

## Supervivencia de las semillas de *Lolium multiflorum* Lam. y del endófito *Neotyphodium occultans* Moon al pasaje por el tracto digestivo en vacunos. Comunicación

*Survival of Lolium multiflorum Lam. seed infected with Neotyphodium occultans Moon after the passage through bovine digestive tract. Communication*

Vignolio<sup>1</sup>, O.R. y Colabelli<sup>2</sup>, M.N.

Unidad Integrada: Facultad de Ciencias Agrarias-UNMdP  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Balcarce

---

### Resumen

Las semillas infectadas con hongos endófitos y consumidas por el ganado, al ser depositadas con las heces, constituyen una fuente de contaminación de pastizales y pasturas. Se realizaron una serie de estudios con la finalidad de conocer si: (a) *Neotyphodium occultans*, endófito de semillas de *Lolium multiflorum*, sobrevive al pasaje por el tracto digestivo de bovinos, (b) las heces de los vacunos pueden ser una vía de propagación de las semillas y del hongo y (c) las plantas de *L. multiflorum* que se establecen en las heces de los vacunos pueden alcanzar el estado reproductivo. Estudio 1. Semillas de *Lolium multiflorum* infectadas con el endófito, 82% de presencia del hongo viable, fueron mezcladas con forraje y ofrecidas a un vacuno para su consumo. Las heces fueron colectadas y acondicionadas en bandejas para facilitar la germinación de las semillas y emergencia de las plántulas de *L. multiflorum*. La cantidad de semillas fue estimada a partir del número de plántulas emergidas. El animal excretó las semillas entre las 24 y 72 horas después de haber sido ingeridas. Se estimó que el animal excretó el 6,5% de las semillas ingeridas. Las plántulas que emergieron en las heces fueron analizadas y el 77,2% estaban infectadas con el endófito y en el 22,8% no se encontró el endófito. Estudio 2. Se colectaron en un pastizal heces secas de vacunos sin plantas creciendo en ellas. Las heces permanecieron en el campo y sobre ellas se registró la emergencia de plántulas de *L. multiflorum*, presuntamente de las semillas consumidas por el animal. Las plantas de *L. multiflorum* que se establecieron en las heces alcanzaron su estado reproductivo y sus semillas presentaron un 32% de infección con el endófito. Los resultados destacan que el hongo *Neotyphodium occultans* presente en las semillas de *Lolium multiflorum* sobrevivió al pasaje por el tracto digestivo del vacuno. Las semillas y el hongo pueden ser propagados por medio de las heces de los vacunos. Las plántulas de *Lolium multiflorum* establecidas sobre las heces alcanzaron la etapa reproductiva y un porcentaje de ellas fueron endófito positivas.

**Palabras clave:** *Lolium multiflorum*, semillas, vacunos, heces, *Neotyphodium occultans*.

Recibido: octubre de 2006

Aceptado: noviembre de 2007

1. Ecología. Grupo Agroecología, Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP). C.C. 276 (7620) Balcarce, Buenos Aires. ovignoli@mdp.edu.ar; ovignolio@balcarce.inta.gov.ar; ovignoli@cybertech.com.ar

2. Biología. Grupo Tecnología de Semillas, Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP). mncolabelli@balcarce.inta.gov.ar

## Summary

Endophyte-infected seeds consumed by cows and deposited in dung can be a source of contamination of pastures and grasslands. We performed studies to know if: (a) *Neotyphodium occultans*, endophyte of *Lolium multiflorum* seeds survives passage through the digestive tract of a cow, (b) *L. multiflorum* seeds and *Neotyphodium occultans* can be spread through cow dung and (c) *L. multiflorum* seedlings that emerge on cow dung can reach the reproductive stage. Study 1. Seeds with 82% presence of endophyte were mixed with grass and offered to a cow. The cow dung was daily collected and spread out on trays under greenhouse conditions. Seed number was estimated through the seedling emergence on dung. All seeds were excreted between 24 and 72 hours after being placed into the cow mouth. It was estimated that the cow excreted 6.5% of the ingested seeds. The seedlings emerged on dung and 77.2% were endophyte-infected and in the 22.8% the endophyte was not found. Study 2. Dung pats -without plants and seedlings growing in them- were gathered in a grassland. The dung pats were put on short grass with the same position as in the grassland. *Lolium multiflorum* seedlings were recorded on the dung pats and these reached reproductive stage and 32% of analyzed seed was endophyte-infected. *Neotyphodium occultans* survived passage through the digestive tract of the cow. *Lolium multiflorum* seeds infected with *Neotyphodium occultans* can be spread with cattle dung. *Lolium multiflorum* plants that grew on dung pats produced seeds. Some of these seeds were endophyte-infected.

**Key words:** *Lolium multiflorum*, seeds, cattle, dung, *Neotyphodium occultans*.

---

## Introducción

Algunas gramíneas C<sub>3</sub> de crecimiento invernal establecen una asociación mutualista con los hongos endófitos del género *Neotyphodium* spp. (White 1987; Clay and Scharld 2002; De Battista 2005; Gundel et al., 2006a). Se ha documentado que las plantas infectadas con *Neotyphodium* spp. presentaron mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico que las plantas no infectadas (Malinowski y Belesky 2000; De Battista 2005; Gundel et al., 2006a; b). *Lolium multiflorum* Lam. es una gramínea de valor forrajero, ampliamente distribuida en Argentina, Chile, Uruguay y sur de Brasil, que puede ser infectada por el endófito *Neotyphodium occultans* (Moon et al., 2000; De Battista 2005). Altos niveles de infección con *N. occultans* fueron registrados en plantas de *L. multiflorum* recolectadas en pastizales de la Pampa Deprimida (Colabelli et al., 2004; De Battista, 2005). Sin embargo, síntomas de toxicidad no han sido informados para el ganado vacuno que consume esta gramínea (De Battista, 2005).

Los vacunos, al consumir semillas infectadas y al diseminarlas con las heces, pueden ser una fuente de contaminación de pasturas libres de endófitos. Hume (1999) y Burggraaf y Thom (2000) registraron que *Neotyphodium lolii*, presente en semillas de *Lolium perenne*, sobrevivió al pasaje por el tracto digestivo de vacunos. Estas semillas depositadas en la pastura junto con las heces produjeron plantas infectadas con el hongo. En pastizales de Ayacucho (Buenos Aires, Argentina) se registró que las plantas de *Lolium multiflorum* que crecían en la comunidad vegetal presentaban un 73% de infección con *N. occultans*; en cambio en las plantas que crecían sobre las heces de los vacunos, la infección fue del 48% (Tellechea et al., 2005). Las semillas de *L. multiflorum* sobreviven al pasaje por el tracto digestivo de los vacunos (Vignolio y Fernández, 2004), en cambio no se tiene información sobre los efectos en el endófito.

Se realizaron tres estudios con el objetivo de conocer si: (a) El endófito *N. occultans* sobrevive al pasaje por el tracto digestivo de

bovinos, (b) Las heces de los vacunos pueden ser una vía de propagación de la gramínea y del hongo y (c) Las plantas de *L. multiflorum* que se establecen en las heces de los vacunos pueden alcanzar el estado reproductivo.

### Materiales y Métodos

Los estudios se realizaron en la Unidad Integrada, EEA INTA Balcarce -Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP), Buenos Aires, Argentina.

*Estudio 1.* Supervivencia del hongo *Neotyphodium occultans* y de las semillas de *Lolium multiflorum* al pasaje por el tracto digestivo de un vacuno.

Se utilizaron semillas de *Lolium multiflorum* cosechadas en diciembre de 2004. El 28 de febrero de 2005, 30 gramos de semillas de *L. multiflorum* con un 82% de presencia de hongo viable, fueron mezcladas con forraje y ofrecidas a un vacuno de 1 año de edad, sano y de aproximadamente 300 kg de peso vivo. Se tomaron tres muestras de 100 semillas cada una y mediante pruebas de germinación en cajas de Petri (8 hs de luz y 20°C) y pruebas de viabilidad (ISTA, 1999) se estimó que la cantidad de semillas vivas de *Lolium multiflorum* ingeridas por el animal fue en promedio ( $\pm$  E.E.) de  $11.310 \pm 875$  semillas. Dado que no se registró pérdida de semillas, se asumió que el animal las ingirió en su totalidad. El animal permaneció confinado en un potrero de 60 x 40 m y alimentado *ad libitum* con gramíneas, principalmente *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata* y *Paspalum dilatatum*. En el potrero no se registraron plantas de *Lolium multiflorum* en estado reproductivo. Las heces fueron recolectadas diariamente con una pala, todas las mañanas desde el 28 de febrero de 2005 (antes de comenzar el estudio) hasta el 7 de marzo de 2005. En cada fecha de recolección, las heces fueron mezcladas y pesadas en su totalidad. Luego se tomaron dos muestras de 800 ml por fecha, se pesaron y se dejaron secar dentro de bandejas a temperatura ambiente y a la sombra. Durante el período que

duró el estudio se recolectaron 67,9 kg de heces y de éstas, 6,8 kg fueron utilizadas para el estudio de emergencia de las plántulas de *L. multiflorum*. El contenido de materia seca de las heces fue del  $11,6 \pm 0,3\%$ . El resto de las heces frescas (61,1 kg) fueron depositadas sobre el pasto corto del campo experimental de la Unidad Integrada. Sobre estas heces, se realizaron observaciones para evaluar el establecimiento de plántulas y el pasaje al estado reproductivo de las plantas de *L. multiflorum*.

El 12 de abril de 2005, las muestras secas de heces se fragmentaron y se colocaron en bandejas con tapas transparentes (12 x 20 x 8 cm de profundidad) sobre una cama húmeda de arena de río. Las bandejas permanecieron en condiciones de invernadero y fueron rotadas cada semana. El riego se realizó con agua corriente. Todas las plántulas de *L. multiflorum* que emergieron fueron transplantadas y cultivadas en macetas llenas con tierra y arena. Cuando no se registró más emergencia de plántulas, las heces se dejaron secar a temperatura ambiente y luego fueron fragmentadas a mano y rehidratadas para generar un nuevo pulso de emergencia. El estudio terminó en agosto de 2005 y se realizaron dos pulsos de emergencia. Las plantas cultivadas con no más de tres o cuatro hojas fueron analizadas por el método de Belanger (1996), adaptado por Colabelli (com. pers.) para determinar la presencia del endófito.

*Estudio 2.* Supervivencia del hongo *Neotyphodium occultans* y de las semillas de *Lolium multiflorum* a las pruebas de digestibilidad *in vitro*.

Las pruebas de digestibilidad *in vitro* (Theodorou et al., 1998) correlacionan con la digestibilidad *in vivo* (Menke et al., 1979). Se analizaron los efectos de la digestibilidad *in vitro* sobre la viabilidad de las semillas de *L. multiflorum* y de la supervivencia de *N. occultans*. La prueba se realizó sobre dos muestras de  $377 \pm 29$  semillas viables con un 82% de presencia de hongo viable (Estudio 1). Finalizada la prueba de digestibilidad, las semillas fueron lavadas con agua corriente sobre un tamiz. De cada muestra se prepararon 3 sub-

muestras (6 en total) de aproximadamente 125 semillas cada una. Las semillas de cada submuestra fueron puestas a germinar sobre bandejas utilizando como sustrato papel de filtro húmedo (8 hs de luz y 20°C). Las semillas germinadas fueron transplantadas en macetas y se cultivaron hasta el momento de ser analizadas. Del total de las plantas cultivadas, se seleccionaron 30 al azar y fueron analizadas para detectar la presencia del endófito como en el estudio 1.

**Estudio 3.** Establecimiento y reproducción de plantas de *Lolium multiflorum* emergidas en heces de vacunos.

En octubre de 2004, se recolectaron de un pastizal de Ayacucho 12 muestras de heces secas sin plántulas sobre su superficie. Las heces se trasladaron hasta la Unidad Integrada y se dejaron sin disturbar sobre el pasto (*Lotus glaber*, *Cyndon dactylon*, *Bromus* spp.) cortado a 5 cm de altura. En 6 de las 12 heces crecieron plántulas de *L. multiflorum*, asumiéndose que estas plántulas se establecieron a partir de las semillas ingeridas por el vacuno. Las plantas florecieron y en enero de 2005 se cosecharon las semillas maduras y se guardaron en heladera (4°C). El 3 de marzo de 2005 se seleccionaron al azar 50 semillas y fueron analizadas para detectar la presencia del endófito (Saha et al., 1988).

### Resultados

**Estudio 1.** El animal excretó las semillas de *L. multiflorum* entre las 24 y 72 horas después de haber sido ingeridas. Se recuperaron 74 semillas (6,5% de las semillas ingeridas). A partir de las plántulas obtenidas de estas semillas se cultivaron 61 plantas. De estas plantas el 77,2% presentaban el endófito y en el 22,8% restante no se encontró el endófito. En las heces dejadas en el campo emergieron plántulas de *L. multiflorum*, cuyas plantas alcanzaron el estado reproductivo.

**Estudio 2.** En la prueba de digestibilidad *in vitro* sobrevivió aproximadamente el 50% de las semillas (176 ± 8) y todas fueron endófito negativas.

**Estudio 3.** Las plantas de *L. multiflorum* establecidas sobre las heces de los vacunos alcanzaron el estado reproductivo y las semillas fueron 32% endófito positivas.

### Discusión

Los resultados revelaron que el endófito *N. occultans* sobrevivió al pasaje por el tracto digestivo del vacuno. Resultados comparables fueron informados para semillas de *Lolium perenne* infectadas con *Neotyphodium lolii* (Burggraaf y Thom, 2000). En *Festuca arundinacea* la viabilidad de las semillas infectadas con *Neotyphodium coenophialum* fue menos afectada que el hongo al pasaje por el tracto digestivo de los novillos y ovejas (Hume, 1999). La cantidad de semillas infectadas de *L. multiflorum* excretadas por los vacunos fue inferior a las consumidas (Hume 1999). En nuestro estudio la viabilidad del hongo en las semillas que sobrevivieron al pasaje por el tracto digestivo del vacuno pasó del 82% al 77%. Además, los resultados de los estudios 1 y 3 pusieron en evidencia que las heces de los vacunos son un sustrato donde las plántulas de *L. multiflorum* pueden crecer y completar su ciclo de vida.

La técnica de digestibilidad *in vitro* afectó diferencialmente a las semillas y al endófito. Sobrevivieron el 50% de las semillas pero el endófito no fue detectado. Se desconoce si fueron los componentes de dicha técnica y/o la temperatura de incubación (38°C durante 72 hs) los factores que afectaron la supervivencia del hongo.

Aunque los resultados del estudio 1 fueron obtenidos con un solo animal, éstos destacan que el hongo *Neotyphodium occultans* presente en las semillas de *Lolium multiflorum* puede

sobrevivir al pasaje por el tracto digestivo del vacuno. Las semillas infectadas con el hongo pueden ser propagadas por medio de las heces de los vacunos. Las plántulas infectadas de *Lolium multiflorum* establecidas sobre las heces completaron su ciclo de vida y las semillas producidas también fueron endófito positivas.

### Agradecimientos

A Maria Rosa Desirello y a los revisores de la presente revista por sus aportes. Al Sr. Aldo Dosantos por facilitarnos el animal para el presente estudio. El animal en ningún momento fue sometido a daño físico o condiciones diferentes a las normales. A los técnicos del Laboratorio de Digestibilidad del INTA Balcarce. El trabajo fue financiado por la UNMdP, Proyecto: Calidad de Semillas en Pastizales y Cultivos de la Región Pampeana.

### Bibliografía

- Belanger, F.C. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal viability. *Crop Science* 36: 460-462.
- Burggraaf, V.T. and Thom, E.R. 2000. Contamination and persistence of endophyte-free ryegrass pastures established by spray-drilling, and intensively grazed by dairy cows in the Waikato region of New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 2000, Vol. 43: 163-173.
- Clay, K. and Schardl, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160: 99 - 127.
- Colabelli, M.N., Torres, M.S., Clausen, A.M. y Peretti, A. 2004. Incidencia de hongos endófitos en colecciones de gramíneas forrajeras nativas y naturalizadas en la República Argentina. *Informativo ABRATES* 14: 80-87.
- De Battista, J. 2005. *Neotyphodium* research and application in South America. *In: Roberts C, West C, Spiers D, eds. Neotyphodium in Cool Season Grasses.* Blackwell Publishing. Ames, IOWA, USA. pp. 63-69.
- Gundel, P.E., Maseda, P.H., Vila-Aiub, M.M., Ghera, C.M. and Benech-Arnold, R. 2006a. Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany* 97: 571-577.
- Gundel, P.E., Maseda, P.H., Ghera, C.M. and Benech-Arnold, R. 2006b. Effects of the *Neotyphodium* endophyte fungus on dormancy and germination rate of *Lolium multiflorum* seeds. *Austral Ecology* 31: 767-775.
- Hume, D.E. 1999. Establishing and maintaining a toxin-free pasture: a review. *In: Woodfield DR, Matthew C. eds. Ryegrass endophyte: an essential New Zealand symbiosis. Proceedings of a New Zealand Grassland Association Symposium held ant Napier, New Zealand 8 October, 1999.* pp. 123-132.
- ISTA (International Seed Testing Association). 1999. *International Rules for Seed Testing.* Zurich. Switzerland. 335 p.
- Malinowski, D.P. and Belesky, D.P. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40: 923-940.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steinglass, H., Fritz, D. and Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal Agricultural Science* 93: 217-222.
- Moon, C.D., Scott, B., Schardl, C.L. and Christensen, M.J. 2000. The evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia* 92: 1103-1118.
- Saha, C.D., Jackson, M.A. and Johnson-Cicalese, J.M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. *Phytopathology* 78: 237-239.
- Tellechea, L., Galeano, E., Colabelli, M.N., Fernández, O., Vignolio, O. y Monterubbianesi, G. 2005. Semillas infectadas con el hongo endófito *Neotyphodium* Glenn, C.W. Bacon & Hanlin y sus vías de dispersión. XXX Jornadas Argentinas de Botánica, 6-10/11/2005. Rosario (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 40. p. 169.
- Theodorou, M.K., Lowman, R.S., Davies, Z.S., Cuddeford, D. and Owen, E. 1998. *Principles*

- of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. *In: In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. British Society of Animal Science Occasional Publication No. 22, Reading; pp. 55-63.
- Vignolio, O.R y Fernández, O.N. 2004. Propagación de semillas de especies de diferente valor forrajero por vacunos en pastizales de La Pampa Deprimida. II Reunión Binacional de Ecología. XI Reunión de la Sociedad de Ecología de Chile. XXI Reunión Argentina de Ecología. Mendoza, 31 de octubre al 5 de noviembre 2004. p.417.
- White, J.F., Jr. 1987. The widespread distribution of endophytes in Poaceae. *Plant Disease* 71: 340-342.