

## MICOFILAS, ENDÓFITOS FÚNGICOS Y ALCALOIDES EN POBLACIONES DE *MELICA STUCKERTII* (POACEAE) DEL CENTRO DE ARGENTINA

CECILIA A. BENAVENTE<sup>1</sup>, MARCELA KURINA-SANZ<sup>2</sup> y MÓNICA A. LUGO<sup>1</sup>

**Summary:** Mycophyllas, fungal endophytes and alkaloids in populations of *Melica stuckertii* (Poaceae) from central Argentina. Poaceae stems are usually associated with Ascomycetes (Balansieae) forming symbiotic associations named mycophyllas. Grasses can not produce alkaloids by itself instead they have to be associated to fungal symbiont to yield them. *Melica stuckertii* is a native and widespread grass. The aims of this work were to study three *M. stuckertii* population from San Luis province (Argentina) taking into account frequency of colonization and alkaloids production. Fungal endophytes were isolated from axenic plantlets obtained from cariopses, and then they were cultured in solid potatoe glucose agar for taxonomic analysis. Alkaloids were found in axenic and field plants but not in fungal liquid culture. Among the studied grass population, frequency of colonization was of 100% suggesting the high performance of association. Fungal endophyte was identified as *Neotyphodium* sp. Alkaloids were produced only into the mycophylla and its biosynthesis could be synergical between host-fungus.

**Key words:** endophytes, *Neotyphodium*, central Argentine, semiarid grasslands, alkaloids, *Melica stuckertii*.

**Resumen:** Los vástagos de Poaceae pueden establecer con Ascomycetes (Balansieae) asociaciones simbióticas endofíticas denominadas micofilas. Las gramíneas no pueden sintetizar alcaloides en ausencia del endófito fúngico. *Melica stuckertii* Hack. es una Poaceae nativa de amplia distribución en el país. El objetivo de este trabajo fue estudiar tres poblaciones de *M. stuckertii* de San Luis (Argentina), considerando: la presencia y frecuencia de endófitos, la producción de alcaloides en la asociación y el simbiote fúngico. A partir de cariopsis se obtuvieron plántulas axénicas de las que se aisló el simbiote fúngico en medio sólido, siendo cultivado para su determinación taxonómica. Además, las plántulas axénicas se utilizaron para la determinación de alcaloides *in planta* y el aislamiento de endófito en medio líquido para la posterior detección de alcaloides *in fungus*. También se examinó la producción de alcaloides «en plantas a campo». *Melica stuckertii* resultó asociada formando micofilas con una frecuencia de colonización del 100 % en las tres poblaciones estudiadas. Las colonias obtenidas fueron blancoalgodonosas y de crecimiento lento, y el endófito aislado se determinó como *Neotyphodium* sp. Los alcaloides fueron detectados sólo en la simbiosis (plántulas axénicas y plantas a campo); así, su biosíntesis en *M. stuckertii* podría ser sinérgica.

**Palabras clave:** endófitos, *Neotyphodium*, Argentina Central, pastizales semiáridos, alcaloides, *Melica stuckertii*.

### INTRODUCCIÓN

La mayoría de las plantas superiores se encuentran asociadas simbióticamente con hongos, dando origen (generalmente) a una relación de carácter permanente y obligado (Schulz & Boyle, 2005). En estas interacciones el simbiote fúngico, denominado endófito fúngico, puede encontrarse en el vástago del hospedante estableciendo micofilas (Clay, 1990), o en los órganos de absorción formando micorrizas (Smith & Read, 1997).

En las micofilas, los endófitos pueden desarrollar todo su ciclo vital dentro del hospedante (inter- o intracelularmente) o parte del mismo puede manifestarse externamente. Estos simbioses pertenecen al grupo de los Ascomycetes (Hypocreales, Clavicipitaceae, tribus Balansieae y Clavicipiteae) y establecen simbiosis que fluctúan desde el mutualismo al antagonismo, desarrollando en sus hospedantes estrategias de vida que se conocen como del tipo I, II y III. En el tipo I, el endófito se reproduce sexualmente, formando sus fructificaciones en reemplazo de las flores, causando así la «castración» del vegetal. En el tipo II, el simbiote fúngico también se reproduce sexualmente,

<sup>1</sup>Diversidad Vegetal I, FQByF-UNSL, lugo@unsl.edu.ar

<sup>2</sup>Química Orgánica-INTEQUI CONICET-UNSL.

pero fructifica sobre la epidermis de sus hospedantes. En el tipo III, el endófito es de distribución sistémica y no se reproduce sexualmente, colonizando asintóticamente al hospedante; su propagación tiene lugar a través de hifas presentes en los óvulos de la planta (White, 1988; Clay, 1998; Clay & Schardl, 2002).

Las diferentes estrategias de vida (I, II y III) de los endófitos fúngicos presentan distintos niveles de especificidad con respecto a los taxones involucrados en la simbiosis. De tal manera, representantes de Poaceae, subfamilia Pooideae, tribu Meliceae, están asociados con hongos cuyas estrategias de vida son del tipo II ó III (Clay, 1990; Bacon & De Battista, 1991; White, 1987).

*Melica stuckertii* Hack. (Poaceae, Pooideae, Meliceae) es una especie nativa de Argentina y su distribución abarca las provincias del oeste, noroeste, norte, centro del país y Buenos Aires. En poblaciones de *M. stuckertii* de Córdoba se aislaron endófitos del vástago, considerando a esta especie como un hospedante frecuente (Lugo *et al.*, 1998).

El término alcaloide fue acuñado por el farmacéutico W. Meissner en 1819 y se aplica a metabolitos secundarios alcalinos que contienen nitrógeno, estando presentes en hojas, semillas, raíces y corteza de representantes de Papaveraceae, Fabaceae (Papilionoidea), Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae y Solanaceae (Gros *et al.*, 1985). Los alcaloides presentan gran diversidad estructural y múltiples actividades biológicas. Su biogénesis deriva de distintos metabolitos primarios nitrogenados como, por ejemplo: la ornitina (que origina los alcaloides del tropano, los pirrolidínicos y los pirrolizidínicos); la tirosina (que da lugar al grupo de los bencilisoquinolefínicos); la lisina (a partir de la que se forman los quinolizidínicos y piperidínicos); y del núcleo de la piridina y del triptofano (de los que derivan los alcaloides quinolínicos e indólicos). Si bien están restringidos a un número limitado de géneros de plantas, su biosíntesis no se circunscribe solo al reino vegetal, sino que algunos hongos y aún algunos animales poseen la capacidad bioquímica de producirlos. La presencia de alcaloides en Poaceae se debe a simbiontes fúngicos asociados parásitos (*Claviceps* y *Balansia*) y a endófitos fúngicos mutualistas (*Neotyphodium*) (Chapman, 1996).

Las micofilas son interacciones simbióticas predominantemente mutualistas, de una gran importancia ecológica y económica, debido a que el simbionte fúngico produce alcaloides del tipo de

lolitrem B, ergovalina y peramina, entre otros (Spiering *et al.*, 2005). Estos compuestos son beneficiosos para el hospedante en cuanto a su supervivencia, ya que invertebrados (Dahlman *et al.*, 1991; Schardl, 2001) y vertebrados herbívoros (Porter, 1994) evitan su ingesta (Bacon & De Battista, 1991). En un principio, se atribuía por completo al simbionte fúngico la síntesis de alcaloides, pero actualmente se considera que existe una interacción biosintética entre planta y endófito, lo que podría indicar un efecto sinérgico en los procesos bioquímicos necesarios para la síntesis de estos compuestos (Clay & Schardl, 2002).

En nuestro país, dentro de las gramíneas nativas conocidas como tóxicas para el ganado, se ha aislado el endófito fúngico *Neotyphodium tembladerae* Cabral & White (Cabral *et al.*, 1999) y se han determinado los alcaloides sintetizados por el simbionte, los que corresponderían a análogos de indol-diterpenos tremorgénicos (Miles *et al.*, 1998; Schardl *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo fue estudiar tres poblaciones de *M. stuckertii* de San Luis, considerando: la presencia y frecuencia de endófitos fúngicos en cada población, la producción de alcaloides en la micofila y en el simbionte fúngico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de muestreo

Se realizaron dos muestreos de *M. stuckertii*. En el primero (7/I/2005) se recolectaron plantas de una población (P1A) ubicada a orillas del dique La Florida, San Luis (S 33°06'34,3" y E 66°00'15,4"), a 1034 msnm.

En el segundo muestreo (16/XII/2006), realizado en la misma localidad, se recolectaron ejemplares de la población P1A (denominada P1B) y de otras dos más, llamadas P2 (S 33° 07'17,1" y E 66° 00'23,3") y P3 (S 33° 07'16,72" y E 66°00'45,5"), a 1036 msnm y 1038 msnm, respectivamente.

### Detección y aislamiento del endófito fúngico

Se utilizaron cuatro vástagos de P1A que fueron tomados al azar, colocados en bolsas de papel y conservados en heladera a 4° C. Para detectar la presencia de los endófitos se observaron 5 cañas de cada planta, las que fueron cortadas y teñidas con azul de anilina siguiendo a Clarck *et al.* (1983).

Para el aislamiento del endófito en medio sólido se utilizaron láminas y vainas de plántulas axénicas

obtenidas a partir de cariopsis, las que fueron esterilizadas en superficie (Schulz *et al.*, 1993) y sembradas en cámara de flujo laminar en frascos con arena (previamente esterilizados), que se mantuvieron a  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  y luz ambiental. Las plántulas de 15-20 días de edad fueron extraídas en esterilidad y se comprobó la presencia del simbionte en láminas y vainas siguiendo a Clarck *et al.* (1983). Los medios de cultivo utilizados fueron agar papa glucosa (APG) y agar extracto de malta (AEM) preparados con cloranfenicol al 0,05% (Bacon & White, 1994). Se realizaron dos experiencias de aislamiento: en la primera, se utilizaron 80 cajas de Petri con APG, y en la segunda, se usaron 70 cajas con APG y 40 con AEM; todas las cajas se mantuvieron en ambiente fresco y oscuro durante dos meses. El inóculo obtenido (inóculo primario) se utilizó para la detección de alcaloides y para la determinación taxonómica del endófito fúngico.

#### *Determinación taxonómica del endófito fúngico*

Cada cepa obtenida se transfirió, tomando porciones de 2 x 2 mm, a 6 cajas de Petri de 5 cm de diámetro con APG y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente.

Los cultivos fueron controlados cada 3-7 días durante 1 mes, observándose el diámetro, color, reverso, margen y textura; los datos obtenidos se utilizaron para la posterior determinación taxonómica del endófito fúngico (White, 1994). Por otro lado, una réplica en APG de cada cultivo se conservó como referencia en heladera a  $4^\circ \text{C}$ .

#### *Frecuencia de colonización*

Para calcular la frecuencia de colonización (Clay & Leuchtmann, 1989) se observaron cañas de todas las plantas.

#### *Detección de compuestos alcaloidales del simbionte fúngico*

Fragmentos de 2 x 2 mm de cada cultivo de inóculo primario se transfirieron a medio líquido M102 (Bacon & White, 1994) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 semanas en agitador orbital a 120 rpm; el medio M102 se utilizó con y sin la adición de cloranfenicol, siguiendo un procedimiento modificado a partir de Parrott (1994). A los 15 días de desarrollo, la biomasa fúngica fue separada del medio de cultivo por filtración al vacío. Por otro lado, el micelio fue

lavado con solventes de extracción de alcaloides, agregándose esta fase líquida al medio de cultivo filtrado; todo esto fue sometido a extracción con AcOEt (X3), luego con MeOH (X3) y finalmente con agua acidificada con HCl. Los extractos orgánicos fueron concentrados al vacío y el extracto acuoso ácido fue fraccionado con  $\text{CHCl}_3$ ; la fase acuosa residual fue alcalinizada con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , posteriormente extraída con  $\text{Cl}_3\text{CH}$  y luego concentrada. Paralelamente, el líquido fue fraccionado con AcOEt (X3), luego con MeOH, alcalinizado y finalmente extraído con  $\text{Cl}_3\text{CH}$ . Cada extracto fue analizado por cromatografía en capa delgada en sílica gel, utilizando como solvente de corrida BuOH-AcOH- $\text{H}_2\text{O}$  (60:20:20) y mezcla de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (65:35:8). Los compuestos alcaloidales fueron revelados con Iodo-platinato y una réplica del extracto se trató con reactivo de Dragendorff. En todas las placas cromatográficas realizadas se utilizaron patrones de alcaloides conocidos (nicotina, berberina y quinina) como testigos de revelado.

#### *Presencia de alcaloides en plántulas micofilicas axénicas*

Se realizó una segunda siembra de cariopsis de P1A en las condiciones ya descritas y con las plántulas micofilicas obtenidas se procedió a detectar la presencia de alcaloides. Para ello, se cortaron las mismas en fragmentos, se colocaron en AcOEt, se sometieron a ultrasonido durante 20 minutos y se maceraron por 72 horas; el macerado se centrifugó y el sobrenadante fue procesado para la extracción de alcaloides. El precipitado vegetal se sometió a una segunda extracción con MeOH y finalmente con agua ácida, siguiendo el procedimiento extractivo y cromatográfico descrito en el ítem anterior.

#### *Presencia de alcaloides en plantas micofilicas a campo*

Todas las plantas recolectadas en el segundo muestreo se secaron a temperatura ambiente, en un lugar seco y oscuro. Con este material se procedió a la detección del simbionte fúngico según Clarck *et al.* (1983) y a la extracción de alcaloides siguiendo el procedimiento señalado anteriormente para plántulas micofilicas axénicas y para el endófito en medio líquido. Los diferentes extractos de cada población fueron analizados por cromatografía como ya fue

descrito.

## RESULTADOS

### *Detección del endófito*

Todas las plantas de las poblaciones estudiadas resultaron colonizadas por endófitos fúngicos y su frecuencia de colonización fue del 100 %.

### *Aislamiento del endófito fúngico*

En el primer aislamiento (cajas de Petri) de inóculo primario, se desarrollaron colonias en 6 cajas (todas a partir de láminas). En el segundo aislamiento (110 cajas), se obtuvieron 8 colonias (1 de lámina y 7 de vaina). Estos resultados se registraron a los 2 meses de cultivo.

De estos cultivos se escogieron cuatro cepas aisladas de vainas (denominadas CB 1, CB 2, CB 3 y CB 4) y se cultivaron en APG para su posterior caracterización morfo-anatómica. Los datos obtenidos en relación al diámetro se muestran en la Fig. 1.

### *Caracterización morfológica del endófito fúngico*

Las colonias de endófitos de los aislamientos cultivados presentaron aspecto algodonoso, levemente afelpado, de color blanquecino, son inodoras, elevadas centralmente, de márgenes ondulados y reverso claro y continuo, sin gúttulas o exudados.

El diámetro a los 22 días de las colonias de las cuatro cepas en APG fue de 7 a 9 mm y su crecimiento fue lento (Fig. 1).

### *Detección de compuestos de naturaleza alcaloidal*

A partir del análisis cromatográfico no se observaron compuestos de naturaleza alcaloidal en los extractos provenientes del simbiote. Contrariamente, los dos reveladores específicos utilizados evidenciaron la presencia de metabolitos alcaloidales en las fracciones orgánicas polares (MeOH) provenientes del cultivo *in-vitro* de plántulas micofílicas y de plantas silvestres.

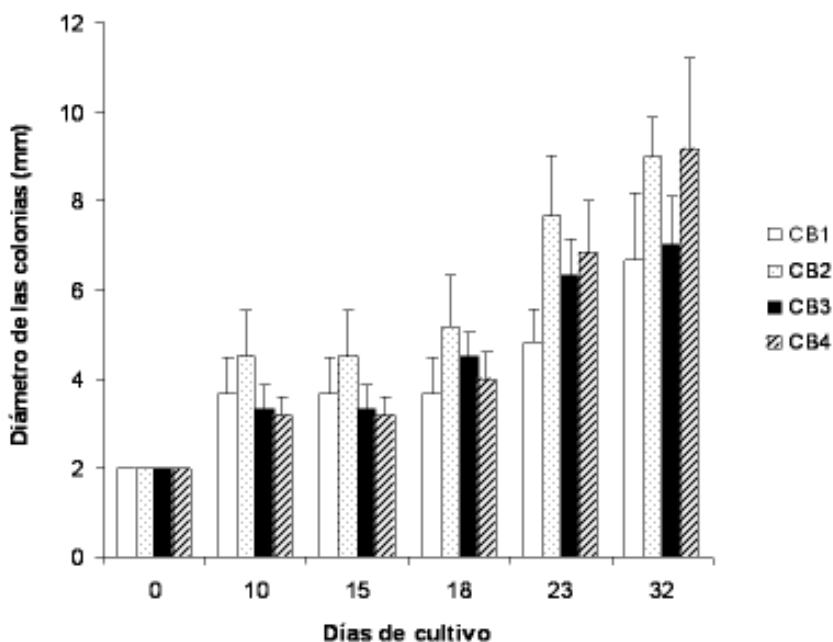


Fig. 1. Crecimiento de las colonias (diámetro medido en mm) a lo largo del tiempo de cultivo (0, 10, 15, 18, 23, 32 días) en APG. Los datos corresponden a la media de seis réplicas (n=6)  $\pm$  el error estándar. Las cepas cultivadas se denominan CB1, CB2, CB3 y CB4.

## CONCLUSIONES

La frecuencia de colonización (100 %) de los endófitos fúngicos de las tres poblaciones estudiadas, supera los valores hallados en poblaciones cordobesas de *Melica stuckertii* (Lugo *et al.*, 1998). La morfología de colonización, que corresponde al tipo III (White, 1988; White *et al.*, 1993), coincide con lo reportado por Lugo *et al.* (1998). Es de destacar que este tipo de colonización es característica del Hemisferio Sur para las Pooideae de zonas templadas, como fuera reportado por Cabral & Lugo (1993, 1994), Cabral *et al.* (1999), Lugo *et al.* (1998), Miles *et al.* (1998), Moon *et al.* (2002) y Morgan-Jones *et al.* (1990), y para las Panicoideae de ambientes tropicales (White *et al.*, 1990).

El alto porcentaje de colonización tipo III que se encontró en poblaciones de *M. stuckertii* de San Luis, sugiere una ventaja selectiva para este tipo de relación. La producción sinérgica (planta-hongo) de alcaloides, le otorgaría al hospedante resistencia a la herbivoría y, en particular, al ataque de insectos (Clay & Schardl, 2002).

El endófito aislado se determinó como *Neotyphodium* sp. (Ascomycetes, Balansieae) de acuerdo a las características morfológicas de las colonias obtenidas y por la baja tasa de crecimiento de las mismas. El diámetro de las cepas cultivadas en APG, a los 22 días, fue de 7-9 mm, siendo estos valores menores a los reportados por Gentile *et al.* (2005) para el endófito aislado de *M. stuckertii* (19,2 mm a los 21 días) de la localidad de Capilla del Monte (Córdoba). Asimismo, Lugo (datos no publicados) aisló endófitos fúngicos del mismo hospedante y lugar, encontrando diferencias macro- y microscópicas con aquellas cepas. Así, colonias de 21 días cultivadas en APG tuvieron un diámetro promedio de 30,6 mm y por sus características microscópicas (estructuras fértiles: fiálides y conidios) se consideró al endófito como *Acremonium* (= *Neotyphodium*) aff. *typhinum* (Glenn *et al.*, 1996); por otro lado, cepas aisladas por Lugo (datos no publicados) de *M. stuckertii* de las localidades cordobesas de Copina y Candonga, no formaron estructuras fértiles y los diámetros de las colonias (9 y 9, 83 mm, respectivamente) a igual tiempo y en el mismo medio de cultivo resultaron similares a las aisladas de las poblaciones puntanas de *M. stuckertii*. De las especies sudafricanas *Melica racemosa* y *M. decumbens*, Moon *et al.* (2002) aislaron el endófito *Neotyphodium melicicola* C. C. Moon et C. L. Schardl, y Gentile *et al.* (2005)

determinaron al endófito de *M. stuckertii* de Capilla del Monte como *N. tembladearae* D. Cabral et J. F. White; estas especies no pudieron ser comparadas con las cepas de San Luis debido a que las mismas no desarrollaron estructuras fértiles.

Si bien aunque varios de los endófitos asexuales (Clay & Schardl, 2002) y los simbioses fúngicos de las especies sudafricanas de *Melica* (Moon *et al.*, 2002) y el endófito *N. tembladearae* asociado a *M. stuckertii* de Capilla del Monte (Gentile *et al.*, 2005) son híbridos, los simbioses obtenidos de *M. stuckertii* de San Luis podrían no serlo, debido a su lento crecimiento en cultivo (Clay & Schardl, 2002). Futuros estudios moleculares sobre endófitos aislados de distintas poblaciones de *M. stuckertii* (incluyendo las aquí analizadas), podrán aportar valiosa información sobre la ubicación taxonómica del simbionte o los simbioses fúngicos de este hospedante y el origen de las asociaciones endofíticas asexuales que, hasta el momento, presentan distribución austral.

En la micofila estudiada (*M. stuckertii*-*Neotyphodium* sp.) los alcaloides fueron detectados sólo en la simbiosis, tanto en plántulas axénicas como en plantas a campo; así, su biosíntesis en *M. stuckertii* podría ser un proceso sinérgico planta-hongo. La mayoría de las micofilas de transmisión maternal o por cariopsis, entre ellas las del tipo III (presente en *M. stuckertii*), producen alcaloides del tipo lolitrem B, ergovalina y peramina, entre otros (Spiering *et al.*, 2005). La síntesis de alcaloides ocurre tanto en la simbiosis planta-hongo como también en el endófito aislado en cultivo, aunque los alcaloides del tipo lolinas sólo se producen en la asociación *Neotyphodium lolii*-hospedante (Clay & Schardl, 2002; Porter, 1994). Así, la presencia de alcaloides en la micofila estudiada no es una excepción; aunque la ausencia de alcaloides en el hongo aislado difiere de lo conocido hasta el momento, podría estar relacionado al grado de hibridización del simbionte fúngico (Clay & Schardl, 2002) o a la escasa biomasa de micelio utilizado en su detección (Ball *et al.*, 1995).

Los pastos nativos *Festuca argentina*, *F. hyeronimi* y *Poa huecu*, tóxicos para el ganado, están asociados con *Neotyphodium tembladearae* (Cabral *et al.*, 1999) y los alcaloides que producen son análogos de indol diterpenoides tremorgénicos (Miles *et al.*, 1998; Schardl *et al.*, 2006). Hasta el momento, *M. stuckertii* no fue reportada como una gramínea tóxica para el ganado; esta aparente inocuidad, conjuntamente con el tipo de asociación observado

(III), permite especular que él o los alcaloides detectados en la micofila *M. stuckertii-Neotyphodium* sp. podrían pertenecer al grupo de las lolinas, compuestos con alto poder insecticida, vermífugo y antifúngico, pero que en las concentraciones presentes *in planta* no resultan tóxicas para mamíferos herbívoros (Clay & Schardl, 2002). Estudios posteriores permitirán aislar y caracterizar a los alcaloides detectados en la micofila analizada.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se realizó en el marco de los proyectos PROIPRO 2-0302 y PROICO 7301 ambos financiados por la FQBYF (UNSL). Las autoras agradecen especialmente a los estudiantes de la Lic. en Cs. Biológicas P. G. Giordano y A. Ochoa y al Biól. Esteban M. Crespo, que colaboraron en la recolección de las plantas, y al Bqco. F. Bisogno y a la Lic. M. Ferrari por su asistencia técnica. M. L. dedica este trabajo a la memoria del recientemente fallecido Dr. Daniel Cabral, en agradecimiento por sus enseñanzas.

## BIBLIOGRAFÍA

- BACON, C. W. & J. DE BATTISTA. 1991. Endophytic fungi of grasses. In: ARORA, D. K., B. RAI, K. G. MUKERJI & G. R. KNUDSEN (eds.), *Handbook of Applied Mycology, Soil and Plants*, pp. 231-255. Vol.1. Marcel Dekker, New York.
- BACON, C. W. & J. F. WHITE Jr. 1994. Stains, media, and procedures for analyzing endophytes. In: *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*, pp. 47-56. CRC Press, Tokyo.
- BALL, O. J. P., R. A. PRESTIDGE & J. M. SPROSEN. 1995. Interrelationships between *Acremonium lolii*, Peramine, and Lolitrem B in perennial ryegrass. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1527-1533.
- CABRAL, D. & M. A. LUGO. 1993. Los endófitos de *Festuca hieronymi* y *Poa huecu*: dos plantas autóctonas tóxicas para el ganado. VI Congreso de Micología y XVI Jornadas Argentinas de Micología, Buenos Aires.
- CABRAL, D. & M. A. LUGO. 1994. Los endófitos fúngicos en Gramíneas de Argentina. VI Congreso Latinoamericano de Botánica, Mar del Plata.
- CABRAL, D., M. J. CAFARO, P. V. REDDY, M. A. LUGO & J. F. WHITE Jr. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia* 91: 315-325.
- CHAPMAN, G. P. 1996. Grass Diversity. In: *The Biology of Grasses*, pp. 14-35. CAB International, Oxon.
- CLARCK, E. M., J. F. WHITE Jr. & R. M. PATTERSON. 1983. Improved histochemical technique for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue and methods of *in vitro* culture of fungus. *J. Microbiol.*

*Meth.* 1: 149-155.

- CLAY, K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Annual Rev. Ecol. Syst.* 21: 275-297.
- CLAY, K. 1998. Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses. In: CHEPLICK, G. P. (ed.), *Population Biology of Grasses*, pp. 255-285. Cambridge University Press, Cambridge.
- CLAY, K. & A. LEUCHTMANN. 1989. Infection of woodland grasses by fungal endophytes. *Mycologia* 81: 805-811.
- CLAY, K. & C. SCHARDL. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Amer. Naturalist* 100: S100-S127.
- DAHLMAN, D. L., H. EICHENSEER & M. R. SIEGEL. 1991. Chemical perspectives on endophyte-grass interactions and their implications to insect herbivory. In: *Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interaction*, pp. 227-252. John Wiley & Sons Inc., New York.
- GENTILE, A., M. S. ROSSI, D. CABRAL, K. D. CRAVEN & C. L. SCHARDL. 2005. Origin, divergence, and phylogeny of *Epichloë* endophytes of native Argentine grasses. *Molec. Phylogenet. Evol.* 35: 196-208.
- GLENN, A. E., C. W. BACON, R. PRICE & T. HANLIN. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88: 369-383.
- GROS, E. G., A. B. POMILIO, A. M. SELDES & G. BURTON. 1985. *Introducción al estudio de los productos naturales*. Secretaría General de la organización de los Estados Americanos, Washington DC.
- LUGO, M. A., A. M. ANTON & D. CABRAL. 1998. Presencia y distribución de micofilas en gramíneas de Argentina. *Anales Jard. Bot. Madrid.* 56: 15-22.
- MILES, C. O., M. E. DI MENNA, S. W. JACOBS, I. GARTHWAITE, G. A. LANE, R. A. PRESTIDGE, S. L. MARSHALL, H. H. WILKINSON, C. L. SCHARDL, O. J. P. BALL & G. C. M. LATCH. 1998. Endophytic fungi in indigenous australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 601-606.
- MOON, C. D., C. O. MILES, U. JÄRLEFORS & C. L. SCHARDL. 2002. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. *Mycologia* 94: 694-711.
- MORGAN-JONES, G., J. F. WHITE Jr. & E. L. PIONTELII. 1990. Endophyte-host associations in forage grasses. XIII. *Acremonium chilense*, an undescribed endophyte occurring in *Dactylis glomerata* in Chile. *Mycotaxon* 39: 441-454.
- PARROTT, W. A. 1994. *In vitro* approaches for the study of *Acremonium-Festuca* biology. In: BACON, C. W. & J. F. WHITE Jr. (eds.), *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*, pp. 37-46. CRC Press, London, Tokio.
- PORTER, J. K. 1994. Chemical constituents of grass

- endophytes. In: BACON, C. W. & J. F. WHITE Jr. (eds.), *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*, pp. 103-123. CRC Press, London, Tokio.
- SCHARDL, C. L. 2001. *Epichloe festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal Genet. Biol.* 33: 69-82.
- SCHARDL, C. L., J. D. BLANKENSHIP, C. MACHADO & M. J. SPIERING. 2006. Essay 13.4. Alkaloid-making fungal symbionts. In: TAIZ, L. & E. ZEIGER (eds.), *Plant Physiology - on line*.
- SCHULZ, B., U. WANKE, S. DRAEGER & H. J. AUST. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.* 97: 1447-1450.
- SCHULZ, B. & C. BOYLE. 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 10: 661-686.
- SMITH, S. E. & D. J. READ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokio, Toronto.
- SPIERING, M. J., G. A. LANE, M. J. CHRISTENSEN & J. SCHMID. 2005. Distribution of the fungal endophyte *Neotyphodium lolii* is not a major determinant of the distribution of fungal alkaloids in *Lolium perenne* plants. *Phytochemistry* 66: 195-202.
- WHITE, J. F. Jr. 1987. Widespread distribution of endophytes in the Poaceae. *Plant Dis.* 71: 340-342.
- WHITE, J. F. Jr. 1988. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. *Mycologia* 80: 442-446.
- WHITE, J. F. Jr. 1994. Taxonomic relationships among the members of the Balansieae (Clavicipitales). In: BACON, C. W. & J. F. WHITE Jr. (eds.), *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*, pp. 3-20. CRC Press, London, Tokio.
- WHITE, J. F. Jr., A. C. MORROW & G. MORGAN-JONES. 1990. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. *Mycologia* 82: 218-226.
- WHITE, J. F. Jr., G. MORGAN-JONES & A. C. MORROW. 1993. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agric. Ecosyst. Environ.* 44: 13-37.

Recibido el 17 de Diciembre de 2007, aceptado el 11 de Julio de 2008.