

# Charakterisierung und Langzeitüberleben von *Epichloë* Endophyten in Genbank Material

<sup>1</sup>T. THÜNEN, E. <sup>2</sup>WILLNER UND <sup>3</sup>Y. BECKER

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institute, Institut für Pflanzenbau und Bodenkunde, Braunschweig

<sup>2</sup>Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben,  
Genbank,

Teilsammlungen Nord, Malchow, Poel

<sup>3</sup>Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

torsten.thuenen@julius-kuehn.de

## Einleitung und Problemstellung

Endophytische Pilze der Gattung *Epichloë* besiedeln Gräser der Unterfamilie *Pooidae*. Sie sind ausschließlich in Blatt und Spross zu finden und bilden eine konstitutiv-symbiotische Lebensgemeinschaft mit ihrem Wirt. Sie sind in der Lage sich sowohl horizontal, als auch vertikal zu vermehren, wobei einige Arten sich ausschließlich vertikal über den Samen ihres Wirtes vermehren. Diese wurden früher unter dem Gattungsnamen *Neotyphodium* geführt. Abhängig vom Genotyp produziert *Epichloë* eine Reihe verschiedener Alkaloide, welche zu den vier Gruppen: Ergot-Alkaloide, Indol-Diterpene, Pyrrolizidin Alkaloide und Pyrrolopyrazin Alkaloide gehören. Ergot-Alkaloide und Indol-Diterpene wirken toxisch auf Vertebraten, Pyrrolizidin und Pyrrolopyrazin Alkaloide wirken fraß ver hindernd bzw. toxisch auf Invertebraten. *Epichloë* schützt seinen Wirt gegen eine Reihe verschiedener biotischer und abiotischer Stressfaktoren (Schardl, 1996). Diese hat dazu geführt das *Epichloë*-Stämme mit einem geeigneten Alkaloid-Profil in einigen Ländern kommerziell eingesetzt werden. So zum Beispiel in Neuseeland, wo bereits 70% des kommerziellen Gras-Saatguts mit *Epichloë* infiziert ist und einen Beitrag von 200 Mio. NZ\$ an der Wirtschaft des Landes hat (Johnson et al., 2013). Neben dem Einsatz in der Weidewirtschaft sind eine Reihe verschiedener Einsatzgebiete vorstellbar und teilweise auch schon realisiert (Kauppinen et al., 2016). Ein breites Spektrum in der Anwendung kann durch die Identifikation neuer Endophyt/Graskombinationen sichergestellt werden. Im Rahmen der hier vorgestellten Versuche wurde untersucht, ob Saatgut aus Genbanken, welches über einen langen Zeitraum eingelagert wurde noch immer als Quelle neuer Endophyt/Graskombinationen herangezogen werden kann.

## Material und Methoden

Ausgangsmaterial: Saatgut von 12 Akzessionen wurde von der Genbank des IPK bereitgestellt. Hierbei handelt es sich um 11 *Lolium perenne* sowie eine *Lolium rigidum* Akzessionen, welche 1998 in Bulgarien gesammelt wurden. Die Infektionsrate mit endophytischen Pilzen wurde nach der Aufsammlung mittels Bengalrosa Färbung bestimmt. Hierbei wurden Infektionsraten zwischen 0% und 100 % ermittelt. Nach einer Saatgutvermehrung im Jahre 2000 wurde das Saatgut auf eine Feuchte von unter 8% getrocknet und anschließend in Glasgefäßen bei -5 °C eingelagert.

Nachweis von *Epichloë* DNA:

DNA Extraktion: Von jeweils 10 Samen wurde DNA mittels DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH) extrahiert. Hierzu wurden die bei -80 °C eingefrorenen Samen zunächst im BeatRupter (BioLab Products) vermahlen. Anschließend wurde Puffer AP1 hinzugegeben. Nach einem weiteren Aufschluss im BeadRupter erfolgte die weitere Extraktion nach Angaben des Herstellers. Die DNA Konzentration wurde abschließend auf 1 ng/µl eingestellt.

PCR: Der Nachweis von *Epichloë* wurde mit spezifischen PCR Primern durchgeführt. Als Forward Primer diente IR-NS 5' 5'-GAGCCCCTGATTCGTAC-3' (Dombrowski et al.,

2006) und als Revers Primer tub2-exon4u-2p6 5'-GTTTCGTCCGAGTTCTCGACAAGCTG-3' (Modifiziert nach Moon et al. (2002)) welche innerhalb des tub2 Gens binden. Die PCR-Reaktion wurde im C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mit 1,25 U DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Folgende Bedingungen wurden verwendet: 1.) 95 °C × 3'; 2.) 95 °C × 25"; 3.) 73 °C × 30" (mit Abnahme um 3 °C pro Zyklus); 4.) 72 °C × 1'; 5.) 4 mal zu 2.); 6.) 72 °C × 3'; 7.) 95 °C × 25"; 8.) 61 °C × 1'; 9.) 72 °C × 2'; 10.) 39 mal zu 7.); 11.) 72 °C × 15'.

Identifikation der *Epichloë* Stämme:

Die ca. 900 bp große PCR Fragmente wurde aufgereinigt und anschließend mit den bei der PCR verwendeten Primern sequenziert. Die Identifikation erfolgte mittels Abgleich der Sequenzen gegen die Datenbank (NCBI BLAST).

Quantifizierung der *Epichloë* DNA:

Die Quantifizierung erfolgte im CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Als Primer dienten IR-NS 5 und IN-NS 3 (Dombrowski et al., 2006) für *Epichloë*, sowie b-tub\_forw und b-tub\_rev (Rasmussen et al., 2007) für das Gras. Die Standardkurven wurden mittels genomischer DNA aus *E. uncinata* Reinkultur bzw. nicht infiziertem *L. perenne* durchgeführt. Hier wurde das gleiche Programm wie beim Nachweis (siehe oben) verwendet. Zusätzlich wurde nach den Schritten 4.) und 9.) die Platte ausgelesen. Im Anschluss erfolgte eine Schmelzkurve (60 °C bis 95 °C) in 0,5 °C Schritten für jeweils 5 Sekunden. Die gemessenen Mengen wurden in pg genomischer *Epichloë* DNA / ng genomischer Pflanzen DNA angegeben.

Bestimmung der Überlebensrate:

Zur Bestimmung der Überlebensrate der Endophyten nach Einlagerung wurden pro Akzession 24 Samen in Multiplatten ausgesät. Nach zwei Monaten wurden die Gräser geerntet und mittels Dot Blot die Besiedlung der Pflanzen mit endophytischen Pilzen nachgewiesen. Anschließend wurden die Gräser gefriergetrocknet. Nicht eindeutige Resultate wurden mittels DNA Extraktion (DNeasy Plant Mini Kit nach Angaben des Herstellers) und anschließender PCR mit *Epichloë* spezifischen Primern (siehe oben) verifiziert.

Charakterisierung der *Epichloë* Stämme:

Die verschiedenen Genotypen wurden anhand ihres Alkaloid-Bildungspotenzials sowie ihres Mating Typs charakterisiert. Hierzu wurde die folgenden Primerpaare aus Florea et al. (2015) verwendet: Ergot-Alkaloid, dmaW-F4/dmaW-6R und p12-F/p12-R; Indol-Diterpene, idtG-F/idtG-R und ltmQ-313/ltmQ-282; Pyrrolizidin Alkaloide, lolA-F1/lolA-R1 und lolC-3a/lolC-5b; Mating Typ, mtAC-F/mtAC-R und mtBA-F/mtBA-R. Für die Pyrrolopyrazin Alkaloide wurde das Primerpaar perA\_A2-F/perA\_A2-R von Takach et al. (2012) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde im C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mit 1 U DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Folgende Bedingungen wurden verwendet: 1.) 94°C × 1'; 2.) 94 °C × 15"; 3.) 56 °C × 30"; 4.) 72 °C × 30"; 5.) 29 mal zu 2.); 6.) 72 °C × 10'.

## Ergebnisse und Diskussion

Nachweis von *Epichloë* DNA:

In den Samen von 11 der 12 Akzessionen konnte eine Besiedlung mit *Epichloë* durch PCR nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um 10 Akzessionen bei denen im Ausgangsmaterial bereits Endophyten über Bengalrosa Färbung nachgewiesen wurden und eine Akzession (GR6603), bei der zuvor keine Infektion festgestellt worden war.

Identifikation der *Epichloë* Stämme:

Durch Abgleich der sequenzierten PCR Produkte mit der in der Datenbank (NCBI) hinterlegten *Epichloë* Sequenzen konnten die Endophyten aus *L. perenne* als *E. festucae* var. *lolii* und der Endophyt aus *L. rigidum* als *E. coenophialia* identifiziert werden.

Quantifizierung der *Epichloë* DNA:

Die mittels quantitativer PCR ermittelten Werte an genomischer *Epichloë* DNA pro ng genomischer Gras DNA zeigten eine positive Korrelation ( $r_{\text{pearson}} = 0,83$  /  $p_{\text{pearson}} = 0,0015$ ) mit der ursprünglich über Bengalrosa Färbung ermittelten Infektionsrate (Abb. 1 links). Hierbei wurde die Akzession GR6603 nicht mit in Auswertung übernommen, da hier ursprünglich eine Infektionsrate von 0% ermittelt wurde, in den Samen aber *Epichloë* DNA nachgewiesen werden konnte. Das  $\beta$ -tubulin Gen liegt bei *Epichloë* in nur einer Kopie vor. Eine Ausnahme bilden Hybride. Da es sich bei *E. coenophialia* um einen Hybriden aus drei verschiedenen *Epichloë* Arten handelt liegt hier das  $\beta$ -tubulin Gen in dreifacher Kopie vor. Dementsprechend wurde der gemessene Wert an genomischer *Epichloë* DNA in diesem Fall durch den Faktor drei geteilt.

Bestimmung der Überlebensrate:

Von den 24 pro Akzession ausgesäten Samen sind zwischen 21 und 24 gekeimt. Die Besiedlungsrate lag zwischen 4,3% und 95,8% und zeigte eine positive Korrelation mit der ursprünglich über Bengalrosa Färbung ermittelten Infektionsrate ( $r_{\text{pearson}} = 0,91$  /  $p_{\text{pearson}} = 9,30 \times 10^{-5}$ ) (Abb. 1 rechts), sowie mit dem Gehalt an genomischer DNA im Saatgut ( $r_{\text{pearson}} = 0,90$  /  $p_{\text{pearson}} = 6,74 \times 10^{-5}$ ) (Abbildung nicht gezeigt). Die größte Abweichung zwischen ursprünglicher Infektionsrate (48%) und Besiedlungsrate (4,3%) zeigte die Akzession GR6558 (*L. rigidum*), welche mit *E. coenophialia* besiedelt ist. Bezogen auf die ursprüngliche Infektionsrate ergibt sich hier eine Überlebensraten von 9,1%. Da von dieser Gras/Endophyt Kombination jedoch nur eine Akzession untersucht wurde, kann hier keine Aussage über die Abhängigkeit der Überlebensrate von Gras- oder *Epichloë* Art getroffen werden. Für die Kombination *L. perenne* und *E. festucae* var. *lolii* lag die Überlebensrate zwischen 80,8% und 119,0%. Da die tatsächliche Infektionsrate des eingesetzten Saatguts zuvor nicht bestimmt werden konnte ohne das Saatgut zu zerstören, können hier rechnerische Überlebensraten von > 100% auftreten.

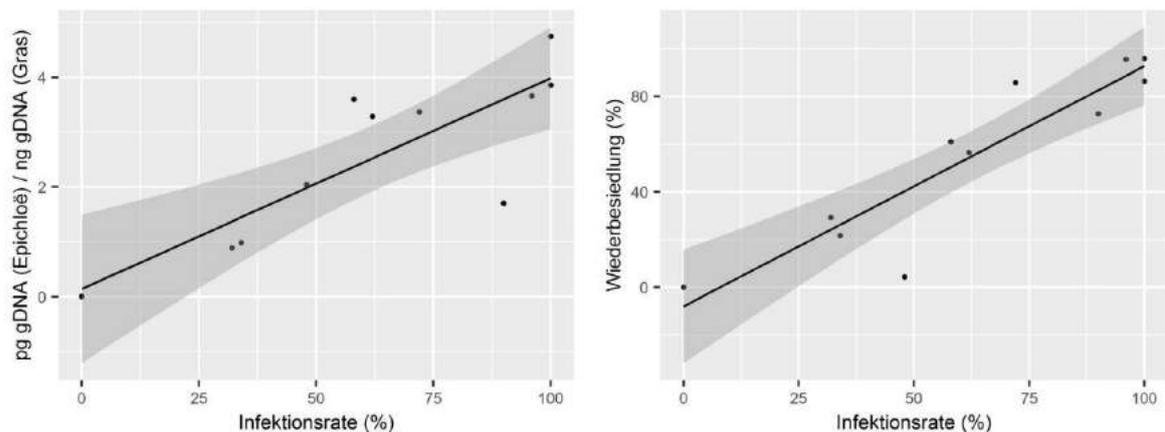


Abb. 1: Korrelation zwischen der durch Bengalrosa ursprünglich bestimmten Infektionsrate des Saatguts vor Einlagerung in der Genbank und a. dem Gehalt an genomischer DNA von *Epichloë* (links) sowie der Wiederbesiedlungsrate des Aufwuchses nach Aussaat (rechts). Das graue Band entspricht dem 95%igen Konfidenzintervall.

Charakterisierung der *Epichloë* Stämme:

*Epichloë* haltige Akzessionen wurden auf das Vorhandensein von Genen untersucht, die an der Alkaloid Biosynthese beteiligte Proteine kodieren. Desweiteren wurde der Mating-Typ der jeweiligen Endophyten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle Akzessionen das Potential haben die für Vertebraten toxischen Indol-Diterpene (*ItmG* und *ItmQ*) zu exprimieren. Ein Pyrrolizidin Alkaloid-Bildungspotential konnte nur für *E. coenophialia* (Akzession GR6558) gezeigt werden.

Tab. 1: Charakterisierung der *Epichloë*-Stämme anhand des Alkaloid-Bildungspotentials und es Mating Types. (+) = PCR-Produkt; (-) = kein PCR-Produkt.

Akzession	<u>Ergot-Alkaloide</u>		<u>Indol-Diterpene</u>		<u>Pyrrrolizidin Alk.</u>		<u>Pyrrolo-pyrazin Alk.</u>	<u>Mating type</u>	
	<i>dmaW</i>	<i>lpsB</i>	<i>ltmG</i>	<i>ltmQ</i>	<i>lolA</i>	<i>lolC</i>	<i>perA</i>	<i>mtAC</i>	<i>mtBA</i>
GR6549	-	+	+	+	-	-	+	-	+
GR6551	-	+	+	+	-	-	+	-	+
GR6558	-	+	+	+	+	+	+	+	+
GR6560	-	+	+	+	-	-	+	-	+
GR6576	+	+	+	+	-	-	+	-	+
GR6592	+	+	+	+	-	-	+	-	+
GR6594	+	+	+	+	-	-	+	-	+
GR6596	+	+	+	+	-	-	+	-	+
GR6603	-	+	+	+	-	-	+	-	+
GR6604	-	-	+	+	-	-	+	-	+
GR6607	-	+	+	+	-	-	+	-	+

## Schlussfolgerungen

Unter den gegebenen Lagerungsbedingungen (<8% Feuchte, -5°C) überlebt *Epichloë* im Genbank Material auch über einen längeren Zeitraum (in unserem Fall 17 Jahre). Zumindest für *E. festucae* var. *lolii* im Saatgut von *L. perenne* konnte gezeigt werden, dass es zu keiner nennenswerten Reduktion der Überlebensrate kommt. Ob dieses auch für andere Gras/Endophyt Kombinationen gilt muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Die hier identifizierten *Epichloë*-Stämme zeigten alle das Potential zumindest eines der beiden für Vertebraten toxischen Alkaloide zu bilden. Bevor diese Stämme in der Weidewirtschaft eingesetzt werden können, muss das toxische Potential durch biochemische Analysen bestimmt werden.

## Literatur

- DOMBROWSKI, J. E., J. C. BALDWIN, M. D. AZEVEDO & G. M. BANOWETZ (2006): "A Sensitive PCR-Based Assay to Detect Fungi in Seed and Plant Tissue of Tall Fescue and Ryegrass Species." *Crop Science* **46**(3): 1064-1070.
- FLOREA, S., C. L. SCHARDL & W. HOLLIN (2015): Detection and Isolation of *Epichloë* Species, Fungal Endophytes of Grasses. *Current Protocols in Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc.
- JOHNSON, L., A. M. DE BONTH, L. BRIGGS, J. CARADUS, S. FINCH, D. FLEETWOOD, L. FLETCHER, D. HUME, R. JOHNSON, A. POPAY, B. TAPPER, W. SIMPSON, C. VOISEY & S. CARD (2013): "The exploitation of *epichloae* endophytes for agricultural benefit." *Fungal Diversity* **60**(1): 171-188.
- KAUPPINEN, M., K. SAIKKONEN, M. HELANDER, A. M. PIIRTILÄ & P. R. WÄLI (2016): "Epichloë grass endophytes in sustainable agriculture." *Nature Plants* **2**: 15224-15230.
- MOON, C. D., C. MILES, U. JARLFORS & C. L. SCHARDL (2002): "The evolutionary origins of three new Neotyphodium endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere." *Mycologia* **94**.
- RASMUSSEN, S., A. J. PARSONS, S. BASSETT, M. J. CHRISTENSEN, D. E. HUME, L. J. JOHNSON, R. D. JOHNSON, W. R. SIMPSON, C. STACKE, C. R. VOISEY, H. XUE & J. A. NEWMAN (2007): "High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*." *New Phytologist* **173**(4): 787-797.
- SCHARDL, C. L. (1996): "EPICHLÖE SPECIES: FUNGAL SYMBIONTS OF GRASSES." *Annual Review of Phytopathology* **34**(1): 109-130.
- TAKACH, J. E., S. MITTAL, G. A. SWOBODA, S. K. BRIGHT, M. A. TRAMMELL, A. A. HOPKINS AND C. A. YOUNG (2012): "Genotypic and Chemotypic Diversity of Neotyphodium Endophytes in Tall Fescue from Greece." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(16): 5501-5510.