

Capítulo 3

BALLICAS CON ENDÓFITOS, SUS CARACTERÍSTICAS, MÉTODOS DE EVALUACIÓN Y COMPORTAMIENTO EN LA ZONA SUR DE CHILE.

Alfredo Torres B., Francisco Lanuza A., Ernesto Cisternas A.,
Stella Moyano A. y Marcelo Villagra B.

3.1 Introducción

Endófito, se denomina a organismos que viven dentro de las plantas, en este caso específico, lo aplicaremos a hongos del género *Neotyphodium*, los cuales establecen una relación simbiótica con las gramíneas forrajeras. Se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, incluso en comunidades naturalizadas de ballicas, festucas y muchas otras especies forrajeras. En Europa, estudios realizados en praderas antiguas de 8 países, señalan que sobre el 80% contienen *N. lolii*, no así los cultivares comerciales, donde sólo 4 de los 16 evaluados fueron positivos al hongo y estos no superaron el 20% de infestación (Galdames, 1995). Se han descrito varias especies de endófitos, presentes en 209 hospederos, principalmente gramíneas (Bacon y De Battista, 1991). Los del género *Neotyphodium*, están infectando a un número aproximado de 25 especies de plantas.

Los primeros antecedentes de la existencia del hongo endófito en ballica y festuca, son de los años 1935 y 1941, respectivamente ; reportes de toxicidad en 1959 y 1950 y recién se asociaron ambos factores en los años 1981 y 1977, respectivamente. Por lo tanto, las primeras investigaciones que estudian la interacción hongo-planta y sus efectos sobre los animales y las plantas, se iniciaron en la década de los 80'.

3.1.1 Relación hongo-planta

Simbiosis

El hongo no produce síntomas a la planta, mantiene una relación simbiótica con ella, en donde encuentra protección (espacios intercelulares de su tejido), nutrientes, la posibilidad de reproducirse y diseminarse, o sea, allí puede completar todo su ciclo de vida (Galdames, 1990).

La planta por su parte, recibe mayor crecimiento, persistencia, mejor tolerancia a condiciones adversas del medio ambiente (déficit hídrico) y cierta resistencia al ataque de plagas, en donde destaca el Gorgojo Argentino de la ballica (*L. bonariensis*).

Lo anterior, se demuestra en los trabajos realizados por Latch y Christensen (1982), Latch *et al.* (1984), Latch *et al.* (1985) y Latch *et al.* (1987) en ballica y festuca. En ballica con y sin endófito, se reportan diferencias favorables en producción de materia seca, área foliar, número de macollos y crecimiento de hojas y raíces en plantas infectadas. En festuca, encontraron aumentos en producción de macollos, biomasa foliar y radicular.

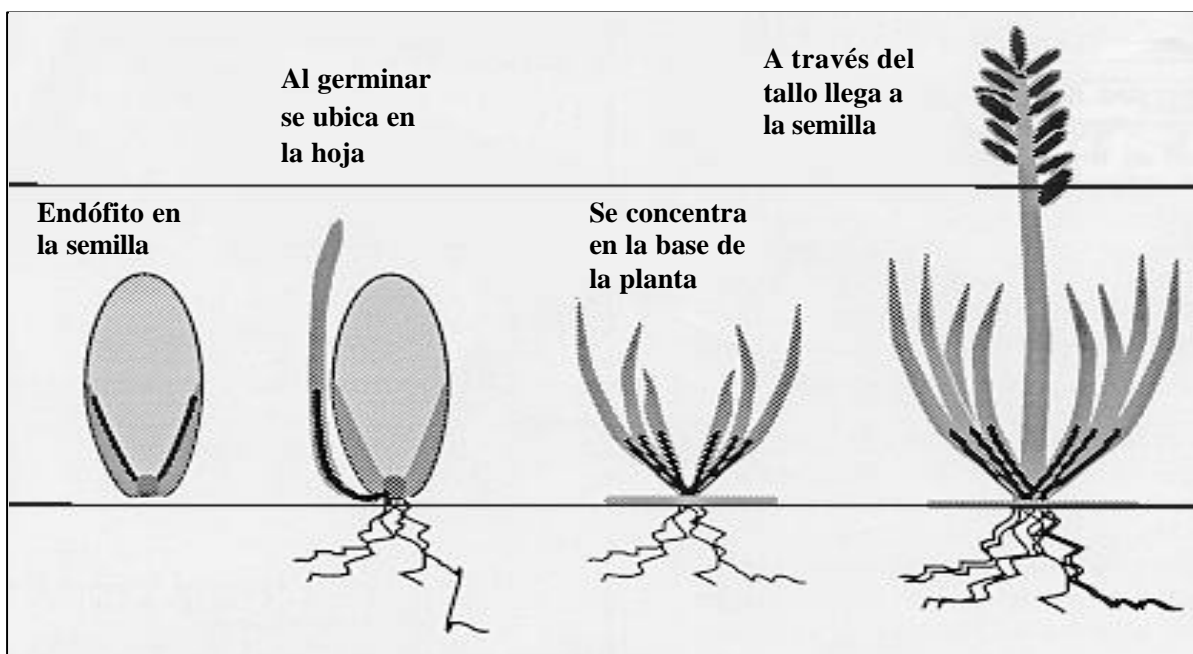
Hospederos de mayor importancia

Los endófitos, *N. lolii* encontrado en ballica perenne (*Lolium perenne*) y *Neotyphodium coenophialum* en festuca (*Festuca arundinacea*), han sido objeto de la mayor atención de los científicos, producto de la gran importancia de éstas especies en las praderas del mundo.

Se puede apreciar que, incluso los cultivares antiguos (Nui, Santa Elvira), presentan endófito, siendo los de niveles más altos los llegados en estos últimos años al país, procedentes de Nueva Zelanda. Esta situación, hace suponer que los niveles de endófito en las praderas sembradas y regeneradas en la Zona Sur, se han incrementado en las últimas temporadas.

Ciclo de vida del hongo

Como se observa en la Figura 3.1, la semilla infectada con grandes cantidades de micelios del hongo, al germinar, origina una plántula en cuya base se ubica el endófito a los pocos días después, así como también en los macollos que emergen posteriormente, para que finalmente en la primavera, al iniciarse el estado reproductivo se localice en la inflorescencia, dentro de las semillas, las cuales darán origen a nuevas plantas infectadas. Lo anterior, deja claramente establecido, que la única forma conocida de transmisión natural del hongo, se produce a través de la semilla (Prestidge y Thom, 1994).



Fuente: Adaptado de Prestidge y Thom, 1994.

Figura 3.1 Ciclo de vida del endófito en ballica perenne

Ubicación en la planta

Las mayores cantidades de micelios, se encuentran en la vaina de las hojas de la mayoría de los macollos, tallos, inflorescencias y semillas. Cantidades muy pequeñas del hongo viven en la lámina, raíces y polen (Prestidge y Thom, 1994).

Viabilidad en la semilla

Las condiciones ambientales en el lugar de almacenamiento de las semillas, así como el período de tiempo transcurrido hasta su utilización, son determinantes en la vida del hongo. Por este motivo, es importante adquirir semilla de la temporada y almacenada en buenas condiciones, bajas temperaturas y humedad. Es frecuente encontrar mayores niveles de endófito en las semillas que en las plantas que originan.

Evaluaciones realizadas por Latch y Christensen (1982), señalan que al almacenar la semilla a temperatura ambiente, la viabilidad de estos hongos decrece fuertemente después de 12 a 24 meses. Sin embargo, *N. lolii* puede sobrevivir al menos por 7 años en la semilla, si esta se almacena entre 0 y 5 °C (Latch y Christensen, 1982). En festuca se han encontrado disminuciones a cero, en un período de 12 a 18 meses.

3.1.2 Alcaloides

Los hongos endófitos, son capaces de producir una serie de compuestos a los cuales se les responsabiliza por la toxicidad en mamíferos, la tolerancia al ataque de insectos y al comportamiento de las forrajeras en condiciones ambientales determinadas.

Galdames (1995), menciona varios grupos de compuestos con actividad biológica, relacionados a la asociación endófito-planta, los cuales se presentan a continuación: Los ergocalcoides, encontrados en plantas de ballica y festuca infectadas, son considerados los principales responsables de síndromes de intoxicaciones en animales producto del consumo de festuca con endófito.

Los alcaloides lolinas, parecieran estar limitados a la producción de *N. coenophialum*-festuca. Son considerados de baja capacidad tóxica para mamíferos, no así para insectos.

Las peraminas, han sido aisladas a partir de cultivos puros de *N. lolii* y encontradas en festuca infectada. Se considera el responsable de la resistencia de la ballica al gorgojo argentino del tallo. En festuca, este alcaloide junto a las lolinas, son considerados como los probables responsables de la tolerancia a insectos.

Los lolitremos, han sido aislados sólo en ballicas infectadas. El lolitrem B, es considerado el principal responsable del síndrome del "ryegrass staggers" o temblores en ovejas.

Finalmente, hay otro grupo de compuestos relacionados a las hormonas vegetales y que han sido determinados en asociaciones endófito-planta. El endófito de la festuca, tendría la capacidad de producir ácido indol acético y ácido absético. De esta manera, las plantas infectadas, presentan mayores niveles de estas hormonas.

Distribución en la planta y en el tiempo

Los compuestos tóxicos, se concentran mayoritariamente en la base de las hojas y semillas y muy poco en las láminas y las raíces. A través del año, las mayores concentraciones de toxinas se encuentran en el verano y otoño y disminuyen considerablemente en invierno y primavera, lo que indica que los niveles están directamente relacionados con la temperatura ambiental.

Lo anterior, concuerda con la información entregada por Lane *et al.* (1997), en donde se indica que los niveles y la concentración del lolitrem B y ergovalina que produce el hongo, se incrementan en las estaciones de mayor temperatura ambiental y del suelo y por ende el riesgo de intoxicación de los animales. Otro fenómeno que explica niveles altos de lolitrem B y ergovalina en otoño, es que en esta época, la pradera puede tener una gran cantidad de material senescente, fracción que se caracteriza por poseer altos niveles acumulados de las toxinas (Keogh *et al.*, 1996).

Efecto sobre insectos

Los mecanismos de mayor tolerancia de las plantas, se explican principalmente por un rechazo al consumo, debido a la sensibilidad de los insectos hacia la presencia de endófitos o a los metabolitos presentes. Es importante mencionar además, que existen otros factores que están provocando inhibición en el consumo de especies forrajeras, principalmente por parte de *L. bonariensis*. Goldson (1982), indica que la resistencia de algunas especies y cultivares puede deberse a la presencia de “factores químicos antialimentarios”, uno de ellos puede ser un contenido más alto de celulosa en la planta.

En el Cuadro 3.1, se presenta el efecto del nivel de endófito sobre el daño causado por el gorgojo argentino del tallo en ballica de rotación, en un estudio realizado en el Centro Regional de Investigación (CRI) Remehue, Llano Central de la Xa Región de Chile.

Cuadro 3.1 Nivel de endófito, daño por gorgojo del tallo y población final en ballica de rotación.

Cultivar	Nivel endófito (% macollos infectados)	Macollos afectados (%)		Población final (macollos /m ²)
		Año 1	Año 2	
Tetrone	0	67	62	108
Abercomo	0	60	44	188
Aberoscar	0	6	30	835
Greenstone E*	37,5	6	29	750
Greenstone LE*	0	10	33	723

Fuente : Torres, *et al.*, 1997.

* LE (Low endosafe= Bajo endófito suave), E (Endosafe= Endófito suave).

Se aprecia que existen cultivares sin endófito, que toleran con éxito los ataques del gorgojo argentino del tallo, sobre todo en la primera temporada, como Aberoscar y Greenstone LE. Es importante destacar que Abercomo, a pesar del mayor daño, mantuvo un buen comportamiento en las dos primeras temporadas. El desempeño de Greenstone E, se debe probablemente a que el nivel de hongo que posee, no es suficiente para marcar una diferencia importante con Greenstone LE. En este trabajo queda claro, que al menos existe otro factor que influye en la tolerancia de algunos cultivares al ataque del *L. bonariensis* como lo plantea Goldson (1982).

La eficiencia de los endófitos, en la disminución de los efectos dañinos que provoca el gorgojo argentino del tallo, han hecho que el uso de cultivares infectados tengan éxito en los países con problemas causados por esta plaga, a pesar de los riesgos que se corren, sobretodo cuando se desconoce el manejo que se debe dar a estas forrajeras.

3.2 Determinación del hongo endófito

El nivel de endófito (% de plantas infectadas) de una pradera, dependerá del porcentaje de infección de la semilla con hongo viable que se utilice en el establecimiento de ésta. De lo anteriormente expuesto deriva la importancia de hacer un análisis para determinar el porcentaje de endófito en la semilla, para tener una primera aproximación de lo que posteriormente tendrá la pradera.

A continuación se describen las metodologías para determinar la presencia del hongo endófito, tanto en semillas como en las vainas de los macollos. La presencia del hongo endófito se determina por análisis microscópico, de acuerdo a la técnica descrita por Clark *et al.* (1983), usando como elemento principal la tinción con rosa bengala.

3.2.1 Determinación en la planta

Materiales

Microscopio ZEISS, para determinación hongos se usa objetivos 10x y 40 x.
Tinción rosa bengala 0,5% (P/V) disuelta en solución acuosa etílica al 5 %.
Bisturí.
Porta objeto.
Cubre objeto.
Macollos de ballica.

Metodología

Se prepara la muestra a partir de la zona basal de la vaina de cada macollo, para lo que se corta longitudinalmente una sección de la vaina.

Posteriormente, con un bisturí se procede a extraer la epidermis interna y se coloca la sección del tejido en un portaobjeto, dejando la epidermis externa hacia abajo. Inmediatamente después se aplica una gota de tinción de rosa bengala 0,5% Peso/Volumen (P/V) para luego cubrir la muestra con un cubreobjeto, se mantiene a temperatura ambiente por 1 minuto aproximadamente y se observa al microscopio ZEISS para determinación hongos, con objetivos 10x y 40 x.

Se consideran positivas o portadoras del hongo endófito, aquellas muestras que en la vaina de los macollos, presentan hifas de crecimiento intercelular, septadas, de aspecto enroscadas y que recorren en forma paralela las células del tejido.

3.2.2 Determinación en la semilla

Materiales

Microscopio ZEISS, para determinación hongos se usa objetivos 10x y 40 x.
Tinción rosa bengala , solución acuosa al 0,25% P/V .
Pinzas.

Porta objeto.
Cubre objeto.
Semillas de ballica.
Hidróxido de sodio (Na OH) al 5%.
Vaso precipitado de 1000 ml.
Agua destilada.

Metodología

En un vaso precipitado con solución de NaOH al 5% P/V, se ponen semillas de ballica por 16 horas, con el objeto de ablandarlas, al cabo de ese tiempo de exposición se lavan las semillas con abundante agua destilada para eliminar el exceso de hidróxido de sodio.

Se seleccionan semillas tratadas al azar y se procede a desglumarlas, luego se ubica la semilla en un portaobjeto, sobre la que se aplica una gota de solución de rosa bengala al 0,25% P/V. Después de un minuto se presiona la semilla con un cubre objeto y se observa al microscopio.

Al igual que en la determinación de las vainas de los macollos, se consideran positivas o portadoras del hongo endófito las muestras en donde es posible observar las hifas del hongo.

3.3 Determinación de toxinas

3.3.1 Preparación de las muestras

El procedimiento de toma de muestras y envío al laboratorio comienza con el corte de las plantas de ballica, se coloca de inmediato en una bolsa de plástico negro u otro envase que impida el ingreso de luz, se transporta de inmediato al laboratorio y con la menor temperatura posible se procede a su liofilización (secado en frío). Si esto no es posible, congelar la muestra a menos de -20°C para su envío al laboratorio de INIA en el CRI La Platina, que es el único en el país en hacer los análisis.

Después de la liofilización, las muestras se muelen y envasan manteniéndolas en oscuridad en cajas plásticas con sílica gel a menos de -20°C hasta su análisis.

3.3.2 Métodos analíticos

Para evaluar cada método se adicionó estándar puro a muestras sin endófito, en tres niveles diferentes de adición, con cinco repeticiones por nivel, considerando además un blanco de reactivos y la muestra testigo.

3.3.2.1 Determinación de lolitrem-B en ballicas

Extracción

La muestra es extraída con una mezcla de cloroformo/metanol, agitando por una hora. Luego se deja decantar y del sobrenadante se toma una alícuota la cual es evaporada con corriente de nitrógeno, a temperatura ambiente y bajo campana de seguridad.

Purificación

Este proceso se realiza en un equipo de extracción en fase sólida, con sistema de vacío. El extracto anterior se reconstituye con diclorometano y se pasa por micro columnas de sílica, la toxina es eluída con una mezcla de diclorometano/acetonitrilo. Se inyectan 20 μ l (microlitros) en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).

Cuantificación

Equipo : HPLC Merck- Hitachi con detector de fluorescencia
Longitud de onda : De excitación 268 nm y de emisión 440 nm
Columna cromatográfica : Waters Zorbax de sílica
Fase móvil : Diclorometano/Acetonitrilo (80:20)

Las áreas o alturas de las muestras entregadas por el computador, se interpolan en una curva de estándar puro.

Recuperación (%) y límite de cuantificación

El porcentaje de recuperación promedio en cinco niveles de adición de estándar fue de 98,3%. El límite de cuantificación del método es de 0,05 mg kg^{-1} de ballicas liofilizadas.

3.3.2.2 Determinación de lolitrem-B en efluentes de ensilajes

La extracción se hizo por partición con una mezcla de cloroformo/metanol en tubos de ensayos y la purificación y cuantificación igual a la realizada para las muestras de ballicas.

El porcentaje de recuperación promedio fue de 97,04%. El límite de cuantificación para este método es de 0,015 mg/L de efluentes de ensilaje.

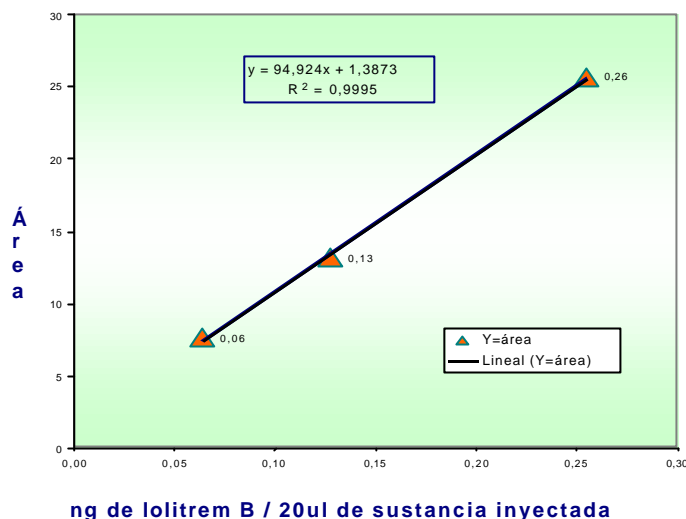


Figura 3.2 Curva para determinación de lolitrem B

3.3.2.3 Determinación de ergovalina en muestras de ballicas

Extracción

La muestra es extraída con una mezcla de cloroformo/NaOH 0,01N, se agita y luego se filtra por Buchner con vacío, ocupando papel Whatman 1PS para evitar residuos de humedad.

Purificación

Del filtrado se toma una alícuota que se hace pasar por una micro columna preparada con sílica HL más sulfato de sodio, la ergovalina es eluída con metanol, se filtra por Millipore y luego se inyectan 20 ul (microlitros) en el cromatógrafo.

Cuantificación

Equipo : HPLC Merck- Hitachi detector de fluorescencia
 Longitud de onda : de excitación 250 nm y de emisión 420 nm
 Columna cromatográfica : Waters X-Terra RP-18
 Fase móvil : Acetonitrilo/carbonato de amonio

Las áreas de las muestras, entregadas por el computador, se interpolan en una curva de estándar puro.

Recuperación (%) y límite de cuantificación

El porcentaje de recuperación promedio en cinco niveles de adición de estándar fue de 98.06%.

El límite de cuantificación del método es de 0,05 mg kg⁻¹ de ballicas liofilizadas.

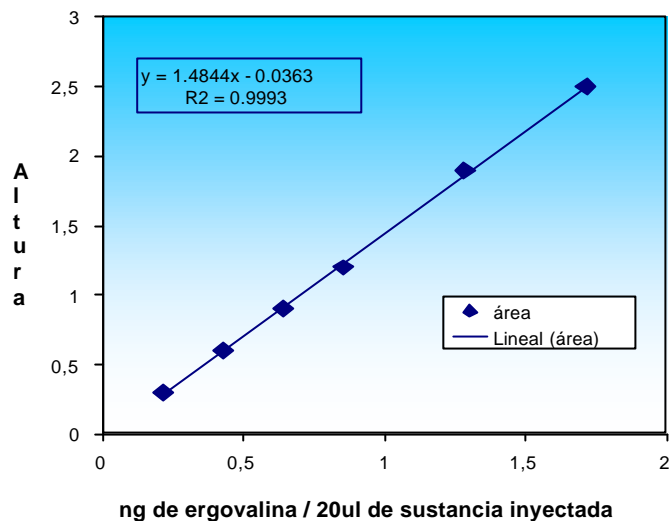


Figura 3.3 Curva para determinación de ergovalina

3.3.2.4 Determinación de peramina en ballicas

Extracción

La muestra se extrae primero con una mezcla de metanol/cloroformo y luego de la agitación, se hace una segunda extracción con agua/hexano, se agita nuevamente y luego se centrifuga.

Purificación

De la fase acuosa se toma una alícuota, se purifica usando el sistema de extracción en fase sólida con columnas de ácido carboxílico. La peramina es eluida y llevada a volumen con metanol. Se inyectan 20 ul (microlitros) en el cromatógrafo.

Cuantificación

Equipo : HPLC Merck- Hitachi con detector ultravioleta
 Longitud de onda : 280 nm
 Columna cromatográfica : Waters Zorbax de sílica
 Fase móvil : metanol/ácido fórmico/carbonato de guanidino

Las áreas de las muestras, entregadas por el computador, se interpolan en una curva de estándar puro.

Recuperación (%) y límite de cuantificación

El porcentaje de recuperación promedio fue de 87,7%.

El límite de cuantificación del método es de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de ballicas liofilizadas.

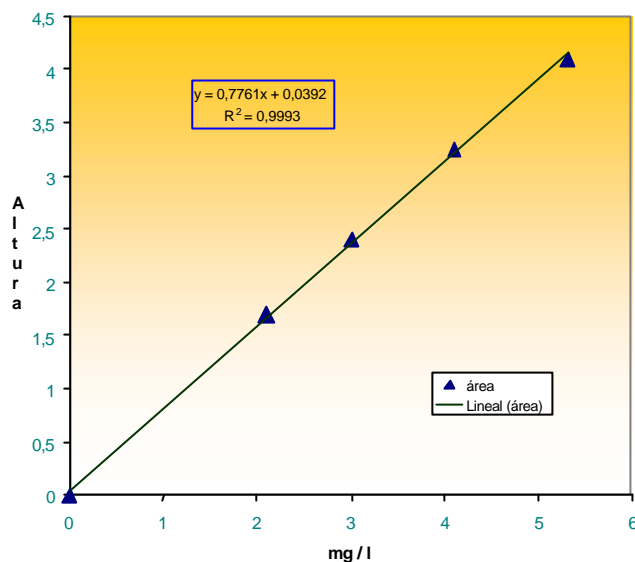


Figura 3.4 Curva para determinación de peramina

3.4 Evaluación de cultivares de ballicas

La necesidad de usar ballicas con hongo endófito depende de cada caso en particular. Donde existen antecedentes de ataques del gorgojo argentino de las ballicas, se deberían usar los cultivares que contengan el hongo. Este, no sólo protegerá a la planta de la plaga, sino que también provocará un mayor rendimiento (10% a 12%), mejor comportamiento frente al déficit hídrico estival, una persistencia más prolongada y tolerancia a otras plagas y enfermedades.

Sin embargo, de no existir pruebas de la presencia del gorgojo, el uso de ballicas con el hongo endófito debe ser cuidadosamente analizado, ya que si no se maneja bien este tipo de praderas, las toxinas producidas por el endófito, pueden provocar problemas de salud en los animales, con disminuciones de producción variables, de acuerdo a la gravedad de la intoxicación.

En la elección de un cultivar de ballica no sólo se debe considerar el nivel de endófito, sino que también su rendimiento, tolerancia al aluminio, precocidad, resistencia a la sequía, crecimiento invernal, vigor al establecimiento y calidad bromatológica, entre los más importantes.

Debido a lo anterior, se establecieron ensayos de cultivares en otoño del año 2000 en Los Lagos (Valdivia), Remehue (Osorno) y Nueva Braunau (Llanquihue); evaluándose por dos temporadas.

La fertilidad del suelo fue adecuada para el desarrollo de las ballicas en ambas temporadas y los niveles de nutrientes se corrigieron según el análisis de suelo.

En la Figura 3.5, se presentan los resultados del nivel de endófito encontrados en los diferentes cultivares de ballica perenne en las distintas localidades.

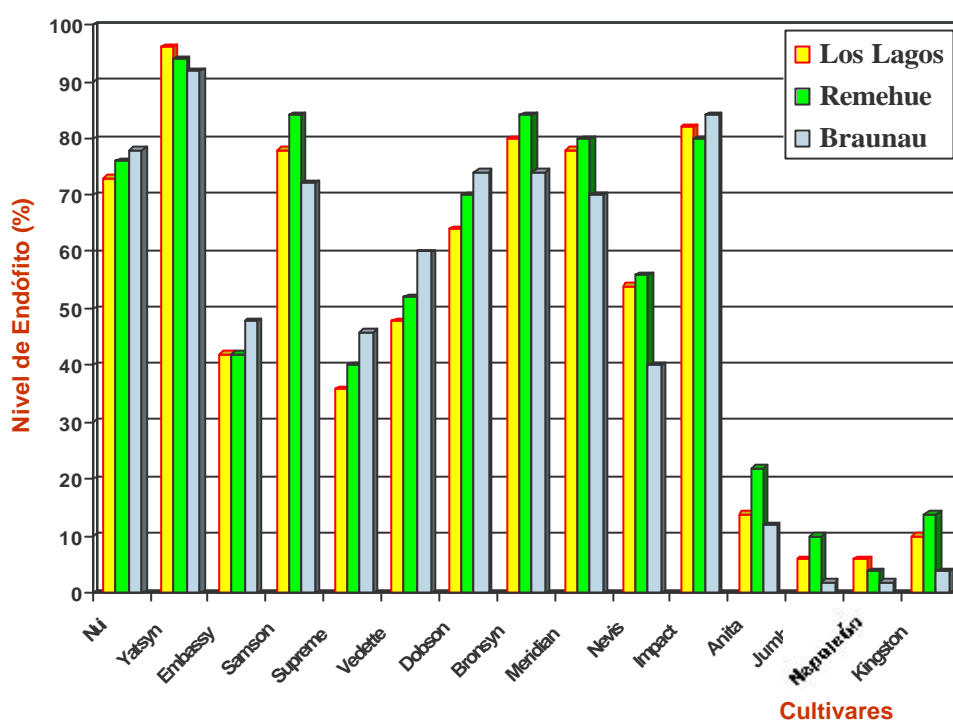


Figura 3.5 Nivel de endófito de la ballica perenne (%).

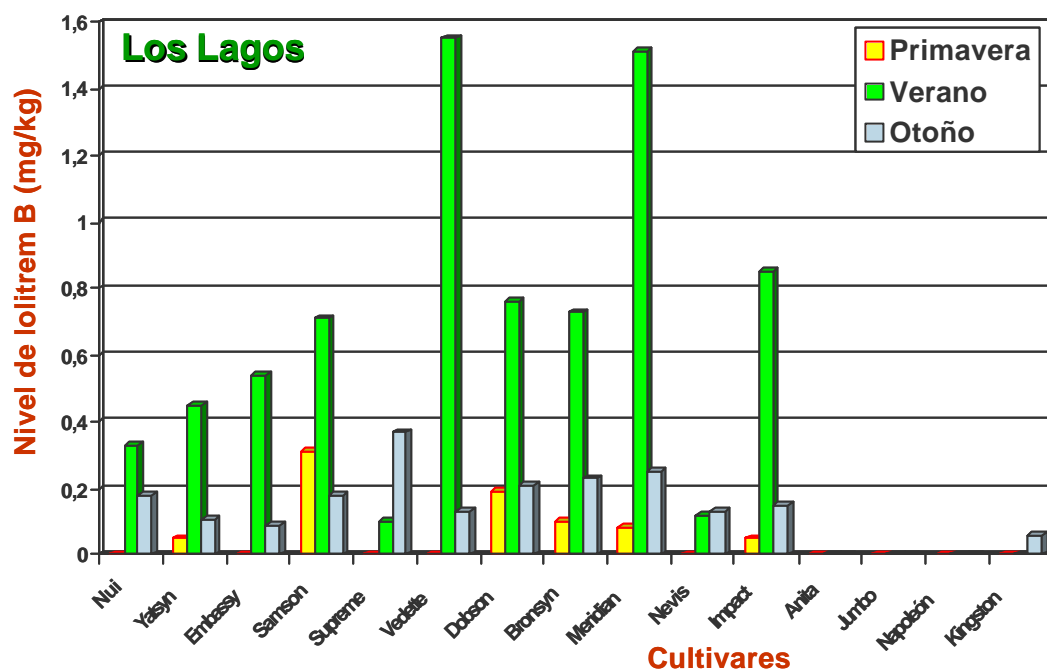
En relación al nivel de endófito, destaca el cultivar Nui con un 76% promedio, valor más alto encontrado en diferentes partidas de semillas analizadas, lo anterior, probablemente explica su buen comportamiento productivo. Este cultivar, no se comercializa con endófito y los diferentes niveles encontrados en la semilla importada desde Nueva Zelandia, se debe probablemente a la selección natural que produce el ataque del gorgojo en los semilleros de ese país, dejando cada vez más plantas con el hongo.

En el resto de los cultivares, la mayoría está dentro de lo normal. Sin embargo, hay cultivares que presentan niveles más bajos que lo descrito en ellas, como Supreme, Embassy, Nevis y Vedette. Esto, probablemente debido a que la viabilidad del hongo en la semilla, depende de factores como el tiempo de almacenamiento y sus

condiciones ambientales. A mayor tiempo de almacenaje, temperatura y humedad, menor viabilidad del endófito.

Otro grupo llama la atención por presentar pequeños porcentajes como Anita, Jumbo, Napoleón y Kingston, las que no deberían tener el hongo, esto puede deberse a contaminación con ballicas naturalizadas.

En la Figura 3.6 se presentan los niveles de lolitrem B de los cultivares por época del año en las tres localidades.



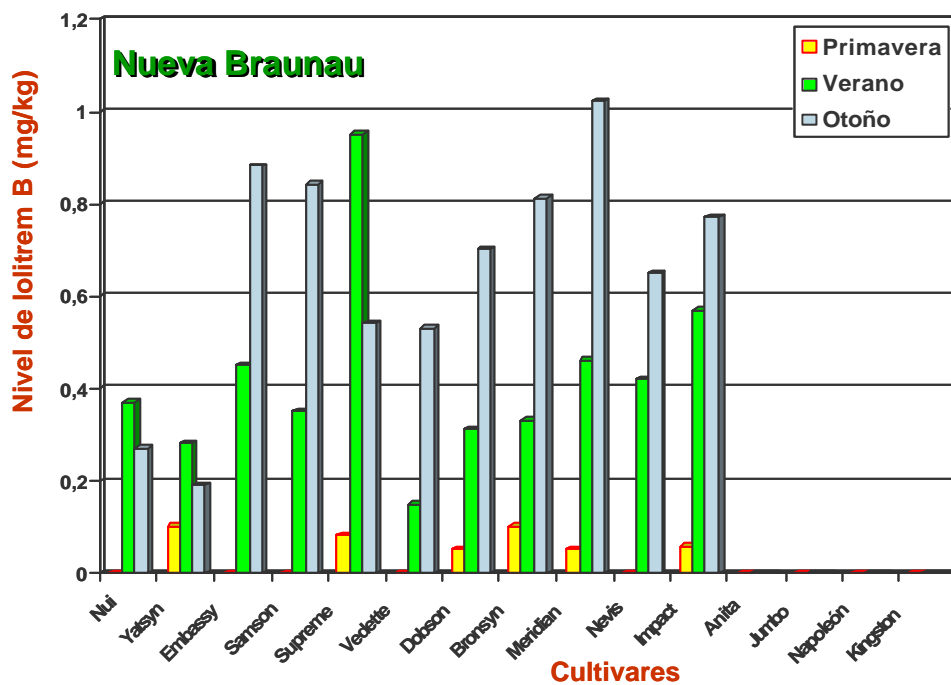
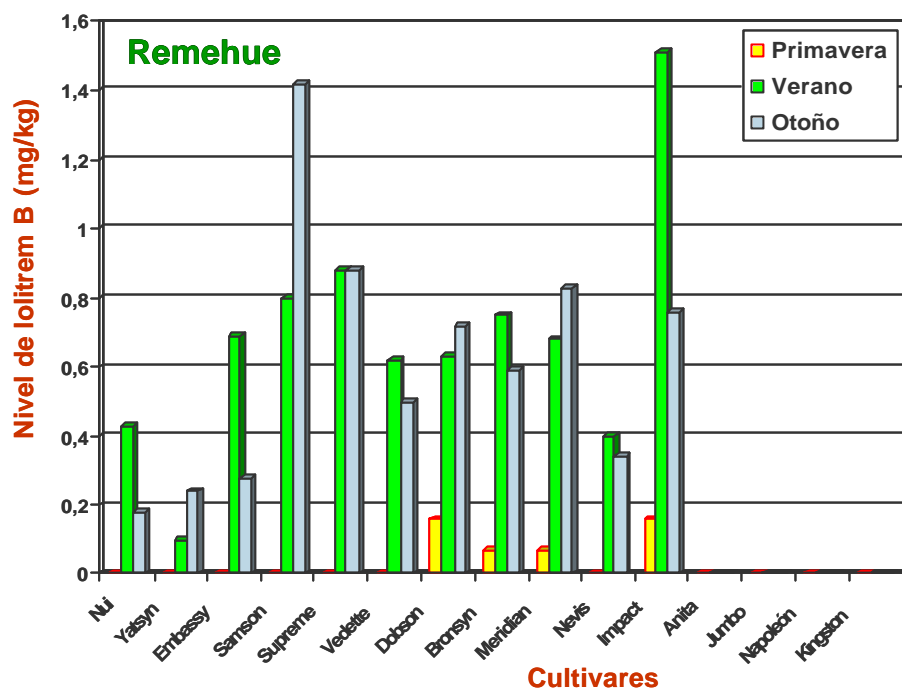
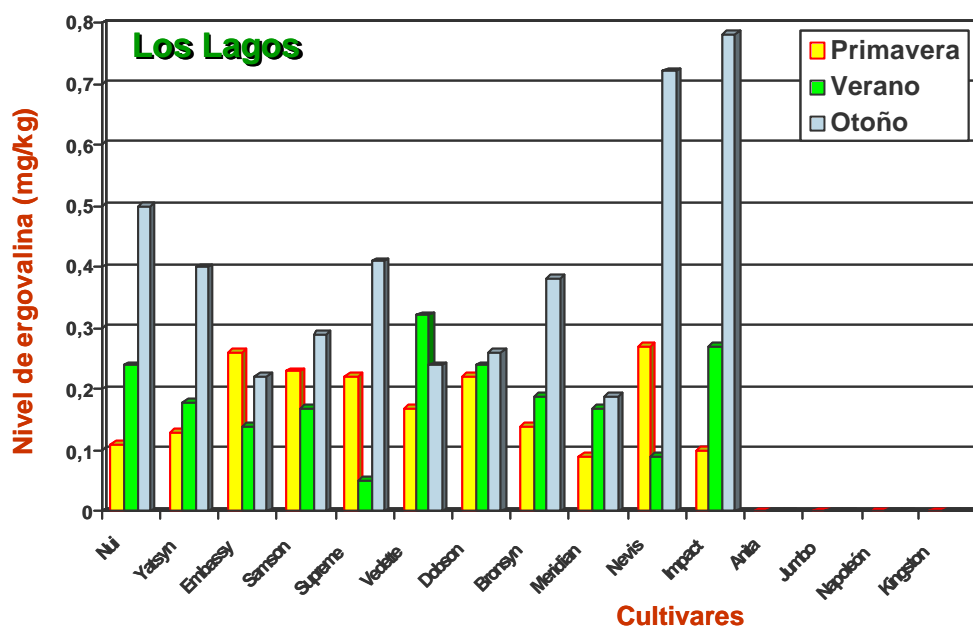


Figura 3.6 Nivel de lolitrem B de los cultivares por época del año en las tres localidades.

Se observa, que los valores se presentan significativamente más altos en verano en Los Lagos, siendo también otoño importante en Remehue y Nueva Braunau. Primavera es la época de menores niveles. Lo anterior concuerda con la información entregada por Lane *et al.* (1997), donde se indica que los niveles y la concentración del lolitrem B se incrementa en las estaciones de mayor temperatura ambiental y del suelo; por ende existe el riesgo de intoxicación de los animales. Otro fenómeno que explica niveles altos de lolitrem B en otoño es que en esta época, la pradera presenta alta cantidad de material senescente, fracción que se caracteriza por poseer altos niveles acumulados de la toxina (Keogh *et al.*, 1996).



El cultivar Impact es el que tiene el nivel más alto en las tres localidades; le siguen Samson, Meridian y Supreme. Por otra parte, entre los cultivares con endófito, los niveles más bajos de lolitrem B son para Yatsyn, Nui y Nevis. Finalmente, Anita, Jumbo, Napoleón y Kingston por no contener el endófito, no poseen lolitrem B.

En la Figura 3.7 se presentan los niveles de ergovalina de los cultivares por época del año en las tres localidades.

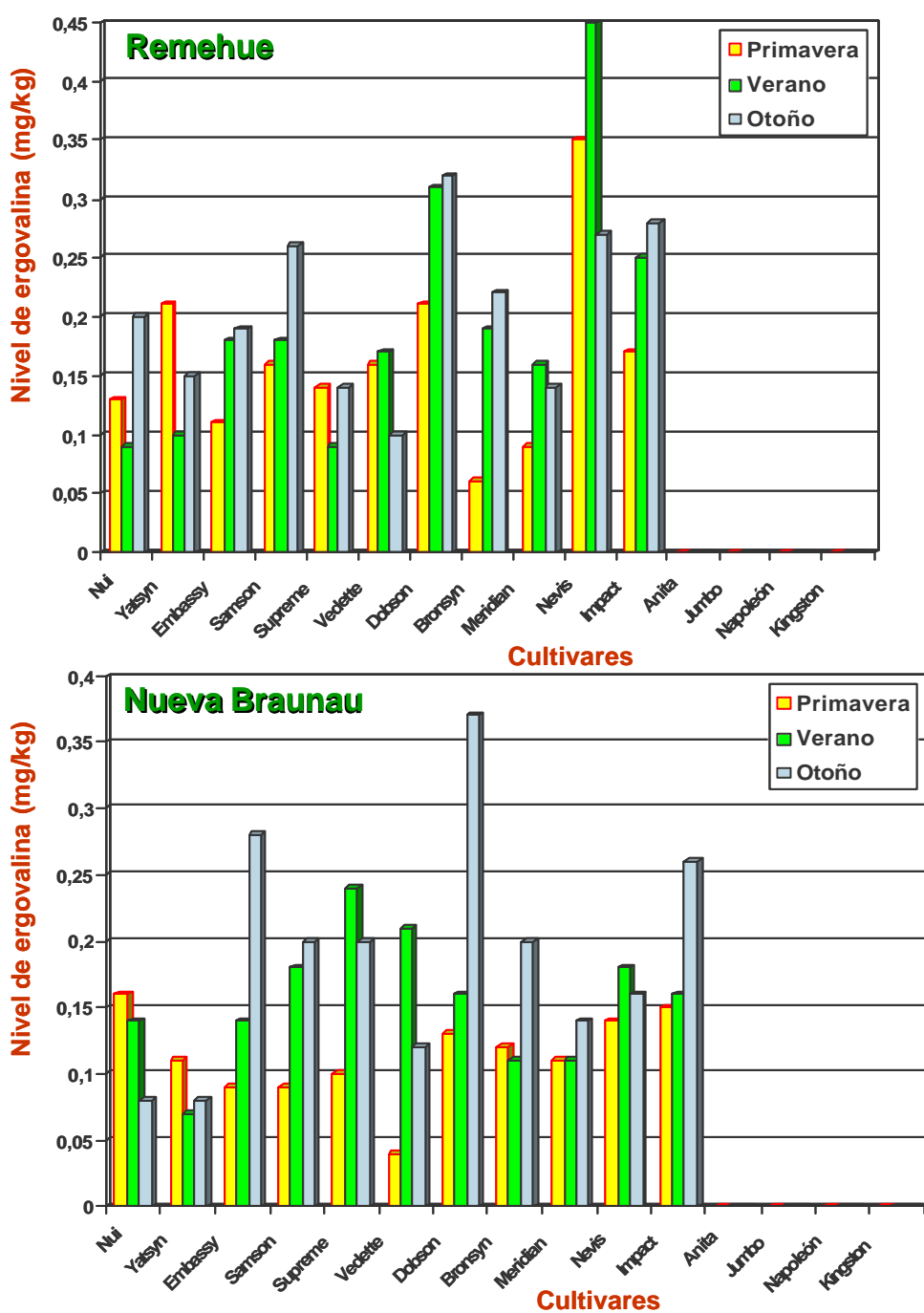
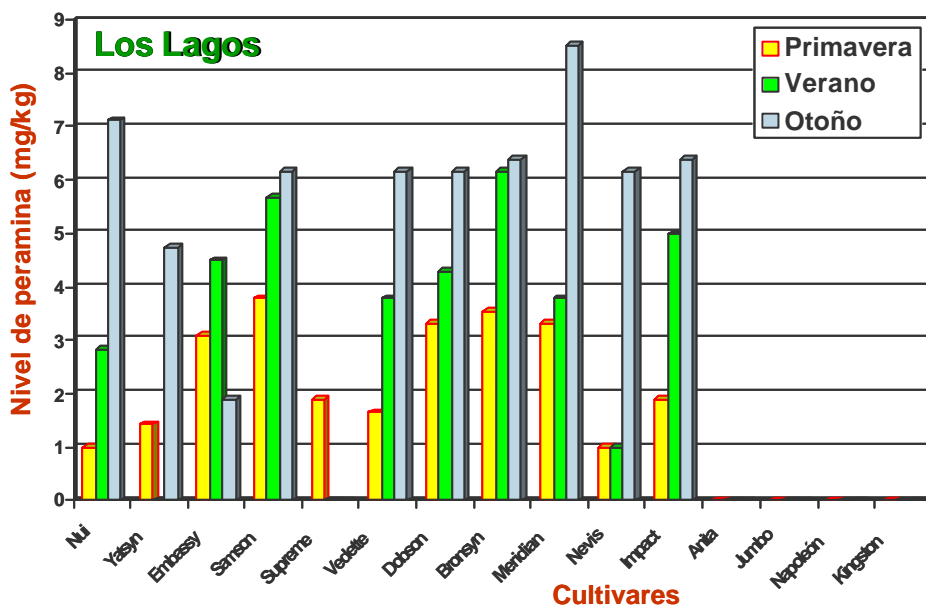


Figura 3.7 Nivel de ergovalina de los cultivares por época del año en las tres localidades.

Se puede observar, que los valores se presentan significativamente más altos en otoño en Los Lagos y Nueva Braunau, siendo también el verano importante en Remehue. Primavera es la época de los niveles más bajos. Al igual que con el lolitrem B, lo anterior concuerda con la información entregada por Lane *et al.* (1997), donde se indica que también los niveles y la concentración de ergovalina que produce el hongo se incrementa en las estaciones de mayor temperatura ambiental y del suelo, sin ser esta toxina de gran importancia por requerir de altas temperaturas para producir problemas en los animales. De la misma manera, los niveles altos de ergovalina en otoño se explican al igual que para lolitrem B, por la cantidad de material senescente en esta época (Keogh *et al.*, 1996).

El cultivar Impact contiene el nivel más alto de ergovalina en las tres localidades, le siguen Nevis, Dobson y Supreme. Finalmente, Anita, Jumbo, Napoleón y Kingston, por no tener endófito, no poseen ergovalina.

En la Figura 3.8 se presentan los niveles de peramina de los cultivares por época del año en las tres localidades.



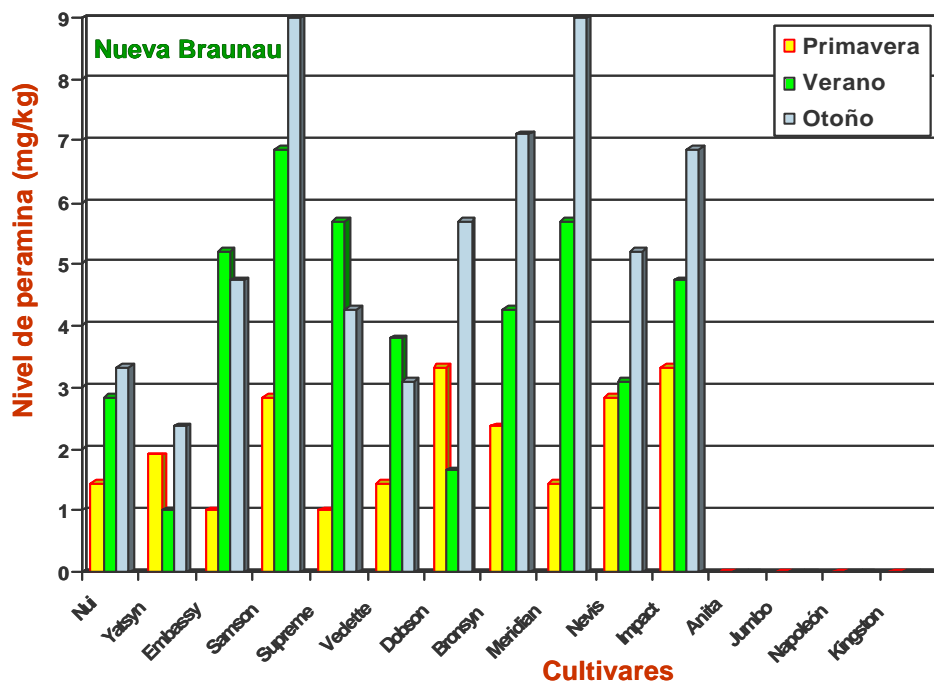
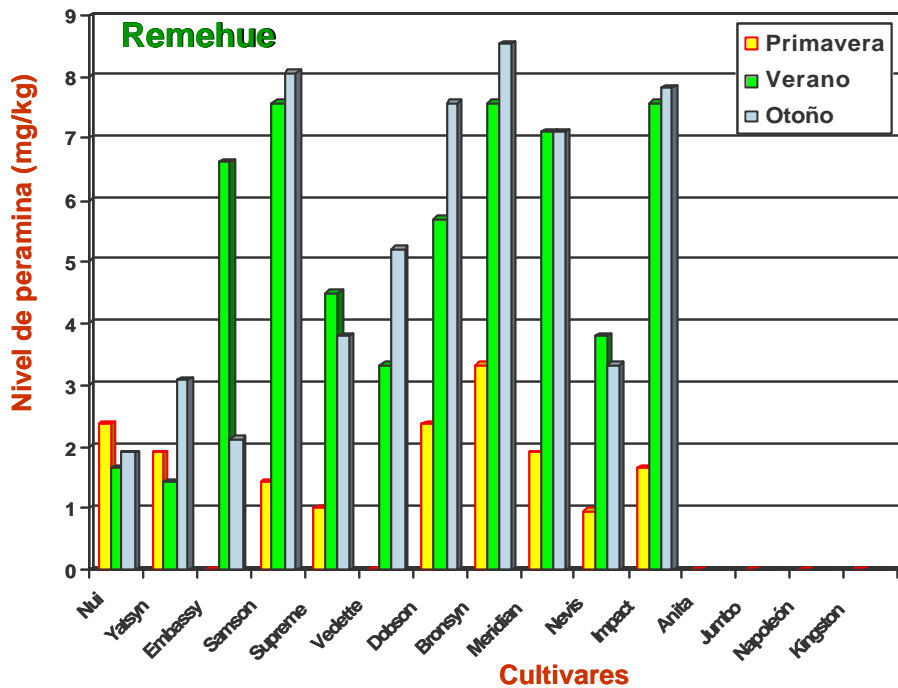


Figura 3.8 Nivel de peramina de los cultivares por época del año en las tres localidades.

Los valores se presentan significativamente más altos en otoño en Los Lagos y Nueva Braunau, siendo también el verano importante en Remehue. Primavera es la época de menor nivel de peramina.

Al igual que con el lolitrem B y ergovalina lo anterior, concuerda con la información entregada por Lane *et al.* (1997), quienes indican que la concentración de todos los metabolitos que produce el hongo se incrementa en las estaciones de mayor temperatura ambiental y del suelo. La peramina, es de gran importancia para repeler al *L. bonariensis*, además de otros insectos. A diferencia de lo que ocurre con lolitrem B y ergovalina, según Keogh *et al.* (1996), la peramina no se encuentra en el material senescente.

Lo anterior concuerda con información proveniente de Nueva Zelandia, donde se indica que los niveles de peramina también se incrementan en las estaciones de mayor temperatura.

Los cultivares con los niveles más altos de peramina en las tres localidades son Meridian, Samson, Bronsyn e Impact, le sigue el cultivar Dobson; mientras que Anita, Jumbo, Napoleón y Kingston, por no tener endófito, no poseen peramina.

En los Cuadros 3.2 y 3.3, se presenta el comportamiento de los cultivares de ballica perenne y de rotación, respectivamente, evaluados por su rendimiento, en las diferentes localidades de la Décima Región durante dos temporadas.

Cuadro 3.2 Rendimiento relativo (%) de ballicas perennes.

Los Lagos	%	Remehue	%	Nueva Braunau	%
Anita	100	Kingston	100	Yatsyn	100
Nui	100	Nevis	94	Dobson	99
Nevis	99	Vedette	92	Vedette	97
Yatsyn	99	Bronsyn	92	Supreme	96
Kingston	99	Nui	90	Nevis	94
Supreme	99	Yatsyn	89	Impact	94
Impact	97	Dobson	88	Bronsyn	93
Vedette	97	Meridian	87	Nui	92
Bronsyn	97	Embassy	86	Anita	91
Samson	96	Impact	86	Samson	90
Napoleón	93	Jumbo	85	Napoleón	90
Embassy	93	Anita	83	Embassy	88
Meridian	91	Samson	83	Jumbo	87

Dobson	88	Napoleón	81	Meridian	86
Jumbo	85	Supreme	80	Kingston	86

Cuadro 3.3 Rendimiento relativo (%) de ballicas de rotación.

Valdivia	%	Osorno	%	Llanquihue	%
Flanker	100	Cruzader	100	Cruzader	100
Ajax	94	Flanker	96	Flanker	99
Cruzader	94	Maverick	94	Maverick	96
Dominó	93	Dominó	88	Dominó	93
Concord	91	Conker	82	Concord	89
Conker	90	Concord	72	Conker	86
Maverick	90	Ajax	70	Sikem	86
Sikem	74	Sikem	62	Ajax	84

En los cuadros 3.2 y 3.3 se observa que los cultivares presentan distinto comportamiento productivo en las diferentes localidades. Sin embargo, hay cultivares que se mantienen en niveles similares en las tres localidades. Los valores indican el porcentaje de rendimiento obtenido con relación al cultivar de mayor producción. Diferencias menores de 10%, generalmente, no son significativas y pueden ser consideradas como similares.

La mayoría de los cultivares presenta un buen comportamiento, especialmente en la localidad de Los Lagos (Valdivia), le sigue Nueva Braunau (Llanquihue) y finalmente Remehue (Osorno), donde las diferencias son mayores.

Considerando el comportamiento en las tres localidades en ballica perenne, destacan los cultivares Yatsyn, Nevis, Vedette, Kingston y Bronsyn, siendo los de menor rendimiento, Samson, Embassy, Napoleón, Meridian y Jumbo.

En el caso de las ballicas de rotación, destacan los cultivares Flanker, Cruzader, Maverick y Dominó, siendo el cultivar de menor rendimiento, Sikem.

3.5 Localización y evolución de toxinas

Se estudió la evolución dinámica de las toxinas del hongo endófito (*N. loli*) en distintas épocas del año y su localización en diferentes partes de la planta en tres cultivares de ballica perenne; Yatsyn 1, Nui y Kingston. Los estratos del perfil de la pradera fueron; 0 a 4 cm, 4 a 8 cm y sobre 8 cm.

En el Cuadro 3.4 se muestran los resultados del análisis de endófito en los diferentes cultivares en primavera – verano.

Cuadro 3.4 Nivel de endófito (%) por cultivar en primavera – verano.

Cultivar	Septiembre	Noviembre	Enero
	2001	2001	2002
	(%)	(%)	(%)
Yatsyn	74	86	88
Nui	20	14	12
Kingston	0	0	0

Se puede observar que no hay grandes cambios entre las diferentes fechas de muestreo. Sin embargo, como era de esperar el nivel más alto corresponde al cultivar Yatsyn, un nivel intermedio para Nui (varía entre 0 y 78%, en semillas que se encuentran en el mercado) y sin la presencia de endófito el cultivar Kingston.

En los Cuadros 3.5, 3.6 y 3.7 se muestran los resultados de los análisis de lolitrem B, ergovalina y peramina, respectivamente en los diferentes cultivares a través del año.

Cuadro 3.5 Nivel de lolitrem B (ppm) por cultivar a través del año.

Cultivar	Estrato	Oct	Dic	May	Ago
	(cm)	2001	2001	2002	2002
		(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Nui	0 - 4 cm	0,06	0,13	0,1	0
Nui	4 - 8 cm	0,05	0,05	0,05	0
Nui	> 8 cm	0	0	0	0
Yatsyn	0 - 4 cm	0	0,35	0	0,15
Yatsyn	4 - 8 cm	0	0,1	0	0,17
Yatsyn	> 8 cm	0	0	0	0,22
Kingston	0 - 4 cm	0	0	0	0
Kingston	4 - 8 cm	0	0	0	0
Kingston	> 8 cm	0	0	0	0

Cuadro 3.6 Nivel de ergovalina (ppm) por cultivar a través del año.

Cultivar	Estrato (cm)	Oct 2001 (ppm)	Dic 2001 (ppm)	May 2002 (ppm)	Ago 2002 (ppm)
Nui	0 - 4 cm	0,15	0,05	0,08	0
Nui	4 - 8 cm	0,12	0,05	0	0,09
Nui	> 8 cm	0,11	0	0	0,05
Yatsyn	0 - 4 cm	0	0,08	0	0
Yatsyn	4 - 8 cm	0,06	0	0	0
Yatsyn	> 8 cm	0	0	0	0
Kingston	0 - 4 cm	0	0	0	0
Kingston	4 - 8 cm	0	0	0	0
Kingston	> 8 cm	0	0	0	0

Cuadro 3.7 Nivel de peramina (ppm) por cultivar a través del año.

Cultivar	Estrato (cm)	Oct 2001 (ppm)	Dic 2001 (ppm)	May 2002 (ppm)	Ago 2002 (ppm)
Nui	0 - 4 cm	0	0	0	0
Nui	4 - 8 cm	0	0	1	1
Nui	> 8 cm	1,42	0	0	1
Yatsyn	0 - 4 cm	0	0	0	0
Yatsyn	4 - 8 cm	0	0	0	0
Yatsyn	> 8 cm	0	0	0	0
Kingston	0 - 4 cm	0	0	0	0
Kingston	4 - 8 cm	0	0	0	0
Kingston	> 8 cm	0	0	0	0

Se observa, que sólo los cultivares con endófito presentan las toxinas lolitrem B, ergovalina y peramina en algunas épocas del año, estos son Nui y Yatsyn.

Es importante también mencionar, que en los meses de enero, febrero y marzo, los que deberían tener valores más altos de toxinas, no se pudieron muestrear por el nulo crecimiento de la pradera, dado el déficit hídrico estival.

Los valores de lolitrem B y ergovalina encontrados son bajos en general, lo que no permite ver con claridad las tendencias estacionales ni de los diferentes estratos de la planta. Davies *et al.* (1993), encontraron valores entre 0,4 y 3,9 ppm para lolitrem B y 0 a 1,5 ppm para ergovalina. El comportamiento del cultivar Nui está más cercano a lo que se menciona en la literatura, mayores contenidos hacia la base de la planta (Keogh *et al.*, 1996) y en épocas más calurosas (Lane *et al.*, 1997).

La peramina sólo se encontró en el cultivar Nui, con alguna tendencia a tener más toxina en las partes superiores de las plantas. Davies *et al.* (1993), encontraron entre 22,1 a 25,9 ppm de peramina.

3.6 Minisilos

Se confeccionaron minisilos en tres estados fenológicos de corte: bota, inicio de espigadura y espiga completa. Se realizaron dos tratamientos de pre-ensiladura: corte directo y premarchito (8 horas).

La acumulación de forraje al estado de bota, fue de 3.500 a 4000 kg/ha de materia seca, con un 14,6 % de materia seca.

El nivel de endófito de las praderas fue 94,5 % para la ballica Yatsyn con el hongo endófito (E+) y 2 % para la ballica sin endófito (E-).

En el Cuadro 3.8, se presentan los resultados de los análisis nutricionales y parámetros fermentativos de los minisilos, producto de los diferentes tratamientos en estudio.

Cuadro 3.8 Resultados de los análisis bromatológicos.

Estado Fenológico	Corte	Endófito	Materia seca (%)	Proteína (%)	E.M. (Mcal/kg)	pH	N-NH ₃
Bota	Directo	E+	16,0	25,2	2,60	4,8	13,2
Bota	Premarchito	E+	26,0	26,3	2,69	4,2	6,5
Inicio espiga	Directo	E+	15,5	19,8	2,53	4,6	12,3
Inicio espiga	Premarchito	E+	32,2	19,1	2,68	4,2	5,5
Espiga	Directo	E+	19,2	13,6	2,36	3,9	8,4
Espiga	Premarchito	E+	34,2	12,0	2,34	4,2	6,2
Espiga	Directo	E-	17,9	14,6	2,44	4,0	8,7
Espiga	Premarchito	E-	33,2	11,9	2,34	6,0	18,7

En el Cuadro 3.8 se observa que el contenido de materia seca es mayor en el ensilaje premarchito que en el corte directo. La proteína total es mayor en ensilaje de corte más temprano, al igual que el contenido de energía.

En relación a los parámetros fermentativos (pH y nitrógeno amoniacal) presentan valores normales, excepto en el tratamiento de ballicas con espiga, sin endófito y premarchito. Lo anterior, probablemente debido al ingreso de aire a las bolsas que lo contenían. También presentan algún problema los de corte directo en estados de bota e inicio de espiga, debido probablemente a la baja materia seca al corte.

En el Cuadro 3.9, se presentan los resultados de los análisis de lolitrem B y ergovalina de los ensilajes, producto de los diferentes tratamientos en estudio.

Cuadro 3.9 Contenido de lolitrem B y ergovalina (ppm) en los diferentes ensilajes.

Estado Fenológico	Corte	Endófito	Lolitrem B (ppm)	Ergovalina (ppm)
Bota	Directo	E+	0,075	0,155
Bota	Premarchito	E+	0,050	0,053
Inicio espiga	Directo	E+	0,085	0,350
Inicio espiga	Premarchito	E+	0,038	0,150
Espiga	Directo	E+	0,138	0,295
Espiga	Premarchito	E+	0,288	0,155
Espiga	Directo	E-	0	0
Espiga	Premarchito	E-	0	0

Se puede observar que los niveles de lolitrem B y ergovalina, en general son bajos. Probablemente se producen pérdidas de esta toxina en el proceso de ensilado y durante la fermentación, en donde ocurre un fuerte aumento de temperatura y acidez (bajo pH).

Dentro de los estados fenológicos de corte, el estado de espiga es el que presenta valores un poco más altos de ambas toxinas, lo que coincide con la migración del hongo a este estrato de la planta (Keogh *et al.*, 1996). Por otra parte, como era de esperar, los ensilajes de ballica sin endófito, no presentan toxinas.

Es importante destacar que la ergovalina tiende a presentar menor contenido en el ensilaje premarchito, esto puede deberse a la pérdida de agua o deshidratación en el proceso de premarchitamiento, donde también se arrastran otros compuestos, principalmente nutritivos.

3.7 Literatura citada

- BACON, C.W. and DE BATTISTA, J. 1991. Endophytic fungi of grasses. *In*: Handbook of Applied Mycology. Vol 1 : Soil and Plants. 9 : 231-254.
- CLARK, E.M., WHITE, J.F., and PATTERSON, R.M. 1983. Improved histochemical techniques for the detection of *Acremonium* in tall fescue and methods of in vitro culture of the fungus. *Journal of Microbiological Methods* 1: 149-155.
- DAVIES, E., LANE, G., LATCH, B., TAPPER, B., GARTHWAITE, I., TOWERS, N., FLETCHER, L. and POWELL, D. 1993. Alkaloid concentrations in field-grown synthetic perennial ryegrass endophyte associations. *Proceedings of the Second International Symposium on Acremonium/grass interactions*. (edited by Hume, D.; Latch, G. and Easton, H.), 72-76
- GALDAMES, R. 1990. El endófito de la Festuca. *IPA Carillanca*. Año 9, N° 3 ISSN-5943. Temuco, Chile. P 3-6.
- GALDAMES, RAFAEL. 1995. El hongo endófito de la festuca, *Acremonium coenophialum* MORGAN-JONES & GAMS, y su incidencia en el sur de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 55 (1) : 67-70 (Enero – Marzo, 1995).

- GALDAMES, R. 1995. Hongos endófitos en praderas y sus implicancias en la ganadería *In*: Seminario de Protección Vegetal. CRI-Carillanca, INIA. Serie Carillanca N° 45. ISSN 0716-7679. P : 59-76.
- GOLDSON, S.L. 1982. An examination of the relationship between Argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis* (Kuschel)) and several of its host grasses. New Zealand Journal of Agricultural Research. 25 : 395-403.
- KEOGH, R.G., TAPPER, B.A. AND FLETCHER, R.H. 1996. Distributions of the fungal endophyte *Acremonium lolii*, and the alkaloids lolitrem B and peramine, within perennial ryegrass. New Zealand Journal of Agriculture Research, 39: 121-127.
- LANE, G.A., TAPPER, B.A., DAVIES, E., HUME, D.E., LATCH, G.C.M., BARKER, D.J., EAST, H.S. AND ROLSTON, M.P. 1997. Effect of growth conditions on alkaloid concentrations in perennial ryegrass naturally infected with endophyte. Proceedings of 3rd International Symposium on Neotyphodium/Grass Interactions (Eds. Bacon and Hill), 179-182.
- LATCH, G.C.M. and CHRISTENSEN, M.J. 1982. Ryegrass endophyte, incidence and control. New Zealand Journal Agricultural Research. 25 :443-448.
- LATCH, G.C.M., CHRISTENSEN, M.J. and SAMUELS, G.J. 1984. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. Micotaxon Vol XX, 2 :535-550.
- LATCH, G.C.M., HUNT, W.F. and MUSGRAVE, D.R. 1985. Endophytic fungi effect growth of perennial ryegrass. New Zealand Journal of Agricultural Research. 28 :165-168.
- LATCH, G.C.M., POTTER, L.R. and TYLER, B.F. 1987. Incidence of endophytes in seeds from collection of *Lolium* and *Festuca* species. Ann. Appl. Biol. 11 :59-64.
- PRESTIDGE, R.A. and THOM, E.R. 1994. Facts about endophyte. Proceedings 46th. Ruakura Farmers' Conference. P : 54-59.
- TORRES, A., CISTERNAS, E. y ANGULO, L. 1997. El rol del endófito (*Acremonium lolii*) en la tolerancia a la plaga *Listronotus bonariensis* de la ballica de rotación (*Lolium multiflorum*). XXII Reunión Anual SOCHIPA A.G., 29 al 31 de octubre de 1997, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. P 11-12.