

## DIVERSIDAD TAXONÓMICA DE HONGOS ENDÓFITOS *Epichloë/Neotyphodium* EN *Lolium perenne* DE DISTINTOS HÁBITATS

TAXONOMIC DIVERSITY OF *Epichloë/Neotyphodium* ENDOPHYTES OF *Lolium perenne* IN DIFFERENT GRASSLAND HABITATS

M.C. SOTO-BARAJAS, B.R. VAZQUEZ DE ALDANA E I. ZABALGOGEAZCOA

Instituto de Recursos Naturales y -Agrobiología de Salamanca (IRNASACSIC). Cordel de Merinas 40-52; 37008 Salamanca; España. [carlos.soto@irnasa.csic.es](mailto:carlos.soto@irnasa.csic.es)

### RESUMEN

*Lolium perenne* se encuentra frecuentemente asociada con hongos endófitos de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* (E/N) que producen metabolitos secundarios que, en determinadas concentraciones, pueden generar problemas de toxicidad en el ganado. Existen diferencias genéticas entre especies fúngicas e individuos de la misma especie con respecto a su capacidad de producir alcaloides. Con la finalidad de identificar la diversidad taxonómica de endófitos E/N en poblaciones naturales de *L. perenne*, se examinaron 378 plantas procedentes de ocho localidades diferentes (desde pastos de dehesa a pastos en zonas costeras). Se observó una incidencia promedio de infecciones endofíticas del 38%, variable de 14% a 62% entre poblaciones. Utilizando cultivos puros se procedió a una clasificación taxonómica basada en morfología y secuencias nucleotídicas parciales de la región ITS de ADN ribosómico y del gen de  $\beta$ -tubulina, con lo que fue posible identificar la existencia de al menos cuatro grupos fenotípicos y genotípicos diferentes entre los endófitos E/N aislados.

**Palabras clave:** pastos, raigrás, diversidad de endófitos, variabilidad morfológica, identificación genética.

### SUMMARY

*Lolium perenne* is often associated with fungal endophytes of the genera *Epichloë* and *Neotyphodium* (E/N). Endophytes produce secondary metabolites as a mean of natural protection against herbivores but can cause toxicity problems in livestock. In order to identify the taxonomic diversity of E/N endophytes in natural populations of *L. perenne*, 378 plants from eight different locations were examined (from dehesa grasslands to pastures in coastal areas). We found an average endophyte incidence of 38%, ranging from 12% to 60%. Pure cultures of the E/N endophytes isolated were used to classify them based on morphological features and on partial nucleotide sequences of the ITS region of ribosomal DNA and the  $\beta$ -tubulin gene. It was possible to identify at least four different phenotypic and genotypic groups between the E/N endophytes isolated.

**Key words:** grasses, raygrass, diversity of endophytes, morphologic variability, genetic identification.

## INTRODUCCIÓN

El raigrás (*Lolium perenne* L.) es la especie forrajera más utilizada en Europa, debido a su amplia distribución ecológica (Peeters, 2004). Gran parte de esa adaptabilidad podría deberse a la asociación simbiótica que establece con hongos de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium* (E/N) (Gibert et al., 2012). Así, en Nueva Zelanda, las praderas de *L. perenne* no persisten sin el endófito *Neotyphodium lolii* ya que el hongo protege a la planta del ataque de un insecto (Easton et al. 2001). Las especies sexuales de los hongos *Epichloë* y sus anamorfos *Neotyphodium*, se encuentran entre los microorganismos denominados endófitos, en virtud de que durante su etapa de crecimiento vegetativo establecen asociaciones asintomáticas con las plantas. El endófito obtiene una provisión de nutrientes y un medio de diseminación a través de las semillas del huésped, al cual confiere dos beneficios principales: aumento de la resistencia a estrés biótico y abiótico y defensa contra la depredación (Clay y Schardl, 2002). Ambos efectos son promovidos por la producción de compuestos biológicos activos, que pueden provocar efectos tóxicos sobre el ganado (Clay y Schardl, 2002).

Aún cuando en Europa los informes sobre casos de toxicosis son poco frecuentes, es importante tener conocimiento sobre la presencia y el tipo de hongos en pastos para evaluar posibles riesgos en producción

animal. Según Arnold (2007) la abundancia, diversidad, y composición de endófitos está influenciada por su microhábitat y en cultivos de hongos puros se han encontrado diferencias genéticas, variación morfológica y bioquímica entre colonias de la misma especie (Bony et al., 2001). Estos hechos deben considerarse en el contexto de la dependencia ambiental de las comunidades de endófitos y los retos implícitos en estimar su diversidad genética.

Actualmente existen variedades de *L. perenne* inoculadas con endófitos que no producen alcaloides tóxicos para mamíferos, y que además contribuyen a una mejor productividad, persistencia, resistencia a plagas y adaptación a zonas marginales (Bouton y Easton, 2005). El objetivo de este trabajo fue identificar la abundancia y diversidad taxonómica de endófitos *Epichloë/Neotyphodium* en poblaciones naturales de *L. perenne*. Supone un primer paso fundamental para determinar en futuras investigaciones su perfil de alcaloides y seleccionar aquellos aislados con potencial agrícola comercial para la mejora de esta gramínea.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestreo de plantas

Se recogieron plantas silvestres de *Lolium perenne* de varios hábitats ubicados en ocho diferentes localidades del NW de España (Tabla I).

Tabla 1. Ubicación y otras características de las localidades de muestreo de *Lolium perenne*.

Localidad	Provincia	Hábitat	Altitud	Número de plantas
Cedeira	Coruña	Costa, monte de eucalipto	62	51
Ciudad Rodrigo	Salamanca	Ribera	625	25
La Vecilla	León	Tierra de cultivo	879	49
Los Valles	Salamanca	Dehesa	813	50
Montemayor	Salamanca	Monte de castaño	628	50
Porqueriza	Salamanca	Dehesa	807	50
Tábara	Zamora	Monte de roble	766	50
Valle Fuentes	León	Monte bajo	1133	53

A final de la primavera y principio del verano de 2012, se recogieron un total de 378 plantas y se trasplantaron a macetas que actualmente se mantienen en un recinto abierto en el IRNASA-CSIC (Salamanca). En algunos de los ejemplares se observaron estromas característicos de infección por *Epichloë typhina* (Pers.) Tul. y C. Tul.

#### Aislamiento e identificación de endófitos

El aislamiento de los endófitos *E/N* de *L. perenne* se inició con el corte de fragmentos de 4 – 5 mm de longitud del tallo que fueron desinfectados superficialmente durante 10 minutos con una solución de lejía comercial al 20% (1% de cloro activo). A continuación se enjuagaron con agua destilada estéril para colocar 15 – 20 fragmentos en placas de Petri con agar de patata y dextrosa (PDA) con 200 mg l<sup>-1</sup> de cloranfenicol. La presencia de hongos endófitos *E/N* se determinó por observación directa considerando

el tiempo de emergencia y las características de crecimiento del micelio. Las colonias de endófitos *E/N* se caracterizan porque el micelio surge aproximadamente al mismo tiempo (después de cinco días) en todos los fragmentos y son de color claro. Aquellas colonias con crecimiento más rápido (2 - 3 días) y otras características morfológicas fueron eliminadas de las placas. Las colonias identificadas como posibles endófitos *E/N* se transfirieron a placas de PDA para observar su desarrollo morfológico, descartar falsos positivos y proceder a su clasificación e identificación.

En el proceso de identificación taxonómica de aislados de endófitos *E/N*, se recurrió a la observación de caracteres morfológicos y a análisis moleculares. En una primera etapa las características morfológicas que se observaron en el medio de cultivo fueron: la velocidad de crecimiento, la forma del cultivo, el color del micelio y su esporula-

ción. Como segundo paso se utilizaron las secuencias nucleotídicas parciales de la región ITS1-5.8S-ITS2 (Innis *et al.*, 1990) y del gen de  $\beta$ -tubulina (*tub2*) (Gentile *et al.*, 2005), que permiten agrupar aislados pertenecientes al mismo taxón.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Incidencia de endófitos en poblaciones de *L. perenne*

El inicio de la emergencia de endófitos *E/N* en fragmentos de planta, varió desde cinco hasta más de 30 días. Se consideraron “positivas” las plantas en las que, a partir del fragmento de planta en PDA, se desarrolló micelio con las características antes indicadas (Materiales y Métodos). En todas las poblaciones muestreadas se observó la presencia de endófitos *E/N*. Se detectaron 137 plantas con endófitos *E/N*, lo que representa un 38,1% del total de plantas analizadas. La incidencia fue variable entre poblaciones, desde el 14% en Montemayor hasta el 62% en Los Valles (Tabla 2). En estudios similares realizados por Lewis *et al.* (1997) se indican por-

centajes entre 1% y 50% en 523 poblaciones de raigrás en Europa.

### Clasificación morfológica

Se obtuvieron 144 aislados de endófitos *E/N* de las 137 plantas infectadas, debido a que en siete de estas se detectaron coinfecciones. La presencia de dos endófitos en una misma planta es un hecho poco frecuente (Paňka *et al.*, 2013). La clasificación ha dado lugar a tres grupos morfológicos bien diferenciados y un grupo mixto (Figura 1): grupo M1: colonias de color blanco, con la menor tasa de crecimiento, agregación del micelio en forma de cerebro; M2: color blanco, el de mayor tasa de crecimiento, abundante micelio superficial en forma algodonosa; M3: de color marrón claro, con una velocidad de crecimiento intermedio y escaso desarrollo de micelio superficial; MN: es un conjunto de aislados con morfotipos diferentes a los descritos, algunos son morfológicamente inestables a través del tiempo; similares en tiempo de emergencia y tipo de micelio a los grupos anteriores.



Figura 1. Colonias representativas de la morfología de endófitos *Epichloë/Neotyphodium* aislados de *Lolium perenne*.

La aparentemente menor diversidad morfológica aquí descrita (Figura 1), en comparación a la indicada por otros autores (Bony *et al.*, 2001) se debe a que el conjunto referido como MN, engloba varios aislados con plasticidad fenotípica en su forma de crecimiento en PDA, comportamiento común entre hongos aislados de medios naturales que crecen en medios sintéticos (Slepecky y Starmer, 2009). Sin embargo, es un factor a tener en cuenta debido a que las características morfológicas podrían estar relacionadas con el perfil de alcaloides producidos (Bony *et al.*, 2001).

La morfología dominante entre los aislados fue la correspondiente al grupo M1 (44,4% de las colonias), y el grupo morfológico con menor presencia fue el M2 (15,9%) (Tabla 2). De las plantas en que se detectó

doble infección se obtuvieron endófitos con morfologías M1 y M3. La totalidad de los aislados de las plantas con estromas en el momento del muestreo pertenecieron al grupo M2.

En todas las localidades se encontraron endófitos con al menos dos morfotipos diferentes (Tabla 2). La mayor variabilidad morfológica fue en pastos de dehesas (Los Valles y Porqueriza), en las que se encontraron los cuatro morfotipos. Según Lewis *et al.* (1997), altos niveles de infección en *Lolium* corresponden a zonas donde el estrés debido a la sequía estival es frecuente. En estas condiciones, la presencia de vegetación con endófitos es mayor al ser estas plantas las que toleran mejor la situación de estrés hídrico en comparación con el pasto sin endófitos.

Tabla 2. Agrupación morfológica por localidad de muestreo de las colonias de endófitos *E/N* aislados en *Lolium perenne*.

Localidad	Morfología <sup>†</sup>				Incidencia de hongos endófitos <i>Epichloë/Neotyphodium</i>	
	M1	M2	M3	MN	Número de plantas	(%)
	Número de aislados					
Cedeira	5	0	0	4	9	17,6
Ciudad Rodrigo	3	6	6	0	15	60,0
La Vencilla	17	1	0	4	22	44,9
Los Valles	12	12	2	5	31	62,0
Montemayor	3	0	0	4	7	14,0
Porqueriza	4	4	4	4	16	32,0
Tábara	12	0	14	1	27	54,0
Valle Fuentes	8	0	4	5	17	32,1
<b>Total:</b>	64	23	30	27	144	-
<b>Porcentaje (%):</b>	44,4	16,0	20,8	18,8	100	38,1

<sup>†</sup>Descripción morfológica: M1= color blanco, crecimiento lento, forma de cerebro; M2= color blanco, crecimiento rápido, micelio superficial algodonoso; M3= color marrón claro, crecimiento lento, micelio superficial escaso; MN= sin morfología definida.

### Clasificación genética

Una primera aproximación para la clasificación taxonómica de los endófitos aislados se hizo en base a la similitud de las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 y del gen de  $\beta$ -tubulina (*tub2*) con otras presentes en la base de datos Genbank. Con este fin se utilizó el programa BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). En ambos casos se corroboró la pertenencia de la totalidad de los aislados a dos géneros: (a) individuos similares al género *Epichloë* (*E. typhina* y *E. festucae*) con morfotipos M1, M2, M3 y MN o (b) más cercanos al género *Neotyphodium* (*N. lolii* y *N. coenophialum*), aislados con morfología M1 y M3. Aunque hay una relación genética estrecha entre *E. festucae* y *N. lolii* no hay

informes sobre la presencia del primero de estos en *L. perenne* (van Zijll *et al.*, 2008). Para un estudio filogenético más detallado y corroborar una relación entre la morfología en PDA y la genética de los endófitos *E/N* aislados, se construyeron árboles filogenéticos con 33 secuencias parciales, tanto de la región ITS como del gen de  $\beta$ -tubulina (*tub2*). Las secuencias se seleccionaron de forma aleatoria entre los endófitos de los grupos morfológicos M1, M2 y M3, excluyéndose los aislados MN debido a su inestabilidad.

El árbol filogenético construido con datos moleculares generó cuatro grupos genéticos: G1, G2a, G2b, y G3 (Figura 2). Se encontró una relación directa entre genotipo y fenotipo de los aislados con morfología M1 y M3. Los endófitos del grupo G2a con morfología M2 corresponden a *Epichloë typhina*.

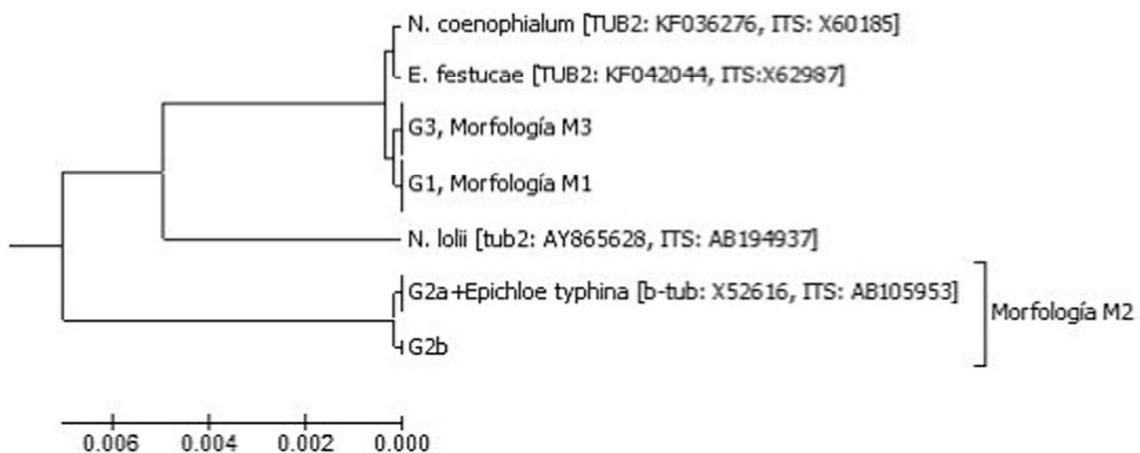


Figura 2. Árbol filogenético basado en la agrupación de las secuencias parciales de la región ITS y del gen de  $\beta$ -tubulina (*tub2*). Incluyen 4 secuencias de referencia de *Epichloë typhina*, *E. festucae*, *Neotyphodium lolii* y *N. coenophialum*. Entre corchetes se indica el número de accesoión de la base de datos GenBank.

Sin embargo, para una clasificación taxonómica a nivel de especie de los grupos G1, G2b, G3 y los de morfología MN, se requiere del uso de otras técnicas de identificación debido a su cercanía taxonómica y la posible existencia de híbridos entre los endófitos *E/N* aislados.

La producción de determinados alcaloides está controlada de forma genética (Young *et al.*, 2005), por lo que entre los endófitos obtenidos probablemente se encuentren diferencias en el perfil de alcaloides. Además, Rasmussen *et al.*, (2007) indican que su concentración estaría vinculada particularmente con la abundancia de micelio *in planta*, factor relacionado con el patrón de desarrollo morfológico del endófito.

## CONCLUSIONES

La incidencia de endófitos *E/N* en poblaciones naturales de *Lolium perenne* es variable, con 38,1% en promedio. En vista de los resultados obtenidos de la clasificación morfológica y de los datos genéticos de endófitos *E/N*, con más de cuatro grupos diferentes, podríamos considerar que estos hábitats contienen variabilidad suficiente para su utilización como germoplasma en investigaciones futuras cuyo objetivo sea seleccionar colonias con un perfil de alcaloides adecuado para la mejora de cultivares de *L. perenne* utilizados en pastizales y céspedes.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es parte del proyecto AGL2011-22783 financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad. MCSB cuenta con una beca de doctorado concedida por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD A.E. (2007) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 51–66.

BONY S., PICHON N., RAVEL C., DURIX A., BALFOURIER F. Y GUILLAUMIN J. J. (2001) The relationship between mycotoxin synthesis and isolate morphology in fungal endophytes of *Lolium perenne*. *New Phytologist*, 152 (1), 125–137.

BOUTON, J. Y EASTON S. (2005) Endophytes in forage cultivars. En: Roberts C.A. *et al.* (eds.) *Neotyphodium in cool-season grasses, current research and applications*, pp. 327–340. Oxford, Reino Unido: Blackwell Publications.

CLAY K. Y SCHARDL C. (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, 160(4), S99–S127.

EASTON H.S., CHRISTENSEN M.J., EERENS J.P.J., FLETCHER L.R., HUME D.E.

KEOGH R.G. (2001) Ryegrass endophyte: a New Zealand Grassland success story. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 63, 37–46.

GENTILE A., ROSSI M.S., CABRAL D., CRAVEN K.D. Y SCHARDL C.L. (2005) Origin, divergence, and phylogeny of epichloë endophytes of native Argentine grasses. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 35(1), 196–208.

GIBERT A., VOLAIRE F., BARE P. Y HAZARD L. (2012) Fungal endophyte reinforces population adaptive differentiation in its hosting grass species. *New Phytologist*, 194 (2), 561–571.

INNIS M.A., GELFAND D.H., SNISKY J.J. Y WHITE T.J. (1990) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, EE UU. Academic Press.

LEWIS G.C., RAVEL C., NAFFAA W., ASTIER C. Y CHARMET G. (1997) Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium spp.* in European countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Annals of Applied Biology*, 130(2), 227–238.

PAŃKA D., PIESIK D., JESKE M. Y BATORO-CIESNEIWSKA A. (2013) Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/*Neotyphodium lolii* association as a response to infection by *Fusarium poae*. *Journal of Plant Physiology*, 170, 1010–1019.

PEETERS A. (2004) *Wild and Sown Grasses: Profiles of a temperate species selection: ecology, biodiversity and use*. Roma, Italia–Oxford, Reino Unido: FAO–Blackwell.

RASMUSSEN S., PARSONS A.J., BASSETT S., CHRISTENSEN M.J., Y NEWMAN J.A. (2007) High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytologist*, 173, 787–797.

SLEPECKY R.A. Y STARMER W.T. (2009) Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 101(6), 823–32.

VAN ZIJLL DE JONG E, DOBROWOLSKI M.P., BANNAN N.I.R., STEWART A.V., SMITH K.F., Y FORSTER J.W. (2008) Global genetic diversity of the perennial ryegrass fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Crop Science*, 48(4), 1487–1501.

YOUNG C.A., BRYANT M.K., CHRISTENSEN M.J., TAPPER B.A., BRYAN G.T. Y SCOTT. B. (2005). Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis-expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of perennial ryegrass. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(1), 13–29.