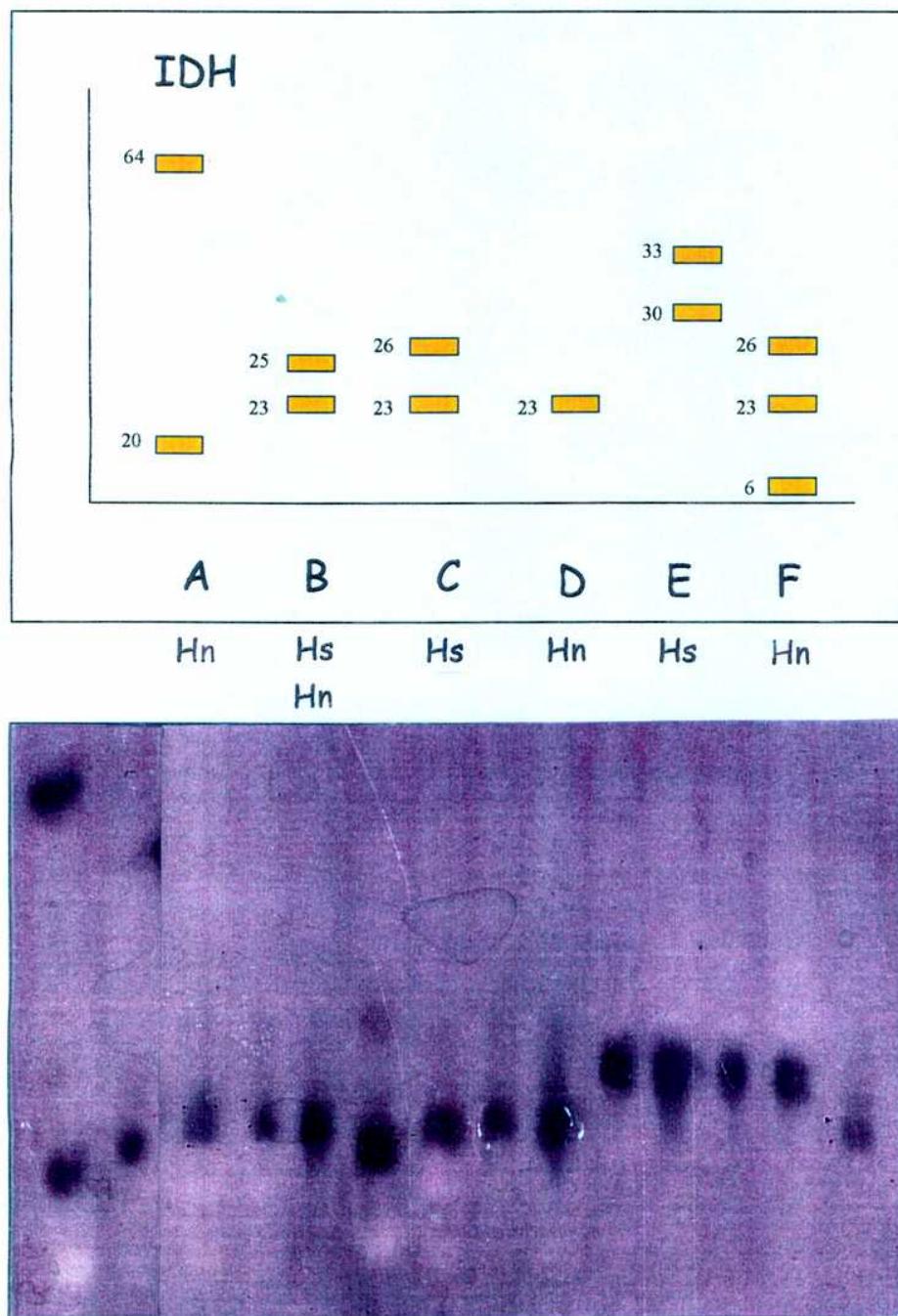


Figura N° 10: esquema y fotografía del gel de IDH.

A-F: electromorfos de las distintas cepas

Hn: hemisferio norte; Hs: hemisferio sur

## FENOTIPOS

Se consideran diferentes fenotipos isoenzimáticos a las combinaciones de los electromorfos de todos los sistemas analizados. Se observaron 12 en un total de 21 cepas autóctonas no tóxicas y 4 del hemisferio norte (Tabla Nº 4).

Los fenotipos 1-4 son únicos para las cepas representantes del hemisferio norte, y los restantes pertenecen a las cepas aisladas de gramíneas autóctonas. Los fenotipos 5 y 6 se distribuyen entre distintos aislamientos de *Poa rigidifolia*, mientras que en *Phleum commutatum* siempre se presentó en fenotipo 7 en todas las cepas estudiadas.

Se observó que las dos poblaciones de *Bromus setifolius* presentan diferentes fenotipos electroforéticos, demostrando que existen diferencias consistentes entre ambas poblaciones. Cabe destacar que el endofito de *Melica stuckertii* difiere notoriamente del resto de endofitos de gramíneas autóctonas.

Los resultados obtenidos demuestran que, en los endofitos autóctonos, existen electromorfos muy similares, en especial para los sistemas SOD, MDH e IDH; aunque en algunas cepas se observan diferencias como en el caso de *Melica stuckertii* y en la población de *Bromus setifolius* de Santa Cruz.

Si observamos a las cepas del hemisferio norte, vemos que difieren considerablemente, en su conjunto, de los endofitos de Argentina, ya que se observan fenotipos diferenciales. Además es importante destacar que existen diferencias entre todos ellos.

Es de mencionar que ningún fenotipo fue compartido por cepas aisladas de diferentes hospedantes.

Tabla N° 4: Electromorfos de cada sistema enzimático y N° de fenotipo correspondiente.

BAFC N°	EST	SOD	LAP	MDH	IDH	G6P	FENOTIPO
E.t 2142	D	B	A	E	A	C	1
N.c 2167	C	C	C	B	B	A	2
E.a 2470	H	E	B	C	F	E	3
E.f 797	G	C	B	E	D	C	4
P.r 641	A	A	B	A	C	B	5
P.r 700	A	A	B	A	C	C	6
P.r 668	A	A	B	A	C	B	5
P.r 673	A	A	B	A	C	C	6
P.r 642	A	A	B	A	C	B	5
P.r 687	A	A	B	A	C	C	6
P.r 684	A	A	B	A	C	C	6
P.c 654	B	A	C	A	C	C	7
P.c 680	B	A	C	A	C	C	7
P.c 682	B	A	C	A	C	C	7
F.m 630	A	A	B	D	C	B	8
F.m 650	A	A	B	D	C	B	8
F.m 659	A	A	B	D	C	B	8
B.s 816	F	A	A	A	B	B	9
B.s 893	F	A	A	A	B	B	9
B.s 896	F	A	B	A	C	B	10
B.s 861	F	A	B	A	C	B	10
M.s 1204	E	D	D	E	E	D	11
M.s 1206	E	D	D	E	E	D	11
M.s 1205	E	D	D	E	E	D	11
M.s 1202	E	D	D	E	E	D	11
M.s 803	A	A	B	A	D	C	12

Abreviaturas: P.r: *Poa rigidifolia*; P.c: *Phleum commutatum*; F.m: *Festuca magellanica*; B.s: *Bromus setifolius*; M.s: *Melica stuckertii*; E.t: *Epichloë typhina*; N.c: *Neotyphodium coenophialum*; E.a: *E. amarillans*; E.f: *E. festucae*.

### 5.3) Análisis estadísticos.

Se construyó una matriz fenética, basándose en un carácter binario (presencia/ausencia) de bandas. Consta de 37 columnas que corresponden a las cepas de endofitos, y 57 filas que corresponden a las bandas de todos los sistemas analizados (Tabla N° 5). El análisis estadístico se realizó utilizando el coeficiente de similitud de Nei & Li. Este índice tiene la forma:

$$S_{xy}: 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

donde  $n_{xy}$  es el número de bandas compartidas, y  $n_x$  y  $n_y$  son los números de bandas en los fenotipos electroforéticos  $x$  e  $y$ , respectivamente. Se probaron otros índices como el de Jaccard, que modificaban los porcentajes de similitud, pero el elegido fue el de Nei & Li.

El fenograma de la Fig. 11 muestra que todas las cepas analizadas se pueden dividir en dos grandes grupos a bajo nivel de similitud; uno correspondiente a los endofitos de gramíneas del hemisferio norte, con excepción de *E.amarillans*, con un porcentaje de similitud menor al 35 %, y otro grupo correspondiente a los aislamientos de gramíneas autóctonas con un porcentaje de similitud que oscila entre 50-90 %. Con excepción de 4 de las 5 cepas estudiadas de *M.stuckertii*, los endofitos asexuales estudiados conforman un grupo con más del 67 % de similitud.

En ese grupo pueden distinguirse dos subgrupos. Uno, con similitudes mayores al 80 %, que contiene a los endofitos de *F.hieronymi* y *P.huecu* (*N.tebladerae*), dos de las plantas tóxicas estudiadas previamente (Cabral et al., 1999), y a los endofitos de plantas no tóxicas de:

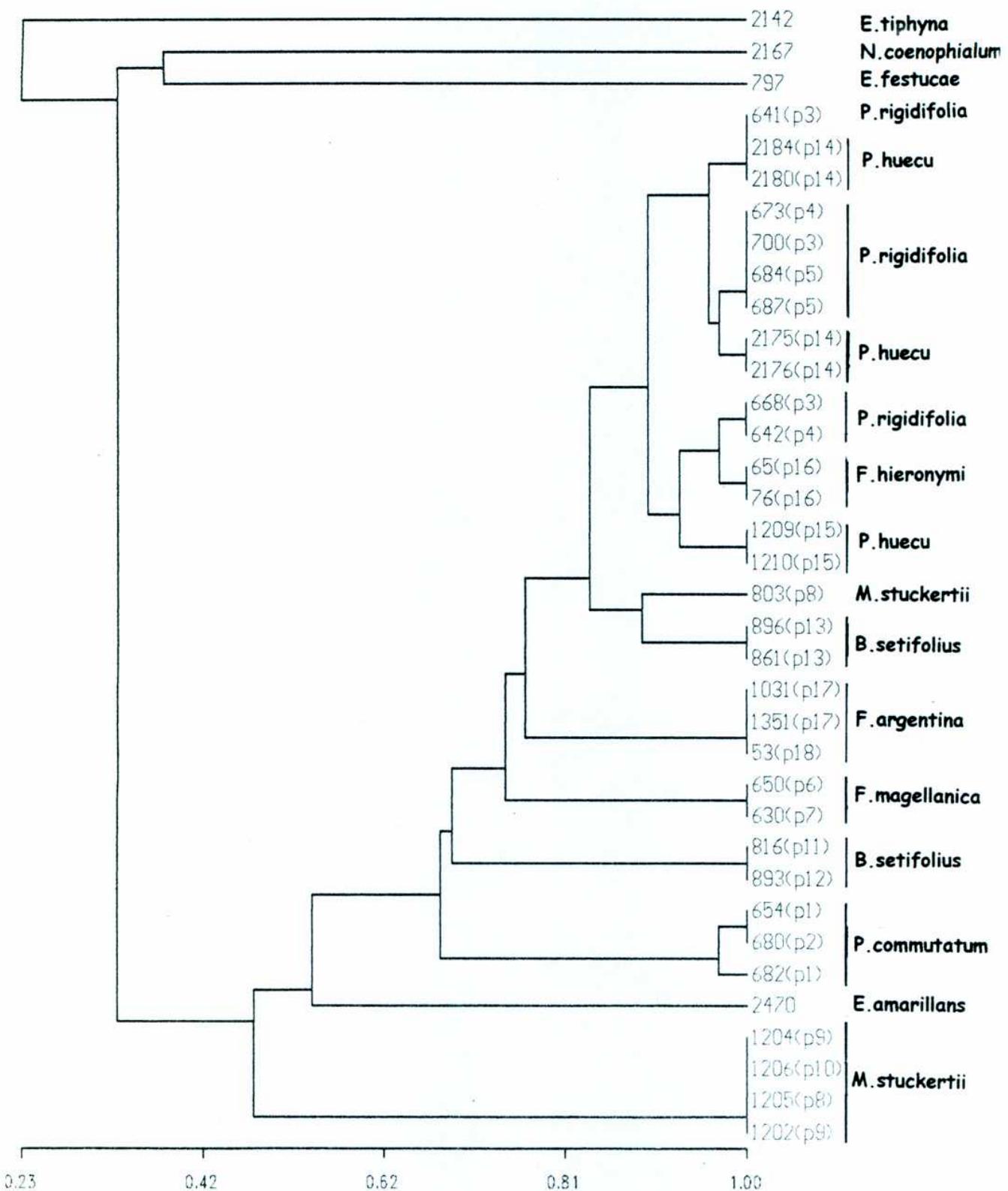
---

*P.rigidifolia*, *B.setifolius* de las poblaciones de Mendoza, y a la cepa 803 de *M.stuckertii*.

El segundo subgrupo, presenta una disposición escalonada de las cepas de endofitos correspondientes a cada hospedante, que se agrupan en núcleos de 2-4 cepas con altas similitudes (97% y 100%). Esta formado en grado decreciente de similitud por los endofitos de *F.argentina*, *F.magellanica*, *B.setifolius* población de Santa Cruz, *Phleum commutatum*, *E.amarillans* y *M.stuckertii*. Las cepas más similares al subgrupo anterior son las que corresponden a *F.argentina*, la tercera planta tóxica incluída por Cabral et al. (1999) como un nuevo taxón.

En el interior de este último subgrupo podemos diferenciar dos conjuntos, uno formado por las cuatro cepas de *M.stuckertii* que forman un núcleo de igual similitud y la cepa de *E.amarillans*, y otro conjunto formado por el resto de los endofitos del subgrupo (Crisci, 1983).

Tabla 3 : Matriz fenotípica de datos. Filas: bandas de los sistemas enzimáticos. Columnas: N° de cepa.



## DISCUSSION

## 6-DISCUSION

En grupos taxonómicamente difíciles, los estudios isoenzimáticos pueden resultar muy útiles en el momento de definir una especie, variedad o raza, en especial en aquellos individuos cuya clasificación se ve imposibilitada sobre la base de diferencias morfológicas.

La electroforesis de isoenzimas ha aportado datos muy importantes para la comprensión de interrogantes tanto sistemáticos como evolutivos. La técnica es relativamente sencilla, de rápida aplicación, y la identificación de nuevas entidades taxonómicas se procesa en poco tiempo.

Los endofitos de pastos han sido ampliamente estudiados en el hemisferio norte (White, 1988; Christensen et al., 1993; Leutchmann, 1994; Tsai et al., 1994; Naffaa et al., 1998). Los datos para Sudamérica son escasos (Morgan-Jones et al., 1990; Bertoni et al., 1993; White et al., 1996; Cabral et al., 1999).

Desde hace 10 años, en el lab. de micología, F.C.E.N, se lleva a cabo el relevamiento, aislamiento y caracterización de endofitos de gramíneas autóctonas tóxicas y no tóxicas de Argentina. En todos los casos se registraron endofitos anamórficos que se incluyen dentro del género-forma *Neotyphodium*, no encontrándose formas teleomórficas hasta el presente.

Los endofitos de las tres gramíneas tóxicas estudiadas previamente (Cabral et al., 1999), no presentan diferencias muy marcadas de los de las gramíneas no tóxicas analizadas en este estudio. Algunos de ellos, como el de *P.rigidifolia*, una cepa de *M.stuckertii* y las cepas de las poblaciones de Mendoza de

*B.setifolius*, se relacionan con similitudes mayores al 83 % con los endofitos de *P.huecu* y *F.hieronymi*, considerados por Cabral et al. (1999), como una única especie *N.tembladera*. Estos datos deberían contrastarse con estudios moleculares, sin embargo, teniendo en cuenta la gran correlación existente entre los estudios moleculares e isoenzimáticos (Cabral et al., 1999), estos endofitos podrían formar parte de la especie *N.tembladera*.

Las únicas que difieren en forma más marcada (48%) del resto de las cepas de gramíneas nativas, son cuatro de las cinco aisladas de *M.stuckertii*. Esto se correlaciona con las diferencias observadas en las características macro y microscópicas de cultivo. Resultados similares obtuvieron Naffaa et al. (1998) con el endofito de *M.ciliata* al que consideraron como una entidad diferente al resto de los endofitos estudiados por datos moleculares e isoenzimáticos, aunque no establecieron un nuevo taxón. La cepa 803 de *M.stuckertii* que se diferencia morfológica e isoenzimáticamente de las otras cuatro, corresponde a la misma población que la cepa 1205. Es decir, las diferencias no son a nivel poblacional sino entre individuos de la misma población de *M.stuckertii*. A pesar de que es necesario analizar un mayor número de muestras, esto indicaría que un mismo hospedante puede estar colonizado por diferentes endofitos.

Los estudios de variación isoenzimática realizados por Leutchmann & Clay en 1990 en endofitos del hemisferio norte, demostraron que existe mayor variabilidad electroforética en pastos naturales que en pasturas comerciales (*N.lolli* de *L.perenne* y *N.coenophialum* de *F.arundinacea*). En este trabajo no parece ocurrir algo similar, es decir, con excepción de *M.stuckertii*, la mayor parte de los endofitos analizados de gramíneas no tóxicas de Argentina no muestran

variabilidad inter ni intrapoblacional. Sólo se observan pequeñas variaciones entre las poblaciones de Mendoza y Santa Cruz de *Bromus setifolius*, que se encuentran muy alejadas.

Nuestros resultados contradicen lo expresado por Leutchmann (1994) y Christensen et al. (1993) de que los endofitos estrictamente asexuales, de transmisión exclusivamente por semilla, estarían confinados a un único hospedante, formando clones de evolución independiente que producirían líneas de endofito-hospedante específicas.

Esto podría ser consecuencia de un tiempo de divergencia menor de los hospedantes y endofitos sudamericanos, ó de que existe o existió la posibilidad de transmisión horizontal que permitiera la colonización de diferentes hospedantes por el mismo endofito. Esta última posibilidad estaría apoyada por las observaciones de White et al. (1996) que demuestran la producción de células conidiógenas y conidios en el filoplano de *A.hiemalis* del hemisferio norte y *P.rigidifolia* de Tierra del Fuego, indicando que, al menos algunos endofitos, no estarían limitados a la transferencia vertical. Cabral (com. pers) también observó la producción de conidios en el interior de las cañas secas de *B.setifolius*.

La posibilidad de que el endofito de una planta pueda ser transmitido por conidios a otra planta del mismo o diferente hospedante, también permitiría que más de un endofito colonizara una misma planta. Esto explicaría los resultados obtenidos en *M.stuckertii*.

En este estudio, en el que se analizaron 21 endofitos aislados de plantas no tóxicas nativas de Argentina, se confirman los resultados obtenidos previamente en el estudio de tres endofitos de plantas

---

tóxicas. Los endofitos de gramíneas nativas conforman entidades diferentes a la mayor parte de las formas sexuales y asexuales del hemisferio norte. Es significativo que la mayor diferencia se establece con *E.typhina* (*N.typhinum*), la forma sexual que ha sido considerada el origen de las formas asexuales del hemisferio norte (Schardl et al., 1991; Schardl, 1996). En cambio, la mayor similitud se establece con *E.amarillans*. Sin embargo la forma asexual de esta especie también es *N.typhinum*. Debería confrontarse con marcadores moleculares si este es el probable antecesor común de las formas asexuales de nuestras gramíneas nativas.

Los resultados del análisis morfológico, isoenzimático y la ausencia de formas sexuales en gramíneas de la Argentina, nos permiten especular sobre el origen de estos hongos. Podríamos suponer que el género *Epichloë* evolucionó en el hemisferio norte y que sólo representantes que no podían formar estroma y que se transmitían de manera vertical, colonizaron Sudamérica. Con esta hipótesis, todos los endofitos de Sudamérica se habrían desarrollado de una o de algunas pocas cepas ancestrales y tienen por lo tanto muy poca variación entre todos ellos.

## CONCLUSIONES

## 7-CONCLUSIONES

1. Los resultados apoyan la hipótesis de que los endofitos que colonizan gramíneas nativas son entidades diferentes a las estudiadas en el hemisferio norte.
2. En la mayor parte de las cepas se observan escasas diferencias entre endofitos de plantas tóxicas y no tóxicas. Los endofitos asexuales de plantas nativas conforman un grupo con similitudes mayores al 67 %. Se desestima la hipótesis de que constituirían entidades diferentes.
3. El endofito de *Poa rigidifolia*, el de una cepa (803) de *M.stuckertii* y el de las cepas de Mendoza de *B.setifolius* podrían ser considerados como parte de la especie *Neotyphodium tembladerae* Cabral et White.
4. Cuatro de las 5 cepas analizadas del endofito de *Melica stuckertii* es el que presenta las mayores diferencias con los aislados a partir de hospedantes tóxicos y no tóxicos, como así también de los aislamientos provenientes del hemisferio norte. Podría ser considerado una entidad taxonómica diferente.
5. Los endofitos de diferentes poblaciones de *Bromus setifolius* presentan características diferenciales.

6. Según los datos analizados, algunos endofitos no estarían limitados a la transferencia vertical. Se postula una posible colonización de tipo horizontal de endofitos al mismo o diferente hospedante.

## BIBLIOGRAFIA

## 8-BIBLIOGRAFIA

- ACHER, A. 1995. Aislamiento e identificación del hongo endofito de *Poa huecu* Par. y búsqueda de sus metabolitos tóxicos. Tesis de Licenciatura. Dir. D. Cabral. Depto. De Cs. Biológicas, F.C.E.N., UBA.
- BACON, C. W. & HILL, N. 1996. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. En: Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, Ecology and Evolution. Redlin, S. C. & Carris, L. M. (eds). APS Press. pp: 155-178.
- BACON, C. W, PORTER, J.K.; ROBBINS, J.D. & LUTRELL, E.S. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 576-581.
- BACON, C. W & WHITE, J. 1994. Biotechnology of endophytic fungi of grasses. Bacon, C. W & White, J. (eds). CRC Press. Boca Ratón, FL.
- BARRET, J. 1989. Molecular variation and evolution. En: Evolutionary biology of the fungi. Rayner, A.D.M.; Brasier, C.M & Moore, D. (eds). Cambridge Univ. Press, Cambridge, England. Pp: 83-95.
- BERTONI, M. D.; CABRAL, D; ROMERO, N. & DUBCOVSKY, J. 1993. Endofitos fúngicos en especies sudamericanas de *Festuca* (Poaceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* **29**: 25-34.
- BONDE, M; MICALES, J & PETERSON, G. 1993. The use of isozyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. *Plant disease* **77** (10): 961-968.
- CABRAL, D & BERTONI, M. D. 1991. Una nueva especie de *Acremonium* endofito de *Festuca argentina*. Resúmenes de las XXIII Jornadas Argentinas de Botánica.

- CABRAL, D & LUGO, M. 1993. Los endofitos de *Festuca hieronymi* y *Poa huecu*, dos plantas tóxicas para el ganado. Resúmenes del VI Congreso Argentino de Micología.
- CABRAL, D & LUGO, M. 1994. Los endofitos fúngicos en gramíneas de Argentina. Resúmenes del VI Congreso Latinoamericano de Botánica.
- CABRAL, D; CAFARO, M; SAIDMAN, B; LUGO, M; REDDY, P & WHITE, J. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Micología* 91 (2): 315-325.
- CAFARO, M. 1997. Caracterización isoenzimática de endofitos fúngicos de gramíneas autóctonas de la Argentina. Tesis de Licenciatura. Dir: D. Cabral. Depto. de Ciencias Biológicas. F.C.E.N. UBA.
- CARROLL, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69 (1): 2-9.
- CHEPLICK, G. & CLAY, K. 1988. Acquired chemical defenses in grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos* 52: 309-318.
- CHRISTENSEN, M. J & LATCH, G. C. 1985. Artificial infections of grasses with endophytes. *Ann. Appl. Biol.* 107: 17-24.
- CHRISTENSEN, M. J., LEUCHTMANN, A., ROWAN, D. D. & TAPPER, B. A. 1993. Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial rye-grass (*Lolium perenne*). *Mycol. Res.* 97: 1083-1092.
- CLARK, E. M., WHITE, J. F. & PATERSON, R. M. 1983. Improved histochemical techniques for the detection of *A. coenophialum* in tall fescue and methods of in vitro culture of the fungus. *Jornal of Microbiology. Methods* 1, pp: 149-155.
- CLAY, K. 1986. Grass endophytes. En: *Microbiology of the phillosphere*. J. Fokkema and J. Van den Heuvel (eds). Cambridge Univ. Press, Cambridge, England, pp: 188-204.
- CLAY, K. 1988. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. En: *Coevolution of fungi with plants and animals*. Academic Press Limited, pp: 79-105.

- CLAY, K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **21**: 275-297.
- CLAY, K. 1991. Fungal endophytes, grasses and herbivores. En: *Microbial mediation of plant-herbivore interactions*. Barbosa, P.; Krischik, V. & Jones, C. (eds). John Wiley & Sons, Inc. Pp: 199-226.
- CRISCI, J. V. & LOPEZ ARMENGOL, M. F. 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Secretaría Gral. De la Organización de los Estados Americanos. Washington, D. C. pp: 39-49.
- FARRIS, J. S. 1979. The information content of the phylogenetic system. *Systematic zoology*. **28**: 483-519.
- FLETCHER, L. R. & HARVEY, I. C. 1981. An association of a *Lollium* endophyte with ryegrass staggers. *N. Z. Vet. J.* **29**: 185-186.
- GANLEY, A. & SCOTT, B. 1998. Extraordinary ribosomal spacer length heterogeneity in a *Neotyphodium* endophyte hybrid: implications for concerted evolution. *Genetics* **150**: 1625-1637.
- GLENN, A.; BACON, C.; PRICE, R. & HANLIN, R. T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomy implications. *Mycologia* **88** (3): 369-383.
- JOHNSON, M. C.; BUSH, L. P. & SIEGEL, M. R. 1986. Infection of tall fescue with *Acremonium coenophialum* by means of callus culture. *Plant Dis.* **70**: 380-382.
- KOGA, H.; CHRISTENSEN, M. J. & BENNETT, R. J. 1993. Cellular interactions of some grass *Acremonium* endophyte associations. *Micol. Res.* **97**: 1237-1244.
- KOHLMEYER, J & KOHLMEYER, E. 1974. Distribution of *Epichloë typhina* (Ascomycetes) and its parasitic fly. *Mycologia* **66**: 77-86.
- KOVACK, W. L. 1993. MVSP-A multivariate statistical package for IBM-PCs, version 2.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK.
- LATCH, G. C & CHRISTENSEN, M. J. 1985. Artificial infections of grasses with endophytes. *Ann. Appl. Biol.* **107**: 17-24.

- LEUCHTMANN, A. 1994. Isozyme relationships of *Acremonium* endophytes from twelve *Festuca* species. *Mycol. Res.* **98** (1): 25-33.
- LEUCHTMANN, A & CLAY, K. 1990. Isozyme variation in *Acremonium/Epichloë* fungal endophyte complex. *Phytopathology* **80**: 1133-1139.
- LINDSTROM, J. T. & BELANGER, F. C. 1994. Purification and characterization of an endophytic fungal proteinase that is abundantly expressed in the infected host grass. *Plant Physiol.* **106**: 7-16.
- LUGO, M; ANTON, A & CABRAL, D. 1998. Presencia y distribución de micofilas en gramíneas de Argentina. *Anales Jard. Bot. Madrid* **56** (1): 15-22.
- MARKERT, C. L. & MÜLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45**: 753-763.
- MICALES, J. A.; BONDE, M. R. & PETERSON, G. L. 1992. Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics. En: *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 4, *Fungal Biotechnology*. Arora, D. K., Elander, R. P. & Mukerji, K. (eds). Dekker, New York. pp: 57-79.
- MORGAN-JONES, G & GAMS, W. 1982. Notes on hyphomycetes. XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of the two sections of *Acremonium*. *Mycotaxon* **15**: 311-318.
- MORGAN-JONES, G; WHITE, J. F. & PIONTELLI, E. L. 1990. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. *Acremonium chilense*, an undescribed endophyte occurring in *Dactylis glomerata* in Chile. *Mycotaxon* **39**: 441-454.
- NAFFAA, W; RAVEL, C & GUILLAUMIN, J. 1998. A new group of European grasses. *Ann. appl. Biol.* **132**: 211-226.
- NEI, M. & LI, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (10): 5269-5273.
- NEILL, J. C. 1940. The endophyte of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *N. Z. J. Sci. Technol. Sec. A* **21**: 280-291.

- NEILL, J. C. 1941. The endophytes of *Lolium* and *Festuca*. N. Z. J. Sci. Technol. Sec. A **23**: 185-193.
- PETRINI, O. 1996. Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. En: Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, Ecology and Evolution. Redlin, S. C. & Carris, L. M. (eds). APS Press. pp: 87-100.
- POMILIO, A. B.; ROFI, R. D.; GAMBINO, M. P.; MAZZINI, C. A. & DEBENEDETTI DE LANGENHEIM, R. T. 1989. The lethal principle of *Poa huecu* (coirón blanco): a plant indigenous to Argentina. *Toxicon* **27**: 1251.
- RIDGWAY, G. J.; SHEIRBURNE, S. W. & LEWIS, R. D. 1970. Polymorphism in the esterases of Atlantic herring. *Trans of American Fisheries Society* **99**: 147-151.
- RIVAS, H & ZANOLLI, C. 1909. La tembladera. Enfermedad propia de los animales herbívoros de las regiones andinas. *Rev. Fac. Agr. Vet. La Plata* **5**: 5-35.
- SAMPSON, K. 1933. The systemic infection of grasses by *Epichloë typhina* (Pers). *Tul. Trans. Br. Mycol. Soc.* **18**: 30-47.
- SCHARDL, C. L. 1996. *Epichloë* species: Fungal symbionts of grasses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 109-130.
- & CLAY, K. 1991. Evolution of mutualistic endophytes from plant pathogens. En: *The Mycota V Part B. Plant Relationships*. Carroll/Tudzynsky (eds). Springer-Verlag Berlin. pp: 221-238.
- ; LIU, J; WHITE, J; FINKEL, R & SIEGEL, M. 1991. Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. *Pl. Syst. Evol.* **178**: 27-41.
- & LEUTCHMANN, A. 1999. Three new species of *Epichloë* symbiotic with North American grasses. *Micologia*, **91** (1), pp:95-107.
- SELANDER, R. K.; SMITH, M. H.; YANG, S. Y.; JOHNSON, W. E. & GENTRY, J. B. 1971. IV. Biochemical polymorphism and systematics in the genus

- Peromyscus. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). Univ. Texas Publ. **103**: 49-90.
- SHAW, C. R. & PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes- a compilation of recipies. Biochem. Genet. **4**: 297-320.
- SIEGEL, M. R; JOHNSON, M. C.; VARNEY, D. R.; NESMITH, W. C.; BUCKNER, R. C.; ET AL. 1984. A fungal endophyte in tall fescue: incidence and dissemination. Phytopathology **74**: 932-937.
- SNEATH, P. H. A & SOKAL, R. R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman: San Francisco, EE.UU.
- SOLTIS, D. E.; HAUFLER, C. H.; DARROW, D. C. & GASTONY, G. J. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of griding buffers, gel and electrode buffers and staining schedules. Amer. Fern J. **73**: 9-27.
- SURVE-IYER, S; ADAMS, G; IEZZONI, A & JONES, A. 1995. Isozyme detection and variation in *Leucostoma* species from *Prunus* and *Malus*. Micología, **87** (4): 471-482.
- TSAI, H; LIU, J; STABEN, C; CHRISTENSEN, M; LATCH, G; SIEGEL, M & SCHARDL, C. 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue by hibridization with *Epichloë* species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 2542-2546.
- URBANELLI, S; SALLICANDRO, P; DE VITO, E; BULLINI, L & BIOCCA, E. 1998. Biochemical systematics of some species in the genus *Tuber*. Mycología **90** (3): 537-546.
- WENDEL, J. F. & WEEDEN, N. F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. En: Isozymes in plant biology. Soltis, D. E. & Soltis, T. S. (eds). Chapman & Hall, London, UK. pp: 5-45.
- WILSON, D. Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. 1993. OIKOS **68** (2): 379-384.
- WHITE, J. F., Jr & MORGAN-JONES, G. 1987. Endophyte-host associations in forage grasses. IX. Concerning *Acremonium typhinum*, the anamorph of *Epichloë typhina*. Mycotaxon **29**: 489-500.

- 
- 1988. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. *Mycologia* **80** (4): 442-446.
- 1994. Taxonomic relationships among the members of the Balansieae (Clavicipitales). En: *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. BACON, C. W & WHITE, J. F., Jr. (eds). CRC Press. Boca Ratón, FL. pp. 3-20.
- ; SHARP, L. T.; MARTIN, T. I. & GLENN, A. E. 1995. Endophyte-host associations in forage grasses. XXI. Studies on the structure and development of *Balansia obtecta*. *Mycologia* **87** (2): 172-181.
- ; MARTIN, T. I. & CABRAL, D. 1996. Endophyte-host associations in forage grasses. XXIII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes in the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia* **88** (2): 174-178.



Tesista: Agustina Gentile



Director: Dr. Daniel Cabral



Codirectora: Dra. Beatriz Saidman



