



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios  
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-481

---

---

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017  
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## Diversidad de hongos endófitos en especies forestales y su posible papel en la defensa de su hospedante y la degradación de la madera

MACAYA-SANZ, D.<sup>1</sup>, EUGENIO M.E.<sup>2</sup>, MARTÍN-SAMPEDRO, R.<sup>2</sup>, FILLAT, U.<sup>2</sup>, IBARRA, D.<sup>2</sup>, DEL BARRIO, A., SOBRINO-PLATA, J.<sup>1</sup>, MEDEL, D.<sup>1</sup>, COLLADA, C.<sup>1</sup>, GIL, L.<sup>1</sup> y MARTÍN, J.A.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sistemas y Recursos Naturales. ETSI Montes, Forestal y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid

<sup>2</sup> Centro de Investigación Forestal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. de La Coruña, km 7,5 - 28040 Madrid

\* E-mail: [juan.martin.garcia@upm.es](mailto:juan.martin.garcia@upm.es)

### Resumen

Los hongos endófitos juegan un papel decisivo en diferentes procesos biológicos. Se consideran implicados en la resistencia de las plantas ante diferentes tipos de estrés. Además, ante la senescencia de los tejidos que habitan, parecen ejercer un papel relevante en las fases iniciales de degradación. Con el fin de progresar en el conocimiento de sus funciones ecológicas se estudió, mediante herramientas metagenómicas, la flora endófitas asociada a dos especies forestales, *Ulmus minor* y *Eucalyptus globulus*, y su implicación en la defensa de la planta ante la grafiosis y en la degradación de la madera, respectivamente. En el olmo se detectaron 164 unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y la frecuencia de dos órdenes fúngicos se correlacionó positivamente con la resistencia de su hospedante a la grafiosis. En ramillos de eucalipto en diferentes fases de degradación se detectaron 115 OTUs, los cuales parecen actuar de forma secuencial en el proceso de acuerdo a su taxonomía y capacidad de degradación de los diferentes componentes de la madera. Los resultados sitúan a los endófitos como herramientas biotecnológicas potenciales en el control de enfermedades y la industria de la celulosa.

### Palabras clave

Endófito, simbiote, defensa, degradación, madera, lignina, celulosa, *Ulmus*, *Eucalyptus*

### 1. Introducción

La mayoría de la plantas en ecosistemas naturales establecen simbiosis con hongos micorrícicos y/o endófitos (PETRINI 1986). Estos hongos simbiotes pueden tener profundos efectos en la ecología, salud y evolución de las plantas así como sobre la diversidad y estructura de otras comunidades de organismos como bacterias, nematodos e insectos (OMACINI et al., 2001). Debido a que la interacción entre planta y endófito no causa síntomas, se podría considerar como una interacción comensalista. Sin embargo, algunos endófitos establecen una interacción positiva para la planta (mutualistas), incrementando su tolerancia frente a factores bióticos y abióticos (RODRIGUEZ et al., 2009), mientras que otros parecen actuar como saprófitos o patógenos latentes. De esta manera, algunos autores definen el endofitismo como un estado transitorio durante el cual se produce una infección asintomática, sin importar el tipo de interacción que puedan tener con su hospedante (SCHULZ et al., 1998).

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha han investigado las variaciones de la diversidad de endófitos entre especies, genotipos, localizaciones u órganos, habiéndose evidenciado que todos estos factores ejercen un efecto significativo en la diversidad. Por ejemplo, genotipos de olmos tolerantes a la grafiosis muestran una menor diversidad de endófitos en el xilema que olmos susceptibles (MARTÍN et al., 2013). Una mayoría de hongos endófitos son capaces de colonizar varias especies (ARNOLD & LUTZONI, 2007). Por ejemplo, hongos como *Alternaria* o *Penicillium* poseen un

amplio rango de hospedantes. Sin embargo, otros hongos endófitos muestran una clara especificidad, como es el caso de *Lophodermium piceae* en *Picea abies* (KOUKOL et al., 2012), o *Discula umbrinella* en haya (MORICCA et al., 2012). Sin embargo, la mayor parte de estudios sobre la diversidad de endófitos realizados hasta la fecha se han realizado mediante técnicas de aislamiento en medios artificiales, técnica que solo es capaz de detectar una minoría de la diversidad total presente en los tejidos.

Si bien se empiezan a conocer los fundamentos de la distribución espacial y temporal de los endófitos en los ecosistemas, aún existe poca información sobre qué servicios ecológicos prestan. El abanico de funciones ecológicas de los hongos endófitos de plantas leñosas probablemente está correlacionado con la diversidad de las especies (PURVIS & HECTOR, 2000). Las interacciones de los endófitos con las plantas les conceden a menudo un aumento de la tolerancia frente a agentes bióticos y abióticos causantes de estrés. Este aumento de resistencia puede producirse por varios motivos: por ejemplo, el endófito puede inducir mecanismos de defensa sistémica en la planta; o producir metabolitos secundarios antifúngicos y/o antibióticos que inhiben el crecimiento de patógenos (SCHULTZ et al., 1999). También pueden parasitar a otros microorganismos o competir con ellos por el espacio y nutrientes de la planta (SAMUELS et al., 2000). De esta forma, los endófitos parecen tener un interesante potencial para el biocontrol de enfermedades en las plantas (RODRÍGUEZ et al., 2009). Sin embargo, especialmente en el caso de especies leñosas, poco se conoce aún sobre los mecanismos e interacciones entre hospedantes, patógenos y endófitos.

Se ha descrito que los hongos endófitos juegan un importante papel en la poda natural, ayudando al árbol a despojarse de las ramas que no necesitan mediante procesos de degradación de la madera mientras protegen los tejidos del tronco contra patógenos más agresivos (KOWALSKI & KEHR, 1992). En un estudio sobre el género *Xylaria*, se propuso la hipótesis de que algunos endófitos permanecen latentes hasta la senescencia de su hospedante para empezar a degradar los contenidos de la pared celular (WHALLEY, 1996). Así, estos endófitos tendrían una posición de partida más ventajosa para aprovechar los recursos disponibles cuando el tejido del hospedante entrara en senescencia, pues habría ganado el nicho ecológico antes de que la descomposición comenzase. PROMPUTTHA et al. (2007) evaluaron si los endófitos se convierten en saprófitos durante la senescencia del hospedador, encontrándose que hay ciertos taxones que posiblemente existan como endófitos y saprófitos. Se cree que un nivel de oxígeno limitado y/o la disponibilidad de nutrientes controlan el comportamiento patogénico de endófitos del xilema, tales como *Fomes fomentarius* y *Nectria coccinea*. Además, se ha evidenciado que hongos endófitos aislados de dos árboles típicos de los bosques chilenos (*Prumnopitys andina* y *Drymis winteri*) muestran actividad ligninolítica y celulolítica y promueven la degradación de la madera (OSES et al., 2006). En este mismo estudio se sugiere la hipótesis de que dentro del ciclo de vida de ciertos hongos descomponedores, hay una fase endofítica en la que no se degrada el xilema.

El presente trabajo pretende profundizar en el conocimiento de la diversidad, distribución y funciones de los hongos endófitos en las especies forestales. Para ello nos planteamos dos hipótesis de trabajo: i) la diversidad de la flora endófitas varía en función del grado de resistencia de la planta hospedante ante el estrés biótico; y ii) ciertos hongos endófitos, al morir el tejido en el que habitan, son pioneros en las primeras etapas de degradación de la madera, donde actúan de forma secuencial en función de sus capacidades metabólicas.

## 2. Objetivos

Para afrontar el estudio de las dos hipótesis de trabajo se han planteado dos objetivos principales: i) analizar la flora endófitas asociada a olmos de diferente grado de tolerancia a *O. novo-ulmi*; y ii) evaluar la variación temporal en la composición de hongos endófitos durante el proceso de degradación de la madera de eucalipto. Ambos objetivos se han afrontado usando técnicas de

secuenciación de ADN metagenómico y el segundo objetivo se ha complementado con estudios metabólicos de algunas cepas representativas de endófitos.

### 3. Metodología

#### 3.1. Toma de muestras

Para el primer objetivo del trabajo, se realizó un muestreo en el banco de clones de olmo ubicado en el Centro Nacional de Recursos Genéticos Forestales Puerta de Hierro (Madrid). Este banco clonal incluye siete genotipos de *U. minor* tolerantes a la grafiosis más otros individuos no resistentes, que presentan diferentes grados de tolerancia a la enfermedad. Se recogieron cuatro ramas (2-3 cm de diámetro) en diez árboles, tres de ellos catalogados como tolerantes, cuatro considerados como de tolerancia intermedia y otros tres susceptibles. Las cuatro ramas de cada árbol se recolectaron en cada uno de los puntos cardinales de la copa con el fin de obtener una muestra representativa de cada individuo, limitando así el posible efecto de infecciones locales. Las ramas se recogieron en la mitad inferior de la copa, hasta una altura de cuatro metros. Las muestras se almacenaron por debajo de 10 °C y se procesaron en una cámara de flujo laminar en un plazo máximo de 24 horas tras su recogida. En primer lugar se esterilizaron superficialmente con cuatro baños secuenciales: (1) 10 minutos en agitación ligera en agua destilada autoclavada con una gota de Tween 20, (2) una vez secados, 30 segundos en etanol al 75%, (3) 5 minutos en hipoclorito de sodio al 4% y (4) 15 segundos en etanol al 75%. Con el fin de eliminar una alta proporción de hongos epífitos, dejamos sólo la parte interior del floema y el xilema, eliminando las capas externas de la corteza mediante un bisturí estéril. Posteriormente, fueron envueltos en papel de aluminio autoclavado y almacenados a -80 °C.

Para el segundo objetivo del trabajo, se recogieron cuatro ramas (2-3 cm de diámetro, una por cada punto cardinal de la copa) de tres individuos de *Eucalyptus globulus* ubicados en la provincia de Toledo. Tras su traslado al laboratorio, los ramillos se introdujeron en una cámara de incubación, sin aplicar ningún tipo de esterilización de su superficie. Los ramillos se mantuvieron en condiciones controladas, a 25 °C, en oscuridad, y con atmósfera saturada de humedad, pero no aislada herméticamente. En el momento inicial (día 0) y en los días 17, 34, 51 y 70 de incubación se tomaron muestras de los ramillos para la extracción del ADN metagenómico, según la metodología especificada en el apartado siguiente. Para cada día de muestreo, el ADN se extrajo juntando material de los cuatro ramillos, evitando tomar material de los 2 cm más cercanos al extremo de los mismos. Así pues, cada día de muestreo se obtuvieron tres muestras de ADN, una por cada árbol muestreado, y cada muestra contuvo ADN procedente de cuatro ramillos. En total se obtuvieron 15 muestras de ADN metagenómico. Asimismo, se eliminó la parte superficial de la corteza en condiciones estériles, para evitar muestrear hongos epífitos. Debe tenerse en cuenta, que no se forzó la muerte de la rama. Por tanto, el tejido vegetal se mantuvo vivo durante las semanas iniciales.

#### 3.2. Aislamiento de ADN fúngico

Las ramas de olmo y eucalipto se trituraron con un molino IKA A11 (Staufen, Alemania) manteniendo los tejidos congelados continuamente con la adición regular de nitrógeno líquido. A continuación, el polvo de madera se almacenó a -80°C en tubos de centrifuga estériles. Las muestras de las cuatro ramas por cada árbol se reunieron y se molieron juntas, de manera que sólo se recuperó un tubo de polvo de madera de cada árbol. Tanto para el primer como para el segundo objetivo, el aislamiento del ADN se realizó después de la digestión enzimática del polvo de madera para mejorar la recuperación del ADN fúngico. Se incubaron aproximadamente 150 mg de polvo de madera durante 20 minutos a 37 °C en 400 µl de solución enzimática que contenía 0,04 mg de Lyticase (referencia L2524, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) y Tris-EDTA 50 mM. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El resto del aislamiento del ADN se llevó a

cabo utilizando el kit de Invisorb Spin Plant Mini (STRATEC Biomedical AG, Birkenfeld, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.3. Determinación de la composición de endófitos

El estudio de la composición de endófitos, tanto en las muestras de olmo como de eucalipto, se llevó a cabo por secuenciación masiva del fragmento ITS1 (primer Espaciador Transcrito Interno) del ADN ribosómico. La creación de la librería se realizó en dos etapas. En primer lugar, amplificamos la región diana con oligonucleótidos que contenían o bien el cebador de específico de hongos ITS1-F, o bien el cebador eucariota ITS2 en el extremo 3', y colas con secuencias universales (tipo M13) en el extremo 5'. Posteriormente, el producto amplificado se reamplificó con oligonucleótidos que contenían tales colas universales, una etiqueta específica para cada muestra y los adaptadores para la pirosecuenciación 454. Después de la segunda PCR, se cuantificó el producto de todas las muestras, se agruparon equimolarmente y se purificaron en una plataforma 454 GS FLX Titanium (Roche, Suiza, Basilea).

El tratamiento bioinformático del resultado de la pirosecuenciación se realizó siguiendo las pautas propuestas por LINDHAL et al. (2013). En primer lugar, se llevaron a cabo los procesos de demultiplexación, eliminación de ruido, desreplicación, desquimerización y truncamiento de secuencias utilizando los valores por defecto del script RunTitanium desarrollado en AmpliconNoise v1.29 (QUINCE et al., 2011). Posteriormente, la región ITS1 se extrajo de las secuencias por medio de FungalITSextractor (NILSSON et al., 2010). Aunque AmpliconNoise crea OTUs (es decir, unidades taxonómicas operacionales) mediante el colapso de secuencias idénticas, nosotros las construimos usando GramCluster 1.3 (RUSSELL et al., 2010) que permite algo de variación entre secuencias. De esta forma, construimos OTUs en todas las muestras de la librería. Dichos OTUs constituyeron la unidad de estudio en los subsiguientes análisis.

El perfil taxonómico se estimó a través de dos métodos diferentes. El primer método consistió en comparar las secuencias ITS1 de cada OTU con la base de datos UNITE usando un algoritmo MEGABLAST (ALTSCHUL et al., 1997). La salida se analizó en MEGAN 4 (HUSON et al., 2011) para obtener la primera asignación taxonómica. En segundo lugar, se comparó con la base de datos UNITE utilizando el *Naïve Bayesian RDP Classifier* (Ribosomal Database Project, WANG et al., 2007), que clasifica las secuencias en el rango taxonómico seleccionado.

### 3.4. Caracterización metabólica de cepas fúngicas aisladas de eucalipto

Con el fin de caracterizar metabólicamente los endófitos implicados en la degradación de la madera se realizaron una serie de aislamientos de hongos endófitos a partir de ramas recogidas en la misma población de eucalipto que en el caso del estudio metagenómico. De esta manera se obtuvo una colección de 21 cepas de endófitos representando a los principales órdenes fúngicos presentes en la madera de eucalipto. El aislamiento de los hongos y su identificación mediante la secuenciación del Espaciador Transcrito Interno (Internal Transcribed Spacer; ITS) de su ADN ribosómico, se realizaron siguiendo la metodología descrita en MARTÍN et al. (2013). Las secuencias se alinearon usando el programa Seqman (DNASTAR, EEUU) y se obtuvo una secuencia de consenso. Posteriormente se empleó el programa BLAST (algoritmo MEGABLAST) del GenBank (NCBI, EEUU) para determinar la secuencia más similar de las presentes en esta base de datos. Además de las cepas de endófitos, se incluyeron en el estudio dos cepas de basidiomicetos saprófitos de pudrición blanca de referencia (*Trametes* sp. y *Pycnoporus sanigineus*), con el fin de comparar las capacidades metabólicas de endófitos y saprófitos.

Para la caracterización metabólica de las cepas se realizaron dos ensayos. El primero para evaluar la posible inhibición del crecimiento de los hongos por una selección de 15 metabolitos secundarios fenólicos, implicados en la defensa de las plantas ante patógenos (WITZELL & MARTÍN,

2008) (Tabla 1). El segundo ensayo se realizó para evaluar la capacidad de crecimiento de las distintas cepas a partir de 13 fuentes de carbono presentes en los tejidos vegetales incluyendo oligosacáridos, polisacáridos, lignina y ácidos grasos (Tabla 1). En un caso concreto se estudió una combinación entre un metabolito secundario (alcohol veratrílico) y la lignina, ya que el primero facilita la degradación de la lignina por algunos hongos saprófitos (ZAPANTA & TIEN, 1997). Para ambos ensayos se utilizaron microplacas de 96 pocillos. El diseño de las microplacas con los diferentes metabolitos y fuentes de carbono estudiados se detalla en el trabajo de BLUMENSTEIN et al. (2015). Las microplacas se prepararon en cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones. En todos los pocillos, el volumen total del medio fue de 100  $\mu$ l. Este medio incluyó las sales que constituyen el medio Murashige y Skoog (MS; MURASHIGE & SKOOG, 1962), y el tinte redox E de BIOLOG a 1,5 mg/l para potenciar el cambio de color del medio a medida que los hongos metabolizasen las distintas sustancias. Además, se administró micelio triturado de cada hongo endófito en una concentración final de 0,1 mg/ml, excepto en los controles negativos, en los que se administró agua. Posteriormente, las microplacas fueron tapadas y selladas con Parafilm y se cultivaron en una cámara de cultivo en total oscuridad a una temperatura de 25 °C. Para poder evaluar la capacidad degradadora de los hongos y sus interacciones con los distintos metabolitos secundarios, se realizaron mediciones con un lector de absorbancia de microplacas ELx808 de BIO-TEK tras 9 días de incubación, realizándose mediciones a una longitud de onda de 630 nm. Una mayor absorbancia se relaciona con un mayor crecimiento del hongo en el pocillo.

Tabla 1. Metabolitos y fuentes de carbono utilizados en los ensayos de caracterización metabólica de hongos endófitos aislados de *Eucalyptus globulus*. C = concentración; M = concentración molar de átomos de carbono

Ensayo de metabolitos secundarios		Ensayo de fuentes de carbono			
Sustancia	C (g/l)	Fuente de carbono primaria		Fuente de carbono secundaria	
		Sustancia	C (M)	Sustancia	C (M)
Ácido salicílico	0,05	Galactosa	0,25		
Ácido gálico	1,00	Glucosa	0,25		
Ácido tánico	1,00	Sacarosa	0,25		
Ácido clorogénico	1,00	Celobiosa	0,25		
Alcohol veratrílico	2,37	Xilosa	0,25		
O-cresol	0,10	Pectina	0,25		
Fenol	0,10	Starch	0,25		
Timol	0,10	Xilano	0,25		
Ácido cafeico	1,00	Lignina Kraft	0,25		
Carvacrol	0,10	Lignina Kraft	0,25	Alcohol veratrílico	0,01
Catequina	1,00	Lignina Kraft	0,12		
Quercetina	0,01	Lignina Kraft	0,12	Alcohol veratrílico	0,12
Miricetina	0,01	Sacarosa	0,25		
		Ácido oleico	0,25		
		Ácido lignocérico	0,05		
		Sacarosa	0,25		

### 3.5. Análisis estadístico

Para analizar variaciones en la composición de hongos endófitos entre grupos de muestras se estudiaron las relaciones entre la frecuencia de aparición de los diferentes OTUs, incluyendo la riqueza de OTUs, y la resistencia a la grafiosis mediante análisis de regresión simple.

Para el análisis de los resultados de la caracterización metabólica de los endófitos de eucalipto se llevaron a cabo análisis de correlación entre la degradación de las distintas fuentes de carbono por los distintos hongos y su día estimado de máxima presencia en el proceso de degradación. Este día se estimó como la media del día de aparición de la cepa en cuestión, ponderada por su abundancia relativa en cada día de muestreo, según los datos metagenómicos. Se realizó también un análisis de componentes principales (PCA) para buscar relaciones entre la filogenia de los hongos y el comportamiento ante las fuentes de carbono y las sustancias de inhibición. Para el análisis estadístico se utilizaron los programas informáticos Microsoft Excel y STATISTICA v8.0.

## 4. Resultados

### 4.1. Diversidad de endófitos en olmo en relación a la tolerancia a la grafiosis

A partir de las muestras de ramillos recogidas en los 10 individuos de olmo estudiados se detectaron un total de 20.000 secuencias asignadas a 164 OTUs, las cuales representan a 14 órdenes fúngicos. Un 32% de las OTUs se detectaron en sólo un árbol y un 69% estuvieron representadas en cuatro árboles o menos. Un 13% de las OTUs se encontraron en al menos 8 de los 10 árboles analizados.

La riqueza de especies por árbol mostró una relación moderada ( $R^2 = 42,38$ ) y significativa ( $P = 0,041$ ) con el nivel de tolerancia a la grafiosis, expresado como la media del % de marchitamiento foliar mostrado por el genotipo tras la inoculación artificial del patógeno. Este último dato se obtuvo a partir de ensayos previos de susceptibilidad realizados por el Programa de Conservación y Mejora de los Olmos Ibéricos en los que se inocularon un mínimo de 6 réplicas por cada genotipo (datos no mostrados). Es decir, los genotipos más susceptibles tendieron a albergar una composición de hongos endófitos menos diversa que los genotipos más tolerantes. No obstante, el genotipo con una mayor riqueza de especies fue un genotipo de tolerancia intermedia (Figura 1).

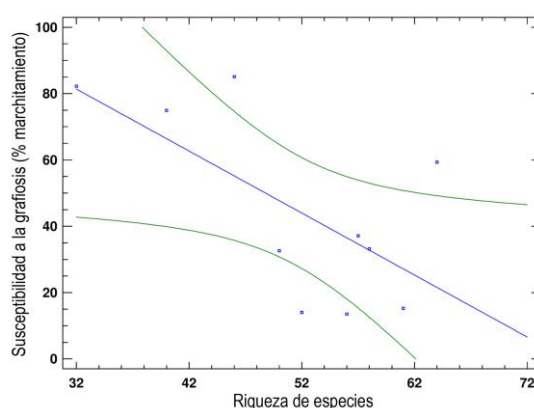


Figura1. Relación entre la susceptibilidad a la grafiosis y la riqueza de hongos endófitos ( $R^2 = 42,38$   $P = 0,041$ )

La abundancia relativa de dos órdenes fúngicos, Erythrobasidiales y Chaetothyriales, en los árboles de estudio mostró una relación significativa ( $R^2 = 82,24$ ,  $P < 0.001$ ; y  $R^2 = 74,98$ ,  $P < 0.005$ , respectivamente) con el grado de tolerancia del árbol a la grafiosis. Esto es, a mayor tolerancia a la grafiosis mayor fue la proporción de estos dos órdenes fúngicos en los ramillos respecto al total de endófitos representados en el árbol (Figura 2).

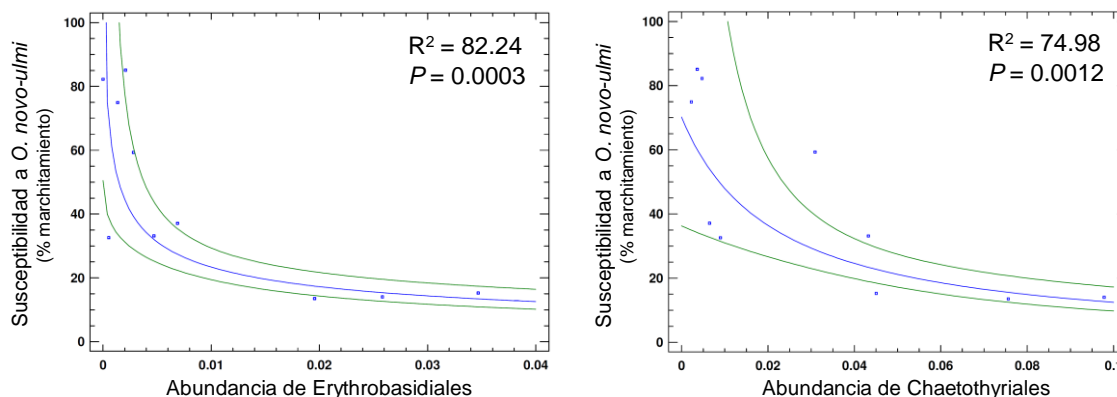


Figura 2. Abundancia de endófitos de los órdenes Erythrobasidiales (izquierda) y Chaetothyriales (derecha) en relación con la susceptibilidad de su hospedante hacia *O. novo-ulmi*.

#### 4.2. Sucesión de hongos endófitos en el proceso de degradación de la madera de eucalipto

De las muestras de ramillos de eucalipto sometidas a un proceso de degradación controlada se obtuvieron 11.000 secuencias que fueron agrupadas en 115 OTUs. La diversidad de OTUs detectada y estimada mediante el índice de Shannon, así como la riqueza de especies, fueron decreciendo a lo largo del experimento hasta alcanzar su mínimo en el día 51 para, finalmente, mostrar un ligero incremento en el día 70 (Figura 3). Los OTUs pertenecientes a los órdenes Dothideales y Pleosporales presentaron una mayor abundancia relativa en los ramillos de eucalipto en los primeros días de degradación (días 0 y 17) para posteriormente ir disminuyendo su proporción en la madera a medida que la degradación progresaba. Por el contrario, otros órdenes como los Botryosphaeriales o los Tremellales fueron más abundantes en los últimos días del periodo de degradación estudiado.

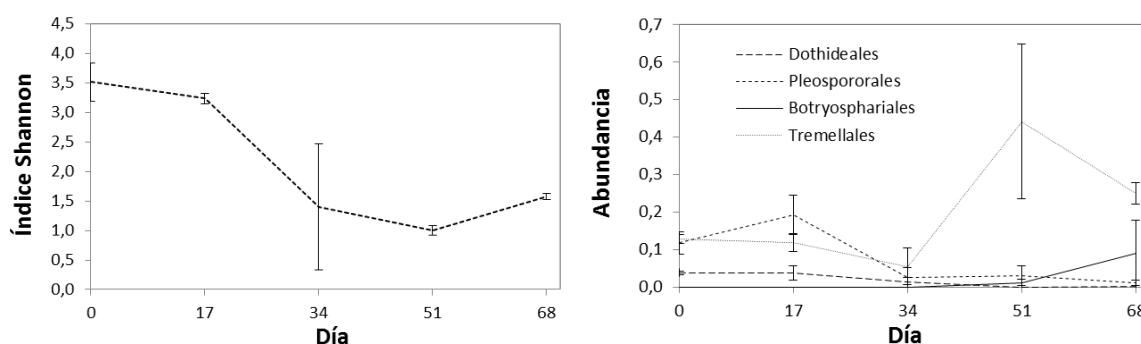


Figura 3. Evolución temporal del índice Shannon de diversidad de endófitos (izquierda) y de la abundancia de los distintos órdenes fúngicos (derecha) en diferentes momentos del proceso de degradación de ramillos de eucalipto.

En los hongos aislados a partir de ramillos de eucalipto, se observó que aquellos endófitos cuyo día estimado de máxima presencia en el proceso de degradación fue temprano (Dothideales y Pleosporales) toleraron mejor ciertos metabolitos secundarios de defensa de las plantas, tales como los ácidos salicílico y tánico (Figura 4). Algunas de estas cepas no solo toleraron estos metabolitos



sino que fueron capaces de metabolizarlos, mostrando un mayor crecimiento que en ausencia del metabolito. Por el contrario, el hongo *Polyporal* saprófito generalista *Trametes* sp. así como otras cepas asociadas a estadios más avanzados de degradación fueron fuertemente inhibidos por estos metabolitos.

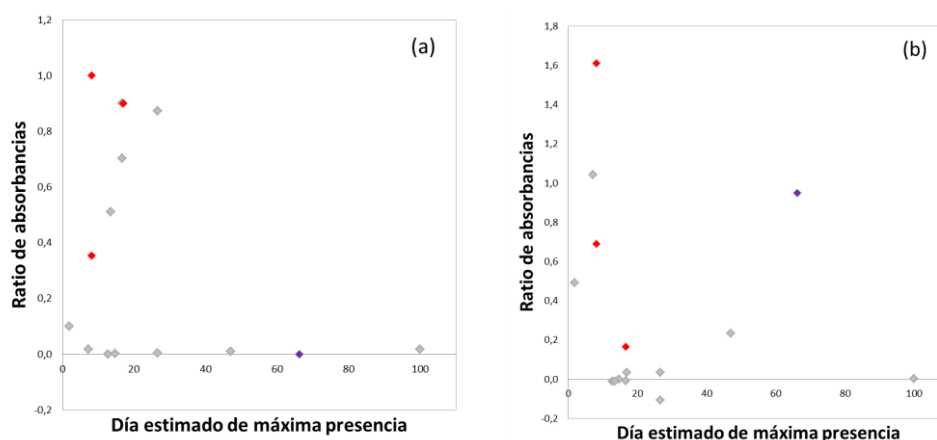


Figura 4. Ratio de absorbancias del crecimiento de hongos endófitos aislados del eucalipto creciendo con o sin el metabolito secundario, frente al día estimado de su máxima presencia en el proceso de degradación de la madera. Metabolitos estudiados: (a) ácido salicílico; (b) ácido tánico. Los puntos rojos representan hongos Dothideales y el morado una cepa de un hongo Botryosphaerial que en el caso b representó una excepción al crecer bien en presencia de ácido tánico, pese a su presencia tardía en el proceso de degradación.

En cuanto al ensayo de metabolización de diferentes fuentes de carbono, la adición de alcohol veratrílico a la lignina en pequeñas proporciones mejoró considerablemente el crecimiento del saprófito generalista *Trametes* sp. y de una cepa Botryosphaerial. El resto de cepas o no se vieron influenciadas por el alcohol veratrílico o se vieron inhibidas por su presencia. Cuando la concentración del metabolito se incrementó hasta igualar la de lignina, la mayor parte de las cepas vieron inhibido su crecimiento, salvo las dos cepas Botryosphaeriales estudiadas (Figura 5). En líneas generales, los endófitos degradaron bien los oligosacáridos, a diferencia de los basidiomicetos generalistas. La pectina solo fue metabolizada de manera notable por los hongos Botryosphaeriales. El resto cepas o la metabolizaron muy ligeramente o fueron incapaces de hacerlo. El xilano fue de metabolizado por casi todas las cepas excepto por el *Trametes* sp., siendo de nuevo los hongos Botryosphaeriales los que mostraron una mayor capacidad degradadora.

## 5. Discusión

Los estudios llevados a cabo en este trabajo apuntan a que los hongos endófitos desempeñan diferentes funciones en las especies forestales. Por un lado, se ha evidenciado que la composición de la flora endófito varía considerablemente entre distintos huéspedes de la misma especie (*Ulmus minor*). Además, esta variación parece guardar cierta relación con la tolerancia del árbol a la enfermedad de la grafiosis. No obstante, el ensayo realizado en olmo necesitaría ser complementado con otros estudios que verificaran la posible relación causal entre la composición de endófitos y la tolerancia a la enfermedad. A su vez, se ha demostrado que la composición endofítica en eucalipto varía con el tiempo durante el proceso de degradación de la madera. Esta variación parece guardar una estrecha relación con la capacidad de las diferentes cepas para degradar los componentes de la madera y para soportar los metabolitos potencialmente fungitóxicos presentes en ella. Estas capacidades degradadoras evidencian que los hongos endófitos no sólo tienen funciones ecológicas relevantes cuando habitan en la planta viva, sino que una vez ésta o alguno de sus órganos muere diferentes taxones de endófitos actúan de manera secuencial y posiblemente complementaria en la

descomposición de los principales componentes de la madera. Esta acción degradadora facilitaría la acción posterior de hongos saprófitos generalistas. A continuación se discuten en mayor profundidad los resultados más relevantes de este trabajo.

Estudios previos de endófitos del olmo realizados mediante aislamientos en medios de cultivo estándar, apuntaron a que los genotipos más susceptibles al patógeno de la grafiosis presentaban una mayor frecuencia y diversidad de endófitos en el xilema que individuos tolerantes (MARTÍN et al. 2013). Sin embargo, cuando se comparaba la flora endófito total de los ramillos (incluyendo también tejidos de floema) esta relación se diluía mostrando ambos grupos diversidades semejantes, aunque con tendencia a una mayor diversidad en los susceptibles. Se sugería entonces la posibilidad de que los individuos tolerantes podrían tener un perfil químico constitutivo más hostil hacia los hongos en general, y por tanto no solo resultaban ser más tolerantes a la grafiosis sino que inhibirían a cualquier hongo que tratara de establecerse en el xilema, fuera o no patogénico (MARTÍN ET al. 2013). Los resultados del presente trabajo, obtenidos mediante técnicas metagenómicas, nos presentan un escenario diferente, donde los genotipos más susceptibles presentan una menor riqueza de endófitos que los genotipos de tolerancia intermedia o alta (Figura 1). Hay que destacar que en este trabajo, a diferencia del desarrollado por MARTÍN et al. (2013), no se separaron los tejidos xilemáticos de los floemáticos. En cualquier caso, la estimación de la composición de endófitos obtenida en el presente estudio ofrece una visión mucho más completa de la flora endófito que la estimada mediante aislamientos (164 OTUs frente a 16 tipos morfológicos en el caso del trabajo con aislamientos), lo que evidencia las limitaciones de los resultados basados únicamente en aislamientos en medios artificiales.

La menor riqueza de hongos endófitos encontrada en olmos susceptibles a la grafiosis podría interpretarse de diferentes maneras. Por un lado, esta menor riqueza haría menos probable la existencia de hongos endófitos con actividades antagonistas hacia *O. novo-ulmi*, o que ocuparan un nicho ecológico similar al del patógeno, dificultando así su establecimiento en el árbol. A su vez, esta menor riqueza haría menos probable la existencia de endófitos que modularan el metabolismo de defensa de la planta, estimulando por ejemplo los mecanismos de resistencia inducida (PIETERSE et al., 2014). Este resultado apoyaría la asunción general de que los sistemas biológicos más diversos son más estables ante perturbaciones ocasionadas por plagas y enfermedades. En el caso de la grafiosis, al tratarse de un patógeno vascular, podríamos argumentar que la flora endófito que habita en el floema no tiene influencia sobre el hongo patógeno, ya que se desarrolla en el interior de los vasos. Sin embargo, la flora endófito del floema podría resultar de vital importancia durante las primeras fases de invasión del hongo, ya que los escolítidos, vectores de la enfermedad, depositan las esporas del patógeno en el floema, donde éstas germinan (ANDERBRANT et al. 2016). Además, los procesos de inducción de mecanismos de resistencia suelen funcionar a nivel sistémico (PIETERSE et al., 2014) y, por tanto, la flora endófito que habita en los tejidos floemáticos podría tener un efecto decisivo a la hora de activar mecanismos de defensa en el xilema.

Un estudio previo demostró que una amplia variedad de hongos endófitos aislados a partir de tejidos de xilema o floema de olmo mostraban un efecto antagonista hacia el patógeno de la grafiosis cuando eran enfrentados en placas Petri en medio de cultivo estándar (MARTÍN et al. 2015). Sin embargo, este efecto inhibitorio o antagonista en placa Petri no se manifestó con claridad en ensayos en planta, en los que estos hongos eran inoculados con antelación a la inoculación del patógeno. Sin perjuicio de que mejoras metodológicas (por ejemplo en cuanto a dosis o métodos de inoculación) pudieran ofrecer mejores resultados, el presente trabajo aporta una serie de taxones fúngicos que pueden resultar de interés para ser ensayadas en planta. En particular, la abundancia relativa de dos órdenes fúngicos en cada uno de los genotipos estudiados mostró una relación estrecha con el grado de tolerancia de la planta hospedante hacia la grafiosis (Figura 2). Cabe destacar que en un ensayo paralelo en el que se estudió la variación espacial de la flora endófito en un olmo centenario, estos dos órdenes fúngicos aparecieron distribuidos por la práctica totalidad de la parte aérea del árbol (datos no publicados), lo cual sugiere su carácter sistémico o, al menos hace poco probable la

hipótesis de que estos hongos realicen infecciones locales. Además estos hongos aparecieron en todos los olmos analizados, lo que sugiere su ubicuidad. A priori parece que los endófitos sistémicos y ubicuos podrían jugar un papel más relevante y basal en el ecosistema, en comparación con endófitos que realizan infecciones locales, si bien estos últimos podrían solapar diferentes funciones entre ellos. El presente trabajo abre nuevas vías de investigación para desvelar si la mayor proporción de estos hongos en individuos tolerantes tiene alguna causalidad o es simplemente fruto del azar o de otros factores no relacionados con la tolerancia.

En el segundo de los objetivos planteados en el trabajo nos preguntábamos cómo la composición de endófitos variaba una vez el tejido comienza a morir y a descomponerse. Los estudios sobre la degradación de la madera tradicionalmente se han centrado en fases de degradación avanzadas, ignorando las primeras etapas, cuando las células vivas de la madera comienzan a morir. Se ha propuesto que los hongos endófitos estarían implicados en desencadenar el inicio del proceso de degradación de la madera (SCHWARZE et al., 2000) y nuestros resultados apoyan esta hipótesis. La diversidad fúngica se mantuvo durante los primeros días, cuando el tejido permaneció aún vivo, pero al morir éste la diversidad cayó, posiblemente debido a una disminución de la flora de hongos incapaces de desarrollarse como saprófitos (Figura 3). La recuperación parcial de la diversidad en los últimos días de estudio podría deberse a la proliferación de flora saprófita que permanecía de forma latente en el tejido.

Si bien en el ensayo de caracterización metabólica de los endófitos se observó una alta variabilidad a nivel de cepa, se pueden deducir algunas tendencias generales en función del momento de aparición de cada taxón en el estudio metagenómico. Los endófitos que aparecieron con mayor frecuencia al inicio del proceso de degradación (principalmente los Dothideales) son capaces de tolerar y metabolizar algunos de los compuestos de defensa de la planta tales como el ácido salicílico y tánico (Figura 4), posiblemente porque son endófitos estrictos adaptados a vivir en tejidos vivos, donde este tipo de compuestos son más abundantes. Los endófitos que aparecieron en las etapas más avanzadas de la degradación, así como los saprófitos generalistas de referencia (i.e. *Trametes* sp.) en líneas generales toleraron peor estos metabolitos secundarios.

El alcohol veratrílico es un metabolito secundario producido por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* y otros hongos de pudrición blanca. Se ha demostrado que este metabolito cataliza la actividad enzimática de la lignina peroxidasa, acelerando la degradación de la lignina (BARBOSA et al., 1996). En nuestro estudio, los endófitos que mejor toleraron la presencia de este metabolito fueron los Botryosphaerales (Figura 5), lo cual sugiere su adaptación a estados avanzados de la degradación de la madera y concuerda con su máxima presencia en el último día de muestreo del estudio metagenómico. Es posible que estos endófitos permanezcan en la madera en estado latente hasta que el tejido comience a morir, y entonces comiencen a degradar los polímeros estructurales de la madera de forma saprófita. Este orden de ascomicetos incluye patógenos capaces de causar la muerte del floema y del cambium en especies forestales, tales como *Botryosphaeria dothidea* o *Neofusicoccum australe*, siendo probable que estos hongos pasen a una fase saprófita una tras la muerte de los tejidos en la que degraden la lignina de la pared celular.

Respecto a los oligosacáridos, prácticamente todos los ascomicetos mostraron un notable crecimiento sobre estas fuentes de carbono. Este resultado sugiere que los hongos endófitos estrictos podrían estar más ligados a células del floema y de los radios parenquimáticos, donde el nivel de oligosacáridos es más alto. Los basidiomicetos saprófitos, por el contrario, no mostraron la misma capacidad de degradación de estos azúcares, en sintonía con el conocimiento de que los hongos basidiomicetos y, en especial, los de pudrición suelen degradar células de madera lignificadas cuyo contenido en azúcares es mínimo (STOKLAND, 2012). Esto denotaría su adaptación a fases más avanzadas de la degradación, donde estos compuestos ya han sido metabolizados.

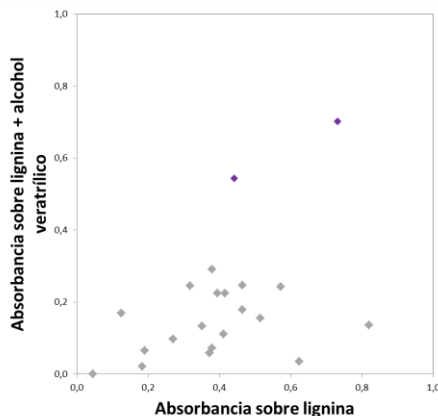


Figura 5. Relación de absorbancias de los hongos endófitos creciendo sobre lignina y sobre lignina suplementada con alcohol veratrílico (1:1). El punto morado representa las cepas de endófitos Botryosphaerales.

## 6. Conclusiones

Las especies forestales albergan una gran diversidad de hongos endófitos, cuyo modo de interacción con su planta hospedante y su entorno biótico y abiótico es aún poco conocido. Esta diversidad varía en función del genotipo de la planta hospedante, y parece guardar cierta relación con el grado de tolerancia de la planta hacia el estrés biótico. Una parte de la flora endófito está adaptada a vivir principalmente sobre tejidos vivos, mientras que otra parte muestra un amplio rango metabólico y está adaptada a vivir en estado latente sobre la planta viva y a proliferar cuando los tejidos comienzan a morir. Se ha evidenciado la implicación de estos hongos en las etapas iniciales de degradación de la madera, acción que posiblemente facilite la posterior actividad de hongos saprófitos más generalistas. De los hongos endófitos seguramente surgirán nuevas herramientas biotecnológicas tanto en el campo de la fitopatología como en la industria lignocelulósica. A modo de ejemplo, una de las cepas estudiadas en el presente trabajo ha sido evaluada recientemente para mejorar la sacarificación enzimática y el pulpeo de la madera de *Eucalyptus globulus* (FILLAT et al., 2016).

## 7. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos CTQ2011-28503-C02-02 y AGL2015-66925-R (MINECO/FEDER).

## 8. Bibliografía

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J.; 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389-402
- ANDERBRANT, O.; YUVARAJ, J.K.; MARTIN, J.A.; GIL, L.; WITZELL, J.; 2016. Feeding by *Scolytus* bark beetles to test for differently susceptible elm varieties. *J. Appl. Entomol.* DOI: 10.1111/jen.12354
- ARNOLD, A.E.; LUTZONI, F.; 2007. "Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?" *Ecology* 88(3): 541-549.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; ST. HARDY, G.E.; 1996. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. Letters in Applied Microbiology, 23: 93-96

BLUMENSTEIN, K.; MACAYA-SANZ, D.; MARTÍN, J.A., ALBRECHTSEN, B.R.; WITZELL, J.; 2015. Phenotype MicroArrays as a complementary tool to next generation sequencing for characterization of tree endophytes. Frontiers in Microbiology 6: 1033. doi: 10.3389/fmicb.2015.01033

FILLAT, U.; MARTÍN-SAMPEDRO, R.; IBARRA, D.; MACAYA, D.; MARTÍN, J.A.; Eugenio; 2016. Potential of the new endophytic fungus *Hormonema* sp. CECT-13092 for improving processes in lignocellulosic biorefineries: biofuel production and cellulosic pulp manufacture. J Chem Technol Biotechnol: DOI: 10.1002/jctb.5075

HUSON, D.H.; MITRA, S.; WEBER, N.; RUSCHEWEYH, H.; SCHUSTER, S.C.; 2011. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. Genome Research 21: 1552-1560

KOWALSKI, T.; KEHR, R.D.; 1992. Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. Sydowia 44:137-168

KOUKOL, O.; KOLARIK, M.; KOLAROVA, Z.; BALDRIAN, P.; 2012. Diversity of foliar endophytes in wind-fallen *Picea abies* trees. Fungal Diversity 54(1): 69-77.

LINDAHL, B.; NILSSON, R.H.; TEDERSOO, L.; ABARENKOV, K.; CARLSEN, T.; KJØLLER, R.; KÕLJALG, U.; PENNANEN, T.; ROSENDAHL, S.; STENLID, J.; KAUSERUD, H.; 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user's guide. New Phytologist 199 (1): 288-299

MARTÍN, J.A.; MACAYA-SANZ, D.; WITZELL, J.; BLUMENSTEIN, K.; GIL, L. 2015. Strong in vitro antagonism by elm xylem endophytes is not accompanied by stable in planta protection against a vascular pathogen under field conditions. European Journal of Plant Pathology 142: 185-196.

MARTÍN, J.A.; WITZELL, J.; BLUMENSTEIN, K.; ROZPEDOWSKA, E.; HELANDER, M.; SIEBER, T.N.; GIL, L.; 2013. Resistance to Dutch elm disease reduces xylem endophytic fungi presence in elms (*Ulmus* spp.). PLoS One 8(2):e56987

MORICCA, S.; GINETTI, B.; RAGAZZI A.; 2012. Species- and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. Phytopathologia Mediterranea 51(3): 587-598.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15(3): 473-497.

NILSSON, R.H.; VELDRE, V.; HARTMANN, M.; UNTERSEHER, M.; AMEND, A.; BARGSTEN, J.; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; JUMPPONEN, A.; ABARENKOV, K.; 2010. An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. Fungal Ecology 3 (4): 284-287.

OMACINI, M.; E. J. CHANETON; GHERSA C.M.; MÜLLER, C.B.; 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. Nature 409(6816): 78-81.

OSÉS, R.; VALENZUELA, S.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J.; 2006. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. International Biodeterioration & Biodegradation 57(2): 129-135.

PETRINI, O.; 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. Microbiology of the Phyllosphere. v. d. H. J. Fokkema NJ. Cambridge, UK, Cambridge University Press: 175-187.

PIETERSE, C.M.J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R.L.; WELLER, D.M.; VAN WEES, S.C.M.; BAKKER P; 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. Annual Review of Phytopathology. 52: 347-375 DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340

PROMPUTTHA, I.; LUMYONG, S.; DHANASEKARAN, V.; MCKENZIE, E.H.; HYDE, K.D.; JEEWON, R.; 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. Microbial Ecology 53(4): 579-590.

PURVIS, A.; HECTOR, A.; 2000. Getting the measure of biodiversity. Nature 405(6783): 212-219.

QUINCE, C.; LANZEN, A.; DAVENPORT, R.J.; TURNBAUGH, P.J.; 2011. Removing noise from pyrosequenced amplicons. BMC Bioinformatics 12:38

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE J.R.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S.; 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist 182(2): 314-330.

RUSSEL, D.J.; WAY, S.F.; BENSON, A.K.; SAYOOD, K.; 2010 A grammar-based distance metric enables fast and accurate clustering of large sets of 16S sequences. BMC Bioinformatics 11:601.

SAMUELS, G.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J.L.; 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. Mycological Research 104(06): 760-764.

SCHULZ, B.; GUSKE, S.; DAMMANN, U.; BOYLE, C.; 1998. Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. Symbiosis 25(1-3): 213-227.

SCHULTZ, B.; RÖMMERT, A.; DAMMANN, U.; AUST H.; STRACK, D.; 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. Mycological Research 103: 1275-1283.

SCHWARZE, F.W.; ENGELS, J.; MATTHECK, C.; 2000. Fungal Strategies of Wood Decay in Trees. Springer-Verlag Berlin Heildeberg, 169 pp.

SIEBER, T. N.; 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? Fungal Biology Reviews 21(2): 75-89

STOKLAND, J.N.; SIITONEN, J.; JONSSON, B.G. 2012. Biodiversity in Dead Wood. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 509 pp.

WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R.; 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. Appl Environ Microbiol. 73 (16): 5261-5267

WHALLEY, A.J.S.; 1996. The Xylareaceous way of life. Mycol Res 100: 897-922

WITZELL, J.; MARTÍN, J.A.; 2008. Phenolic metabolites in the resistance of northern forest trees to pathogens-past experiences and future prospects. Can J For Res 38:2711-2727

ZAPANTA, L.S.; TIEN, M.; 1997. Low Molecular Weight Compounds in Lignin Degradation. Journal of Biotechnology 53: 93-102