Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Efecto de endofitos Epichloë sobre la micorrización y productividad de gramíneas hospedantes y no hospedantes

Vignale, María Victoria

2016-03-23

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Vignale, María Victoria. (2016-03-23). Efecto de endofitos Epichloë sobre la micorrización y productividad de gramíneas hospedantes y no hospedantes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Vignale, María Victoria. "Efecto de endofitos Epichloë sobre la micorrización y productividad de gramíneas hospedantes y no hospedantes". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-23.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

"Efecto de endofitos *Epichloë* sobre la micorrización y la productividad de gramíneas hospedantes y no hospedantes"

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

María Victoria Vignale

Licenciada en Ciencias Biológicas, FCEyN-UBA

Directora de tesis: Dra. María Victoria Novas

Consejera de estudios: Dra. María Victoria Novas

Lugar de trabajo: Lab. de Micología, PROPLAME-PRHIDEB-CONICET y FCEyN-UBA

Buenos Aires, 23 de marzo de 2016

AGRADECIMIENTOS

No hubiese sido posible realizar esta Tesis sin la ayuda de todos!!:

Mis directores la Dra. M. Victoria Novas y el Dr. Leopoldo Javier Iannone por ser sobre todo muy buenas personas y grandes investigadores. Por confiar en mí, guiarme y ayudarme en todo lo que necesito, siempre! GRACIASSSSSS

UBA y CONICET por las becas para realizar mi doctorado.

Los jurados: Dra. Marina Omacini, Dra. Alejandra Rodriguez y Dr. Mario Saparrat, por la buena predisposición para evaluar esta tesis.

Dr. José P. De Battista y su grupo de la EEA INTA de Concepción del Uruguay por la ayuda con los experimentos a campo.

Dr Martin Scervino y Dra. Ivana Della Monica por la introducción al uso de las micorrizas *in vitro.*

Mi familia: mamá, papá, Juan y Ana, Santi, Abuela Elva, Abuelo José, Abuela Haydee y mis sobris los mejores del mundo Saru, Eleni y Juanpe.

Ema ♥

Pato por ser mi amiga y compañera compinche de labo y ayudarme siempre con su paciencia infinita.

Agus por ayudarme con las micorrizas, regadas, idas y venidas al invernadero, búsquedas de nitrógeno líquido y preparación de sustancias peligrosas jaja.

Al lab 69! Vicky, Leo, Pato, Agus, Ale, Pablo, Flor, Laura

Integrantes del PROPLAME-PRHIDEB: Andrea, Ceci, Laura DB, Laura L, Silvia, Silvia Inés, Susi P, Susi B, Esteban 1, Esteban 2, Fer, Caro, Lili, Bernardo, Juli, Leito, Raúl, Marce, Isa, Euge, Sandy, Franco, Andres, Luis, Anahí.

Comunidad Urdi: Aye, Laucha y la más linda Colombina por ser tan buenos amigos.

Ro, Kingui, Mechi, Caro R, Agus FdP

Mis amigos villeguenses, incondicionales, aunque nunca saben bien qué hago siempre me apoyan y dan energía!

ÍNDICE

RESUMEN 12

ABSTRACT 13

ABREVIATURAS 14

INTRODUCCIÓN GENERAL 15

Los endofitos *Epichloë* 15

Ciclo de vida y reproducción 16

Beneficios producidos por los endofitos 18

Endofitos *Epichloë* - gramíneas nativas: incidencia y distribución en Argentina 20

Asociación de la forrajera *Bromus auleticus* con endofitos *Epichloë* 22

Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) 24

Interacción entre HMA y endofitos *Epichloë* 29

HIPÓTESIS GENERALES 32

OBJETIVOS 33

Generales 33

Específicos 33

CAPÍTULO 1 "Efecto de endofitos *Epichloë* en la colonización micorrícica y producción de biomasa de *Bromus auleticus.* Ensayo a campo" 34

INTRODUCCIÓN 35

HIPÓTESIS PARCIALES 37

OBJETIVOS PARCIALES 37

MATERIALES Y MÉTODOS 38

RESULTADOS 42

DISCUSIÓN 47

CONCLUSIONES PARCIALES 50

CAPÍTULO 2 "Evaluación *in vitro* de la interacción entre endofitos *Epichloë* y hongos formadores de micorrizas arbusculares" 51

INTRODUCCIÓN 52

Sistemas de cultivo *in vitro* de raíces 54

HIPÓTESIS PARCIALES 57

OBJETIVOS PARCIALES 57

MATERIALES Y MÉTODOS 58

Obtención de exudados de endofitos *Epichloë* 59

Obtención de exudados de raíces de plantas 59

RESULTADOS 63

Efecto de los exudados de los endofitos sobre caracteres pre-infectivos de *Gigaspora rosea* . 63

Efecto de exudados sobre la esporulación y desarrollo de micelio de HMA en raíces transformadas de *Daucus carota.* 63

Exudados de endofitos 63

Exudados de plantas 64

DISCUSIÓN 67

CONCLUSIONES PARCIALES 70

CAPÍTULO 3 "Evaluación en maceta del efecto de endofitos *Epichloë* y sus exudados sobre la micorrización y biomasa del hospedante y sus vecinos" 71

INTRODUCCIÓN 72

Triple interacción: Gramínea–endofitos *Epichloë*–Hongos formadores de micorrizas arbusculares 72

HIPÓTESIS PARCIALES 75

OBJETIVOS PARCIALES 76

PARTE A – *Bromus auleticus* 77

MATERIALES Y MÉTODOS 77

RESULTADOS 81

PARTE B – *Bromus auleticus* en vecindad con *Lolium multiflorum* 90

MATERIALES Y MÉTODOS 90

RESULTADOS 93

DISCUSIÓN 98

CONCLUSIONES PARCIALES 102

CAPÍTULO 4 "Estudio del efecto de endofitos *Epichloë* en la colonización micorrícica y producción de biomasa de sus vecinas a campo" 103

INTRODUCCIÓN 104

HIPÓTESIS PARCIALES 106

OBJETIVOS PARCIALES 106

MATERIALES Y MÉTODOS 107

RESULTADOS....110
DISCUSIÓN....114
CONCLUSIONES PARCIALES....116
DISCUSIÓN GENERAL....117
CONCLUSIONES GENERALES....120
REFERENCIAS....122
ANEXO....139

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Colonización de *Epichloë tembladerae* en A- Semilla. B- Caña de la gramínea nativa *Bromus auleticus*. Las flechas y las letras H señalan las hifas de *Epichloë*. 16

Fig 2. Esquema del ciclo de vida de *Epichloë*. Modificado de Afkhami y Rudgers (2008) 18

Fig 3. Mapa de Argentina mostrando la distribución de pastos nativos infectados con *Epichloë,* modificado de Iannone et al. (2012b). 21

Fig 4. *Bromus auleticus* en el campo 23

Fig 5. Fases típicas en la colonización de una raíz por HMA. Modificado de Parniske (2008). 26

Fig 6. Esquema indicando la diversidad de posibles interacciones que involucran al micelio extraradical de las micorrizas. Adaptado de Finlay (2008) 27

Fig 7. A- Esquema típico de un arbúsculo modificado de Parniske (2008). MPA: Membrana PeriArbuscular, MPF: Membrana Plasmática Fúngica, EPA: Espacio PeriArbuscular, PC: Pared Celular. B- Foto de un arbúsculo 28

Fig 1 - 1. Difrentes estructuras de los HMA encontradas durante la observación de las raíces. A y C. Coils; B y E. Arbúsculos; D. Vesícula terminal y F. Punto de entrada de la hifa a la raíz de la planta. 42

Fig 1 - 2. Colonización micorrícica (M) y porcentaje de arbúsculos (A) en plantas de *B. auleticus* que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë*; E-=plantas no infectadas con *Epichloë*) y el nivel de fertilización aplicado al suelo (F+= con aplicación de fertilizante; F-= sin la aplicación de fertilizante). A. y C. corresponden al ecotipo LP y B. y D. corresponden al ecotipo EP. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos y tiempos de cosecha ($p<0,05$). Las barras de error representan el error estándar (EE). 44

Fig 1 - 3. Peso seco acumulado (g) de plantas de *Bromus auleticus* en las sub-subparcelas que difieren en el estatus endofítico y en la fertilización del suelo. LP= ecotipo La Pampa; EP= ecotipo El Palmar; E+= plantas infectadas con *Epichloë*; E-= plantas no infectadas con *Epichloë*; F+= con aplicación de fertilizante al suelo; F-= sin aplicación de fertilizante al suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$). Las barras de error representan el EE. 45

Fig 1 - 4. Número de panojas de *B. auleticus* producidas en las sub-subparcelas. LP= ecotipo La Pampa; EP= ecotipo El Palmar; E+= plantas infectadas con *Epichloë*; E-= plantas no infectadas con *Epichloë*; F+=sin la aplicación de fertilizante al suelo; F-= con la aplicación de fertilizante al suelo. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada ecotipo ($p<0,05$). Las barras de error representan el EE. 45

Fig 1 - 5. Producción de semillas (g) en las sub-subparcelas. LP= ecotipo La Pampa; EP= ecotipo El Palmar; E+= plantas infectadas con *Epichloë*; E-= plantas no infectadas con *Epichloë*; F+=sin la aplicación de fertilizante al suelo; F-= con la aplicación de fertilizante al suelo. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada ecotipo ($p<0,05$). Las barras de error representan el EE. 46

Fig 2 - 1. Los exudados de las plantas median una gran cantidad de interacciones rizosféricas: a nivel específico (lado derecho), interacciones multitróficas (abajo) y a nivel de comunidades (lado izquierdo). Las barras de colores representan diferentes microorganismos y los rectángulos grises (lado izquierdo) representan comunidades microbianas de la rizósfera. Las barras dentro de cada comunidad representan la distribución cuantitativa y cualitativa de los microorganismos. Cuadrados, pentágonos, círculos, estrellas y

rectángulos representan diferentes compuestos liberados como exudados de las raíces. Esquema modificado de Huang et al. (2014). 53

Fig 2 - 2. Capa de aleurona de una semilla de *Bromus auleticus* infectada con *Epichloë*, se observan las hifas características (H). 59

Fig 2 - 3. Esquema de obtención de exudados A- de endofitos B- de plantas, utilizados para suplementar el medio donde crecieron los HMA en asociación con las raíces transformadas de *D. carota.* 60

Fig 2 - 4. A-Placa de Petri (90x15 mm) donde se visualizan las 4 áreas de 0,25 cm^2 delimitadas con la grilla para el recuento de esporas e hifas. B-Raíz transformada de *Daucus carota* en asociación con *Rhizophagus intraradices.* R=raíz transformada de *Daucus carota*; ME= micelio extraradical de *R. intraradices* y E=espora de *R. intraradices*. 45X 62

Fig 2 - 5. Efecto del agregado de diferentes concentraciones de exudados de *E. tembladerae* sobre parámetros pre-infectivos de *G. rosea* cultivada en medio semisólido: **A-** Número de clusters de células auxiliares, número de ápices, longitud hifal (cm) y porcentaje de germinación de las esporas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). **B-** Cluster de células auxiliares observado con microscopio óptico (40X).63

Fig 2 - 6. Longitud hifal y número de esporas de *R. intraradices* cultivado en raíces transformadas de *Daucus carota* suplementado con exudados de A. *Epichloë tembladerae;* B. *Epichloë coenophiala;* C. *Bromus auleticus* y D. *Lolium multiflorum.* Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones para la longitud hifal mientras que letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones para el número de esporas (p<0,05). Todos los datos fueron relativizados al control que se realizó sin el suplemento de exudados. El tratamiento E- se realizó con el suplemento de exudados de *B. auleticus* E- y *L. multiflorum* E- para los cuales se eligió la concentración 0,1 %. Las barras de error representan el error estándar. 65

Fig 3 - 1. Esquema de los tratamientos realizados. La planta que se encuentra encerrada con un óvalo fue la que seleccionó en cada caso para realizar las mediciones correspondientes y es la que se encuentra subrayada en el detalle del tratamiento debajo de cada maceta. 78

Fig 3 - 2. Micorrización total (%) incluyendo hifas, arbúsculos, coils y vesículas en plantas de *B. auleticus* que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el error estándar (EE). 81

Fig 3 - 3. Arbúsculos (%) en plantas de *B. auleticus* que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 82

Fig 3 - 4. Hifas (%) en plantas de *B. auleticus* que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 82

Fig 3 - 5. Longitud del vástago (cm) de las plantas de *Bromus auleticus* en simbiosis con hongos formadores de micorrizas arbusculares (M+) y sin estar asociadas (M-). Letras diferentes indican diferencias

significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE. 84

Fig 3 - 6. Número de macollos de la gramínea nativa *Bromus auleticus* luego de 6 meses de crecimiento en invernadero. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 85

Fig 3 - 7. Floración de la gramínea nativa *Bromus auleticus* luego de 6 meses de crecimiento que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. M+= asociada con hongos formadores de micorrizas arbusculares y M-=sin estar asociadas. 86

Fig 3 - 8. A. Peso seco del vástago (g) y B. Peso seco de la raíz (g) de plantas de *Bromus auleticus* luego de 6 meses de crecimiento en maceta en el invernadero. E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. EXU+= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y EXU-=sin aplicación de exudados durante el crecimiento de las plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE. 87

Fig 3 - 9. Concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG) fácilmente extraíble expresada como miligramo de proteína por gramo de suelo seco. E+=corresponde al suelo acondicionado con dos plantas de *Bromus auleticus* con endofito por maceta; E+/E-=suelo de las macetas que contenían una planta con endofito y una sin y E-= suelo proveniente de macetas que contenían dos plantas sin endofito por maceta. EXU+= tratamiento con exudado de endofito y EXU-=sin aplicación de exudados durante el crecimiento de las plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 88

Fig 3 - 10. Concentración de A. Fósforo (mg/kg) B. Nitrógeno total (g/kg) C. Carbono total (g/kg) medidos al final del ensayo. E+=corresponde al suelo acondicionado con dos plantas de *Bromus auleticus* con endofito por maceta; E+/E-=suelo de las macetas que contenían una planta con endofito y una sin y E-= suelo proveniente de macetas que contenían dos plantas sin endofito por maceta. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE. 89

Fig 3 - 11. Micorrización total (%) en plantas de *B. auleticus* (izquierda) en donde B+=infectadas con *E. tembladerae* y B-=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a L+ y las barras punteadas a L-. Plantas de *Lolium multiflorum* (derecha) en donde L+=infectadas con *E. occultans* y L-=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a B+ y las barras punteadas a B-. EXU+= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y EXU-=sin aplicación de exudados. Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el error estándar (EE). 93

Fig 3 - 12. Arbúsculos (%) en plantas de *B. auleticus* (izquierda) en donde B+=infectadas con *E. tembladerae* y B-=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a L+ y las barras punteadas a L-. Plantas de *Lolium multiflorum* (derecha) en donde L+=infectadas con *E. occultans* y L-=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a B+ y las barras punteadas a B-. EXU+= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y EXU-=sin aplicación de exudados. Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el error estándar (EE). 94

Fig 3 - 13. Longitud del vástago (cm) de las plantas de *B. auleticus* (izquierda) en donde B+=infectadas con *E. tembladerae* y B-=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a L+ y las barras punteadas a L-. Plantas de *Lolium multiflorum* (derecha) en donde L+=infectadas con *E. occultans* y L-=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a B+ y las barras punteadas a B-. EXU+= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y EXU-=sin aplicación de exudados. Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el error estándar (EE). 95

Fig 3 - 14. Número de macollos de *Bromus auleticus* (izquierda) y de *Lolium multiflorum* (derecha) luego de 6 meses de crecimiento en maceta en el invernadero. B+=corresponde a las plantas de *Bromus auleticus* asociadas con *E. tembladerae* y B- sin endofito; L+= *Lolium multiflorum* asociado a *E. occultans* y L- sin endofito. EXU+= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y EXU-=sin aplicación de exudados. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 95

Fig 3 - 15. Peso seco del vástago (g) de plantas de *Bromus auleticus* (izquierda) y de *Lolium multiflorum* (derecha) luego de 6 meses de crecimiento en maceta en el invernadero. B+=corresponde a las plantas de *Bromus auleticus* asociadas con *E. tembladerae* y B- sin endofito; L+= *Lolium multiflorum* asociado a *E. occultans* y L- sin endofito. EXU+= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y EXU-=sin aplicación de exudados. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE. 96

Fig 3 - 16. Peso seco de la raíz (g) de plantas de *Bromus auleticus* (izquierda) y de *Lolium multiflorum* (derecha) luego de 6 meses de crecimiento en maceta en el invernadero. B+=corresponde a las plantas de *Bromus auleticus* asociadas con *E. tembladerae* y B- sin endofito; L+= *Lolium multiflorum* asociado a *E. occultans* y L- sin endofito. EXU+= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y EXU-=sin aplicación de exudados. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE. 97

Fig 4 - 1. A-Esquema del ensayo planteado. Los rectángulos grandes representan a las parcelas en donde fueron sembradas las plantas de *Bromus auleticus* del ecotipo EP y entre sus líneas fueron sembradas las diferentes gramíneas: L+= *Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans;* L-=*Lolium multiflorum* sin endofito; S+= *Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala;* S-=*Schedonorus arundinaceus* sin endofito Bc=*Bromus catharticus*. B- Analizando la emergencia total de las plántulas en las parcelas a los dos meses desde la siembra. 108

Fig 4 - 2. Emergencia total de plántulas (n°) de las diferentes gramíneas en las parcelas acondicionadas con *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). *L+= Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans;* L-=*Lolium multiflorum* sin endofito; *S+= Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S-=Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc=Bromus catharticus*. Letras diferentes significan diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 110

Fig 4 - 3. A- Porcentaje de micorrización y B- Porcentaje de arbúsculos en diferentes gramíneas: *L+= Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans; L-=Lolium multiflorum* sin endofito; *S+=Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S-=Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc=Bromus catharticus* que crecieron durante 6 meses en parcelas acondicionadas con plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). Letras diferentes significan diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 111

Fig 4 - 4. A- Longitud del vástago (cm) y B- Longitud de la raíz (cm) de las gramíneas *L+= Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans; L-=Lolium multiflorum* sin endofito; *S+=Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S-=Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc=Bromus catharticus* que crecieron

durante 6 meses en parcelas acondicionadas con plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). Letras diferentes significan diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 112

Fig 4 - 5. Número de hojas de las gramíneas *L*+= *Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans; L*-=*Lolium multiflorum* sin endofito; *S*+=*Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S*-=*Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc*=*Bromus catharticus* que crecieron durante 6 meses en parcelas acondicionadas con plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Letras diferentes significan diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 112

Fig 4 - 6. Peso seco del vástago (g) de las gramíneas *L*+= *Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans; L*-=*Lolium multiflorum* sin endofito; *S*+=*Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S*-=*Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc*=*Bromus catharticus* que crecieron durante 6 meses en parcelas acondicionadas con plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). Letras diferentes significan diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE. 113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 – 1. Parámetros del suelo medidos. F+ y F- corresponden al nivel de fertilización; 0 meses: Principio del ensayo y 12 meses: final del ensayo; pH en agua 1:2.5 H_2O; Ct (%): Carbono total; Nt (%): Nitrógeno total; P (ppm, fósforo disponible); Rel C/N: Relación Carbono/Nitrógeno. 40

Tabla 2 - 2. Longitud hifal (m) de *Rhizophagus intraradices* creciendo en asociación con las raíces transformadas de *Daucus carota* en placas suplementadas con exudados de endofitos: *E. tembladerae* y *E. coenophiala* y exudados de plantas: *B. auleticus* y *L. multiflorum* a diferentes concentraciones 0,05; 0,1; 1,5 y 3 %. El tratamiento control se realizó sin el suplemento de exudados y el tratamiento E- se realizó con el suplemento de exudados de *B. auleticus* E- y *L. multiflorum* E- para los cuales se eligió la concentración 0,1 %. 66

Tabla 2 - 3. Número de esporas producidas por *Rhizophagus intraradices* creciendo en asociación con las raíces transformadas de *Daucus carota* en placas suplementadas con exudados de endofitos: *E. tembladerae* y *E. coenophiala* y exudados de plantas: *B. auleticus* y *L. multiflorum* a diferentes concentraciones 0,05; 0,1; 1,5 y 3 %. El tratamiento control se realizó sin el suplemento de exudados y el tratamiento E- se realizó con el suplemento de exudados de *B. auleticus* E- y *L. multiflorum* E- para los cuales se eligió la concentración 0,1 %. 66

Tabla 3 - 1. Porcentaje de hifas, arbúsculos, vesículas y coils en los diferentes tratamientos ± error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05). 83

Efecto de endofitos *Epichloë* sobre la micorrización y la productividad de gramíneas hospedantes y no hospedantes

RESUMEN

Las plantas a menudo establecen múltiples asociaciones simbióticas simultáneas con diferentes microorganismos; sin embargo, la forma en que cada simbionte afecta a los otros simbiontes y los efectos de estas múltiples interacciones en la productividad de las plantas hospedantes no son bien entendidos.

Esta tesis está centrada en contribuir al conocimiento de las interacciones multitróficas entre gramíneas nativas y endofitos *Epichloë*. Particularmente, está dirigida a la caracterización de la triple asociación mutualista entre gramíneas, endofitos y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y a establecer los mecanismos que expliquen la correlación positiva observada entre la presencia de endofitos *Epichloë* y la colonización de gramíneas nativas por HMA.

Se realizaron ensayos ***in vitro***, donde se analizó el efecto de los exudados de endofitos y de plantas infectadas con endofitos (E+) y no infectadas (E-) sobre la fase extramatrical de los HMA. Se estudiaron, **en invernadero**, el efecto de exudados de endofitos sobre la micorrización y la productividad vegetal en plantas de *Bromus auleticus* libres de endofitos (E-) y en plantas vecinas agronómicamente seleccionada: *Lolium multiflorum* (E+ y E-). Se analizaron, **a campo**, el efecto simultáneo en simbiosis de los endofitos y los HMA sobre el desarrollo vegetativo y otros caracteres de interés agronómico de gramíneas nativas como *Bromus auleticus*, seleccionadas agronómicamente: *Lolium multiflorum* y *Schedonorus arundinaceus y* sobre una gramínea libre de endofitos en la naturaleza: *Bromus catharticus.*

Este plan comprende estudios básicos para el futuro aprovechamiento y manejo tecnológico de la triple simbiosis mutualista que se relacionan con el mejoramiento de pastos para el forraje y productividad vegetal.

Palabras clave: *Bromus auleticus*, *Epichloë,* Hongos formadores de micorrizas arbusculares, *Neotyphodium*, Simbiosis

Effect of epichloid endophytes on arbuscular mycorrhizal colonization and productivity of host and non host grasses

ABSTRACT

Plants often establish multiple simultaneous symbiotic associations with different micro-organisms; however, the way in which each symbiont affects the other symbionts and the effects of these multiple interactions on plant performance are not well understood.

This thesis is focused on contributing to the knowledge of multitrophic interactions between native grasses and *Epichloë* endophytes. Particularly, it is directed to the characterization of the triple mutualist interaction between grasses, endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and to establish mechanisms that explain the observed positive correlation between the presence of *Epichloë* endophytes and the colonization of native grasses by HMA.

In vitro tests where the effect of endophytes exudates and from infected (E +) and endophyte free plants (E-) on the AMF extramatrical phase were performed.

Greenhouse experiments were also performed to study the effect of endophyte exudates on the mycorrhization and plant productivity of uninfected (E-) *Bromus auleticus* and *Lolium multiflorum* (ryegrass) (E+ and E-) (agronomically selected).

We performed **field trials** to study the simultaneous effect of symbiotic endophytes and AMF on the vegetative development and other traits of agronomic interest of native grasses as *Bromus auleticus*, agronomically selected as *Lolium multiflorum* and *Schedonorus arundinaceus* and endophyte-free grass in nature: *Bromus catharticus*.

This plan includes basic studies for the future development and technological management of a triple mutualistic symbiosis that relate to the improvement of pastures for forage and plant productivity.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi, *Bromus auleticus*, *Epichloë*, *Neotyphodium*, Symbiosis

ABREVIATURAS

ANAVA = Análisis de la Varianza

APGc = Agar Papa Glucosado con cloranfenicol

Ba+ = *Bromus auleticus* con endofito

Ba- = *Bromus auleticus* sin endofito

Bc = *Bromus catharticus*

C = carbono

E+ = con endofito

E- = sin endofito

Exu+ = con exudados

Exu- = sin exudados

EE = error estándar

EP = El Palmar, ecotipo de la gramínea nativa *Bromus auleticus* asociada con *Epichloë tembladerae*

F+ = con aplicación de fertilizante

F- = sin la aplicación de fertilizante

h = horas

HMA = Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares

L+ = *Lolium multiflorum* con endofito

L- = *Lolium multiflorum* sin endofito

LP = La Pampa, ecotipo de la gramínea nativa *Bromus auleticus* asociada con *Epichloë pampeana*

M+ = con micorrizas

M- = sin micorrizas

N = nitrógeno

P = fósforo

PGc = Papa Glucosado con cloranfenicol

PSRG = Proteínas del suelo relacionadas con la glomalina

S+ = *Schedonorus arundinaceus* con endofito

S- = *Schedonorus arundinaceus* sin endofito

INTRODUCCIÓN GENERAL

Se conoce con el nombre genérico de endofitos, a hongos que viven en el interior de los tejidos o células de las estructuras aéreas de las plantas, no ocasionan síntomas aparentes de infección y se reconoce una relación generalmente mutualista entre sus integrantes. La planta provee al hongo de nutrientes (fotosintatos), protección y un mecanismo de dispersión y reproducción (semillas infectadas) (Clay 1990; Schardl et al. 2004).

Los endofitos *Epichloë*

El presente trabajo se centró en un grupo particular de endofitos fúngicos foliares, conformado por las especies asexuales del género *Epichloë* Tul. (Hypocreales, Clavicipitaceae), antes incluidas en el género *Neotyphodium* Glenn, Bacon & Hanlin (Leuchtmann et al. 2014). Los hongos del género *Epichloë* (Tul) son un grupo de Ascomicetes (Hypocreales, Clavicipitaceae) que incluyen especies sexuales y asexuales que establecen asociaciones simbióticas como endofitos foliares y son comúnmente llamados "endofitos de pastos" debido a que crecen en los tejidos aéreos de algunas gramíneas C3 (Poaceae, subfamilia Pooideae) (Schardl et al. 2004; Leuchtmann et al. 2014). Estos endofitos colonizan los meristemas de macollos y flores en formación y se caracterizan por crecer de manera sistémica e intercelular en el apoplasto de los tejidos aéreos de sus hospedantes sin producir síntomas de colonización o enfermedad (White Jr 1987) (**Fig 1**). No se han observado haustorios u otro tipo de estructura intracelular involucrada en asociaciones de tipo patogénicas, ni degradación de pared celular que desencadene mecanismos de respuesta en el hospedante (Christensen et al. 2008).

Se considera que los endofitos se desarrollan a expensas de los nutrientes tales como aminoácidos, azúcares y compuestos orgánicos e inorgánicos como calcio, nitrato y potasio que obtienen del espacio apoplástico del hospedante (Moy et al. 2002; Kuldau y Bacon 2008; White y Torres 2010).

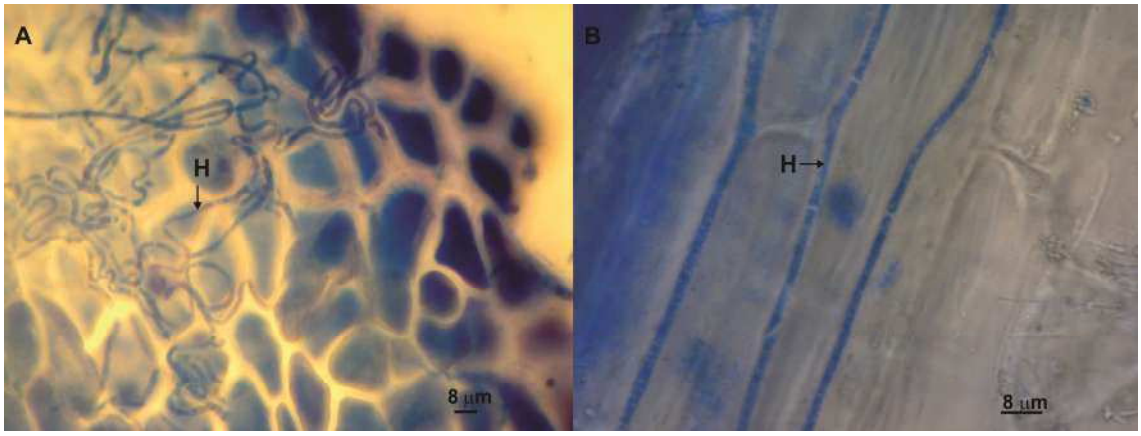

Fig 1. Colonización de *Epichloë tembladerae* en **A-** Semilla. **B-** Caña de la gramínea nativa *Bromus auleticus*. Las flechas y las letras H señalan las hifas de *Epichloë*.

Ciclo de vida y reproducción

En base a diferencias en sus ciclos de vida (**Fig 2**), se han establecido 3 tipos de asociaciones con distintos grados de patogenicidad (White Jr 1988). Las especies sexuales, que pueden corresponder a la Asociación Tipo I o Tipo II, se caracterizan por producir estromas (signo de infección) sobre las cañas florales de su hospedante, que impiden la expansión de la hoja bandera evitando el desarrollo de la inflorescencia (causando la enfermedad conocida como "choke"). Sobre el estroma se generan conidios que actúan como espermacios. Dado que se trata de especies heterotálicas, el proceso de reproducción sexual se desencadena cuando los espermacios son llevados a un estroma del tipo de apareamiento opuesto, por moscas del género *Botanophila* (Schardl et al. 2004). Luego de la fecundación, en el estroma maduran los peritecios con ascos y ascosporas filiformes, las cuales se consideran responsables del contagio, al infectar flores y ovarios en desarrollo en plantas vecinas (transmisión horizontal). Luego de la fecundación del óvulo, las hifas permanecen dentro de la semilla y colonizan a las plántulas hijas luego de la germinación (Philipson y Christey 1986; Schardl y Phillips 1997; Schardl et al. 2004). Cuando se desarrollan estromas sobre todos los macollos reproductivos de la planta hospedante impidiéndole completamente la producción de semillas (Asociación Tipo I), producen esterilidad total de la planta y la transmisión de los endofitos se realiza mediante esporas sexuales únicamente. En cambio, en la Asociación Tipo II se produce una esterilidad parcial. Los estromas se desarrollan sobre algunos de los macollos reproductivos mientras que en otros macollos las flores desarrollan normalmente y el endofito coloniza el ovario sin alterar la formación de la semilla, de esta

manera, la producción de semillas es suprimida sólo en parte y el hongo se propaga tanto a través de las ascosporas como en las semillas.

Las especies asexuales no suprimen la reproducción de su hospedante (Asociación Tipo III), sino que colonizan el ovario sin alterar el desarrollo de la semilla, permaneciendo generalmente asociados a la capa de aleurona. Luego, infectan la plántula al germinar la semilla (excepto *Epichloë stromatolonga* que forma un estroma pero no se observó que complete la fase sexual (Leuchtmann et al. 2014)). Por lo que, se considera que la forma de transmisión y reproducción de los endofitos asexuales es mayormente vertical a través de las semillas del hospedante, de la planta madre a las plantas hijas (White Jr 1988). La tasa de transmisión vertical es muy eficiente, alcanzando en algunos casos el 100 % (Clay y Schardl 2002). No obstante, en la naturaleza, las poblaciones presentan una frecuencia de infección variable, indicando que existiría variabilidad en la efectividad del mutualismo y/o en la eficiencia de transmisión del endofito (Clay y Schardl 2002; Saikkonen et al. 2004; Gundel et al. 2008). Las variaciones en las tasas de transmisión, detectadas tanto en poblaciones de especies nativas como de especies mejoradas agronómicamente (Gundel et al. 2009; Rudgers et al. 2009), parecen depender de factores abióticos y bióticos. Sin embargo, prácticamente no existe información acerca de cómo operan los distintos factores ecológicos sobre el proceso de transmisión. En los últimos años se ha comprobado que algunas especies asexuales pueden transmitirse en forma horizontal por la infección de conidios del simbionte producidos sobre el hospedante (Tadych et al. 2012; Oberhofer y Leuchtmann 2014).

La mayoría de las especies sexuales son haploides mientras que, en contraposición, la mayoría de las especies asexuales son híbridos, inter o intraespecíficos. Es decir, que derivan de ancestros haploides con la posibilidad de eventos de hibridación sucesiva, posiblemente mediados por la fusión de hifas de las especies parentales presentes en una misma planta hospedante (Clay y Schardl 2002; Moon et al. 2004; Gentile et al. 2005). Análisis filogenéticos junto con estimaciones de tamaños de genomas, y en los últimos años la secuenciación de genomas enteros, muestran que las especies híbridas han conservado la mayoría o el total de los genomas aportados por las dos, y a veces tres, especies ancestrales (Kuldau et al. 1999; Schardl et al. 2013).

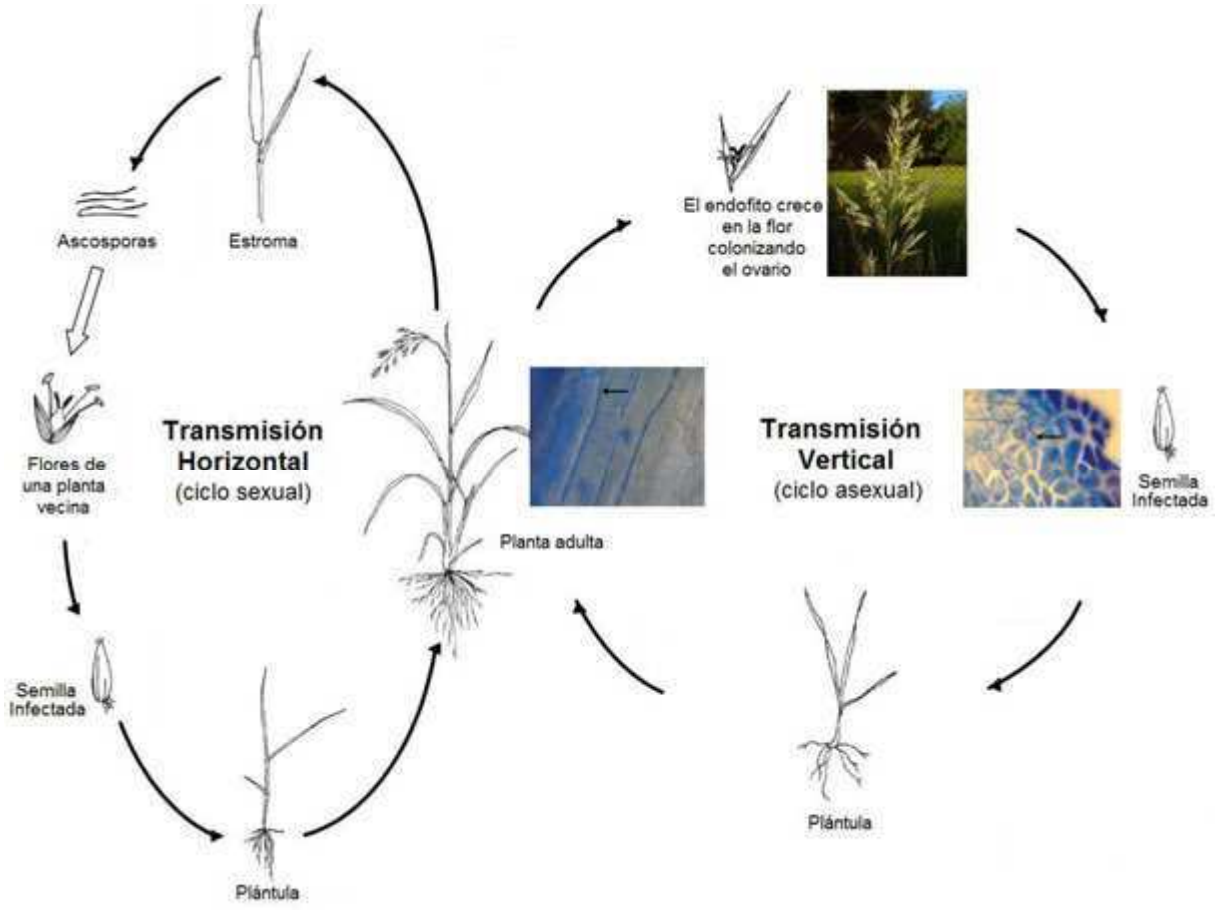

Fig 2. Esquema del ciclo de vida de *Epichloë*. Modificado de Afkhami y Rudgers (2008)

Beneficios producidos por los endofitos

Promoción del crecimiento y resistencia a estrés abiótico Diversos estudios han revelado que los endofitos promueven el desarrollo de biomasa, la producción de semillas y la capacidad de rebrote de las plantas hospedantes (Clay 1988; Iannone et al. 2012c; Zhang et al. 2015). Además, pueden conferir tanto resistencia al estrés por inundación (Song et al. 2015) como por sequía (Malinowski y Belesky 2000; Oberhofer et al. 2013) y por metales pesados (Zaurov et al. 2001; Soleimani et al. 2010; Zhang et al. 2010).

Toxicidad contra herbívoros Una de las características distintivas y considerada una de las más importantes de esta asociación simbiótica es la capacidad fúngica de producir diversas clases de alcaloides con efecto anti-herbívoros (Luo et al. 2015; Saikkonen et al. 2015). Existe una gran variación inter e intraespecífica en la cantidad y composición química de los alcaloides producidos en las plantas infectadas (Saikkonen et al. 2013a;

Saikkonen et al. 2015). Tanto la combinación endofito-gramínea como las variables ambientales afectan la producción de alcaloides y deben ser tenidas en cuenta al usar gramíneas infectadas con endofitos para su uso en la agricultura (Helander et al. 2016). Estos alcaloides pueden dividirse en cuatro clases: alcaloides del ergot (ergovalina y ergotamina) e indol-diterpenos (incluyendo lolitrems) ambos con fuertes efectos neurotóxicos en mamíferos (Panaccione 2005; Young et al. 2006) y pirrolzidinas (lolinas) y pirrolpirazinas (peraminas) que tienen efectos neurotóxicos o alteran la alimentación de insectos fitófagos y posiblemente otros invertebrados como los nematodes (Schardl et al. 2007; Bacetty et al. 2009; Popay et al. 2009; Matsukura et al. 2014).

Efectos sobre hongos patógenos En cuanto a su efecto sobre hongos patógenos, son pocos los ensayos realizados e indican que las plantas E+ son afectadas en menor medida que las E- por los patógenos, viéndose efectos de inhibición *in vivo* e *in vitro* (Yue et al. 2000; Clarke et al. 2006; Tian et al. 2008; Pérez et al. 2013; Vignale et al. 2013; Ma et al. 2014; Xia et al. 2015)

Efectos en la comunidad La presencia de plantas infectadas con endofitos promueve cambios en su entorno. Los exudados radicales regulan la estructura microbiana del suelo y la diversidad de la rizósfera inhibiendo el crecimiento de microorganismos, a través de compuestos antifúngicos e incrementando la abundancia mediante compuestos promotores del crecimiento (Broeckling et al. 2008). Por ejemplo puede alterar tasas de descomposición de la materia orgánica, cadenas tróficas y las comunidades del suelo (Omacini et al. 2004; Lemons et al. 2005; Casas et al. 2011; Omacini et al. 2012). Además, en mayor o menor medida, la presencia de plantas con endofitos puede modificar la composición de la comunidad vegetal (Rudgers et al. 2010). A pesar de la gran cantidad de resultados recopilados a lo largo de los años, sobre los efectos del endofito en organismos y comunidades del suelo es necesario seguir investigando estos aspectos de la interacción incluyendo diferentes sistemas gramínea-endofito, principalmente en gramíneas silvestres donde se evidencia mayor variabilidad en la respuesta y donde se han realizado menos trabajos.

Otros beneficios Se ha revelado que diferentes especies de *Epichloë* pueden reprogramar el metabolismo de su planta hospedante y modelar la fotosíntesis (Rozpądek et al. 2015) y la señalización química entre ellos (Dupont et al. 2015; Eaton et al. 2015) y por lo tanto

promover así el crecimiento y la reproducción mejorando el *fitness* de la planta hospedante (Rudgers et al. 2007; Saikkonen et al. 2013a).

Los efectos mencionados anteriormente, resultantes de la interacción gramínea hospedante – endofitos *Epichloë*, están influenciados por varios factores entre los que se encuentran el genotipo de cada miembro de la asociación (Gundel et al. 2010b; Saikkonen et al. 2010). Estos factores interactúan entre sí generando combinaciones en las que la asociación puede resultar desde beneficiosa a perjudicial para el hospedante y la supervivencia y transmisión del endofito. Esto da lugar a que en una especie hospedante haya plantas o poblaciones con y sin endofitos.

Entre otros parámetros ambientales que influyen en la incidencia de estos endofitos se encuentran los nutrientes, el pH del suelo, la comunidad vegetal y las precipitaciones (Malinowski y Belesky 2000; Novas et al. 2007).

Endofitos *Epichloë* - gramíneas nativas: incidencia y distribución en Argentina

En Argentina se han registrado, hasta el momento, 38 especies de hospedantes asociadas a endofitos, en su mayoría no tóxicas para el ganado (Iannone et al. 2012b). Las especies hospedantes pertenecen a los géneros: *Briza, Bromus, Festuca, Melica, Phleum y Poa* (Iannone et al. 2011) y las especies más recientemente detectadas son *Hordeum comosum* (Gundel et al. 2010a) y *Poa calchaquiensis* (Iannone et al. 2012b).

Aunque el conocimiento sobre endofitos en pastos nativos de la Argentina se ha incrementado en los últimos años (Cabral et al. 1999; Gentile et al. 2005; Novas et al. 2007; Iannone et al. 2009; Iannone et al. 2012b; Iannone et al. 2012c; Iannone et al. 2015), su diversidad, distribución y la incidencia ha sido poco estudiada en la mayoría de los hospedantes. Estas asociaciones endofitos-gramíneas están distribuidas en un amplio rango de ambientes, desde las selvas subtropicales en el norte del país, hasta los desiertos fríos del sur de la Patagonia (Iannone et al. 2012b) (**Fig 3**), y la incidencia de los endofitos varía entre las poblaciones de pastos.

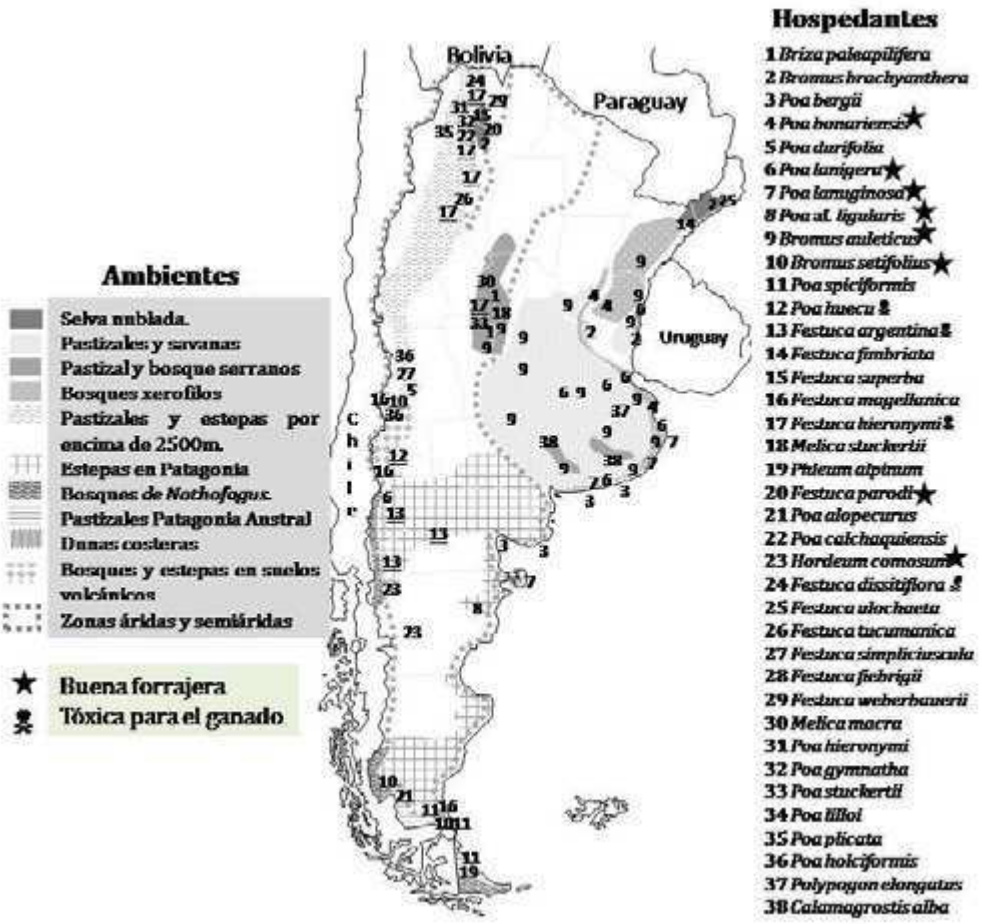

Fig 3. Mapa de Argentina mostrando la distribución de pastos nativos infectados con *Epichloë,* modificado de Iannone et al. (2012b).

En Argentina menos del 20 % de las especies de pastos estudiados están infectadas por endofitos *Epichloë*. En el caso particular de *Bromus auleticus,* las poblaciones naturales presentan un 100 % de infección (Iannone et al. 2011).

Hasta el momento, en ninguno de los pastos infectados se ha observado "choke" u otro síntoma relacionado con la presencia de estadios sexuales, por lo que se postula que en Argentina y probablemente en Sudamérica sólo se encuentran especies asexuales. Los estudios realizados sobre las relaciones filogenéticas entre los endofitos de gramíneas nativas indican la existencia de al menos 5 especies de endofitos (Mc Cargo et al. 2014; Mc Cargo 2015). Cuatro de ellas híbridos interespecíficos derivados de las especies sexuales, *E. typhina* subsp. *poae y E. festucae l*as cuales no han sido reportadas en Argentina (Gentile et al. 2005; Mc Cargo et al. 2014; Iannone et al. 2015).

Cabe destacar la presencia de una misma especie de *Epichloë* en diversas especies hospedantes no relacionadas filogenéticamente y la presencia de más de una especie de endofito por especie hospedante en algunos casos, como se ha observado en *B. auleticus*

(Iannone et al. 2009; Iannone et al. 2012b), *Phleum alpinum* y *Bromus setifolius* (Mc Cargo et al. 2014).

Asociación de la forrajera *Bromus auleticus* con endofitos *Epichloë*

Bromus auleticus Trin. ex Nees (Pooideae) es una gramínea C3 perenne invernal nativa de Argentina, sur de Brasil y Uruguay. Dentro de Argentina, donde es vulgarmente denominada cebadilla chaqueña, su área de distribución abarca las provincia de La Pampa, Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, San Luis, Entre Ríos y Corrientes (Gutiérrez y Pensiero 1998; Millot 2001). Se la puede encontrar tanto en pastizales de la región pampeana como en las sierras cordobesas y puntanas, sur de la región chaqueña y en la Mesopotamia hasta la mitad sur de Corrientes. Habita en suelos arenosos o arenosos-humíferos pero en las áreas de gran explotación agro-ganadera es más difícil de encontrar por efecto del laboreo continuado (Gutiérrez y Pensiero 1998).

La mayor parte de sus poblaciones se encuentra actualmente en forma de ecotipos o poblaciones naturales adaptadas a tapices indisturbados y no sobrepastoreados, ya que su domesticación es reciente por ser aún poco conocida y por no existir todavía suficiente semilla comercial en la región (Millot 2001).

Las plantas son perennes, cespitosas, presentan rizomas breves y forman matas cuyas cañas pueden alcanzar hasta 1 m de altura (Burkart 1969). Las panojas son erectas y pueden medir hasta 20 cm de longitud. Las espiguillas son grandes (2 a 3 cm) y portan entre 6 y 9 flores (**Fig 4**).

Fig 4. *Bromus auleticus* en el campo

La aceptabilidad y preferencia por parte del ganado se evidencia por su disminución en la comunidad natural debido a los pastoreos intensos y continuos (Ragonese 1985).

Debido a su alta productividad, palatabilidad, riqueza en proteínas, persistencia a campo y resistencia a la sequía (Moraes y Oliveira 1990; Millot 1999; Gasser et al. 2005), esta gramínea es considerada una excelente forrajera. Es considerada una de las forrajeras más valiosas en el Cono Sur (Millot 1999; Traverso 2001; Ayala et al. 2010; Bustamante et al. 2012), por lo que se recomienda su incorporación a pasturas implantadas por su importante crecimiento en otoño-invierno y su elevada persistencia (Olmos 1993; Mombelli y Spada 1996; Ruiz y Covas 2004). La elongación de entrenudos comienza entre comienzos y mediados de agosto, por lo que admite pastoreos vegetativos hasta fines de julio, sin afectar significativamente la producción de semilllas.

Actualmente está siendo mejorada genéticamente y algunas variedades están siendo comercializadas como forraje en Uruguay (Ayala et al. 2010).

En 2006 Iannone & Cabral, realizaron por primera vez la caracterización de la asociación entre *B. auleticus* y sus endofitos asexuales *Epichloë,* bajo condiciones controladas. En dicho trabajo se estudiaron diversos parámetros como peso de semillas, emergencia de plántulas, desarrollo y propagación vegetativa y resistencia a la defoliación

en plantas de un año, encontrándose un incremento en todos los parámetros medidos en plantas E+ comparadas con plantas E- (Iannone y Cabral 2006).

Entre las especies hospedantes nativas de Argentina, *B. auleticus* es la que reúne mejores aptitudes como forrajera. Esta especie constituye un excelente modelo ya que presenta una amplia distribución en la región pampeana, zona que ha sufrido las mayores modificaciones debido a la actividad agrícola-ganadera. Sus distintas poblaciones se encuentran asociadas a al menos tres endofitos diferentes: *E. pampeana* y *E. tembladerae*, capaces de producir lolinas y peraminas respectivamente pero incapaces de producir alcaloides tóxicos para el ganado como alcaloides del ergot o lolitremos (Iannone et al. 2011; Iannone et al. 2012a) y otra especie no formalmente descripta (*Epichloë* sp.) potencial productora de precursores de alcaloides del ergot (Mc Cargo 2015).

Además han sido estudiados aspectos relacionados con la semilla y su germinación. Las semillas infectadas con *E. pampeana* resultaron más livianas y con mayor porcentaje y tasa de emergencia que las contrapartes E- (Iannone y Cabral 2006), mientras que aquellas infectadas con *E. tembladerae* mostraron un efecto perjudicial con respecto a la producción de semillas frente a sus correspondientes E- (Iannone et al. 2012c). En cuanto a su efecto sobre otros microorganismos se evaluó el efecto de la presencia de endofitos en *B. auleticus* frente a la infección por el hongo patógeno *Ustilago bullata* y por los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA). En el primer caso, se observó que *B. auleticus-Epichloë* spp. presentaban menos síntomas de enfermedad (carbón) y mejor desarrollo y supervivencia de las plántulas (Vignale et al. 2013).

Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA)

Micorriza es la simbiosis mutualista entre las raíces de las plantas y los hongos del suelo pertenecientes al Phylum Glomeromycota (Schubler et al. 2001). La palabra micorriza del griego MYKES = hongo y RHIZA = raíz fue acuñada por Frank (1885) para describir la unión de dos formas diferentes para generar un único órgano morfológico. Se conocen al menos 7 tipos principales de micorrizas, basadas en su estructura y en su función: las micorrizas arbusculares (MA), las ectomicorrizas (EM), las ectendomicorrizas, las orquidioides, las arbutoides, las ericoides y las monotropoides (Smith y Read 2008). Las micorrizas viven intercelularmente en el parénquima cortical de las raíces de las plantas, en la superficie de las raíces y alrededor de las células epidérmicas de la raíz (van der Heijden et al. 2015).

Los HMA se asocian con las raíces de más del 80 % de las angiospermas (van der Heijden et al. 1998; Smith y Read 2008; van der Heijden et al. 2015), esta característica es,

probablemente, consecuencia del carácter ancestral de las micorrizas, su ubicuidad y su coevolución junto con las plantas.

El mayor beneficio atribuido a la simbiosis con HMA, es el aumento en la adquisición de nutrientes del suelo, particularmente fósforo y nitrógeno (Smith y Read 2008). Otros beneficios que se les atribuyen son: un incremento en la biomasa vegetal (Hoeksema et al. 2010), resistencia a patógenos de raíces (Borowicz 2001; Liu et al. 2007; Wehner et al. 2010; Lewandowski et al. 2013), mayor absorción de agua (Marulanda et al. 2003), incremento en la tolerancia a diferentes situaciones de estrés biótico y abiótico (Augé 2001; Ruiz-Lozano et al. 2006; Pozo et al. 2010; Hassan et al. 2013; Lenoir et al. 2016), mayor tasa fotosintética (Sheng et al. 2008) y cambios en el metabolismo de carbohidratos (Smith y Read 2008).

Proceso de colonización

La colonización de las raíces de las plantas por HMA involucra una serie de eventos que están altamente regulados por ambos simbiontes (Feddermann et al. 2010). Antes de la colonización, las raíces de las futuras plantas hospedantes exudan strigolactonas, moléculas señal responsables de inducir la germinación de las esporas, la ramificación hifal y aumentar la actividad metabólica fúngica (**Fig 5**) (Akiyama et al. 2005; López-Ráez et al. 2008; García-Garrido et al. 2009; Smith y Smith 2011) mientras que las plantas no hospedantes no tienen ningún efecto sobre los HMA o a veces este es inhibitorio (Requena et al. 2007). Los hongos producen factores Myc que inducen oscilaciones de calcio en las células epidérmicas de las raíces y activan los genes de las plantas relacionados con la simbiosis (**Fig 5**) (Kosuta et al. 2003; Maillet et al. 2011).

Luego de la germinación, las esporas deben encontrarse con un hospedante adecuado dentro de los 8 a 20 días (Giovannetti et al. 2001). La hifa penetra la epidermis de la raíz y crece intercelularmente en el parénquima cortical. En algunas células de la corteza, el hongo penetra la pared e invagina la membrana celular, formando una zona delimitada por las dos membranas citoplasmáticas, el arbúsculo (**Fig 5**) (Genre et al. 2008). Los movimientos bidireccionales de sustancias como el fosfato y los carbohidratos entre la planta y el hongo ocurren principalmente en esta interfase y es un requisito para el desarrollo de la simbiosis mutualista (Genre et al. 2008; Parniske 2008; Smith y Read 2008). Las hifas también crecen hacia el exterior de la raíz poniéndose en contacto con el suelo, donde pueden adquirir nutrientes, formar esporas y colonizar nuevas raíces. Nunca hay colonización de las células de la endodermis ni en el cilindro vascular. Tampoco se han observado estructuras fúngicas en los ápices meristemáticos de las raíces micorrizadas.

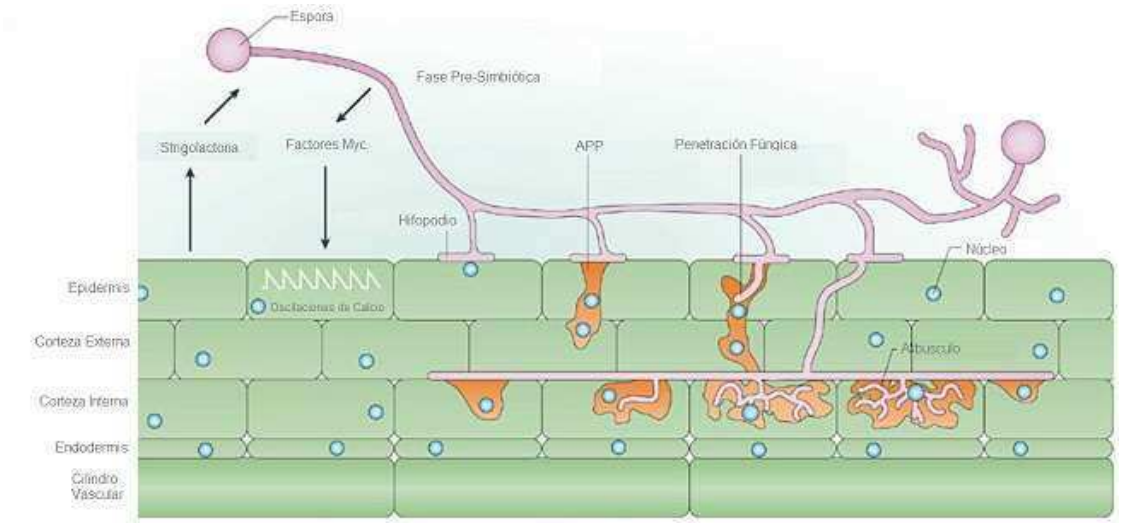

Fig 5. Fases típicas en la colonización de una raíz por HMA. Modificado de Parniske (2008).

Se distinguen dos fases en la colonización: una que se desarrolla extraradicalmente y otra intraradicalmente con estructuras particulares inter e intracelulares.

– **Fase Extraradical (pre-simbiótica)**

Las esporas, el micelio extrarradical y los segmentos de raíces colonizadas son la fuente de inóculo necesaria para que pueda desarrollarse la simbiosis.

Esporas y esporocarpos

Las esporas, estructuras de resistencia, se forman a partir de las hifas externas, de manera terminal o intercalar dependiendo de la especie. Pueden ser solitarias o estar agrupadas en esporocarpos. La producción de esporas tiene lugar al finalizar el ciclo reproductivo de la planta hospedante, aunque existen grandes diferencias entre distintas especies de HMA, los hospedantes micorrizados y las condiciones ambientales.

Micelio extraradical

Las hifas de los HMA son cenocíticas, con miles de núcleos inmersos en un mismo citoplasma. Estas hifas se ramifican, explorando el suelo en busca de fósforo, nitrógeno y micronutrientes que luego son transferidos a la planta hospedante (**Fig 6**) (Finlay 2008).

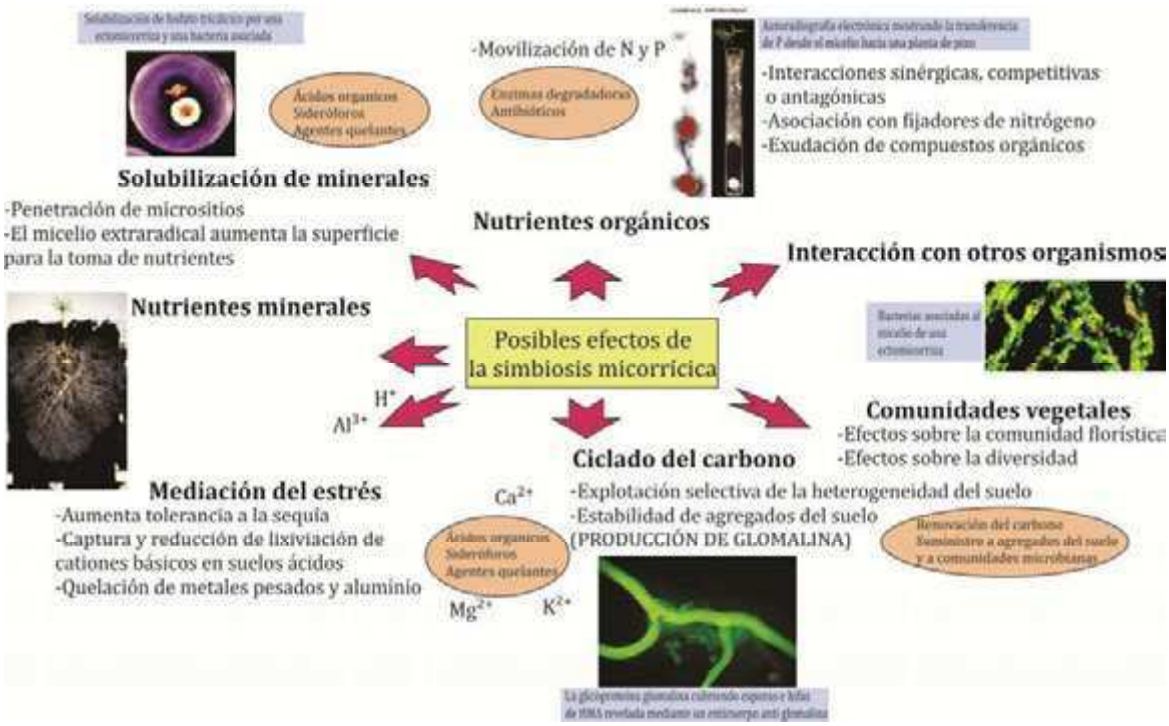

Fig 6. Esquema indicando la diversidad de posibles interacciones que involucran al micelio extraradical de las micorrizas. Adaptado de Finlay (2008)

– **Fase Intraradical**

La colonización primaria se lleva a cabo luego del reconocimiento de la planta, las hifas entran en contacto con la raíz y forman un apresorio, también llamado hifopodio, que se desarrolla a partir de la hifa madura. Las células de las plantas desarrollan un aparato de pre-penetración (APP) que guía a las hifas hasta las células de la corteza donde se desarrollan las estructuras típicas de los HMA (Parniske 2008).

Arbúsculos

La formación de un arbúsculo se desencadena cuando una hifa intercelular penetra las paredes de la célula vegetal sin romper la membrana plasmática, la cual se invagina y crece acompañando el desarrollo de esta estructura (**Fig 7**). De esta manera, el hongo nunca penetra dentro del citoplasma y restringe su crecimiento al apoplasto de las células del parénquima cortical. Los arbúsculos tienen un tiempo de vida más corto que las células hospedantes (aproximadamente 8 días) (Parniske 2008). Javot et al. (2007) analizaron el tiempo de desarrollo de un arbúsculo en detalle y encontraron que crece hasta alcanzar un máximo (que depende también del hospedante), luego se induce la senescencia al producirse un septo entre el citoplasma y la hifa del arbúsculo y finalmente colapsa hasta

que desaparece por completo. Los arbúsculos son considerados esenciales para clasificar a la simbiosis micorrícica como funcional (Bécard y Piché 1989).

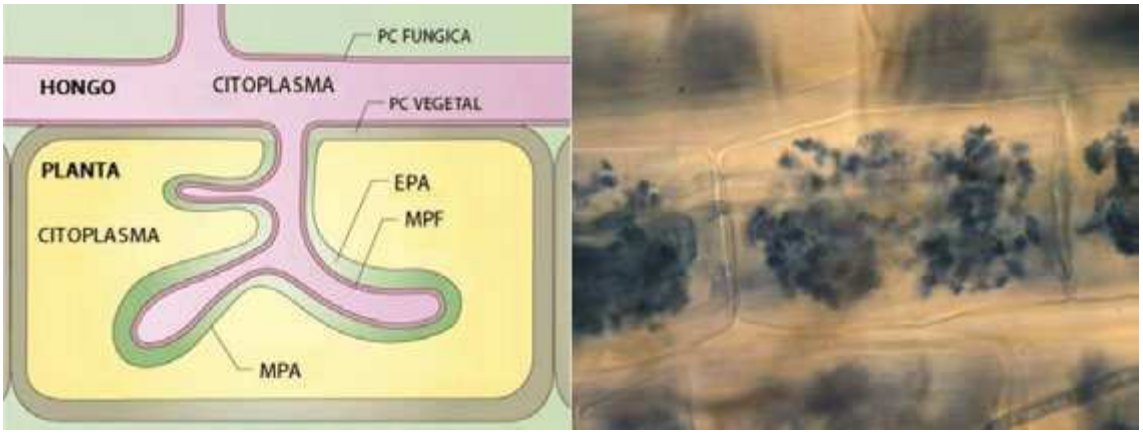

Fig 7. A- Esquema típico de un arbúsculo modificado de Parniske (2008). **MPA**: Membrana PeriArbuscular, **MPF**: Membrana Plasmática Fúngica, **EPA**: Espacio PeriArbuscular, **PC**: Pared Celular. **B-** Foto de un arbúsculo

Vesículas

Las vesículas son estructuras con paredes gruesas que pueden tener forma variable, contienen una alta proporción de lípidos y numerosos núcleos (Smith y Read 2008). Se originan a partir del ensanchamiento de una hifa y pueden ser terminales o intercalares (Peterson et al. 2004). Se las considera como estructuras de reserva, pero aún se desconoce bien su fisiología, particularmente en lo que respecta a la movilización de sus reservas y a la funcionalidad como una forma de propágulo (Bonfante y Perotto 1995). Algunos géneros nunca las producen (Smith y Read 2008).

Coils

Son hifas enruladas intracelularmente que se dirigen de célula en célula de la corteza sin romper la membrana plasmática. Se supone, al igual que los arbúsculos, que están involucrados en el transporte de fósforo (Smith et al. 2004).

Producción de Glomalina

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares son cruciales para el funcionamiento de los ecosistemas y contribuyen a la formación, el mantenimiento y la calidad de los suelos a través de la exudación de glomalina por sus esporas e hifas extraradicales (Rillig 2004; Dai et al. 2013; Rillig et al. 2015).

La glomalina es una glicoproteína que almacena carbono (C), es homóloga a una proteína de choque térmico hallada comúnmente en plantas (Gadkar y Rillig 2006), es hidrofóbica, resistente a proteólisis, a cambios en el pH, a detergentes y a la desnaturalización (Wright et al. 1996). Contiene altas concentraciones de hierro (0,8 – 8,8 %), por lo que una hipótesis propuesta acerca de su rol es que representa un componente estructural importante en la acumulación de hierro en el suelo (Wright y Upadhyaya 1998). Otra característica que se le atribuye es que impregna la materia orgánica, uniéndola al limo, a la arena y a partículas de arcilla. Esto le proporciona una mayor estructura al suelo y mantiene al C almacenado (Wright y Upadhyaya 1998).

Estudios previos han informado que el contenido de glomalina en los suelos se ve afectado por la especie de planta, las propiedades físico químicas del suelo, la alteración de la vegetación (Rillig et al. 2002), el cambio en el uso del suelo (Rillig et al. 2003; Wang et al. 2011; López-Merino et al. 2015) y la rotación de cultivos (Wright y Anderson 2000). Por lo tanto, existe una preocupación sobre el mantenimiento responsable de los HMA en suelos cultivados.

Según Rillig (2004), el término "glomalina" debe referirse únicamente a la proteína sintetizada por el gen putativo de los HMA, mientras que las fracciones extraídas del suelo deben ser nombrados como proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG) (Reyna y Wall 2013).

Interacción entre HMA y endofitos *Epichloë*

A pesar de que los endofitos y las micorrizas reciben los mismos beneficios de la planta hospedante, difieren en su ubicación y en el momento de la colonización. Ambos adquieren hidratos de carbono, pero únicamente los endofitos habitan los tejidos en donde se lleva a cabo la fotosíntesis, es por esto que, acceden primero a esta fuente. Por otro lado, los endofitos *Epichloë* son transmitidos verticalmente desde la planta madre a las semillas (Clay 1990) y los HMA colonizan a sus hospedantes horizontalmente, después de que las semillas germinan y las raíces crecen (Brundrett 2002). Entonces, si una segunda asociación como los HMA provee beneficios a la planta, se esperaría que esta interacción fuese promovida o al menos tolerada por los endofitos transmitidos verticalmente.

Los endofitos *Epichloë* y los HMA, son constituyentes comunes de los pastizales. Trabajos realizados en gramíneas seleccionadas agronómicamente, han reportado que la infección por endofitos reduce la esporulación y colonización del hospedante por HMA (Chu-Chou et al. 1992; Guo et al. 1992; Omacini et al. 2006; Keenan y Rudgers 2008; Liu et al. 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de estudios realizados por

nuestro grupo, en gramíneas nativas, sugieren que la presencia de endofitos *Epichloë* favorece la micorrización de los hospedantes, cabe aclarar, que estos trabajos fueron realizados en poblaciones naturales donde el genotipo del hospedante no pudo ser controlado. Desde el año 2005 se está estudiado la triple simbiosis planta – endofito – HMA con el objetivo de evaluar si estos sistemas son beneficiosos para la planta y cómo pueden ser manejados en sistemas agronómicos. En estos trabajos se analizó, a campo, la micorrización de poblaciones de *Bromus setifolius* de Santa Cruz (Novas et al. 2005) y poblaciones de *Poa bonariensis*, de Punta Indio, Buenos Aires (Novas et al. 2009), que difieren en la incidencia de especies asexuales de *Epichloë*. En ambos casos se observó una mayor micorrización en las poblaciones con mayor incidencia de endofitos. Por otro lado, se observó que las plantas sin endofitos (E-) cuando se encontraban próximas a sus pares con endofitos (E+), presentaron la misma tasa de micorrización que las primeras, sugiriendo que las E+ podrían estar liberando compuestos a la rizósfera que estarían implicados en los efectos. El estudio de las plantas vecinas fue abordado en detalle en el trabajo de Omacini et al. 2006 en donde realizaron un experimento en maceta con la gramínea agronómicamente seleccionada *Lolium multiflorum.* En este trabajo se observó que las plantas E+ en monocultivos o en cultivos mixtos E+/E- presentaron una menor micorrización que las E-. Por otro lado, la colonización micorrícica de las plantas E- dependió del estatus endofítico de su vecina. Las plantas E- vecinas de las E+ presentaron un nivel de colonización mayor que las E- en monocultivos, sugiriendo que la inhibición ocurre principalmente de manera sistémica en las plantas E+ (Omacini et al. 2006).

Estudios *in vitro* sobre el efecto de los endofitos y sus exudados mostraron un efecto positivo sobre los estados pre-infectivos de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), apoyando los resultados obtenidos a campo (Novas et al. 2011).

Muchos de los estudios realizados teniendo en cuenta la triple interacción: endofito-gramínea-HMA, no han considerado la posibilidad de que la variabilidad dentro de cada tipo de simbiosis pueda influir en la interacción entre ellos y en la respuesta de las plantas. En este sentido, Larimer et al. 2012 encontraron variación entre poblaciones de endofitos y especies de HMA en cuanto al crecimiento del hospedante, detectando efectos aditivos de cada simbionte.

El sistema *Bromus auleticus*-endofitos resulta interesante para el estudio de estas simbiosis por tratarse de una gramínea nativa con alto potencial comercial que aún se desarrolla en estado silvestre. Asimismo, por ser oriunda de la región pampeana, es

posible desarrollar experimentos a campo bajo condiciones ambientales similares a aquellas en las que evolucionó esta asociación.

Las características mencionadas de la asociación *B. auleticus* -endofitos y los efectos que estos tienen sobre características de interés agronómico, su amplia distribución geográfica y ambiental, y que además habita en simpatría con otras especies de gramíneas hospedantes de endofitos, hacen de esta asociación un modelo sumamente interesante para el estudio de distintos aspectos de estas simbiosis.

HIPÓTESIS GENERALES

- Las plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* favorecen la colonización por hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en las plantas hospedantes y en las vecinas.

- La asociación gramínea-endofito produce compuestos que son liberados a la rizósfera afectando la micorrización del hospedante y plantas vecinas.

- La triple interacción afecta la productividad de los hospedantes.

- Los exudados de *Epichloë tembladerae* favorecen la colonización por HMA en plantas libres de endofitos y en gramíneas seleccionadas agronómicamente.

OBJETIVOS

Generales

- Contribuir al conocimiento de interacciones multitróficas entre gramíneas nativas y endofitos fúngicos.

- Dilucidar los mecanismos mediante los cuales los endofitos *Epichloë* favorecen la colonización de gramíneas nativas por micorrizas arbusculares.

Específicos

- Evaluar la colonización micorrícica de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* en un ensayo a campo y compararla con la micorrización de plantas E-.

- Determinar el efecto de exudados obtenidos de cultivos de endofitos y de raíces de plantas hospedantes sobre el desarrollo de la fase extramatrical de micelio y la generación de esporas de los hongos formadores de micorrizas arbusculares en raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota*).

- Analizar el efecto simultáneo en simbiosis de los endofitos y hongos formadores de micorrizas arbusculares sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo del hospedantes (peso seco de vástago y peso seco de la raíz, número de macollos, floración), así como sobre otros caracteres de interés agronómico.

- Estudiar el efecto directo de los endofitos *Epichloë,* a través de la asociación con *Bromus auleticus,* y su efecto indirecto a través del empleo de exudados, sobre la micorrización y biomasa en plantas libres de endofitos (E-) y gramíneas seleccionadas agronómicamente (*Lolium multiflorum*) en ensayos en invernadero.

- Evaluar el efecto de los endofitos *Epichloë* de *Bromus auleticus* sobre la colonización de HMA y producción de biomasa en gramíneas vecinas de interés agronómico como *Lolium multiflorum*, *Schedonorus arundinaceus y Bromus catharticus* en ensayos a campo.

CAPÍTULO 1

"Efecto de endofitos *Epichloë* en la colonización micorrícica y producción de biomasa de *Bromus auleticus.* Ensayo a campo"

INTRODUCCIÓN

Las asociaciones mutualistas son comunes en la naturaleza y los organismos suelen estar involucrados en más de una interacción en forma simultánea (Omacini et al. 2001; Stachowicz 2001; Finkes et al. 2006). Una clase de interacción multitrófica que ha recibido poca atención es la que se establece entre las gramíneas, los endofitos fúngicos foliares, y los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA). Los endofitos *Epichloë*, establecen simbiosis mutualistas con distintas especies de gramíneas, a las que les confieren numerosas ventajas adaptativas. Por otro lado, la simbiosis micorrícica, formada entre HMA y las plantas, es conocida por su significancia ecológica y su valor en una economía sustentable. Si bien el impacto de cada uno de los simbiontes fúngicos sobre el hospedante en forma independiente, es prácticamente indiscutible, y a pesar de los considerables avances en el tema, la triple simbiosis, entre hospedante, endofitos y micorrizas, aún está pobremente caracterizada.

Los endofitos y los HMA reciben refugio y nutrientes de su planta hospedante (Brundrett 2002), sin embargo, difieren en su ubicación y momento de su colonización. Estudios realizados en gramíneas de interés agronómico han registrado que la infección endofítica reduce la esporulación y la colonización por HMA (Chu-Chou et al. 1992; Guo et al. 1992; Müller 2003; Omacini et al. 2006; Mack y Rudgers 2008; Liu et al. 2011). Por el contrario, los estudios sobre poblaciones silvestres de pastos nativos sugirieron una asociación positiva entre la colonización de micorrizas y la incidencia endofitos.

En Argentina, hasta el momento, se han estudiado 2 gramíneas hospedantes a campo: *Bromus setifolius* y *Poa bonariensis*, asociadas a diferentes especies de *Epichloë*. Tanto en *B. setifolius* de Santa Cruz, (Novas et al. 2005) como en *P. bonariensis* de Punta Indio, provincia de Buenos Aires (Novas et al. 2009) se registró una micorrización significativamente mayor en las plantas infectadas por endofitos (E+) en comparación a las plantas E- (libres de endofitos). Considerando que las poblaciones estudiadas habitan ambientes ecológicamente disímiles, presentando la misma tendencia en todos los casos, los resultados sugieren que podría tratarse de un patrón bastante generalizado y que este efecto no estaría restringido a una sola especie endofítica ni de hospedante. En el caso particular de *Bromus auleticus,* sólo se cuenta con datos de un ensayo en maceta en el que se utilizó el ecotipo La Pampa (asociado a *E. pampeana*). Como resultado también se han observado diferencias significativas en la micorrización a favor de las plantas E+ (Arrieta et al. 2015).

Se sabe que la colonización micorrícica y la respuesta de la planta dependen de la interacción de ambos simbiontes y estos son afectados por algunas condiciones como pH y tipo del suelo,

identidad de la especie de micorriza y la identidad y estado de desarrollo de la planta hospedante (Lambais y Cardoso 1990; Smith y Read 2008). Frecuentemente no se puede encontrar una correlación entre el porcentaje de colonización de la raíz y la respuesta en el crecimiento de la planta (Allen 2001).

Como la respuesta de la micorrización varía a lo largo del estadio de desarrollo de la planta, pueden surgir interpretaciones erróneas a partir de experimentos a corto plazo. Nogueira y Cardoso (2003) midieron la colonización micorrícica en plantas de soja a las 3, 6, 9 y 12 semanas de crecimiento y observaron que de la semana 9 a la 12 la colonización disminuye. Esta reducción puede ser atribuida a una limitación en los recursos energéticos para el mantenimiento y crecimiento de los HMA.

Se sabe que la colonización por HMA es reducida significativamente tanto por altos como bajos niveles de fósforo en el suelo (Amijee et al. 2006; Nagy et al. 2009; Balzergue et al. 2011; Liu et al. 2011). El uso de fertilizantes disminuye el porcentaje de infección de la raíz (Miranda et al. 1989; Miranda y Harris 2006) y niveles de fósforo mayores a los requeridos para el crecimiento de las plantas también inhiben el desarrollo de arbúsculos. Abbott y Robson (1979) observaron que la colonización de la raíz se redujo solamente cuando el nitrógeno (N) y fósforo (P) estaban disponibles en concentraciones suficientes para las plantas, lo que demuestra la importancia de estos dos nutrientes en la regulación de la simbiosis (Sylvia y Neal 1990; Johnson et al. 2003; Blanke et al. 2005).

Zhou et al. (2016) observaron que existe una interacción entre endofitos y HMA en cuanto a la absorción de fósforo del suelo, resultando en una mayor concentración de este elemento en las plantas E+. Sin embargo, otros estudios reportaron que la concentración de P no se ve afectada por la infección simultánea entre endofitos *Epichloë* y HMA (Omacini et al. 2006; Liu et al. 2011).

La interacción entre gramíneas nativas, HMA y endofitos se ha evaluado comparativamente en poblaciones silvestres con distintos niveles de infección, en experimentos *in vitro* o en maceta. Sin embargo, no se han realizado hasta el momento estudios en condiciones de campo diseñados para evaluar el efecto de los endofitos *Epichloë* sobre la colonización de HMA en gramíneas nativas. Considerando además que las prácticas de cultivo de la región podrían afectar la micorrización de las plantas, se diseñó un ensayo de 1 año de duración para evaluar simultáneamente el efecto de dos ecotipos de *B. auleticus*, el uso de fertilizantes y la edad del hospedante sobre la micorrización.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Las plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* favorecen la colonización por hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA).

- Diferentes simbiosis de *Bromus auleticus* (*Epichloë pampeana asociado al* ecotipo La Pampa y *E. tembladerae* asociado al ecotipo El Palmar) responden de manera diferencial a la micorrización.

- Las simbiosis simultáneas establecidas entre plantas de *Bromus auleticus* con endofitos *Epichloë* y HMA afectan la biomasa y otros caracteres de interés agronómico del hospedante, dependiendo del genotipo de los simbiontes.

- La aplicación de fertilizante al suelo afecta de manera diferencial la micorrización y la biomasa de *B. auleticus*. Esta respuesta depende de la simbiosis *B. auleticus-Epichloë* y del estatus endofítico.

- El nivel de micorrización varía de acuerdo al estadio de crecimiento de las plantas.

OBJETIVOS PARCIALES

- Evaluar a campo la colonización por HMA en una gramínea nativa de interés agronómico como *Bromus auleticus* en simbiosis con distintas especies de endofitos *Epichloë*.

- Analizar la productividad a campo de dos simbiosis *Bromus auleticus* - *Epichloë*, asociado simultáneamente a HMA.

- Analizar la micorrización y biomasa en *Bromus auleticus* en simbiosis con *Epichloë,* cultivadas en distintas condiciones de fertilización del suelo.

- Evaluar si diferentes estadios fenológicos del hospedante afectan la colonización de las plantas por HMA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo a campo para evaluar el efecto del estatus endofítico y diferentes niveles de fertilización sobre la micorrización de dos ecotipos de *Bromus auleticus* (LP asociado a *Epichloë pampeana* y EP asociado a *Epichloë tembladerae*) en diferentes estadios de su crecimiento (3, 6 y 12 meses). Además, fueron medidos los parámetros: biomasa aérea, número de panojas y producción de semillas por sub-subparcela. El ensayo se llevó a cabo en la EEA-INTA de Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

Semillas utilizadas y estatus endofítico

En el presente trabajo, se contó con semillas de *Bromus auleticus* de dos ecotipos diferentes: **ecotipo La Pampa**, originaria de Intendente Alvear, provincia de La Pampa, naturalmente infectada con *Epichloë pampeana* Iannone y Schardl y el **ecotipo El Palmar**, perteneciente a la provincia de Entre Rios y asociado a *E. tembladerae* (Cabral y White) Iannone y Schardl (Iannone et al. 2009).

Las plantas E- se obtuvieron mediante la eliminación del endofito de las semillas E+ originales por almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Luego, las semillas fueron sembradas en el campo en la EEA-INTA en parcelas establecidas para este fin y se armaron lotes de acuerdo a su ecotipo (LP o EP) y estatus endofítico (E+ o E-). Antes del inicio del experimento fueron colectadas a mano.

El estatus endofítico fue evaluado en los lotes de semillas antes de iniciar el experimento y en las plantas antes de ser cosechadas. Como el procedimiento requiere la destrucción de las semillas, se seleccionaron 50 al azar de cada lote que fueron sumergidas en una solución de hidróxido de sodio al 10 % acuoso a 22°C por 5 horas. Luego fueron teñidas con azul de anilina. Para evaluar los macollos antes de cosechar la plantas, se usó la técnica histológica convencional detallada por Clark et al. (1983). Como criterio se estableció que una semilla o planta es considerada infectada (E+) si se visualizan las hifas asociadas a la capa de aleurona en las semillas o si las típicas hifas intercelulares se observan creciendo en el parénquima cortical (ver **Fig 1** en la Introducción)

Diseño experimental

Las semillas de los diferentes ecotipos fueron sembradas en parcelas sub-subdivididas en un diseño en bloques completamente aleatorizado en donde la parcela principal correspondió a los dos niveles de ecotipo, LP y EP. La subparcela fue asignada a los dos niveles de fertilización: F+,

cuando el suelo fue suplementado con 15gr $(m^2)^{-1}$ de diamonio fosfato ((DAP)-(NH_4) $2HPO_4$)) - y 8gr $(m^2)^{-1}$ de urea (este nivel de fertilización es el que comúnmente se le aplica a los suelos de la provincia de Entre Ríos), o F- sin el agregado de fertilizante. En el tratamiento F+, los nutrientes fueron suministrados después de la siembra y después de cada una de las cosechas realizadas a los 3, 6 y 12 meses de edad de las plantas. Por último, la sub-subparcela correspondió al estatus endofítico: E+ o E-. Cada sub-subparcela quedó conformada por 5 líneas de 4 metros de largo, distanciadas entre sí por 20 cm. Se sembraron 12 gramos de semillas por línea.

Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, 3 tiempos de cosecha (3, 6 y 12 meses) y 3 plántulas o plantas, según el tiempo de cosecha, fueron removidas de cada sub-subparcela para medir los parámetros de micorrización mencionados y chequear el estatus endofítico de cada una.

Colonización micorrícica

Para estimar el nivel de colonización micorrícica, tres plántulas/plantas de cada sub-subparcela fueron removidas con su sistema radical. Las raíces fueron lavadas con agua de la canilla para remover el suelo adherido a ellas y fueron inmediatamente teñidas con Tripan Blue (Phillips y Hayman 1970) (ver anexo). Como las plántulas de 3 meses aún tenían el sistema radical pobremente desarrollado, la totalidad del sistema radical fue analizado sin embargo, para las plantas de 6 y 12 meses, se seleccionaron al azar 30 segmentos de 1 cm de largo y la colonización micorrícica fue cuantificada según Trouvelot et al. (1986) a través del software MYCOCALC (http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html). Los parámetros medidos fueron el porcentaje de colonización total (M) y el porcentaje de arbúsculos (A).

Parámetros de crecimiento

- **Biomasa**

Para poder estimar la biomasa aérea, en todos los tiempos de muestreo, las plantas fueron cortadas a 7 cm del suelo. El material cosechado fue secado a 80°C durante dos días y se calculó el peso seco de cada tiempo de cosecha. Luego fue utilizado para calcular la biomasa acumulada (g) producida.

- **Número de panojas**

Cuando las plantas florecieron, las panojas de cada sub subparcela fueron contadas

- **Producción de semillas**

Las semillas de cada sub-subparcela fueron cosechadas y pesadas.

Análisis del suelo

Las propiedades químicas del suelo fueron analizadas al comienzo y al final del ensayo. Dos muestras de suelo de cada tratamiento fueron tomadas de los primeros 5-15 cm, secadas a temperatura ambiente y tamizadas a través de un tamiz de 2 mm de poro.

Los siguientes parámetros fueron medidos en el Instituto de Geocronología y Geología Isotópica (INGEIS):

- pH 1:2.5 H_2O
- Carbono total (Walkley-Black)
- Nitrógeno total (Kjeldahl)
- Fósforo disponible (ppm) (Kurtz and Bray Nº1)

Tabla 1 – 1. Parámetros del suelo medidos. F+ y F- corresponden al nivel de fertilización; 0 meses: Principio del ensayo y 12 meses: final del ensayo; pH en agua 1:2.5 H_2O; Ct (%): Carbono total; Nt (%): Nitrógeno total; P (ppm, fósforo disponible); Rel C/N: Relación Carbono/Nitrógeno.

	pH (1:2.5)	Ct (%)	Nt (%)	P (ppm)	Rel C/N
F+ 0 meses	7,08	2,20	0,24	35,90	9,16
F- 0 meses	7,43	2,18	0,23	9,10	9,48
F+12 meses	7,53	2,31	0,23	16,57	10,04
F- 12 meses	7,67	2,11	0,20	3,23	10,55

A modo descriptivo, los parámetros químicos de las muestras colectadas al comienzo del ensayo con la aplicación de fertilizante al suelo, muestran un suelo neutro mientras que en el resto de los tratamientos se observa un suelo moderadamente básico. Por un lado, no se observan diferencias en el contenido de carbono y nitrógeno pero el contenido de fósforo disponible fue mayor en las muestras obtenidas de los tratamientos con el agregado de fertilizante. En cuanto a la relación C/N, esta fue levemente mayor en las muestras obtenidas al final del ensayo (**Tabla 1 – 1**).

Análisis estadísticos

El porcentaje de micorrización total (M) y el porcentaje de arbúsculos (A) fueron analizados mediante modelos lineales mixtos generalizados utilizando el método de estimación de máxima verosimilitud. Los ecotipos (LP o EP), el nivel de fertilización (F+ o F-) y el estatus endofítico (E+ o E-) fueron incorporados como variables independientes. Los diferentes tiempos de cosecha (3, 6 o 12 meses) y los bloques fueron incorporados como efectos aleatorios. Las comparaciones fueron realizadas con el test DGC (Di Rienzo et al. 2002) utilizando R a través del programa Infostat R-DCOM (Di Rienzo et al. 2011).

Los resultados correspondientes a la biomasa fueron analizados mediante un ANAVA de tres factores en donde los factores principales fueron ecotipo, estatus endofítico y fertilización. El número de panojas y la producción de semillas fueron analizados a través de un ANAVA de dos factores para cada ecotipo en donde el estatus endofítico y la fertilización fueron los factores principales.

Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia de 0,05 con el paquete estadístico Infostat para Windows versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011). En todos los casos los supuestos de los análisis fueron chequeados. Las tablas completas de los análisis realizados se encuentran en el anexo.

RESULTADOS

Colonización micorrícica

La simbiosis, medida como la extensión total de la colonización micorrícica y la frecuencia de arbúsculos fue significativamente mayor en las plantas infectadas con *Epichloë* y no fue afectada por la fertilización, ya sea en plántulas o en plantas adultas. En todos los tratamientos fueron observadas estructuras de hongos formadores de micorrizas arbusculares (**Fig 1 - 1**).

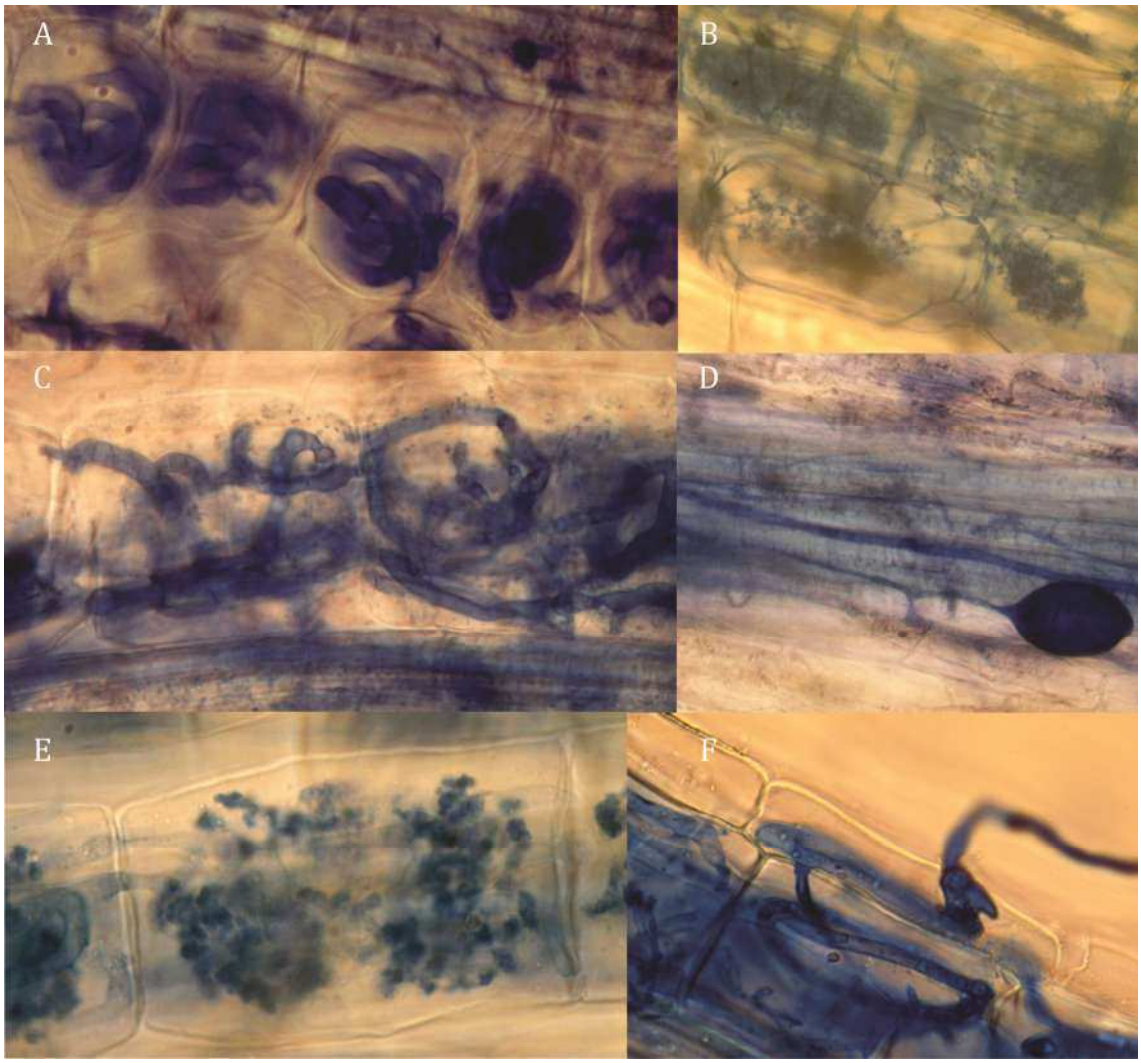

Fig 1 - 1. Difrentes estructuras de los HMA encontradas durante la observación de las raíces. **A y C.** Coils; **B y E.** Arbúsculos; **D.** Vesícula terminal y **F.** Punto de entrada de la hifa a la raíz de la planta.

En los tres tiempos de cosecha, la colonización micorrícica (M) y el porcentaje de arbúsculos (A) no fueron afectados por el ecotipo (F_M=1,42; p=0,2528; F_A=1,45; p=0,2484) ni por la aplicación de

fertilizante al suelo (F_M=0,05 *p*=0,8297; F_A=0,05 *p*=0,8301) (**Fig 1 - 2**). Las diferencias en la micorrización total entre tratamientos fueron significativas debido al estatus endofítico de las plantas (F=57,76; *p*<0,0001) y estos parámetros también se vieron significativamente afectados por la edad de las plantas (F=61,33; *p*<0,0001). Se encontró una interacción significativa entre el tiempo de cosecha y el estatus endofítico (F_M=3,76; *p*=0,0343; F_A=6,18; *p*=0,054) (ver tabla completa en el anexo)

A los tres meses luego de la siembra, no se observaron diferencias entre plantas E+ (infectadas con *Epichloë pampeana*) y plantas E- (ecotipo LP) (**Fig 1 - 2A**), mientras que en el ecotipo EP, la colonización (M) de plantas E+ (infectadas con *E. tembladerae*) fue significativamente mayor que en las E- (**Fig 1 - 2B**). En este tiempo, las plantas de LP, libres de endofitos correspondientes al tratamiento F+ fueron las que presentaron el nivel más bajo de colonización (13,46 %).

Las plantas E+ de seis meses de edad, de ambos ecotipos, presentaron los niveles más altos de micorrización (M) (**Fig 1 - 2A y B**) y de porcentaje de arbúsculos (**Fig 1 - 2C y D**) con respecto a las E-, alcanzando valores 42 y 36 % más altos en la colonización micorrícica en los tratamientos F- y F+ respectivamente (**Fig 1 - 2B**). Además, en este tiempo, las plantas presentaron los niveles más altos de M y A en comparación con los valores obtenidos a los 3 y 12 meses de edad.

Al igual que lo observado a los 6 meses, a los 12 meses, los porcentajes de M y A fueron significativamente mayores en las plantas E+ de ambos ecotipos (**Fig 1 - 2**). Sin embargo, la aplicación de fertilizante tuvo un efecto diferencial en las plantas E+ de los diferentes ecotipos. Mientras que en LP las plantas E+F- presentaron un nivel de micorrización 17,04 % mayor que las plantas E+F+ (**Fig 1 - 2A**), en el ecotipo EP, las plantas E+F+ presentaron un porcentaje 24,47 mayor de micorrización que las E+F- (**Fig 1 - 2B**).

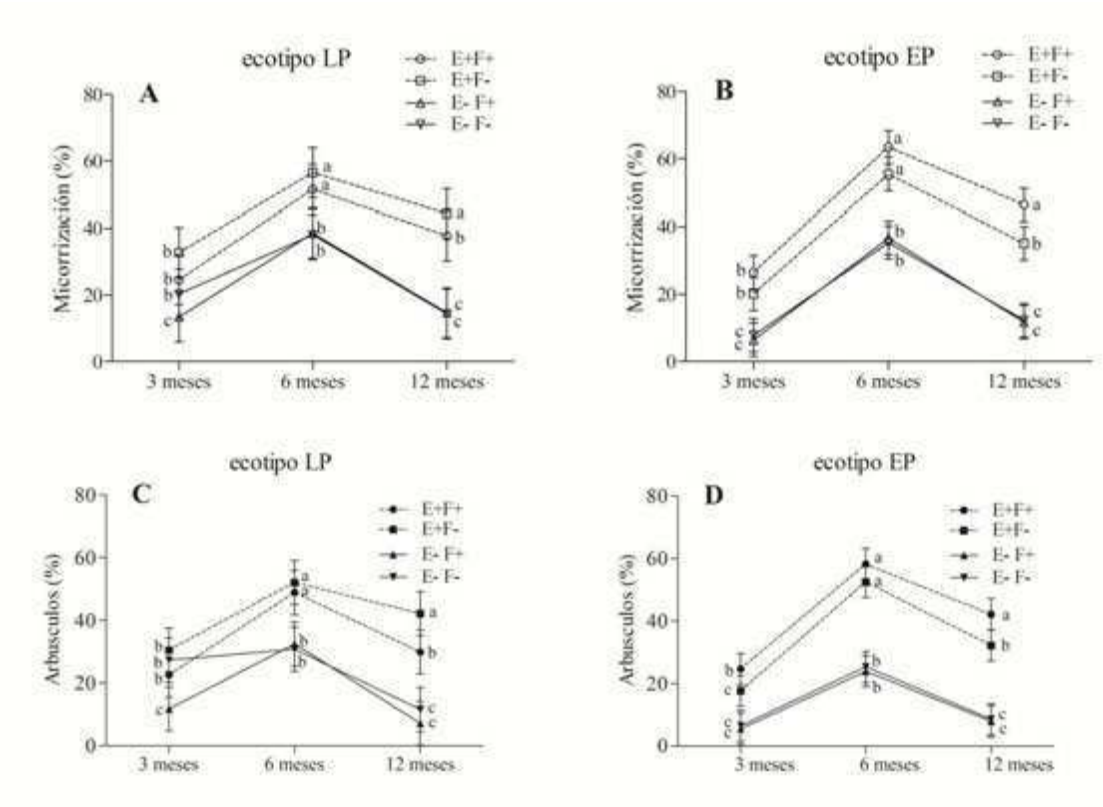

Fig 1 - 2. Colonización micorrícica (M) y porcentaje de arbúsculos (A) en plantas de *B. auleticus* que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë*; E-=plantas no infectadas con *Epichloë*) y el nivel de fertilización aplicado al suelo (F+= con aplicación de fertilizante; F-= sin la aplicación de fertilizante). **A**. y **C**. corresponden al **ecotipo LP** y **B.** y **D.** corresponden al **ecotipo EP**. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos y tiempos de cosecha ($p<0,05$). Las barras de error representan el error estándar (EE).

Parámetros de crecimiento

– **Biomasa**

Mientras que la biomasa aérea acumulada (g) fue significativamente mayor en los tratamientos con fertilizante (F=83,16; *p*=0,0008), no se observaron diferencias debidas al estatus endofítico (F=0,28; *p*=0,6140) ni debidas al ecotipo (F=0,35; *p*=0,6157) (**Fig 1 - 3**). El ANAVA de tres factores reveló una interacción significativa entre el estatus endofítico y los ecotipos de *Bromus auleticus* (F=11,60; *p*=0,0093). La mayor producción de biomasa fue observada en las plantas E+ y E- con altos niveles de nutrientes, particularmente en el ecotipo LP (**Fig 1 - 3**).

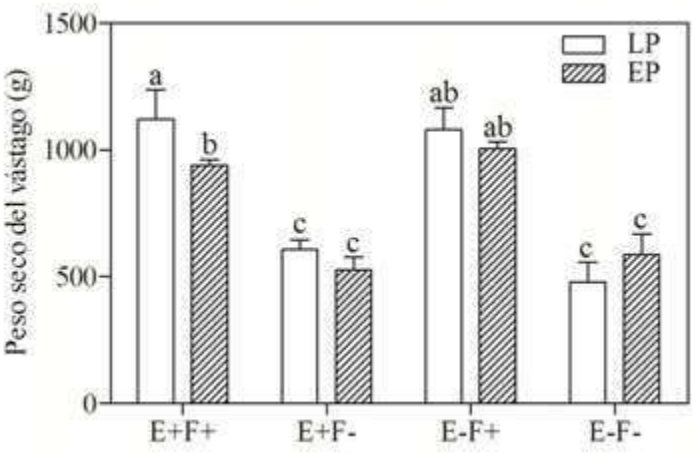

Fig 1 - 3. Peso seco acumulado (g) de plantas de *Bromus auleticus* en las sub-subparcelas que difieren en el estatus endofítico y en la fertilización del suelo. LP= ecotipo La Pampa; EP= ecotipo El Palmar; E+= plantas infectadas con *Epichloë*; E-= plantas no infectadas con *Epichloë*; F+= con aplicación de fertilizante al suelo; F-= sin aplicación de fertilizante al suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

– **Número de panojas**

Con respecto al número de panojas, en el ecotipo LP las plantas E- produjeron menos panojas que sus pares del tratamiento con fertilizante (F=6,95; p=0,0299) pero no se observaron diferencias debidas a la presencia del endofito (F=0,99; p=0,3492) (**Fig 1 - 4**). En el ecotipo EP, el número de panojas fue afectado por el estatus endofítico (F=12,17; p=0,0101) y por la fertilización del suelo (F=243,47; p<0,0001). El número de panojas producidas en el tratamiento E+F+ del ecotipo EP fue un 20,43 % mayor que en el tratamiento E-F+ del mismo ecotipo.

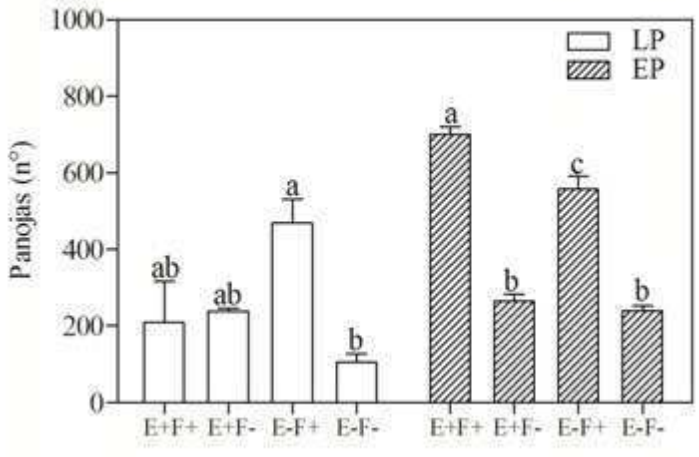

Fig 1 - 4. Número de panojas de *B. auleticus* producidas en las sub-subparcelas. LP= ecotipo La Pampa; EP= ecotipo El Palmar; E+= plantas infectadas con *Epichloë*; E-= plantas no infectadas con *Epichloë*; F+=sin la aplicación de fertilizante al suelo; F-= con la aplicación de fertilizante al suelo. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada ecotipo (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

– **Producción de semillas**

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de semillas (**Fig 1 - 5**). En el ecotipo EP los valores fueron homogéneos pero en LP la variabilidad fue mayor.

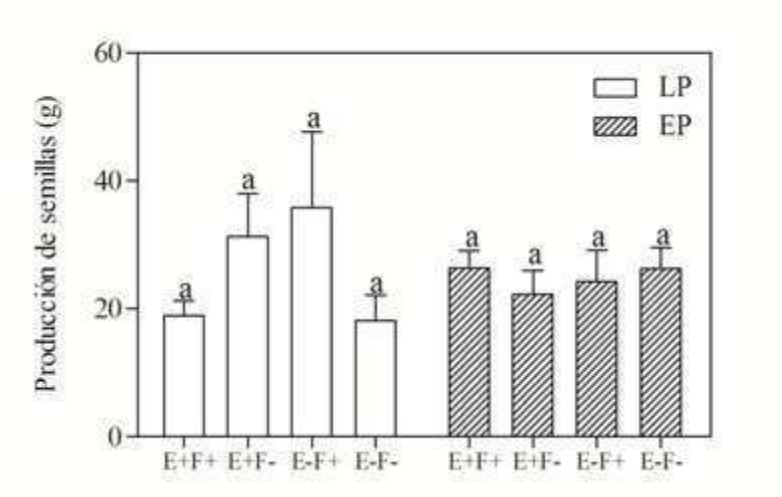

Fig 1 - 5. Producción de semillas (g) en las sub-subparcelas. LP= ecotipo La Pampa; EP= ecotipo El Palmar; E+= plantas infectadas con *Epichloë*; E-= plantas no infectadas con *Epichloë*; F+=sin la aplicación de fertilizante al suelo; F-= con la aplicación de fertilizante al suelo. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada ecotipo ($p<0,05$). Las barras de error representan el EE.

DISCUSIÓN

Los efectos de los endofitos en sus hospedantes han sido ampliamente estudiados en gramíneas seleccionadas agronómicamente, en particular sobre el crecimiento, producción de alcaloides y resistencia al estrés abiótico. Sin embargo, la utilización de este modelo de hospedante podría enmascarar la diversidad biológica relevante inherente a gramíneas nativas silvestres a la hora de hacer generalizaciones sobre el impacto de los endofitos en la naturaleza (Saikkonen et al. 2006).

Este estudio es el primero que analiza el efecto de endofitos foliares sobre la colonización de hongos formadores de micorrizas arbusculares de una gramínea nativa, en un experimento a largo plazo en condiciones de campo. Nuestros resultados muestran claramente que *Epichloë pampeana* (ecotipo La Pampa) y *E. tembladerae* (ecotipo El Palmar) en asociación con *Bromus auleticus* modulan positivamente la colonización por hongos formadores de micorrizas arbusculares. Se observó un efecto más intenso de la asociación con *E. tembladerae* sobre la micorrización. Esto apoya la hipótesis de una asociación positiva entre endofitos *Epichloë* y HMA en gramíneas silvestres nativas, propuesta sobre evidencias obtenidas en estudios previos realizados en poblaciones naturales de *Bromus setifolius* (Novas et al. 2005) y *Poa bonariensis* (Novas et al. 2009). En el caso de *B. setifolius* se cuantificó la micorrización de plantas E+ y E- provenientes de diferentes poblaciones, mientras que en *P. bonariensis* se analizó una población E+ (100 % de incidencia), una E- (0 % de incidencia) y otra E+/E- (50 % de incidencia). Por lo tanto, la asociación positiva entre la presencia de micorrizas y el nivel endofítico podría haber sido también parcialmente afectada por las diferencias en el genotipo (nivel inter poblacional) entre plantas E+ y E- o debido a las características del suelo. En el presente trabajo, las plantas E- se obtuvieron mediante la eliminación de endofito de las semillas E+ de la misma población. Por lo tanto, esperamos que cualquier posible efecto asociado a las diferencias genotípicas se reduzca al mínimo. Hasta el momento, todos los estudios realizados en pastos nativos contrastan con los resultados obtenidos en gramíneas seleccionadas agronómicamente, donde las plantas infectadas con *Epichloë* mostraron una reducción en la colonización y esporulación de HMA (Chu-Chou et al. 1992; Guo et al. 1992; Müller 2003; Omacini et al. 2006; Antunes et al. 2008; Mack y Rudgers 2008; Liu et al. 2011). Mientras que en algunos de estos trabajos se utilizaron inóculos comerciales, en todos nuestros estudios a campo las raíces fueron inoculadas naturalmente con inóculo nativo y en los que se realizaron bajo condiciones experimentales, se utilizó suelo nativo como inóculo de micorrizas (Novas et al. 2005; Novas et al. 2009; Arrieta et al. 2015) por lo que hasta este punto no era posible hacer comparaciones directas.

En cuanto a la fertilización del suelo, Schubert y Hayman (1986) afirmaron que el nivel de colonización de micorrizas aumenta cuando los niveles de fósforo son menores o iguales a 50 ppm, mientras que por encima de este nivel la colonización disminuye hasta detectarse poca infección cuando los niveles superan las 100 ppm (incluso cuando el sustrato se inocula con una mezcla micorrizas). En este sentido, varios estudios sugieren que la alta fertilidad del suelo reduce la colonización por HMA (Blanke et al. 2005; Mack y Rudgers 2008; Liu et al. 2011). En el presente trabajo, encontramos diferencias en las concentraciones de P entre los tratamientos de fertilización (las concentraciones máximas medidas al final del ensayo fueron 16,57 ppm de P en el suelo fertilizado y 3,23 ppm en el no fertilizado), sin embargo, la colonización de micorrizas no se vio afectada por este factor. Dado que estos niveles de P están incluidos dentro del rango considerado favorable para el establecimiento de la asociación con HMA, una posible explicación para este resultado sería considerar que los niveles de fertilizantes utilizados no fueron lo suficientemente altos como para inhibir la micorrización. Sin embargo, otra razón sería que los endofitos *E. tembladerae* y *E. pampeana* asociados con el hospedante, promueven la colonización por micorrizas, disminuyendo así el efecto inhibidor del fertilizante. Se necesitan más estudios para analizar el efecto de la fertilización del suelo en la micorrización, en donde los niveles de fósforo disponible sean superiores a los mencionados por Schubert y Hayman (1986).

Independientemente de haber presentado niveles mayores de colonización micorrícica, las plantas E+ no difirieron de las E- en la mayoría de los caracteres de crecimiento evaluados en el presente estudio. En los ecotipos LP y EP, la biomasa seca acumulada del vástago fue mayor en los tratamientos F+ pero no se observaron diferencias debido al estatus endofítico. Con respecto al número de panojas, en el ecotipo LP sólo se encontraron diferencias debido a la fertilización, mientras que en el ecotipo EP, el número de panojas fue afectado por el estatus endofítico y por el nivel de fertilización, mostrando los mayores valores en el tratamiento E+F+. Por lo tanto, estos resultados sugieren que un incremento en la colonización micorrícica en asociación con endofitos *Epichloë* no necesariamente tendría un impacto directo en el desarrollo del hospedante. Sin embargo, en este estudio nos centramos en la medición de parámetros de interés agronómico y podría haber otros beneficios asociados a estos simbiontes tales como una mayor resistencia a la sequía o un aumento de la competencia, que no fueron estudiados en este trabajo.

Los resultados obtenidos en cuanto al desarrollo de plantas E+ y E- son contrastantes parcialmente con estudios anteriores donde las plantas de *B. auleticus* E+ presentaron mayores valores que las E- en los parámetros estudiados (Iannone y Cabral 2006; Iannone et al. 2012c). Estas diferencias podrían atribuirse a las condiciones experimentales, ya que en esos estudios las plantas fueron cultivadas individualmente (en macetas o en el campo), minimizando así la competencia entre ellas. Además, las diferencias entre estos resultados y los observados en el campo por Iannone et al. (2012c) también podrían ser debidas a diferencias en las condiciones

ambientales entre ambos experimentos. Sin embargo, en contraste a lo observado en otros pastos nativos en donde los endofitos tienen un efecto negativo en el crecimiento de las plantas (Faeth et al. 2004), en *B. auleticus*, *E. tembladerae* y *E. pampeana* tienen un efecto claramente positivo (Iannone y Cabral 2006; Iannone et al. 2012c) o neutral sobre las características de crecimiento. En resumen, los resultados indican un efecto variable entre los parámetros observados que se extiende desde positivo o neutro en la biomasa seca de ambos ecotipos a positivo en el aumento de panojas en el ecotipo, asociado (una vez más) con un aumento de la colonización por HMA en plantas E+.

Las variaciones observadas en la colonización micorrícica en los diferentes períodos de cosecha, 3, 6 y 12 meses, muestran que los resultados en las etapas tempranas de las plantas son diferentes a los observados en las etapas finales pudiendo influir en los parámetros medidos en la planta (Nogueira y Cardoso 2003). Es importante conocer el desarrollo de la asociación hospedante-micorriza para poder evaluar los parámetros luego de que la simbiosis haya tenido tiempo para completarse y establecerse. En este trabajo, se observó que *Bromus auleticus* a los 6 meses presenta el mayor nivel de colonización en comparación con los 3 y 12 meses medidos. Además, el porcentaje de arbúsculos registrado fue alto comparándolo con los valores de la micorrización total y debido a que estos son una estructura esencial para el intercambio de nutrientes, podría considerarse como un indicador de la activa simbiosis.

Los mecanismos exactos que explican la diferencia en el nivel de colonización micorrícica entre plantas infectadas y no infectadas no se han determinado aún. Los compuestos producidos por endofitos foliares podrían participar en este proceso y se han propuesto tres mecanismos pertinentes por los que estos compuestos podrían ser liberados en el suelo e influenciar la colonización por HMA: i) gutación (Koulman et al. 2007), ii) lixiviación y iii) la exudación radicular (Antunes et al. 2008). Aunque los endofitos *Epichloë* solamente colonizan los tejidos aéreos de sus hospedantes, diferentes estudios apoyan la hipótesis de que los compuestos pueden ser exudados de las raíces afectando a la microflora del suelo y modificando las propiedades de la rizósfera (Bernard et al. 1997; Omacini et al. 2004; Casas et al. 2011; Hosseini et al. 2014). Teniendo en cuenta los efectos observados en la promoción de la colonización micorrícica en las plantas E+, postulamos que las gramíneas nativas infectadas con *Epichloë* exudan un perfil de compuestos diferente a las plantas E-, sin embargo, se necesitan más investigaciones para dilucidar la exacta composición y mecanismos implicados.

Finalmente, son necesarios más estudios para evaluar la interacción entre endofitos *Epichloë* y hongos formadores de micorrizas arbusculares y sus efectos sobre la biología de las plantas. Los presentes resultados apoyan la hipótesis que la simbiosis entre endofitos *Epichloë* en asociación con pastos nativos favorece la interacción con otros simbiontes fúngicos mutualistas, haciendo de éste un modelo muy interesante en términos de los beneficios que ambos simbiontes proporcionan al hospedante.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de una asociación positiva entre endofitos *Epichloë* y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en gramíneas nativas, haciendo este modelo importante para el mejoramiento de pasturas.

- Los valores obtenidos en biomasa y número de panojas no corroboran la hipótesis que las plantas infectadas con endofitos *Epichloë* presentan un aumento en estos caracteres de interés agronómico, en comparación con las plantas sin endofito. El tratamiento EP E+F+, donde sí se produjo un aumento significativo del número de panojas con respecto al tratamiento E-F+, no evidenció una asociación positiva de este carácter con la producción de semillas.

- Los resultados del presente estudio no corroboran la hipótesis que distintos niveles de fertilización del suelo afectan de manera diferencial la colonización de plantas de *B. auleticus* por HMA, al menos para los niveles utilizados, pero sí apoyan que la fertilización afecta positivamente la biomasa y otros caracteres de interés agronómico en las plantas de *B. auleticus.*

- Los resultados apoyan la hipótesis que la edad de las plantas afecta el nivel de micorrización, obteniéndose los mayores valores a los 6 meses de iniciado el ensayo.

CAPÍTULO 2

"Evaluación *in vitro* de la interacción entre endofitos *Epichloë* y hongos formadores de micorrizas arbusculares"

INTRODUCCIÓN

En la última década, los mecanismos por los que los exudados de raíces intervienen en las interacciones rizosféricas han sido ampliamente estudiados (Broeckling et al. 2008; Doornbos et al. 2012; Chaparro et al. 2013a). Las raíces de las plantas secretan sustancias químicas que pueden mediar una serie de interacciones tales como planta-planta, planta-microorganismos y planta-fauna del suelo. Estas interacciones pueden variar desde neutrales a beneficiosas o perjudiciales (Mercado-Blanco y Bakker 2007; Raaijmakers et al. 2009). Los compuestos exudados de la raíz pueden ser agrupados en dos clases: los de bajo peso molecular, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos, y otros metabolitos secundarios y los compuestos de alto peso molecular, como polisacáridos y proteínas (Bais et al. 2006; Badri y Vivanco 2009). La composición de los exudados (cantidad y calidad) es determinada por el cultivar, la especie, la etapa de desarrollo de la planta, y diversos factores ambientales, incluyendo tipo de suelo, pH, temperatura, y la presencia de microorganismos (Badri y Vivanco 2009).

La estructura de la comunidad microbiana presente en la rizósfera sufre cambios que dependen del genotipo (1) (Broeckling et al. 2008) y etapa de desarrollo de la planta (2)(Chaparro et al. 2013b), exposición a suelos supresivos de enfermedades (3) (Mendes et al. 2011), composición de exudados (4) (Badri et al. 2013) y señalización hormonal (5) (Carvalhais et al. 2013). Los compuestos específicos que son liberados como exudados de las raíces median interacciones planta-microorganismo o incluso a nivel de especie: los flavonoides (6) actúan como molécula señal para iniciar la simbiosis entre rizobios y leguminosas (Abdel-Lateif et al. 2012), las estrigolactonas (7) estimulan la ramificación hifal de las micorrizas (Akiyama et al. 2005), el ácido málico (8) está involucrado en el reclutamiento de *Bacillus subtilis* (rizobacteria promotora del crecimiento vegetal o su sigla en inglés PGPR: plant growth promoting rhizobacteria) (Rudrappa et al. 2008), Interrupción o iniciación de de detección del quórum en bacterias "*quorum sensing*" (QS) (9) (Gao et al. 2003). Los azúcares y aminoácidos (10) actúan como quimio-atrayentes para los microorganismos. Se sabe poco acerca del rol de las proteínas (11) secretadas por las raíces de las plantas y la interacción con los microorganismos y por lo tanto se necesita mayor investigación (**Fig 2 - 1**). Otro tipo de compuestos exudados median interacciones multitróficas: las leguminosas atraen nematodes (12) que actúan como portadores de rizobios que aumentan la nodulación de las plantas al igual que la interacción entre PGPR y rizobios (13), la interacción entre PGPR y micorrizas (14) resulta en una mayor eficiencia de colonización micorrícica (Hernández 2013) (**Fig 2 - 1**).

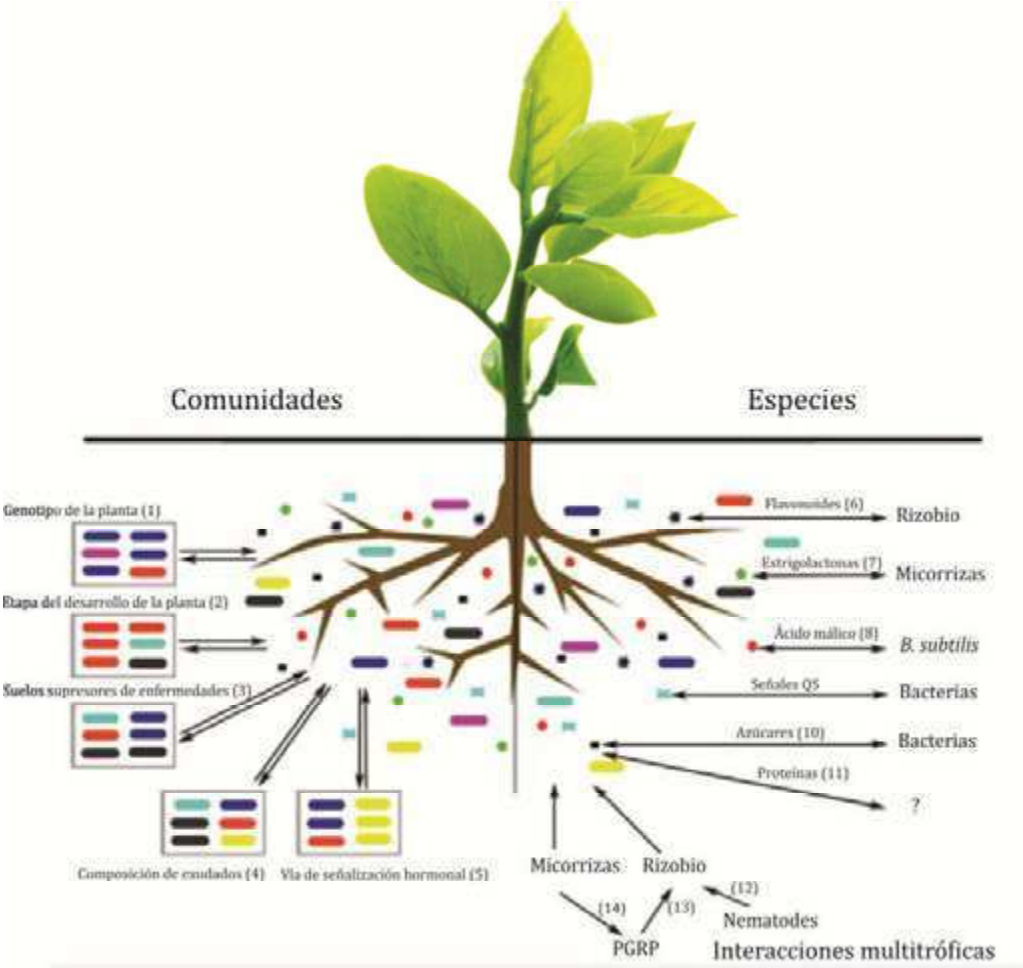

Fig 2 - 1. Los exudados de las plantas median una gran cantidad de interacciones rizosféricas: a nivel específico (lado derecho), interacciones multitróficas (abajo) y a nivel de comunidades (lado izquierdo). Las barras de colores representan diferentes microorganismos y los rectángulos grises (lado izquierdo) representan comunidades microbianas de la rizósfera. Las barras dentro de cada comunidad representan la distribución cuantitativa y cualitativa de los microorganismos. Cuadrados, pentágonos, círculos, estrellas y rectángulos representan diferentes compuestos liberados como exudados de las raíces. Esquema modificado de Huang et al. (2014).

En los últimos años, la relevancia del rol ecológico de los endofitos *Epichloë* se ha centrado en el estudio de la producción de alcaloides bioactivos, hormonas y otros metabolitos que regulan la respuesta de las plantas y los hongos a diferentes tipos de ambientes (Bacon 1977; Siegel y Bush 1996; Saikkonen et al. 2004; Hamilton et al. 2012; Saikkonen et al. 2013a; Panaccione et al. 2014). La mayoría de los trabajos se han focalizado en la toxicidad de los alcaloides frente a los herbívoros pero, la literatura más reciente sugiere que además de los alcaloides que proporcionan una respuesta defensiva a la planta, otros productos de origen fúngico y vegetal juegan importantes roles en la simbiosis endofito-gramínea (Pieterse y Dicke 2007; Rodriguez y Redman 2008; Cheplick y Faeth 2009; Eaton et al. 2011; Gundel et al. 2012; Rasmussen et al. 2012; Schardl et al. 2012; Pineda et al. 2013). Algunos autores sugieren que las consecuencias ecológicas de la

simbiosis pueden abarcar desde la interacción planta-herbívoro a la interacción con comunidades microbianas, animales y vegetales (Clay y Holah 1999; Omacini et al. 2001; Lemons et al. 2005; Rudgers et al. 2010; Saari et al. 2010; Casas et al. 2011; Saikkonen et al. 2013b; García Parisi et al. 2014; Omacini 2014).

Según Antunes et al. (2008) hay al menos tres mecanismos posibles por los cuales los compuestos producidos por los endofitos son liberados al suelo y pueden producir cambios en la producción de esporas y en la colonización de las plantas por hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA). Un mecanismo podría ser a través de la gutación o por el líquido que es liberado de hojas dañadas por ejemplo al ser comidas por un animal. Otro mecanismo posible es la lixiviación y descomposición del material vegetal en el suelo. Esta última hipótesis fue probada por Antunes et al. (2008) quienes sugirieron que la lixiviación es un mecanismo por el cual los compuestos químicos producidos por los endofitos dentro de la planta llegan al suelo y reducen la colonización micorrícica de otras plantas vecinas. El tercer mecanismo propuesto es la exudación de compuestos a través de la raíz. Aunque los endofitos *Epichloë* habitan sólo en tejidos vegetales aéreos, los efectos detectados sobre los herbívoros que se alimentan de raíces y otros organismos de suelo (Latch 1993; Bernard et al. 1997), sugieren la traslocación de estos compuestos hacia las raíces afectando la microbiota del suelo (Casas et al. 2011).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) son incapaces de completar su ciclo de vida en ausencia de una raíz hospedante. Sus esporas pueden germinar y presentar un crecimiento hifal limitado en ausencia de una planta hospedante, pero el crecimiento hifal es muy limitado. Poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que rigen la señalización y el reconocimiento entre HMA y sus plantas hospedantes. En una de las primeras etapas de reconocimiento, las hifas de los hongos producen una extensa ramificación en las proximidades de las raíces antes de la formación del apresorio (estructura utilizada para penetrar la raíz de la planta). La ramificación hifal es desencadenada por moléculas señal que liberan las plantas hospedantes (Giovannetti et al. 1993; Akiyama et al. 2005; Parniske 2008; Maillet et al. 2011).

Sistemas de cultivo *in vitro* de raíces

Debido a su condición de simbiontes obligados y a su carácter hipógeo, los avances en el estudio de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y de los procesos involucrados en su interacción con las plantas dependen en gran medida de los sistemas de cultivo *in vitro* que incluyen a ambos organismos. Estos sistemas han evolucionado con los años y en la actualidad han contribuido a responder numerosos interrogantes relacionados con la fisiología y la bioquímica de la asociación (Fernández Suárez 2012). El empleo del cultivo de raíces, como un sistema simplificado para establecer la simbiosis micorrícica arbuscular, ha sido muy utilizado y

particularmente útil en numerosos estudios fisiológicos que incluyen dos aspectos fundamentales: el intercambio de señales entre los simbiontes y el metabolismo fúngico (Fortin et al. 2002). Aun siendo este sistema de naturaleza artificial, existen numerosas razones para continuar utilizándolo en el estudio de los HMA. Está demostrado que las especies fúngicas cultivadas forman las estructuras típicas involucradas en la colonización (apresorios, arbúsculos y vesículas) y producen un profuso micelio extraradical, así como abundante número de esporas. Las esporas son morfológica y estructuralmente similares a las producidas en maceta y las estructuras intraradicales son capaces de iniciar nuevas asociaciones micorrícicas después de un período de subcultivo, indicando que la especie fúngica es capaz de completar su ciclo de vida en esas condiciones (Fortin et al. 2002).

La primera esporulación *in vitro* fue obtenida por Bécard y Fortin (1988) utilizando raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.) colonizadas con *Glomus intraradices* Schenck y Smith. Posteriormente, Bécard y Piche (1992) realizaron algunas modificaciones en el medio de cultivo existente, reduciendo las concentraciones de algunos elementos para evitar la inhibición del establecimiento micorrícico sin afectar el crecimiento y desarrollo radical. Esto permitió contar con un sistema de cultivo monoxénico altamente reproducible caracterizado por la producción de grandes cantidades de micelio y esporas (Diop et al. 1992). En las últimas dos décadas ha aumentado el número de trabajos dedicados a la investigación con cultivos *in vitro* de HMA utilizando varias especies y diferentes condiciones en el medio de cultivo (Cranenbrouck et al. 2005).

Uno de los principales factores que explica la condición de biotrófos obligados de los HMA es el metabolismo o la absorción de carbono en el estadio presimbiótico, debido al hecho de que las hifas extraradicales de estos hongos son incapaces de absorber carbohidratos (Douds Jr et al. 2000). Por este motivo, la asociación micorriza-planta se basa en el intercambio de carbono que le ofrece la planta a cambio de fósforo (Kiers et al. 2011) y nitrógeno (Fellbaum et al. 2012). Sumado a esto, todos estos eventos ocurren en un ambiente hipógeo, altamente complejo, que dificulta aún más las investigaciones.

Antunes et al. (2008) realizaron experimentos *in vitro* en donde analizaron el efecto de extractos acuosos de hojas en la germinación de esporas de HMA. El efecto directo de los endofitos por lixiviación y descomposición fue probado en Omacini et al. (2004) y en Lemons et al. (2005). El efecto directo de exudados de raíces de plantas infectadas con *Epichloë* y no infectadas sobre el desarrollo infectivo (desarrollo de micelio extraradical) *in vitro* de HMA no se ha investigado hasta el momento. En el trabajo de Novas et al. (2011) se analizaron parámetros pre-infectivos *in vitro* en *Bromus setifolius*, gramínea nativa. Los exudados de las raíces de plantas infectadas produjeron un aumento de la ramificación y de la longitud hifal de HMA en comparación con los exudados de

plantas no infectadas mientras que el efecto de los exudados de endofitos en la longitud del micelio de HMA dependió de las cepas y concentraciones utilizadas.

Con el objetivo general de obtener información sobre los mecanismos involucrados en la interacción que se establece entre los endofitos *Epichloë* asociados a gramíneas y los HMA, en este trabajo se implementaron técnicas *in vitro* en una gramínea nativa no estudiada hasta el momento. Además, se propone incluir en el sistema de estudio, gramíneas de importancia agronómica, que presentan un efecto negativo en la colonización micorrícica, para poder realizar una comparación directa de ambos modelos de gramíneas bajo las mismas condiciones experimentales. En el presente capítulo, se analizó el efecto *in vitro* de los exudados de las raíces de gramíneas E+ y E- tanto nativas como de importancia agronómica en los estados pre-infectivos e infectivos de hongos formadores de micorrizas arbusculares (germinación, número de esporas y longitud hifal). Por otro lado, se analizó el efecto directo de los exudados de endofitos en los mismos parámetros antes mencionados de los HMA.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Los exudados de *Epichloë* aislado de *Bromus auleticus* (gramínea nativa) afectan positivamente los caracteres pre-infectivos y el desarrollo de la colonización de los HMA (fase extramatrical y esporulación).

- En la simbiosis gramínea nativa-endofito se producen compuestos que son exudados a través de las raíces de la planta y promueven la micorrización y desarrollo extramatrical de los HMA.

- Los exudados de gramíneas seleccionadas agronómicamente en simbiosis con *Epichloë* y los exudados de las cepas de *Epichloë,* aisladas de estas gramíneas, disminuyen el desarrollo de HMA *in vitro.*

OBJETIVOS PARCIALES

- Determinar el efecto de exudados de raíz de *Bromus auleticus* y los exudados de cepas de endofitos, aisladas de *B. auleticus*, sobre el desarrollo de la fase extramatrical de micelio y la producción de esporas de los hongos formadores de micorrizas arbusculares en raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota*).

- Estudiar el efecto de exudados de raíces de gramíneas seleccionadas agronómicamente y los exudados de las cepas de endofitos asociadas a dichas gramíneas sobre el desarrollo de la fase extramatrical de micelio y la producción de esporas de los hongos formadores de micorrizas arbusculares en raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota*).

- Comparar la micorrización en el sistema endofito-gramínea nativa con el sistema de gramíneas seleccionadas agronómicamente y sus endofitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de estudio

Para poner a prueba las hipótesis planteadas se desarrollaron ensayos *in vitro* utilizando como modelo de gramínea nativa a *Bromus auleticus*. Por otro lado, como modelo de gramíneas de importancia agronómica se seleccionó a *Schedonorus arundinaceus* asociada a *E. coenophiala* y *Lolium multiflorum* asociada a *E. occultans*. El laboratorio cuenta con semillas con endofito (E+) y sin endofito (E-) de *Bromus auleticus, Lolium multiflorum* y *Schedonorus arundinaceus.*

Detección, esterilización superficial y aislamiento de cepas de endofitos a partir de muestras vegetales

El estatus endofítico fue chequeado en los lotes de semillas de las gramíneas utilizadas antes de iniciar los ensayos. Se seleccionaron 50 semillas al azar de cada lote que fueron sumergidas en una solución de hidróxido de sodio al 10 % acuoso a 22°C por 5 horas. Luego fueron teñidas con azul de anilina. Una semilla es considerada infectada (E+) si se visualizan las hifas asociadas a la capa de aleurona. En los casos de presencia de hifas características de *Epichloë* (**Fig 2 - 2**) las semillas se procesaron para aislar el endofito. Esto se realizó en placas de Petri con agar papa glucosado con cloranfenicol (APGc) (ver anexo) esterilizando superficialmente 30 semillas en lavados sucesivos de etanol 70 % por un minuto, hipoclorito de sodio 50 % por 8 minutos y etanol 50 % por un minuto. Luego, se sembraron 5 semillas/placa de Petri (60x15 mm) con medio APGc para restringir la proliferación de bacterias. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 24°C por un mes. Las placas fueron examinadas periódicamente, seleccionando sólo aquellos aislamientos de micelio blanco y crecimiento lento, característicos de endofitos *Epichloë*, que fueron repicados para obtener cultivos axénicos en nuevas placas de Petri. Posteriormente, se los repicó en tubos con APGc en pico de flauta para conservarlos en heladera a 4°C.

Con respecto a *Bromus auleticus*, se obtuvo una nueva cepa para el ecotipo EP pero en los ensayos se decidió trabajar con la cepa de *E. tembladerae* BAFC 2561 (también aislada del ecotipo EP) conocida por sus efectos benéficos, dando continuidad a estudios previos. En *Schedonorus arundinaceus,* se obtuvo un solo aislamiento y en *Lolium multiflorum* aunque ya se sabe que su endofito no es cultivable, a modo protocolar se realizó el procesamiento de las semillas pero como era esperable, no se pudo aislar el endofito.

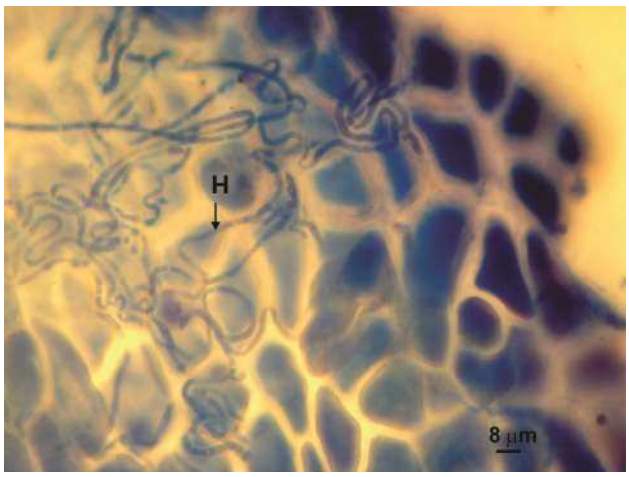

Fig 2 - 2. Capa de aleurona de una semilla de *Bromus auleticus* infectada con *Epichloë*, se observan las hifas características (H).

Obtención de exudados de endofitos *Epichloë*

Los aislamientos obtenidos de *B auleticus* y de *S. arundinaceus*, así como la cepa *E. tembladerae* (2561), fueron cultivados en agitación en medio GA (Galvagno 1976) (ver anexo) a 24°C. A los 30 días, los cultivos fueron filtrados utilizando una bomba de vacío y se mantuvieron en el freezer a -20°C hasta el momento de su utilización, momento en que se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0,22 mm Millipore (**Fig 2 - 3A**).

Obtención de exudados de raíces de plantas

Las semillas E+ y E- de *B. auleticus* del ecotipo EP, *Lolium multiflorum y Schedonorus arundinaceus* fueron esterilizadas superficialmente y colocadas en tubos (3 cm diámetro, 30 cm alto) conteniendo solución nutritiva (Ponce et al. 2004) (ver anexo) con el fin de obtener sus exudados radicales en esterilidad. Las plantas fueron mantenidas en una cámara de cultivo a 22°C con un fotoperiodo luz-oscuridad de 12 h. Diez semanas luego de la germinación, las plantas se cosecharon, se chequeó el estatus endofítico (Clark et al. 1983) y los exudados fueron conservados en el freezer a -20°C hasta su utilización, momento en que se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0,22 mm Millipore (**Fig 2 - 3B**).

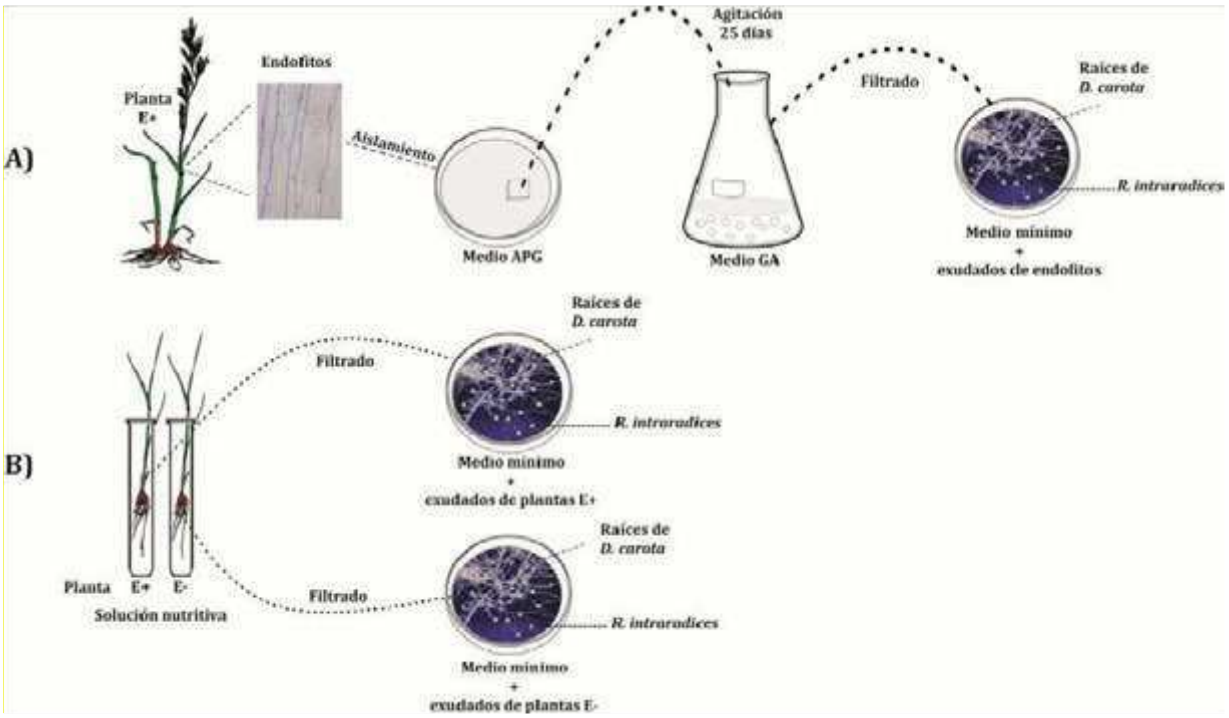

Fig 2 - 3. Esquema de obtención de exudados **A-** de endofitos **B-** de plantas, utilizados para suplementar el medio donde crecieron los HMA en asociación con las raíces transformadas de *D. carota.*

Producción de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares

Se preparó inóculo de dos especies de HMA: *Gigaspora rosea* Nicolson y Schencky *Rhizophagus intraradices* (Schenck y Smith) Walker y Schüßler a partir de inóculo cedido por el laboratorio de Microbiología del suelo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires depositadas en el Banco de Glomeromycota *In-vitro* (http://www.bgiv.com.ar/strains). Para esto, se prepararon 12 macetas de 5 L con una mezcla de tierra comercial: arena en igual proporción, tindalizada previamente (80-100°C y presión constante durante 1 hora por 3 días consecutivos con intervalo de 24 h). La mitad de las macetas fueron inoculadas con *G. rosea* (JB5 - origen: provincia de Buenos Aires) y la otra mitad con *R. intraradices* (GB1 - origen: provincia de Buenos Aires), utilizando *Zea mays* (maíz) como planta trampa. Luego de seis y cuatro meses respectivamente, se extrajo una porción de suelo, se evaluó la presencia de esporas y en los casos positivos, se cosechó la planta trampa a la altura de la corona, se secó el suelo a temperatura ambiente y se guardó en la heladera (4°C) para su posterior utilización.

Efecto de los exudados de *E. tembladerae* (2561) sobre parámetros pre-infectivos de HMA

Gigaspora rosea fue la especie elegida para los ensayos *in vitro* ya que por el gran tamaño de sus esporas es muy práctica para realizar cuantificaciones. A partir del inóculo obtenido, 500 esporas

de *G. rosea* fueron aisladas y esterilizadas superficialmente según (Mosse 1962) (ver anexo). A continuación, las esporas fueron sembradas en placas de Petri (60x15 mm) con medio Gel-Gro® (4 %) (ver anexo) suplementado con diferentes concentraciones de los exudados de la cepa 2561 (*E. tembladerae*): concentraciones finales de 0,1 % (v/v), 1,5 % (v/v) tomando como referencia a las concentraciones utilizadas en Novas et al. (2011) y control (medio GA). En cada placa de Petri se sembraron 10 esporas y se realizaron 8 réplicas de cada concentración. Las placas fueron incubadas a 24°C en oscuridad por siete días. Los parámetros medidos fueron: porcentaje de germinación de esporas, número de ápices, número de clusters de células auxiliares o su sigla en inglés: BAS (branched absorbing structures, producidas por el micelio extraradical y que se cree que son sitios de toma de nutrientes del suelo (Bago 2000)) (**Fig 2 - 5B**) y longitud hifal medida según Marsh (1971).

Efecto de los exudados de los endofitos y de gramíneas con y sin endofito sobre la esporulación y desarrollo de micelio de HMA en raíces transformadas de *Daucus carota.*

Las raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L., Ri T-DNA) colonizadas por *Rhizophagus intraradices* fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología del Suelo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Los cultivos stock de las raíces para la realización de los experimentos fueron mantenidos en placas de Petri con medio mínimo (M) (Bécard y Fortin 1988) (ver anexo) solidificado con 0,4 % (p/v) de Gel-Gro® con un pH de 5,8-6 en oscuridad a 22°C. Los cultivos fueron repicados cada 6-7 semanas para mantener un rápido crecimiento (St-Arnaud et al. 1996).

Para los siguientes experimentos, se utilizaron placas de 90x15 mm que fueron suplementadas con distintas concentraciones de exudados de endofitos: *E. tembladerae* y *E. coenophiala,* o de plantas*: B. auleticus* E+*,* y *L. multiflorum* E+ (Control; 0,05; 0,1; 1,5; 3 %). Se seleccionaron estas concentraciones siguiendo el trabajo de Novas et al. (2011). Se realizaron 8 réplicas para cada concentración.

Las placas se incubaron a 24°C por 75 días. La fase extramatrical y el porcentaje de esporulación se midieron siguiendo el método de Marsh (1971) utilizando una grilla transparente milimetrada delimitando 4 áreas de 0,25 cm^2 en cada placa (**Fig 2 - 4A)**.

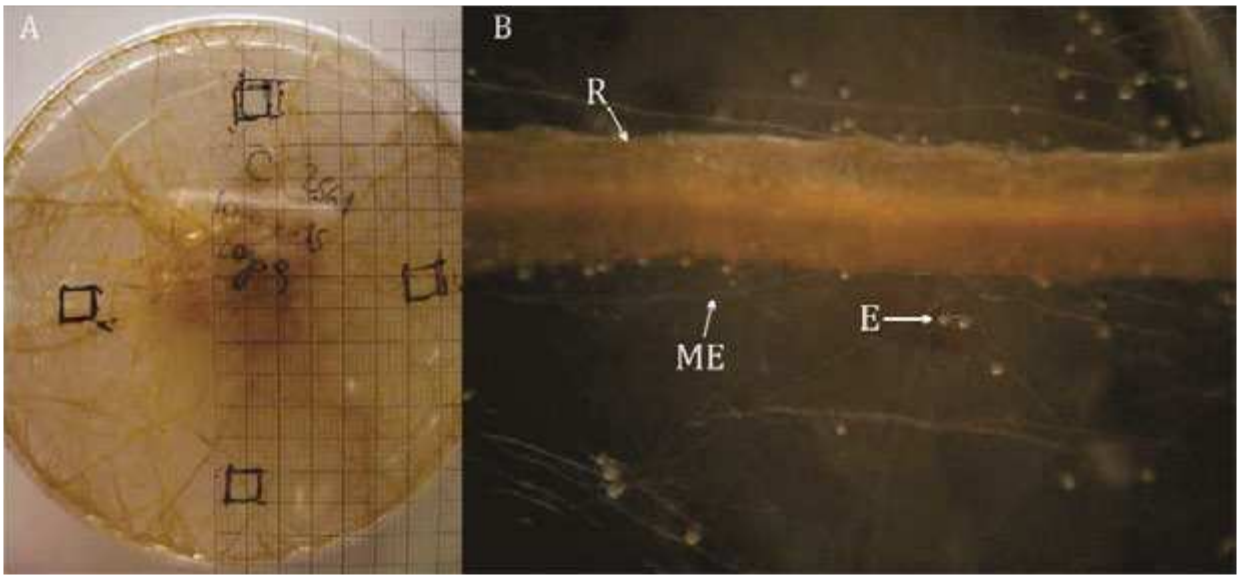

Fig 2 - 4. A-Placa de Petri (90x15 mm) donde se visualizan las 4 áreas de 0,25 cm² delimitadas con la grilla para el recuento de esporas e hifas. **B-**Raíz transformada de *Daucus carota* en asociación con *Rhizophagus intraradices.* R=raíz transformada de *Daucus carota*; ME= micelio extraradical de *R. intraradices* y E=espora de *R. intraradices*. 45X

Análisis estadísticos

El efecto de los exudados de los endofitos sobre los caracteres pre-infectivos de *Gigaspora rosea* (germinación (%), longitud hifal (cm), número de clusters y número de ápices) así como el efecto de los exudados de endofitos y de plantas con y sin endofitos sobre la longitud hifal y el número de esporas en asociación con las raíces transformadas de *Daucos carota* fueron analizados mediante un análisis de la varianza no paramétrico: Kruskal Wallis debido a que no se cumplían los supuestos del ANAVA.

Los datos fueron relativizados con respecto al control (sin complementar el medio con exudados) mediante la siguiente fórmula: $[Xi/\bar{X}c-1]$ en donde Xi es el valor de cada dato en cada tratamiento y $\bar{X}c$ es el valor promedio del control. De esta manera, si los exudados tienen un efecto positivo sobre la variable medida, se obtiene un valor positivo mientras que si se observa una disminución, se ve reflejado mediante un valor negativo.

Para todos los análisis se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo et al. 2011).

RESULTADOS

Efecto de los exudados de los endofitos sobre caracteres pre-infectivos de *Gigaspora rosea*

Los exudados obtenidos del cultivo de *E. tembladerae* afectaron diferencialmente los parámetros evaluados sobre los HMA (**Fig 2 - 5A**). Por un lado, los clusters de células auxiliares (**Fig 2 - 5B**) (H_{CCA}=2,94; p_{CCA}=0,2240) y el número de ápices (H_A=3,48; p_A=0,1751) no presentaron diferencias significativas en relación a las concentraciones utilizadas. Por otro lado, la longitud hifal y el porcentaje de germinación presentaron valores significativamente mayores en la concentración 0,1 % (H_{LH}=9,09; p_{LH}=0,0106 y H_G=6,36; p_G=0,0391) a aquellos obtenidos en 1,5 % y en el control.

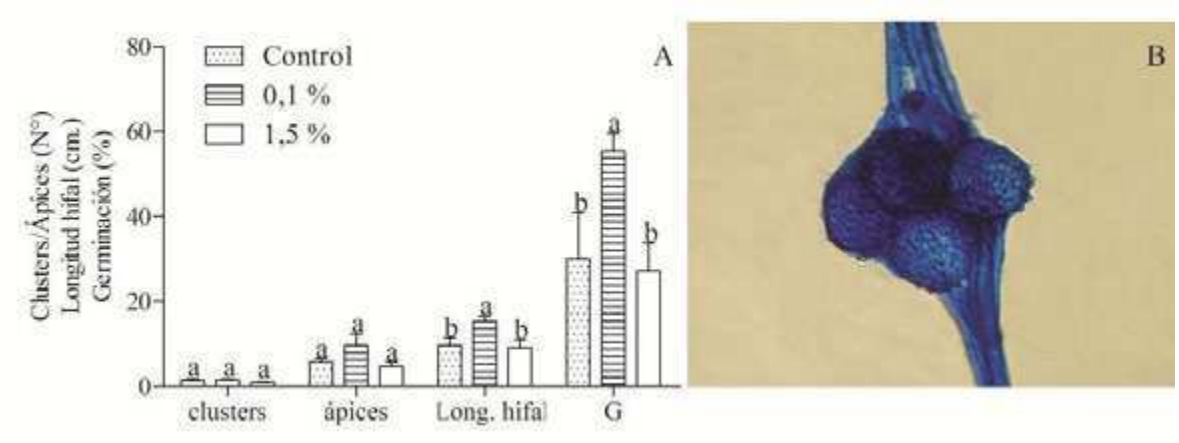

Fig 2 - 5. Efecto del agregado de diferentes concentraciones de exudados de *E. tembladerae* sobre parámetros pre-infectivos de *G. rosea* cultivada en medio semisólido: **A-** Número de clusters de células auxiliares, número de ápices, longitud hifal (cm) y porcentaje de germinación de las esporas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). **B-** Cluster de células auxiliares observado con microscopio óptico (40X).

Efecto de exudados sobre la esporulación y desarrollo de micelio de HMA en raíces transformadas de *Daucus carota.*

Exudados de endofitos

Se observó un aumento significativo en la longitud hifal de *R. intraradices* en las placas suplementadas con 0,05 y 0,1 % de exudados de *E. tembladerae* (H=19,11, p=0,0003) (**Fig 2 - 6A**) presentando valores 12,4 y 46,3 % superiores a los obtenidos en el control. En las concentraciones de exudados al 1,5 y 3 % el crecimiento disminuyó entre un 44,4 % y un 97,4 % respectivamente comparado con el control.

Con respecto a la esporulación se observó un aumento entre 5,7 y 77,5 % en las concentraciones de exudados al 0,05 y 0,1 % mientras que esta fue inhibida entre 68,7 y un 99 % al 1,5 y 3 % respectivamente (H=20,06, *p*=0,0001) (**Fig 2 - 6A**)

En las placas suplementadas con exudados de *Epichloë coenophiala,* endofito aislado de *Schedonorus arundinaceus,* se observó una disminución significativa en la longitud hifal de *R. intraradices* (H=15,10 y *p*=0,0016), presentando una disminución del 30 % en la concentración 0,1 % alcanzando un 100 % en la concentración de 3 % (**Fig 2 - 6B**).

En cuanto al número de esporas (H=5,49 y *p*=0,045) se registró una baja de entre 63,7 y 100 % (no se observó esporulación en las dos concentraciones más altas de exudados) (**Fig 2 - 6B**).

Exudados de plantas

En las placas suplementadas con exudados de *B. auleticus* E+ se observaron incrementos significativos tanto en la longitud hifal (H=17,55, *p*=0,0015) como el número de esporas (H=13,45, *p*=0,0091). En ambos parámetros, los mayores valores fueron observados con el suplemento del exudado al 3 %, registrándose el doble de la longitud hifal en comparación al control y el cuádruple en el número de esporas (**Fig 2 - 6C**). Cuando las placas fueron suplementadas con exudados de plantas E-, se obtuvieron valores similares al control (**Fig 2 - 6C**)

Al suplementar las placas con exudados de *L. multiflorum*, se observó una disminución de la longitud hifal desde 30 % en la concentración 0,05 y 50 % con el suplemento del exudados al 3 % (H=3,91; *p*=0,4172). Se observó una disminución del 97 % en el número de esporas (H=10,65; *p*=0,0281) (**Fig 2 - 6D**). La adición de exudados de plantas E- produjo una disminución significativa de ambos parámetros con respecto al control.

Al comparar el efecto de los dos tipos de exudados utilizados, de plantas con y sin endofito y exudados sólo del endofito, se observa que a la misma concentración, los valores que se alcanzan con los exudados obtenidos de *B. auleticus* son mayores en cuanto a la longitud hifal y al número de esporas que aquellos obtenidos con exudados del endofito *E. tembladerae*. A altas concentraciones los exudados de *E. tembladerae* resultaron inhibitorios.

Los exudados de *E. coenophiala* y de *L. multiflorum* disminuyeron el desarrollo hifal y esporulación de *Rhizophagus intraradices*.

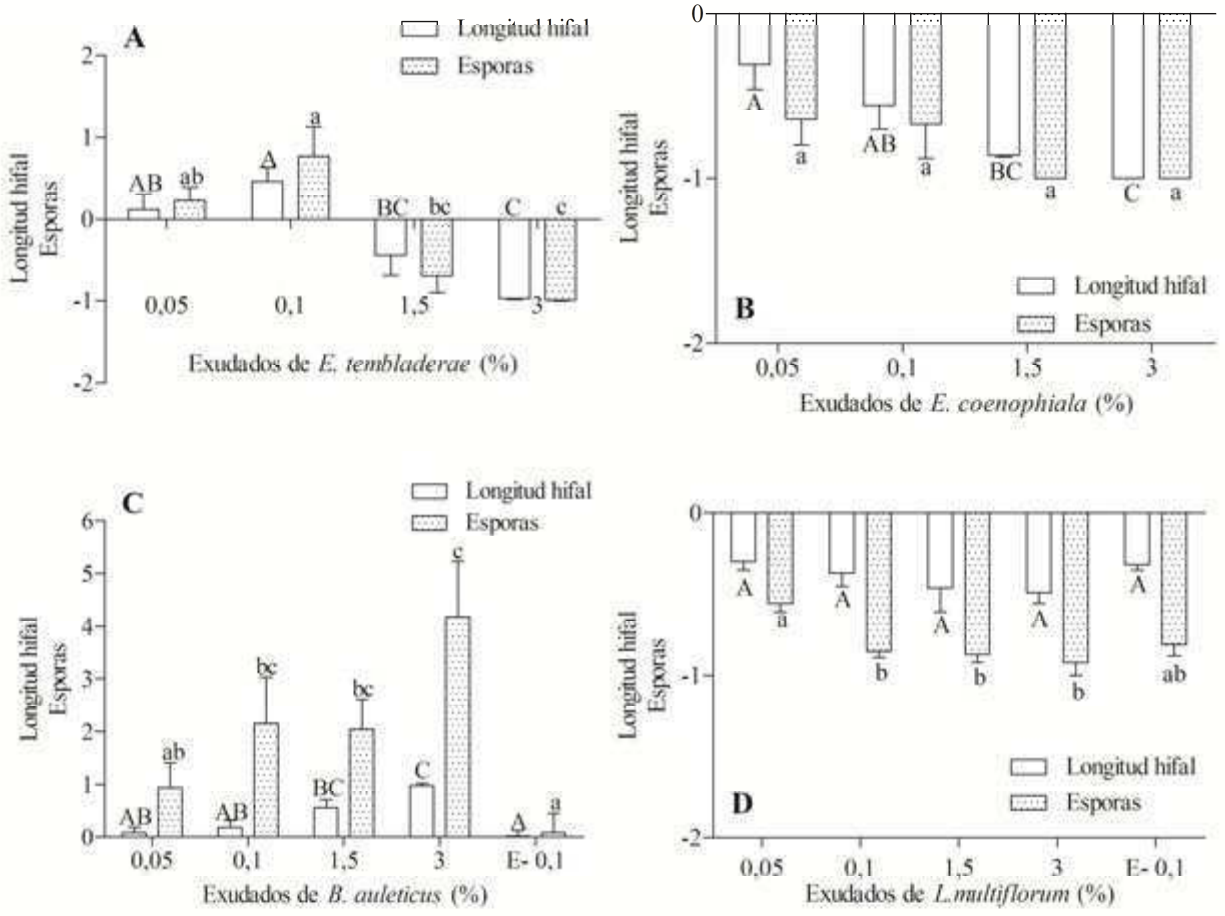

Fig 2 - 6. Longitud hifal y número de esporas de *R. intraradices* cultivado en raíces transformadas de *Daucus carota* suplementado con exudados de **A.** *Epichloë tembladerae;* **B.** *Epichloë coenophiala;* **C.** *Bromus auleticus* y **D.** *Lolium multiflorum.* Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones para la longitud hifal mientras que letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones para el número de esporas ($p<0,05$). Todos los datos fueron relativizados al control que se realizó sin el suplemento de exudados. El tratamiento E- se realizó con el suplemento de exudados de *B. auleticus* E- y *L. multiflorum* E- para los cuales se eligió la concentración 0,1 %. Las barras de error representan el error estándar.

A continuación, se puede observar en la **Tabla 2 - 1** y **Tabla 2 - 2** los valores de la longitud hifal (m) y el número de esporas para cada tipo y concentración de exudado.

Tabla 2 - 1 Longitud hifal (m) de *Rhizophagus intraradices* creciendo en asociación con las raíces transformadas de *Daucus carota* en placas suplementadas con exudados de endofitos: *E. tembladerae* y *E. coenophiala* y exudados de plantas: *B. auleticus* y *L. multiflorum* a diferentes concentraciones 0,05; 0,1; 1,5 y 3 %. El tratamiento control se realizó sin el suplemento de exudados y el tratamiento E- se realizó con el suplemento de exudados de *B. auleticus* E- y *L. multiflorum* E- para los cuales se eligió la concentración 0,1 %.

	Control	**0,05**	**0,1**	**1,5**	**3**	**0,1 E-**
E. tembladerae	12,52±2,05	14,08±2,24	18,32±2,12	6,96±2,99	0,33±0,12	-
E. coenophiala	16,14±2,02	11,19±2,49	7,09±3,82	2,19±0,00	0,00±0,00	-
B. auleticus	9,75±1,86	10,46±1,07	11,49±1,37	15,11±1,54	19,24±0,45	9,93±0,99
L. multiflorum	9,21±0,64	6,48±0,46	5,81±0,79	4,93±1,39	4,67±0,64	6,23±0,32

Tabla 2 - 2 Número de esporas producidas por *Rhizophagus intraradices* creciendo en asociación con las raíces transformadas de *Daucus carota* en placas suplementadas con exudados de endofitos: *E. tembladerae* y *E. coenophiala* y exudados de plantas: *B. auleticus* y *L. multiflorum* a diferentes concentraciones 0,05; 0,1; 1,5 y 3 %. El tratamiento control se realizó sin el suplemento de exudados y el tratamiento E- se realizó con el suplemento de exudados de *B. auleticus* E- y *L. multiflorum* E- para los cuales se eligió la concentración 0,1 %.

	Control	**0,05**	**0,1**	**1,5**	**3**	**0,1 E-**
E. tembladerae	8,80±2,39	9,31±0,81	15,54±3,14	2,75±1,82	0,06±0,06	-
E. coenophiala	17,90±1,73	6,50±2,91	5,96±3,82	0,00±0,00	0,00±0,00	-
B. auleticus	2,71±1,07	5,25±1,28	8,54±2,41	8,25±1,54	14,00±2,87	2,92±0,99
L. multiflorum	4,94±1,66	2,19±0,21	0,75±0,21	0,65±0,26	0,40±0,40	0,95±0,34

DISCUSIÓN

Este trabajo representa la primera evidencia del efecto directo de los endofitos *Epichloë* y los exudados de las raíces de las plantas infectadas en el desarrollo extramatrical y esporulación de los HMA, y corrobora los resultados obtenidos por Novas et al. (2011), en relación al aumento de los valores de los parámetros pre-infectivos de los HMA causados por los exudados radiculares de gramíneas E+ y los exudados de endofitos aislados de gramíneas nativas.

Al comparar el efecto de los exudados utilizados se observó que, a la misma concentración, los valores de la longitud hifal y el número de esporas de *R. intraradices* fueron mayores al suplementar con los exudados obtenidos de *Bromus auleticus* E+ que con exudados del endofito *E. tembladerae.* Por otro lado, altas concentraciones de exudados del endofito resultan inhibidores del crecimiento de HMA. Probablemente, el o los compuestos involucrados en el incremento de las variables medidas, estén más concentrados en el exudado de endofitos y a mayores concentraciones podría tener un efecto tóxico (Colpas et al. 2003).

En las placas suplementadas con exudados de *L. multiflorum* E+ y con exudados del endofito *E. coenophiala* se observaron valores negativos, es decir se produjo inhibición en cuanto al desarrollo de las estructuras pre-infectivas mencionadas anteriormente. Además, se observó una disminución al agregar exudados de *L. multiflorum* E-, sin embargo los exudados de las plantas de *Bromus auleticus* E- presentaron resultados similares al control, lo que sugiere que además del endofito, el genotipo de la planta estaría interviniendo en la producción de sustancias que limitan la simbiosis con los HMA (Vierheilig et al. 2003).

En cuanto a la germinación de esporas, se observa que esta aumenta en contacto con exudados de plantas E+. El mayor porcentaje de germinación fue registrado al suplementar el medio con exudados en una concentración final de 0,1 % en relación al control. En otros estudios se observó que este parámetro también se incrementó ante la presencia de exudados de hongos saprobios (Fracchia et al. 2004), mientras que exudados de levaduras o de otro tipo de endofitos no mostraron ningún efecto (Scervino et al. 2008; Scervino et al. 2009). Por lo tanto, creemos que los exudados de raíces juegan un papel complejo en estados pre-infectivos e infectivos de los HMA. Sin embargo, se necesita más investigación para poder dilucidar el mecanismo de acción para determinar el rol y la composición química de los exudados en esta asociación tripartita.

Se sabe que hongos endofíticos pueden alterar la composición de exudado de la raíz (Guo et al. 2015) y que pueden influir en los procesos biogeoquímicos del suelo (por ejemplo, el carbono y el almacenamiento de nitrógeno, estructura de la comunidad microbiana del suelo y de la función, la

actividad enzimática). Pero poco se sabe sobre el comportamiento metabólico de las plantas cuando son afectadas simultáneamente por simbiontes microbianos foliares y radiculares (Ponce et al. 2009). Los datos del estudio de Ponce et al. (2009) sugieren que los microorganismos regulan el metabolismo de flavonoides y ácido fenólico con un efecto sistémico en las plantas. Sin embargo, aún no ha sido dilucidado si los cambios en el metabolismo de las plantas debido a hongos endofíticos afectan el desarrollo de micorrizas. Estudios relacionados revelaron que los compuestos de exudado de raíz liberados por gramíneas contienen una rica diversidad química, incluyendo azúcares, fenoles, lípidos, ácidos carboxílicos y proteínas (Jones et al. 2004; Bais et al. 2006; Broeckling et al. 2008). Muchos de estos compuestos han sido correlacionados positivamente con actividad microbiana (Vale et al. 2005).

Los endofitos en cultivo pueden producir compuestos con actividad anti-fúngica (Vignale et al. 2013), por lo tanto, los exudados podrían ser una mezcla de compuestos inhibidores o promotores de diferentes hongos. Cada compuesto puede estar presente en una concentración diferente y la actividad de cada compuesto dependería de la concentración. En nuestro modelo específico, el efecto neto de esta mezcla de compuestos aumenta el crecimiento de los HMA. La cantidad y la estructura de los compuestos podrían ser dependientes de la interacción entre el endofito y la planta. La composición de los exudados y la concentración de los compuestos activos pueden ser también diferentes, dependiendo de si los exudados son producidos por la simbiosis o por el endofito en cultivo puro.

Proponemos que cuando se establece la interacción tripartita se produce un complejo mecanismo de regulación de la colonización de micorrizas. Los resultados de nuestros experimentos sugieren que los endofitos *Epichloë* modifican los patrones de exudados de la raíz que modulan indirectamente los parámetros pre-infectivos de HMA. Un posible mecanismo podría ser la traslocación de un compuesto o grupo de compuestos producido por el endofito hacia el apoplasto de las células de la planta, luego a las raíces para ser finalmente exudado a la rizósfera. Otra hipótesis podría ser la producción por parte de la planta de uno o varios compuestos en respuesta a la asociación con los hongos *Epichloë*.

Por lo tanto, este trabajo proporciona evidencia de que afecta a los exudados de las raíces como una forma válida para afectar los microorganismos del suelo. Sin embargo, otros mecanismos tales como la lixiviación, pueden ocurrir simultáneamente.

Esperamos que muchos de estos interrogantes puedan ser respondidos cuando conozcamos la composición de los exudados y el efecto de cada compuesto y su concentración en las variables estudiadas en este trabajo. Es necesario seguir trabajando para explicar la tendencia al aumento en la colonización de hongos formadores de micorrizas arbusculares en pastos nativos infectados por endofitos *Epichloë*. Además, las consecuencias ecológicas de los cambios mediados en la simbiosis

de HMA pueden tener implicancias importantes para el funcionamiento del ecosistema natural y el manejo de los pastos o cultivos forrajeros.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Los resultados obtenidos en *E. tembladerae* corroboran la hipótesis de que los exudados de endofitos aislados de gramíneas nativas afectan positivamente los caracteres pre-infectivos de los HMA.

- Los resultados apoyan la hipótesis que los exudados de *Epichloë tembladerae* aislado de *Bromus auleticus*, afectan positivamente la fase extramatrical y esporulación de los HMA y este efecto es dependiente de la concentración del exudado dado que a altas concentraciones resultaron inhibitorios.

- Los resultados apoyan la hipótesis que los exudados de raíces de *Bromus auleticus* en asociación con *Epichloë tembladerae*, afectan positivamente la fase extramatrical y esporulación de los HMA, coincidiendo con los resultados obtenidos a campo en el Capítulo anterior.

- Las evidencias obtenidas en relación al efecto de los exudados de *Lolium multiflorum,* en simbiosis con *Epichloë,* y los exudados de *E. coenophiala,* cepa aislada de *Schedonorus arundinaceus,* sostienen la hipótesis que gramíneas seleccionadas agronómicamente disminuyen el desarrollo de HMA *in vitro.*

CAPÍTULO 3

"Evaluación en maceta del efecto de endofitos *Epichloë* y sus exudados sobre la micorrización y biomasa del hospedante y sus vecinos"

INTRODUCCIÓN

Triple interacción: Gramínea–endofitos *Epichloë*–Hongos formadores de micorrizas arbusculares

Las plantas pueden asociarse simultáneamente con múltiples simbiontes durante todo su desarrollo, comprender la dinámica de estas simbiosis es ecológicamente relevante. Algunas asociaciones como las de los endofitos *Epichloë* y los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) con gramíneas son comunes de encontrar en la naturaleza. La infección simultánea de las plantas hospedantes con micorrizas y endofitos se presenta tanto en los ecosistemas naturales como en los agrícolas. Estos simbiontes pueden potencialmente interactuar entre sí e influir en el *fitness* de la planta hospedante y de ellos mismos. Son escasos los trabajos que investigan estos dos tipos de interacciones y estos no han tenido en cuenta que la variabilidad dentro de cada tipo de simbiosis puede influir en la respuesta de las plantas. Por otra parte, la mayoría de los estudios se centran en especies agronómicas que naturalmente pueden ser menos dependientes de la interacción con HMA debido principalmente a las historias de fertilización (Johnson 1993; Saikkonen 2000).

La mayoría de los estudios ecológicos sobre endofitos tienden a centrarse en los componentes y sus efectos por encima de la superficie pero se reconoce que estos hongos alteran procesos que suceden en el suelo, en particular a nivel microbiano. Estos procesos, como el reciclado de nutrientes, pueden controlar la abundancia de especies así como la estructura y la diversidad de las comunidades de plantas (van der Heijden et al. 1998; Bonkowski y Roy 2005). En este sentido, los estudios que se centran en la relación de las plantas hospedantes con uno de los simbiontes fúngicos son numerosos, mientras que los que involucran a los dos simbiontes son poco comunes. Particularmente escasos son los que evalúan el efecto de uno de los simbiontes sobre el otro y los cambios que producen en el hospedante (Vandegrift et al. 2015).

La presencia simultánea de varios simbiontes es probable que afecte la interacción natural que cada uno establece con su hospedante como consecuencia de la alteración en el balance costo-beneficio entre el hospedante y los simbiontes a través de la competencia por un recurso común (Bronstein 1994). En el marco de estas múltiples interacciones pueden generarse diferentes escenarios. Efectos interactivos positivos pueden resultar si hay un aumento desproporcionado de los beneficios en relación con los costos de ambas asociaciones. Este fenómeno probablemente ocurra entre simbiontes funcionalmente diferentes que provean a su hospedante con beneficios distintos (Stanton 2003). Por esta razón, el sinergismo es más frecuentemente encontrado entre organismos simbiontes nutricionalmente complementarios (Jia et al. 2004). En este mismo

escenario, si los simbiontes interactuaran entre ellos de manera de incrementar el *fitness* del otro, su coexistencia resultaría en un incremento sinérgico del desarrollo del hospedante (Miller y Travis 1996). En el extremo opuesto, interacciones múltiples podrían disminuir los efectos independientes de cada simbionte a través de la reducción de los recursos. En última instancia, la reducción de los recursos del hospedante provocaría una disminución en el *fitness* en base a las interacciones individuales. Interacciones antagónicas son esperables si los simbiontes compiten por los fotosintatos de la planta (Harris et al. 1985) o si las interacciones son funcionalmente equivalentes ya que el hospedante debe pagar el costo de cada asociación pero, sólo recibe beneficios equivalentes a una sola (Stanton 2003).

Los endofitos fúngicos asexuales y los HMA pueden incrementar considerablemente la producción de biomasa, la producción de semillas y la competitividad de sus hospedantes (Clay 1988; Novas et al. 2003; Iannone y Cabral 2006; Smith y Smith 2011). Mientras que en varios trabajos se registró incremento en el crecimiento de las plantas E+ en relación a las E- (Iannone y Cabral 2006; Iannone et al. 2012c), en otros estudios no se encontraron diferencias significativas entre plantas de diferente estatus endofítico cuando se tuvo en cuenta la micorrización (Novas et al. 2005). Por lo tanto, todavía no está claro qué tipo de interacción se establece entre estos tres simbiontes en simultáneo.

Se sabe que los endofitos *Epichloë* reducen la colonización micorrícica en gramíneas forrajeras mejoradas agronómicamente como *Schedonorus arundinaceus* (festuca alta) (Chu-Chou et al. 1992; Mack y Rudgers 2008), *Lolium perenne* (raigrás perenne) (Müller 2003) y *Lolium multiflorum* (raigrás anual) (Omacini et al. 2006) pero la micorrización se ve aumentada en gramíneas silvestres como *Bromus setifolius* (Novas et al. 2005) y *Poa bonariensis* (Novas et al. 2009). Como se mencionó en la Introducción y en el Capítulo 1 de esta Tesis, contamos con evidencias sobre el incremento de la micorrización en gramíneas nativas. En el trabajo realizado por Arrieta et al. (2015) se evidenció un incremento de la micorrización en plantas de *B. auleticus* del ecotipo La Pampa (asociado a *Epichloë pampeana*) en un ensayo en macetas. Sumado a esto, los resultados presentados en el Capítulo 1 muestran claramente que *Bromus auleticus* en asociación con *Epichloë pampeana* (ecotipo La Pampa) y *E. tembladerae* (ecotipo El Palmar) modulan positivamente la colonización por hongos formadores de micorrizas arbusculares.

Como se ha mencionado anteriormente, los HMA son cruciales para el funcionamiento de los ecosistemas y contribuyen a la formación, el mantenimiento y la calidad de los suelos a través de la exudación de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG) por sus esporas e hifas extraradicales (Rillig 2004; Dai et al. 2013; Rillig et al. 2015). El contenido de glomalina en los suelos puede ser afectado por diversos factores como: la especie de hospedante, las propiedades físico químicas del suelo, la alteración de la vegetación (Rillig et al. 2002), el cambio en el uso del suelo (Rillig et al. 2003; Wang et al. 2011; López-Merino et al. 2015) y la rotación de cultivos

(Wright y Anderson 2000). Hasta el momento, sólo se ha estudiado el efecto de *Epichloe coenophiala* asociado a *Schedonorus arundinaceus* sobre la producción de esta proteína y los resultados revelaron una disminución en la concentración de glomalina en suelos asociados a plantas E+ en comparación con las E- (Buyer et al. 2011). Considerando el efecto positivo de los endofitos *Epichloë* en la micorrización de gramíneas silvestres, hipotetizamos que su presencia promueve también el incremento de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina. Se ha observado una correlación entre la agregación del suelo, el contenido de carbono, de nitrógeno y la abundancia de HMA (Wilson et al. 2009; Fokom et al. 2012). En este sentido, se sabe que las PSRG son un reservorio de carbono (C) y nitrógeno (N) en el suelo ya que estos componentes se encuentran en su estructura (Zhu y Miller 2003; Driver et al. 2005). El Fósforo (P), el N y el C son esenciales para el desarrollo de la simbiosis micorrícica, por lo que la disponibilidad de estos nutrientes puede controlar la colonización. Las plantas proveen C transfiriendo hidratos de carbono a través de las raíces mientras que desde el suelo se provee N y P (Treseder 2004).

Hasta el momento los estudios sobre el efecto de endofitos *Epichloë* sobre la micorrización de su hospedante y/o plantas vecinas han generado resultados dispares según el modelo de gramínea utilizado. Diferencias metodológicas entre ellos han dificultado la interpretación de estos resultados. En el Capítulo 2 por primera vez se evaluó el efecto de los exudados de una gramínea nativa silvestre y una seleccionada agronómicamente y los exudados de los endofitos aislados de las mismas sobre diferentes caracteres de HMA en ensayos *in vitro*. Los resultados apoyan los obtenidos previamente.

En la búsqueda de los mecanismos involucrados en estas complejas interacciones, nos preguntamos cómo será la respuesta a la micorrización y la producción de biomasa de gramíneas nativas silvestres y gramíneas seleccionadas agronómicamente, presentando diferente estatus endofítico, cuando son cultivadas en simultáneo.

El objetivo general de este capítulo fue estudiar el efecto directo de los endofitos *Epichloë,* a través de la asociación con *Bromus auleticus,* y su efecto indirecto a través del empleo de exudados, sobre la micorrización y biomasa del hospedante y de plantas vecinas de la misma especie o de una especie agronómicamente seleccionada como *Lolium multiflorum.* Se midió también el efecto sobre parámetros del suelo como la concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina y el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo, en ensayos en invernadero.

HIPÓTESIS PARCIALES

- La simbiosis que se establece entre *Bromus auleticus* y el endofito *Epichloë tembladerae* favorece la colonización de esta gramínea y de gramíneas vecinas por hongos formadores de micorrizas arbusculares.

- Los exudados de *Epichloë tembladerae,* aislado de *Bromus auleticus,* favorecen la colonización por HMA en plantas libres de endofitos y en gramíneas seleccionadas agronómicamente.

- Las plantas colonizadas simultáneamente por micorrizas arbusculares y endofitos *Epichloë* afectan la biomasa y otros caracteres de interés agronómico del hospedante y sus vecinos

- Los endofitos *Epichloë* favorecen la producción de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina por parte de los HMA.

- Las plantas colonizadas por micorrizas y endofitos simultáneamente provocan cambios en las propiedades químicas del suelo.

OBJETIVOS PARCIALES

- Analizar el efecto de la coexistencia de plantas de *Bromus auleticus* con distinto estatus endofítico sobre la micorrización de dichas plantas y de gramíneas vecinas seleccionadas agronómicamente.

- Estudiar en forma comparativa, el efecto de exudados de endofitos de gramíneas nativas, sobre la micorrización de *B. auleticus* y *L. multiflorum* en diferentes combinaciones de estatus endofítico.

- Analizar el efecto simultáneo de las simbiosis de los endofitos y los hongos formadores de micorrizas arbusculares sobre el desarrollo vegetativo del hospedante, así como sobre otros caracteres de interés agronómico.

- Medir la concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina en suelo acondicionado con *Bromus auleticus* infectado y no infectado con *Epichloë tembladerae.*

- Analizar comparativamente los niveles de carbono, nitrógeno y fósforo en los suelos con micorrizas y sin micorrizas acondicionados con *Bromus auleticus* infectado y no infectado con *Epichloë tembladerae.*

Para llevar adelante los objetivos propuestos, se dividió este capítulo en 2 partes. La **parte A** está dedicada a la gramínea nativa *Bromus auleticus* y la **parte B** a *Bromus auleticus* en vecindad con la gramínea seleccionada agronómicamente *Lolium multiflorum*.

PARTE A – *Bromus auleticus*

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo utilizando plantas de *Bromus auleticus* E+ (colonizadas por *E. tembladerae*) y E- como modelo de gramínea nativa y se utilizó como inóculo el hongo formador de micorrizas arbusculares *Rhizophagus intraradices*.

Diseño experimental

Para evaluar el efecto del estatus endofítico de *Bromus auleticus* y el rol de los exudados del endofito *E. tembladerae* sobre la colonización de plantas vecinas se estableció un ensayo en invernadero que constó de 16 tratamientos.

Se realizaron 5 réplicas por tratamiento y las macetas se mantuvieron en el invernadero por 6 meses (

Fig 3 - 1). En cada maceta fueron colocadas dos plantas divididas por una malla de tela mosquitera (1 mm de apertura de poro) resistente a la intemperie y a la corrosión que permitió mantener separadas las raíces permitiendo el libre movimiento de exudados.

Los tratamientos fueron las combinaciones de:

- Estatus de la colonización con endofitos y sus vecinos: plantas infectadas (E+E+), plantas libres de endofitos (E-E-), plantas infectadas que tienen como vecina a una no infectada (E+E-) y plantas no infectadas que tiene como vecina a una infectada (E-E+).
- Agregado de exudados de endofitos (EXU+) o sin el agregado (EXU-).
- Estatus de la colonización con HMA: Micorrizas (M+) o suelo estéril (M-).

En detalle:

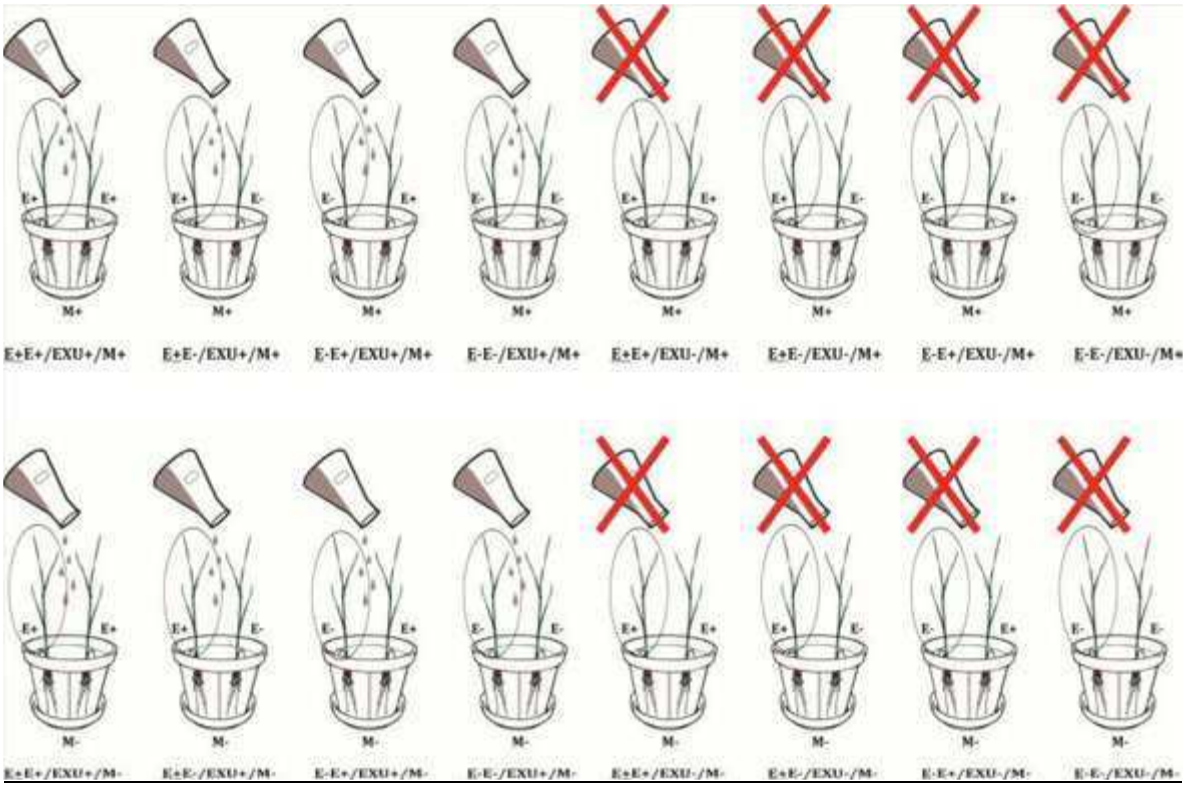

Fig 3 - 1. Esquema de los tratamientos realizados. La planta que se encuentra encerrada con un óvalo fue la que seleccionó en cada caso para realizar las mediciones correspondientes y es la que se encuentra subrayada en el detalle del tratamiento debajo de cada maceta.

Preparación de macetas y mantenimiento

Se utilizó como sustrato una mezcla de suelo: arena 1:1 que se esterilizó mediante tindalización: 80°C y presión constante durante 1 hora por 3 días consecutivos con intervalo de 24 h.

Las semillas fueron pre-germinadas y cuando las plantas tuvieron un mes de crecimiento fueron trasplantadas a macetas de 14 cm de diámetro. A la mitad de las macetas se las suplementó con 5 gramos de inóculo de HMA conteniendo una sola especie: *Rizophagus intraradices* (obtenido anteriormente según Capítulo 2 – sección Materiales y Métodos) que constó de raíces colonizadas y aproximadamente 100 esporas/g.

Las plantas fueron regadas 3 veces por semana y en una de esas ocasiones se suplementó el riego con 10 ml/maceta de exudados de *Epichloë tembladerae* (obtenidos según Capítulo 2 – sección Materiales y Métodos).

Obtención de exudados de endofitos *Epichloë*

La cepa de *Epichloë tembladerae* (2561) fue cultivada en medio líquido papa glucosado (PG) en agitación a 24°C. A los 30 días los cultivos fueron filtrados utilizando una bomba de vacío y se

mantuvieron en el freezer a -20°C hasta el momento de su utilización, momento en que se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0,22 mm Millipore.

Estatus endofítico

El estatus endofítico de los lotes de semillas usadas fue evaluado como se mencionó en el Capítulo 1 – sección Materiales y Métodos antes de iniciar el experimento y en todas las plantas antes de ser cosechadas.

Colonización micorrícica

Para estimar el nivel de colonización micorrícica, un gramo de raíces de cada planta fue lavado con agua de la canilla para remover el suelo adherido y las raíces fueron inmediatamente teñidas con Tripan Blue (Phillips y Hayman 1970) (ver anexo). La colonización micorrícica fue medida según McGonigle et al. (1990).

Parámetros de crecimiento

Se midieron los siguientes parámetros de crecimiento en todos los tratamientos:

- **Longitud del vástago**

La longitud de la hoja más larga fue medida en cada planta.

- **Número de macollos**

Se contó el número de macollos en cada planta.

- **Floración**

Se registró la producción de cañas florales en todas las macetas.

- **Peso seco del vástago y de la raíz**

Para estimar el peso seco del vástago y de la raíz, la parte aérea fue separada del sistema radicular, ambas partes fueron pesadas por separado y el material cosechado fue secado a 80°C durante dos días para determinar el peso seco del vástago y de la raíz (g).

Detección de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG)

Se tomaron muestras de suelo de 3 macetas al azar de cada tratamiento del ensayo explicado anteriormente. Las PSRG fueron extraídas según Wright et al. (1996). Un gramo de suelo fue mezclado con 8 ml de citrato de sodio 20 mM a pH 7 en tubos Falcon de 15 ml. Luego, los tubos fueron autoclavados a 121°C por 30 minutos y fueron centrifugados a 5.000 x g por 15 minutos. El sobrenadante representa las PSRG fácilmente extraíbles. El ensayo de Bradford fue utilizado para la cuantificación proteica a 595 nm usando como estándar la proteína seroalbúmina bobina (BSA).

Análisis del suelo

Se tomaron muestras de suelo de 3 macetas diferentes, seleccionadas al azar, de cada tratamiento. Las muestras fueron homogenizadas, secadas a temperatura ambiente y tamizadas a través de un tamiz de poro de 2 mm.

Los siguientes parámetros fueron medidos en el Instituto de geocronología y geología isotópica (INGEIS):

- Carbono total (Walkley-Black) (g/kg)
- Nitrógeno total (Kjeldahl) (g/kg)
- Fósforo (Kurtz and Bray Nº1) (mg/kg)

Análisis estadísticos

El porcentaje de micorrización total, arbúsculos e hifas de los diferentes tratamientos así como la determinación de PSRG fue analizada mediante un ANAVA de 2 factores en donde el estatus endofítico con su vecino (E+E+; E-E-; E+E-; E-E+) y la aplicación de exudados de *E. tembladerae* (EXU+ o EXU-) fueron los factores principales. Los datos de arbúsculos debieron ser transformados con la raiz cuadrada debido a que no se cumplieron los supuestos del análisis estadístico. Para analizar los porcentajes de vesículas y coils, se utilizó un análisis no paramétrico de la varianza, Kruskal Wallis, por no cumplirse los supuestos del ANAVA.

Los resultados correspondientes a los parámetros de crecimiento (longitud del vástago, peso seco del vástago, peso seco de la raíz) fueron analizados mediante un ANAVA de tres factores en donde los factores principales fueron: estatus endofítico con su vecino (E+E+; E-E-; E+E-; E-E+), exudados (EXU+ o EXU-) y micorrizas (M+ o M-). El número de macollos fue analizado con un análisis de la varianza no paramétrico: Kruskal Wallis debido a que no se cumplieron los supuestos del análisis ANAVA.

Las diferencias en la floración fueron analizadas utilizando el test de chi-cuadrado (χ^2) mediante la construcción de tablas de contingencia 2x2 combinando factores. Las combinaciones fueron las siguientes: M+EXU+ *vs* M-EXU+, M+EXU- *vs* M-EXU-, E+EXU+ *vs* E-EXU-, EXU+ *vs* EXU-, E+M+ *vs* E-M+, E+M- *vs* E-M-.

Los parámetros del suelo (Fósforo, nitrógeno y carbono) fueron analizados mediante un ANAVA de 3 factores en donde los factores principales fueron: estatus endofítico (E+; E+E-; E-), exudados (EXU+ o EXU-) y micorrizas (M+ o M-). Los datos de nitrógeno debieron ser transformados con la raíz cuadrada.

Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia de 0,05 con el paquete estadístico Infostat para Windows versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011). En todos los casos los supuestos fueron chequeados y las comparaciones fueron realizadas con el test de Tukey.

RESULTADOS

Colonización micorrícica

Se observó una colonización micorrícica significativamente mayor en la en las plantas de *Bromus auleticus* E+ con respecto a las E- (F=3,92; *p*=0,0207) registrándose un aumento del 48,14 %. Las plantas E+ vecinas de las E- disminuyeron un 8,51 % el nivel de micorrización aunque estos valores no fueron significativos (**Fig 3 - 2**). No se observaron diferencias significativas en este parámetro debidas a la aplicación de exudados de *E. tembladerae* a las macetas (F=0,66; *p*=0,4261) aunque las plantas E+ que fueron regadas con exudados presentaron una micorrización 13,27 % mayor que aquellas que no fueron regadas (**Fig 3 - 2**).

Las macetas que no fueron inoculadas con HMA no presentaron colonización en sus raíces.

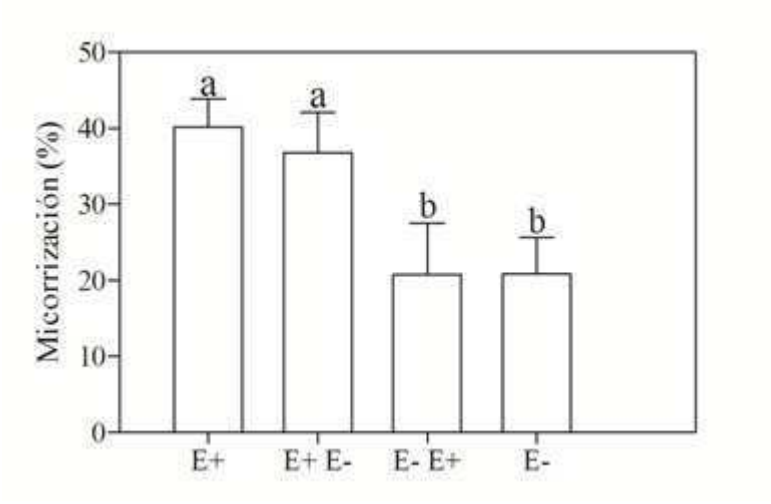

Fig 3 - 2. Micorrización total (%) incluyendo hifas, arbúsculos, coils y vesículas en plantas de *B. auleticus* que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E- =plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el error estándar (EE).

En relación a la formación de arbúsculos en las raíces de *Bromus auleticus*, se detectó una interacción significativa entre el estatus endofítico y la aplicación de exudados (F=3,49; *p*=0,0313). Las plantas E+EXU+ (riego con exudados) presentaron un 73,02 % más de arbúsculos que las E-EXU+ y un 75,25 % más que las plantas E-EXU- (sin exudado) (**Fig 3 - 3**).

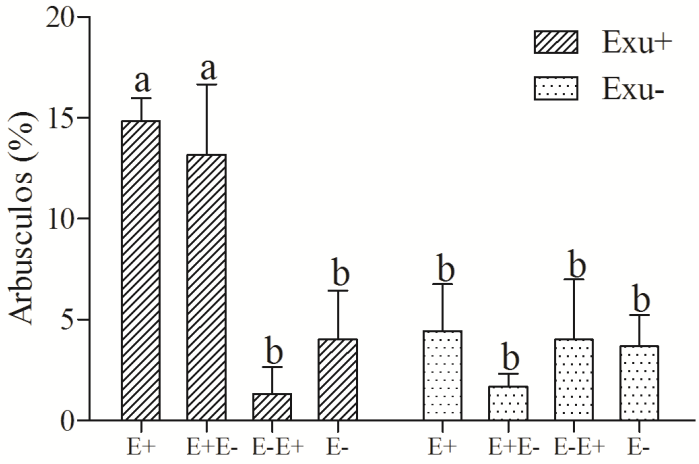

Fig 3 - 3. Arbúsculos (%) en plantas de *B. auleticus* que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

Se observaron diferencias significativas en la colonización hifal asociadas al estatus endofítico (F=3,71; p=0,0253). La diferencia entre la colonización hifal entre las plantas E+ y las E- fue de 44 % a favor de las E+. La aplicación de exudados no influyó significativamente en este parámetro (F=0,00014; p=0,9905) (**Fig 3 - 4**).

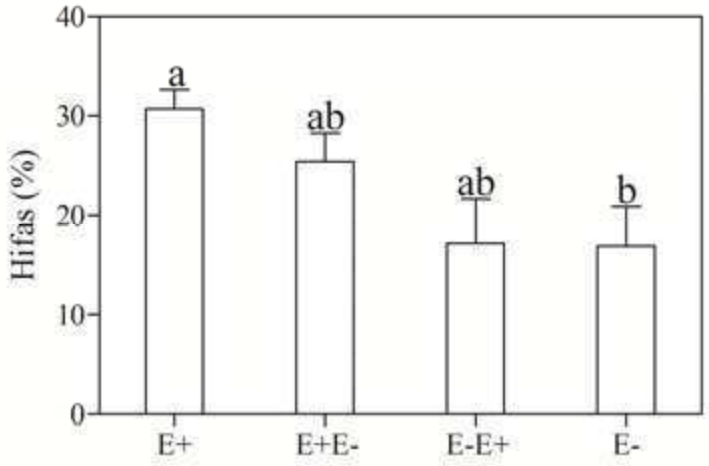

Fig 3 - 4. Hifas (%) en plantas de *B. auleticus* que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

Comparando la formación de coils en los diferentes tratamientos, se detectaron diferencias significativas (H=14,41 *p*=0,0033). Sin embargo, la cantidad de vesículas fueron homogénea en todos los tratamientos (H=10,60; *p*=0,0861) (**Tabla 3 - 1**).

A continuación se presentan en la **Tabla 3 - 1** los porcentajes de todas las estructuras analizadas

Tabla 3 - 1. Porcentaje de hifas, arbúsculos, vesículas y coils en los diferentes tratamientos ± error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos (*p*<0,05).

	E+ Exu+	**E+E- Exu+**	**E-E+ Exu+**	**E- Exu+**	**E+ Exu-**	**E+E- Exu-**	**E-E+ Exu-**	**E- Exu-**
Hifas (%)	30,8± 4,2**a**	27,0± 4,3**a**	13,7±3,3**a**	18,6± 5,6**a**	30,5± 0,8**a**	23,8± 4,2**a**	20,7± 8,7**a**	15,3± 4,8**a**
Arbúsculos (%)	14,8± 1,1**a**	13,2±3,5**a**	1,3± 1,3 **b**	4,0± 2,5 **b**	4,4± 2,3 **b**	1,7± 0,6 **b**	4,0± 2,9**b**	3,7± 1,5**b**
Vesículas (%)	2,2±1,8**a**	0 **a**	0 **a**	1,8±1,0 **a**	2,5±0,7 **a**	1,7±1,7 **a**	0,7±0,5 **a**	0,8±0,4**a**
Coils (%)	6,5±0,8**a**	0 **b**	0 **b**	0,6±0,6**b**	0 **b**	0**b**	1,2±0,9 **ab**	5,0±2,6 **ab**

Parámetros de crecimiento

- **Longitud del vástago**

La longitud del vástago fue afectada significativamente por la presencia de micorrizas en el suelo (F=7,87; *p*=0,0072). Los vástagos de las plantas micorrizadas (M+) fueron un 12,62 % más bajos que los de las no micorrizadas (M-) (**Fig 3 - 5**). El estatus endofítico (F=1,65; *p*=0,1913) y la aplicación de exudados (F=0,03; *p*=0,8623) no influyeron en este parámetro.

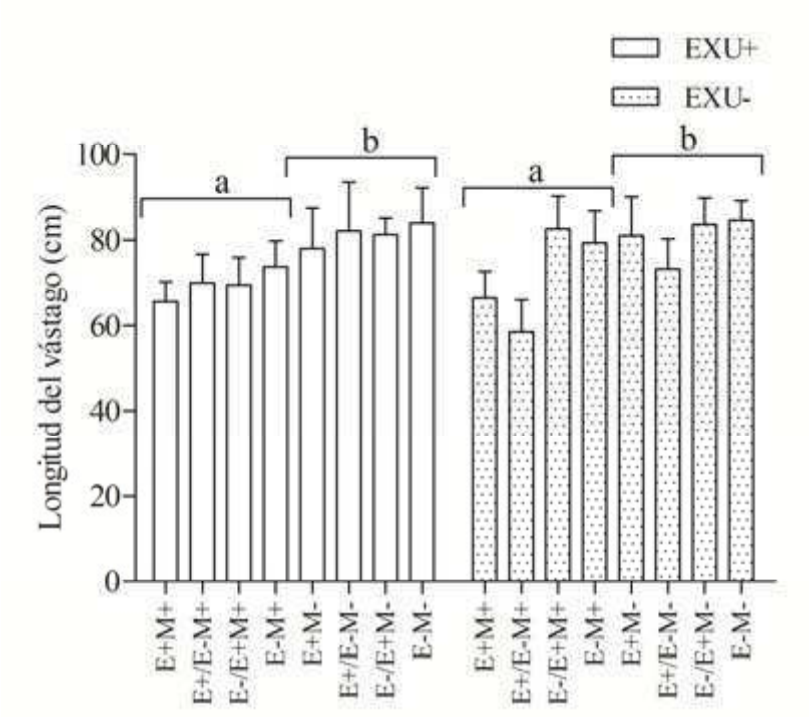

Fig 3 - 5. Longitud del vástago (cm) de las plantas de *Bromus auleticus* en simbiosis con hongos formadores de micorrizas arbusculares (M+) y sin estar asociadas (M-). Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE.

– **Número de macollos**

Se observaron diferencias en el número de macollos entre los tratamientos (H=32,61; p=0,0047). Las plantas regadas con exudados (EXU+) produjeron más macollos que las EXU-. En el caso del tratamiento E+M+ se observó un aumento de 41,62 % en las plantas EXU+ con respecto al tratamiento E+M+EXU- (**Fig 3 - 6**). Los tratamientos E+/E- y E-/E+ sin micorrizas pero con riego de exudados produjeron más macollos que sus pares EXU-.

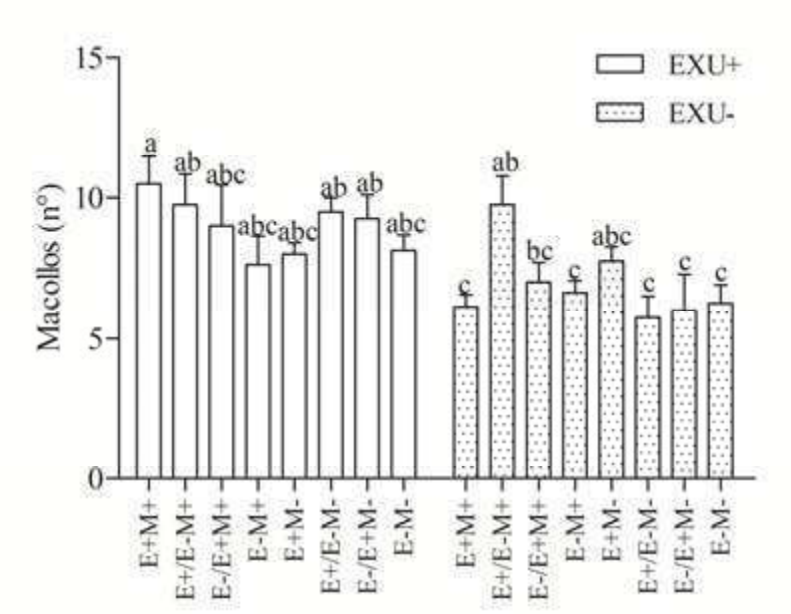

Fig 3 - 6. Número de macollos de la gramínea nativa *Bromus auleticus* luego de 6 meses de crecimiento en invernadero. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

– **Floración**

Las plantas en asociación con *Epichloë tembladerae* (E+) florecieron en mayor proporción que las E- (**Fig 3 - 7**) y estas diferencias fueron significativas en las siguientes combinaciones de factores E+M+ *vs* E-M+ (χ^2=10,42; p=0,0012), E+EXU+ vs E-EXU+ (χ^2=8,29; p=0,004), E+EXU- *vs* E-EXU- (χ^2=4,2; p=0,0384) (**Fig 3 - 7**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas debidas a otras combinaciones de factores M+EXU+ *vs* M-EXU+ (χ^2=0,1; p=0,75), M+EXU- *vs* M-EXU- (χ^2=0,48; p=0,49), EXU+ *vs* EXU- (χ^2=0,98; p=0,32), E+M- *vs* E-M- (χ^2=2,5; p=0,091) (**Fig 3 - 7**).

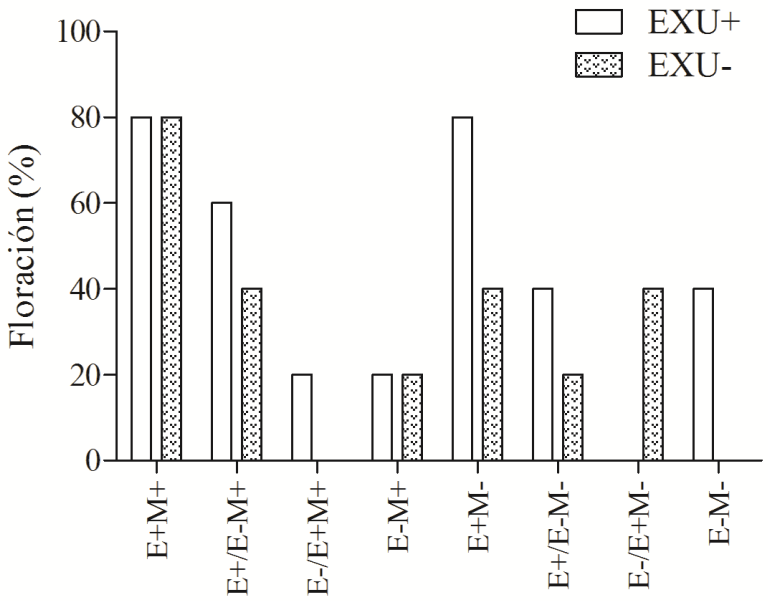

Fig 3 - 7. Floración de la gramínea nativa *Bromus auleticus* luego de 6 meses de crecimiento que difieren en el estatus endofítico (E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. M+= asociada con hongos formadores de micorrizas arbusculares y M-=sin estar asociadas.

– **Peso seco del vástago**

Ni el estatus endofítico (F=0,91; *p*=0,4451) ni la micorrización (F=0,04; *p*=0,8395) afectaron significativamente el peso seco del vástago (**Fig 3 - 8A**). Sin embargo, este parámetro presentó valores significativamente mayores en las plantas regadas con exudados de *E. tembladerae* (F=10,35; *p*=0,0023). Las plantas E+M+ con riego de exudados, presentaron un peso seco del vástago 26,70 % mayor que las plantas E+M+ sin exudados. Las plantas E- en contacto con las E+ regadas con exudados y con presencia de micorrizas presentaron un 12, 17 % más que las plantas E-M+EXU+ (**Fig 3 - 8A**).

– **Peso seco de la raíz**

En cuanto al peso seco de la raíz, se observó el mismo patrón que en el peso seco del vástago. Ni el estatus endofítico (F=0,50; *p*=0,6818) ni la micorrización (F=0,07; *p*=0,7927) afectaron significativamente el peso seco de la raíz (**Fig 3 - 8**). Sin embargo, las plantas regadas con exudados de *E. tembladerae* (EXU+) fueron un 30,45 % mayores que las del tratamiento EXU- (F=10,70; *p*=0,0020) (**Fig 3 - 8**).

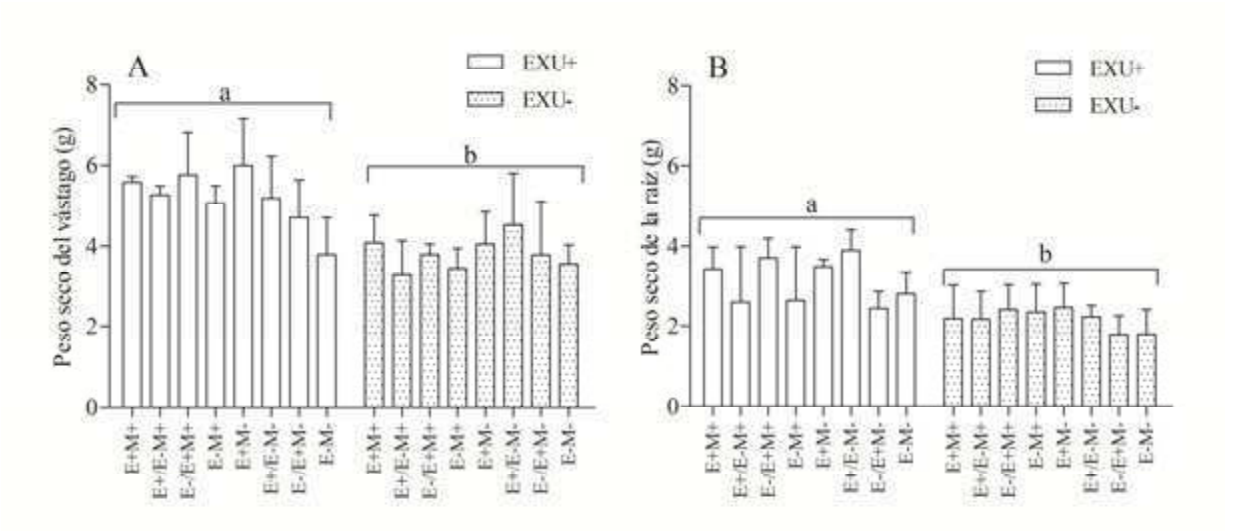

Fig 3 - 8. **A.** Peso seco del vástago (g) y **B.** Peso seco de la raíz (g) de plantas de *Bromus auleticus* luego de 6 meses de crecimiento en maceta en el invernadero. E+= plantas infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus; E+E-=plantas E+ creciendo junto con una no infectada (E-); E-E+= planta E- creciendo junto con una E+ y E-=plantas no infectadas con *Epichloë* creciendo junto a otra de igual estatus. EXU+= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y EXU-=sin aplicación de exudados durante el crecimiento de las plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE.

Detección de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG)

La cantidad PSRG medida no fue significativamente diferente debido al estatus endofítico (F=3,21; p=0,0766) ni debido a los exudados (F=0,60; p=0,4532) (**Fig 3 - 9**). Se observó una tendencia al aumento en la concentración de PSRG en el suelo en los tratamientos con plantas E+ y E- en la misma maceta (**Fig 3 - 9**).

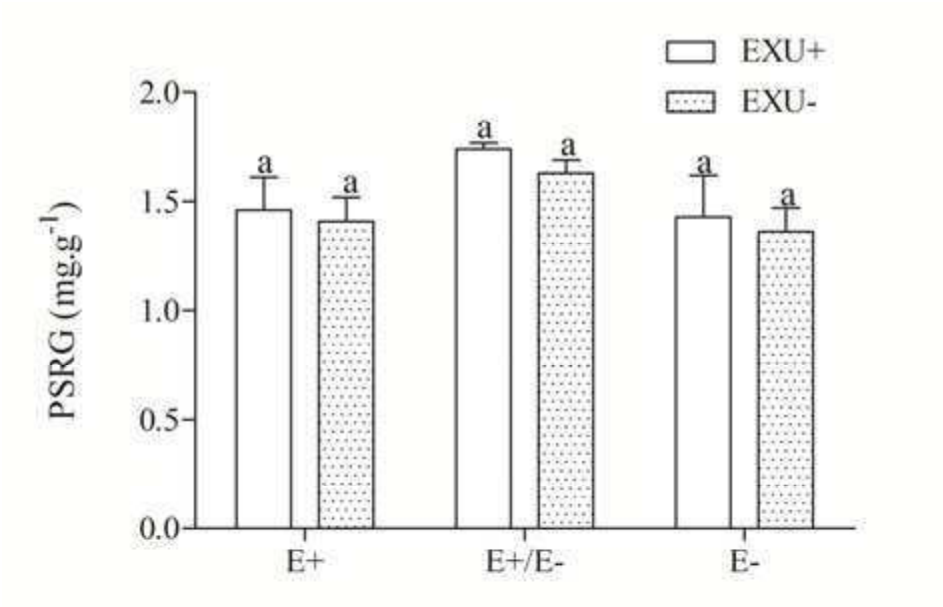

Fig 3 - 9. Concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG) fácilmente extraíble expresada como miligramo de proteína por gramo de suelo seco. E+=corresponde al suelo acondicionado con dos plantas de *Bromus auleticus* con endofito por maceta; E+/E-=suelo de las macetas que contenían una planta con endofito y una sin y E-= suelo proveniente de macetas que contenían dos plantas sin endofito por maceta. EXU+= tratamiento con exudado de endofito y EXU-=sin aplicación de exudados durante el crecimiento de las plantas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

Análisis del suelo

Se analizó el contenido de Fósforo (P) (mg/kg), Nitrógeno total (N) (g/kg) y Carbono total (C) (g/kg) en el suelo en tres réplicas de todos los tratamientos luego de seis meses de crecimiento de las plantas (**Fig 3 - 10**).

En cuanto al contenido de P, se observaron diferencias significativas debidas al agregado de exudados (F=10,07; p=0,0042). La concentración de fósforo fue 17,55 % mayor en los tratamientos EXU- (sin aplicación de exudados). No se encontraron diferencias debidas al endofito (F=2,17; p=0,1372) ni a las micorrizas (F=0,0032; p=0,9556) (**Fig 3 - 10A**).

Al analizar el contenido de N en el suelo, se observó que los suelos con micorrizas (M+) presentaron un 12,8 % más de nitrógeno que los M- (F=63,50; p≤0,0001) (**Fig 3 - 10B**). Ni la presencia del endofito (F=0,48; p=0,6242) ni el suplemento con exudados (F=0,83; p=0,3704) influyó en este parámetro.

El contenido de C se vio incrementado por la presencia de micorrizas (M+) (F=13,60; p=0,0012) (**Fig 3 - 10C**) pero no fue afectado por la presencia de endofitos (F=0,06; p=0,9388) ni por tipo de exudados (F=0,04; p=0,8453) (**Fig 3 - 10**).

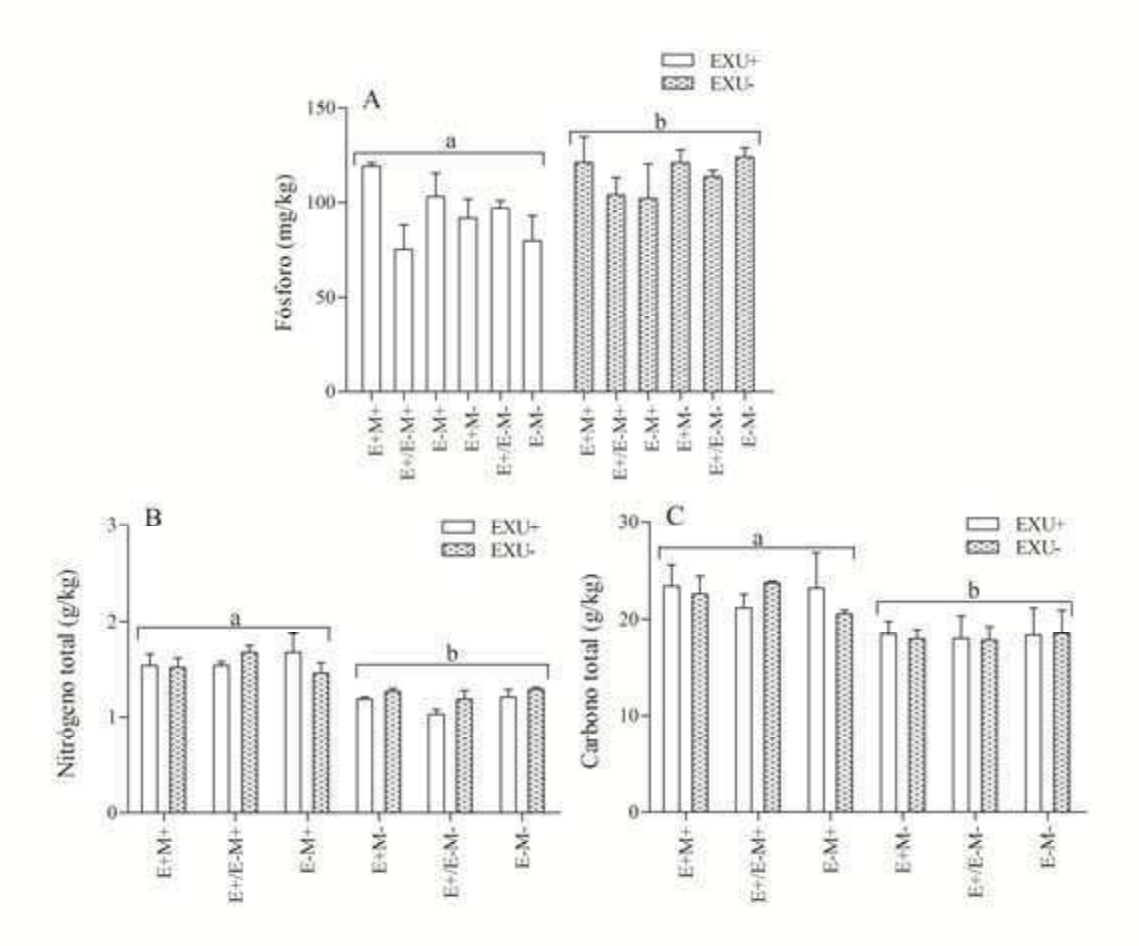

Fig 3 - 10. Concentración de **A**. Fósforo (mg/kg) **B.** Nitrógeno total (g/kg) **C.** Carbono total (g/kg) medidos al final del ensayo. E+=corresponde al suelo acondicionado con dos plantas de *Bromus auleticus* con endofito por maceta; E+/E-=suelo de las macetas que contenían una planta con endofito y una sin y E-= suelo proveniente de macetas que contenían dos plantas sin endofito por maceta. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE.

PARTE B – *Bromus auleticus* en vecindad con *Lolium multiflorum*

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo utilizando plantas E+ y E- de *Bromus auleticus* asociada con *Epichloë tembladerae*, como modelo de gramínea nativa y *Lolium multiflorum* asociada con *Epichloë occultans* (E+) y sin asociar (E-) como modelo de gramínea agronómicamente seleccionada. Se utilizó como inóculo el hongo formador de micorrizas arbusculares *Rhizophagus intraradices*.

Exudados de endofitos *Epichloë*

Los efectos principales fueron: la **especie de gramínea**: *Bromus auleticus* (nativa)/*Lolium multiflorum* (agronómicamente seleccionada); el **estatus de la colonización con endofitos y sus vecinos**: plantas infectadas (E+) ó plantas libres de endofitos (E-); el **agregado de exudados de endofitos** (EXU+) o sin el agregado (EXU-) y el **estatus de la colonización con HMA** (Micorrizas (M+)/suelo estéril (M-).

En cada maceta se colocaron dos plantas de diferente especie y estatus endofítico como se menciona a continuación:

- B.a E+ - L.m E+/EXU+/M+
- B.a E+ - L.m E-/EXU+/M+
- B.a E- - L.m E+/EXU+/M+
- B.a E- - L.m E-/EXU+/M+
- B.a E+ - L.m E+/EXU-/M+
- B.a E+ - L.m E-/EXU-/M+
- B.a E- - L.m E+/EXU-/M+
- B.a E- - L.m E-/EXU-/M+

Y otros 8 tratamientos iguales a los mencionados anteriormente pero con suelo estéril (M-).

Las plantas de *Lolium multiflorum* fueron colocadas en las macetas 40 días después que las de *Bromus auleticus* debido a que estas últimas presentan una baja velocidad de crecimiento inicial por lo que necesitan un tiempo para establecerse y poder competir con *L. multiflorum*.

Se realizaron 5 réplicas por tratamiento y las macetas se mantuvieron en el invernadero por 7 meses.

Preparación de macetas y mantenimiento

Las macetas fueron preparadas y acondicionadas como fue descripto en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 3 – Parte A

Estatus endofítico

El estatus endofítico fue chequeado en los lotes de semillas usadas antes de iniciar el experimento y en todas las plantas antes de cosechar como fue descripto en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1.

Colonización micorrícica

Para estimar el nivel de colonización micorrícica, un gramo de raíces de cada planta fue lavado con agua de la canilla para remover el suelo adherido y fueron inmediatamente teñidas con Tripan Blue (Phillips y Hayman 1970) (ver anexo). La colonización micorrícica fue medida según McGonigle et al. (1990).

Parámetros de crecimiento

Se midieron los siguientes parámetros de crecimiento en todos los tratamientos:

- **Longitud del vástago**

La longitud de la hoja más larga fue medida en cada planta de cada maceta.

- **Número de macollos**

Se contabilizaron el número de macollos en todas las plantas.

- **Peso seco del vástago y de la raíz**

Para poder estimar el peso seco del vástago y de la raíz, la parte aérea fue separada del sistema radicular, ambas partes fueron pesadas por separado y el material cosechado fue secado a 80°C durante dos días. Luego el peso seco del vástago y de la raíz (g) fue calculado.

Análisis estadísticos

El porcentaje de micorrización total y arbúsculos fue analizado mediante un ANAVA de 3 factores en donde el estatus endofítico del hospedante (E+ o E-); la aplicación de exudados de *E. tembladerae* (EXU+ o EXU-) y el estatus endofítico de su vecino (E+ o E-) fueron los factores principales. Los resultados correspondientes a los parámetros de crecimiento (longitud del vástago, número de macollos, peso seco del vástago y de la raíz,) fueron analizados mediante un ANAVA de cuatro factores en donde los factores principales fueron: estatus endofítico (E+ o E-); micorrizas

(M+ o M-); exudados (EXU+ o EXU-) y estatus endofítico de su vecino (E+ o E-). Los datos de longitud del vástago de *Bromus auleticus* debieron ser transformados con la función raíz cuadrada. Los supuestos fueron chequeados y las comparaciones fueron realizadas a través del test de Tukey. Los datos de peso seco del vástago y raíz de *Lolium multiflorum* fueron analizados mediante un análisis no paramétrico de la varianza Kruskal Wallis por no cumplirse los supuestos del ANAVA.

Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia de 0,05 con el paquete estadístico Infostat para Windows versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011).

RESULTADOS

Colonización micorrícica

Se observó un aumento significativo en la colonización micorrícica en las plantas de *Bromus auleticus* E+ con riego con exudados (EXU+) y cuyas vecinas fueron las plantas de *Lolium multiflorum* no infectadas con *E. occultans* (E-) (**Fig 3 - 11**). La interacción entre los tres factores fue significativa (F=6,67; *p*=0,0200).

Al analizar la micorrización de las plantas de *Lolium multiflorum* se observó un aumento significativo de este parámetro cuando se encontraban en vecindad con *Bromus auleticus* E+ (F=0,08; *p*=0,7826) (**Fig 3 - 11**). La micorrización de las plantas de *L. multiflorum* en vecindad con plantas de *B. auleticus* E+ fue el doble de las de aquellas en vecindad con *B. auleticus* E-. Ni el estatus endofítico de *L. multiflorum* (F=0,14; *p*=0,7101) ni los exudados (F=0,14; *p*=0,7101) influyeron en este parámetro.

Se observó una mayor colonización micorrícica de las plantas de *Bromus auleticus* comparándolas con las de *Lolium multiflorum*.

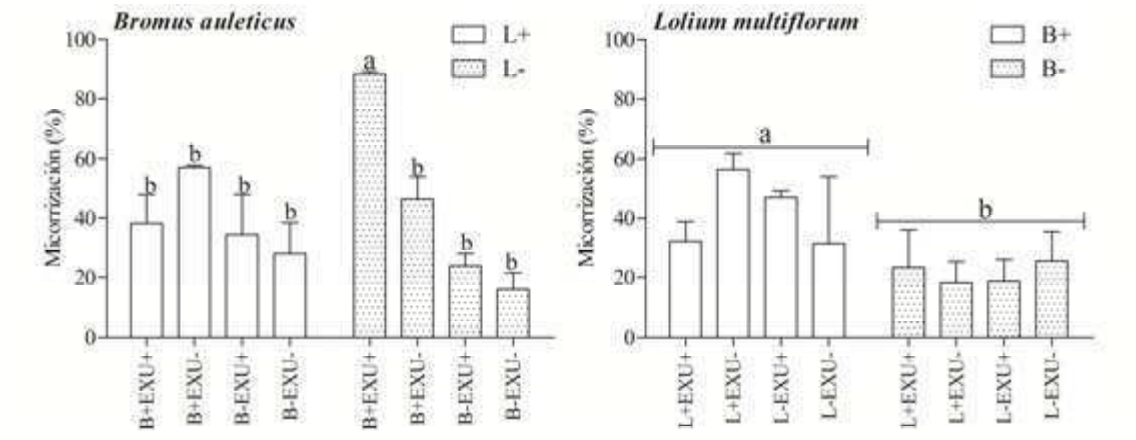

Fig 3 - 11. Micorrización total (%) en plantas de ***B. auleticus* (izquierda)** en donde **B+**=infectadas con *E. tembladerae* y **B-=**no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a L+ y las barras punteadas a L-. Plantas de ***Lolium multiflorum* (derecha)** en donde **L+**=infectadas con *E. occultans* y **L-**=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a B+ y las barras punteadas a B-. **EXU+**= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y **EXU-**=sin aplicación de exudados. Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (*p*<0,05). Las barras de error representan el error estándar (EE).

Los arbúsculos presentaron el mismo patrón que la colonización micorrícica total.

Las plantas de *Bromus auleticus* E+ con riego de exudado y cuya planta vecina fue L-, presentaron el mayor porcentaje de arbúsculos (74,34 %). La interacción entre los factores fue significativa (F=9,76; *p*=0,0065) (**Fig 3 - 12**).

La presencia de *Bromus auleticus* con endofito (B+) como vecino favoreció la formación de arbúsculos en *L. multiflorum*, presentando un 64 % más que las plantas que tuvieron como vecino a B- (F=7,54; *p*=0,0158) (**Fig 3 - 12**).

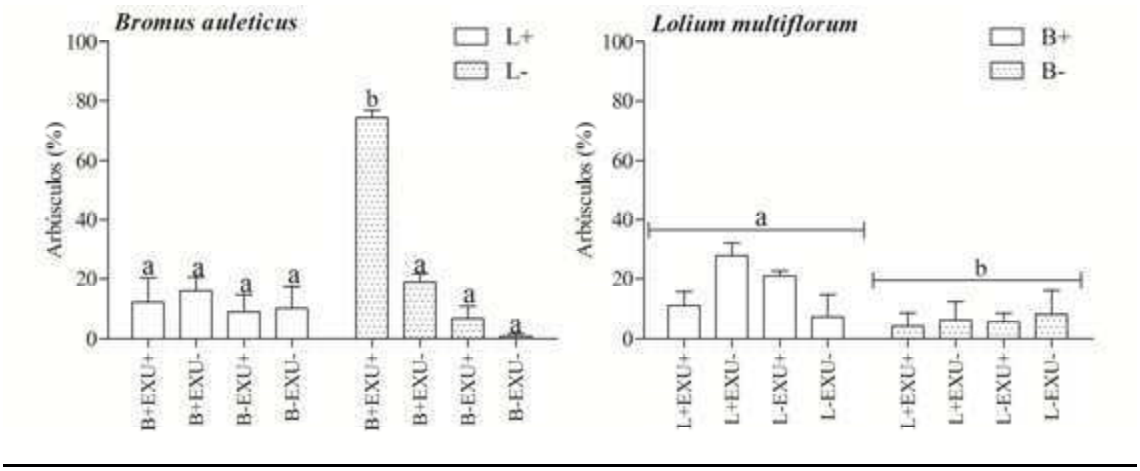

Fig 3 - 12. Arbúsculos (%) en plantas de ***B. auleticus*** **(izquierda)** en donde **B+**=infectadas con *E. tembladerae* y **B-=**no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a L+ y las barras punteadas a L-. Plantas de ***Lolium multiflorum*** **(derecha)** en donde **L+**=infectadas con *E. occultans* y **L-**=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a B+ y las barras punteadas a B-. **EXU+**= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y **EXU-**=sin aplicación de exudados. Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0,05$). Las barras de error representan el error estándar (EE).

Parámetros de crecimiento

- **Longitud del vástago**

No se observaron diferencias significativas en la longitud del vástago de la gramínea nativa *Bromus auleticus* ni en la gramínea agronómicamente seleccionada *Lolium multiflorum* (H=1745; *p*=0,2904) (**Fig 3 - 13**).

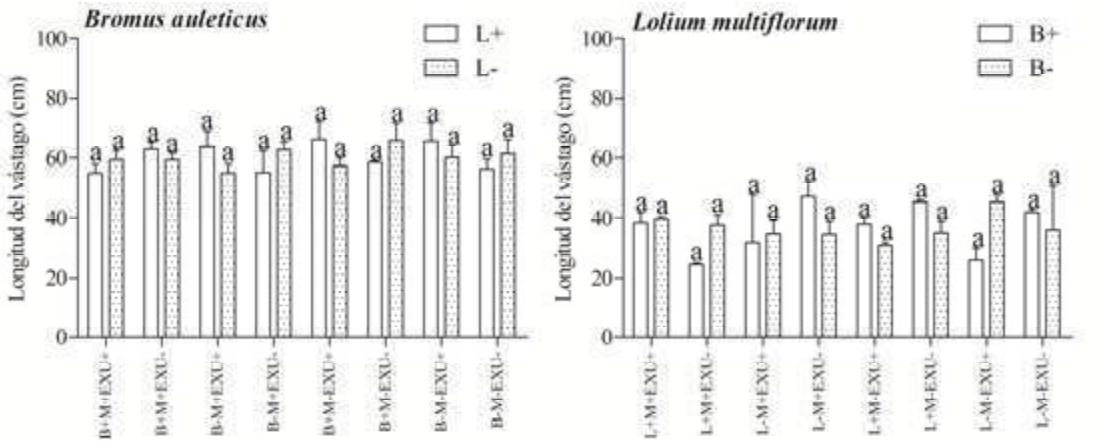

Fig 3 - 13. Longitud del vástago (cm) de las plantas de ***B. auleticus*** **(izquierda)** en donde **B+**=infectadas con *E. tembladerae* y **B-=**no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a L+ y las barras punteadas a L-. Plantas de ***Lolium multiflorum*** **(derecha)** en donde **L+**=infectadas con *E. occultans* y **L-**=no infectadas. Las barras blancas representan a las plantas que tuvieron como vecinas a B+ y las barras punteadas a B-. **EXU+**= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y **EXU-**=sin aplicación de exudados. Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Letras diferentes revelan diferencias significativas entre los tratamientos (p<0,05). Las barras de error representan el error estándar (EE).

– **Número de macollos**

En cuanto al número de macollos no se observaron diferencias entre los tratamientos de *Bromus auleticus*, pero sí entre los de *Lolium multiflorum* (H=24,23; p=0,0496) (**Fig 3 - 14**) sin evidenciarse ningún patrón.

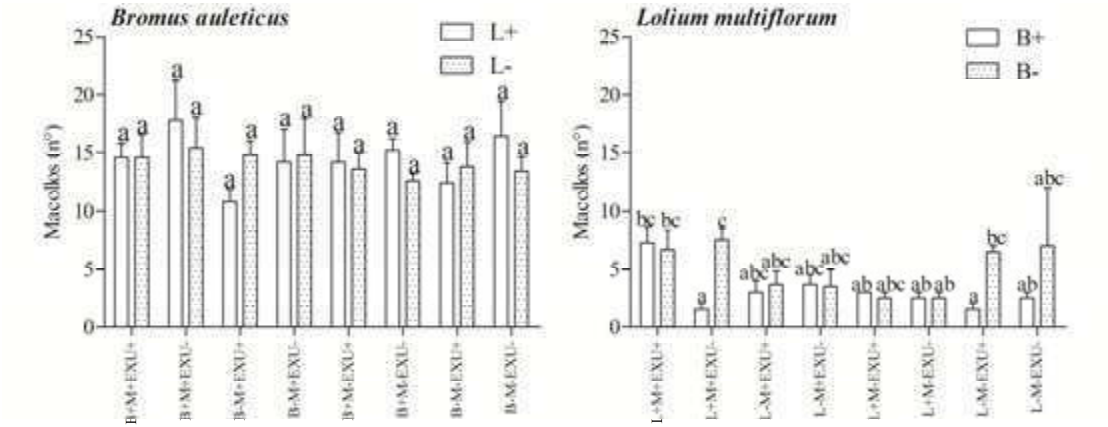

Fig 3 - 14. Número de macollos de ***Bromus auleticus*** **(izquierda)** y de ***Lolium multiflorum*** **(derecha)** luego de 6 meses de crecimiento en maceta en el invernadero. **B+**=corresponde a las plantas de *Bromus auleticus* asociadas con *E. tembladerae* y **B-** sin endofito; **L+**= *Lolium multiflorum* asociado a *E. occultans* y **L-** sin endofito. **EXU+**= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y **EXU-**=sin aplicación de exudados. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

– **Peso seco del vástago**

Las plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *E. tembladerae* presentaron un aumento del 13,87 % en el peso seco con respecto a aquellas no infectadas (F=7,16; *p*=0,0095) mientras que la micorrización (F=1,62; *p*=0,2080), la aplicación de exudados (F=1,46; *p*=0,2315) y las plantas vecinas (F=1,88; *p*=0,1756) no influyeron en este parámetro (**Fig 3 - 15**).

En cuanto al peso seco del vástago de *L. multiflorum*, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (H=23,98; *p*=0,0654) (**Fig 3 - 15**).

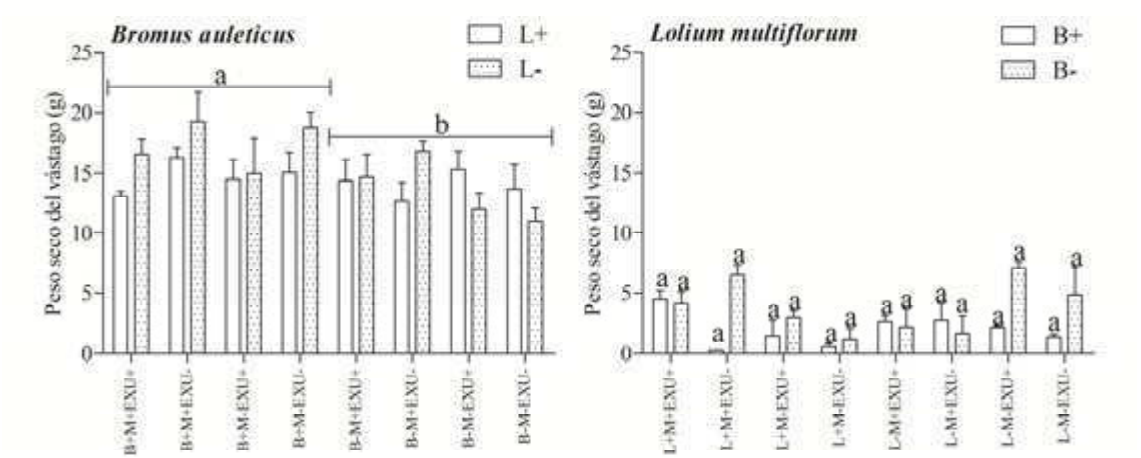

Fig 3 - 15. Peso seco del vástago (g) de plantas de ***Bromus auleticus* (izquierda)** y de ***Lolium multiflorum* (derecha)** luego de 6 meses de crecimiento en maceta en el invernadero. **B+=**corresponde a las plantas de *Bromus auleticus* asociadas con *E. tembladerae* y **B-** sin endofito; **L+**= *Lolium multiflorum* asociado a *E. occultans* y **L-** sin endofito. **EXU+**= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y **EXU-**=sin aplicación de exudados. Letras diferentes indican diferencias significativas (*p*<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE.

– **Peso seco de la raíz**

No se observaron diferencias significativas en cuanto al peso seco de las raíces de *B. auleticus* ni por el estatus endofítico (F=0,16; *p*=0,6925), ni por la presencia de micorrizas (F=1,12; *p*=0,2930) ni por la aplicación de exudados (F=0,17; *p*=0,6815) ni por las plantas vecinas (F=0,42; *p*=0,5218). Tampoco se observaron diferencias en las plantas de *L. multiflorum* (H=18,10; *p*=0,2559) (**Fig 3 - 16**).

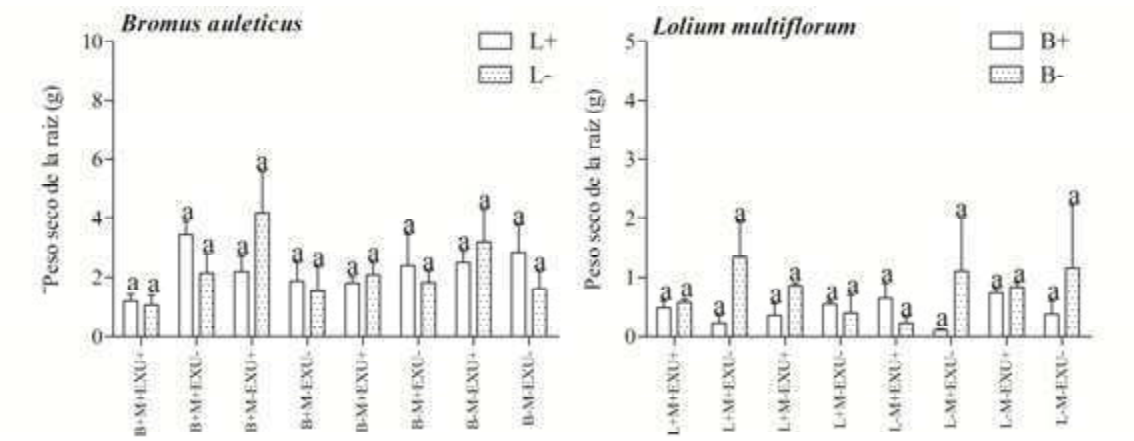

Fig 3 - 16. Peso seco de la raíz (g) de plantas de ***Bromus auleticus*** **(izquierda)** y de ***Lolium multiflorum*** **(derecha)** luego de 6 meses de crecimiento en maceta en el invernadero. **B+=**corresponde a las plantas de *Bromus auleticus* asociadas con *E. tembladerae* y **B-** sin endofito; **L+**= *Lolium multiflorum* asociado a *E. occultans* y **L-** sin endofito. **EXU+**= tratamiento con exudado de *E. tembladerae* y **EXU-**=sin aplicación de exudados. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Las barras de error representan el EE.

DISCUSIÓN

Efecto de los endofitos *Epichloë* y sus exudados en la colonización micorrícica

Los estudios que se han realizado en gramíneas colonizadas simultáneamente por endofitos y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) han brindado resultados contradictorios en cuanto a la colonización micorrícica de los hospedantes. En aquellos donde se usaron gramíneas seleccionadas agronómicamente se encontró que la presencia del endofito disminuye la colonización por HMA (Omacini et al. 2006; Mack y Rudgers 2008; Liu et al. 2011), en cambio en gramíneas nativas la colonización se promueve (Novas et al. 2005; Novas et al. 2009; Arrieta et al. 2015). Otros estudios concluyen que la colonización varía de acuerdo a la especie de HMA utilizada (Liu et al. 2011; Larimer et al. 2012; Zhou et al. 2016).

Nuestros resultados demuestran, una vez más, que las gramíneas nativas, *Bromus auleticus* en este caso, presentan mayores niveles de colonización por HMA, cuando se encuentran asociadas a endofitos. En la parte A de este capítulo se observó que los exudados de *Epichloë* potenciaron la colonización en plantas E+, promoviendo la formación de arbúsculos y la colonización hifal en *B. auleticus*. La micorrización de las plantas E- en presencia de las E+ no se vio afectada tal como lo esperábamos pero suponemos que al ser un ensayo de 6 meses en maceta puede no haberse llegado a registrar este efecto y tal vez en una población en equilibrio la respuesta sea más evidente.

En relación a la parte B de este capítulo, uno de los resultados más contundentes fue el incremento de micorrización en plantas de *L. multiflorum* en vecindad con plantas de *B. auleticus* E+. En este caso ni el agregado de exudados ni el estatus endofítico de *L. multiflorum* afectaron este parámetro. Esto podría indicar que sí son exudados los que modulan la micorrización del hospedante como de plantas vecinas pero serían aquellos producidos en interacción entre *B. auleticus* y *E. tembladerae* los que tendrían mayor efecto en comparación con los exudados producidos por *E. tembladerae* de manera aislada de la planta.

Sumado a esto, por un lado las plantas de *B. auleticus* siempre presentaron mayor nivel de micorrización que las de *L. multiflorum* y, por otro lado, las plantas E+ fueron las que presentaron mayor nivel de micorrización y, en este caso, el tratamiento que presentó valores significativamente mayores fue con el agregado de exudados y en vecindad con plantas *L. multiflorum* E-. Este resultado indicaría la existencia de cierta contraposición entre los efectos de promoción de la micorrización por parte de *B. auleticus* E+ y la inhibición de la misma por parte de *L. multiflorum* E+. El mismo resultado fue obtenido en cuanto a la cuantificación de arbúsculos. Sin embargo, es importante notar que en este ensayo las plantas de *L. multiflorum* E- no presentaron

mayores valores de micorrización que las E+, es decir que la infección endofítica en este caso no produjo un efecto negativo ni positivo en cuanto a la colonización micorrícica. Este resultado se contrapone con el obtenido por Omacini et al. (2006) en donde se observaron mayores valores de colonización micorrícica de las plantas de *Lolium multiflorum* E- que estaban creciendo junto con las E+, sugiriendo que la inhibición ocurre de manera sistémica en las plantas infectadas.

Hasta el momento, los mecanismos exactos que expliquen los efectos negativos o positivos de plantas E+ con HMA no han sido dilucidados. Una posible explicación es que sean compuestos del metabolismo primario o secundario de los tejidos de plantas infectadas o exudados los que actúen directamente como promotores o inhibidores de la simbiosis (Zhou et al. 2016). Algunos estudios sugieren que los alcaloides podrían ser los responsables de la reducción de la micorrización en plantas E+ (Chu-Chou et al. 1992; Antunes et al. 2008; Mack y Rudgers 2008). Otros estudios se inclinan por la hipótesis de que los endofitos pueden cambiar las propiedades físicas y químicas del suelo afectando la colonización micorrícica (Franzluebbers y Hill 2005; Buyer et al. 2011; Iqbal et al. 2012).

Parámetros de crecimiento

Creemos que nuestro trabajo es uno de los primeros en tener en cuenta los efectos de la interacción entre dos simbiontes fúngicos en el rendimiento de una gramínea nativa como es *Bromus auleticus* y sus vecinos de la misma especie y de una especies diferente como lo es la gramínea agronómicamente seleccionada *Lolium multiflorum*.

En cuanto a la biomasa, se observó que tanto el peso seco del vástago como el de la raíz de *B. auleticus* aumentaron cuando las plantas fueron regadas con exudados de *E. tembladerae*. Este resultado es muy llamativo y despierta nuestro interés ante el gran potencial de aplicación agrobiotecnológica. A su vez, sabemos que este incremento de biomasa con EXU+ es debido a un mayor número de macollos y no a un crecimiento en altura de las plantas. Iannone y Cabral (2006) ya habían registrado que las plantas E+ producen un mayor número de macollos que las E- lo que significa que poseen una mayor capacidad para reproducirse asexualmente.

Al analizar los cultivos mixtos *B. auleticus-L. multiflorum* (parte B), el peso seco del vástago fue afectado significativamente por el estatus endofítico de la gramínea nativa *B. auleticus*, siendo las plantas E+ las que presentaron los mayores valores. Esto coincide con trabajos previos en donde se observó que la presencia del endofito aumenta la biomasa del hospedante (Omacini et al. 2006; Iannone et al. 2012c; Guo et al. 2015). Sin embargo, otros trabajos postulan que cuando las gramíneas se encuentran en situación de estrés, la producción de biomasa es mayor pero cuando las plantas reciben adecuada cantidad de agua y nutrientes, no se observa diferencias en producción de biomasa utilizando esa energía para la síntesis y almacenamiento de compuestos defensivos (Wu et al. 2016). En relación al peso seco de raíz y a la longitud del vástago no se

observaron diferencias significativas entre tratamientos ni en *B. auleticus* ni en *L. multiflorum*. En cuanto al número de macollos, no se encontraron diferencias significativas en *B. auleticus* pero si en *L. multiflorum*. Sin embargo, no se pueden asignar directamente dichas diferencias a un factor en particular ni a una combinación de factores.

Se registró que la floración está asociada positivamente con la presencia del endofito (E+). Esto ya había sido registrado en el trabajo de Iannone et al. (2012c). No se observaron diferencias en la floración comparando plantas M+ y M- aunque hay evidencias de que este parámetro se ve aumentado por la presencia de micorrizas en otras plantas (Scagel 2003; Perner et al. 2007; Garmendia y Mangas 2012).

Considerando los parámetros de crecimiento estudiados, no se encontró una tendencia clara sobre el efecto de los factores analizados. La interacción entre HMA y sus hospedantes se ve claramente modificada por los endofitos pero esos cambios no necesariamente se ven reflejados en un mayor crecimiento de las plantas.

Propiedades del suelo

No se observó un efecto en la concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG) ni por presencia del endofito ni por el riego con exudados de *E. tembladerae*. Estudios anteriores realizados en un mesocosmos con festuca alta (*Schedonorus arundinaceus*) por 60 semanas revelaron una disminución de la concentración de glomalina en suelos asociados a plantas E+ en comparación con las E- (Buyer et al. 2011). Este resultado se correlaciona con el hecho de que en gramíneas seleccionadas agronómicamente la colonización micorrícica disminuye.

El método utilizado para medir PSRG fue el método de Bradford que mide proteínas totales, es simple, rápido y fácilmente reproducible (Bradford 1976; Halvorson y Gonzalez 2006) y se basa en la suposición de que durante la extracción se desnaturalizan totalmente todas las proteínas distintas de la glomalina. Sin embargo, algunos autores han detectado inconsistencias en este método y han postulado otro método colorimétrico con ácido bicinconínico para una medición más precisa (Reyna y Wall 2013). Consideramos que todavía no podemos concluir cuál es el efecto de los endofitos sobre la concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina hasta probar nuevas metodologías o poner a punto algún método de extracción *in vitro*. Sin embargo, de manera descriptiva podemos afirmar que trabajando en macetas, al tomar muestras de suelo, en las macetas correspondientes al tratamiento E+ se observa mayor agregación de suelo que en las E-.

Al analizar los nutrientes, se observó que tanto el contenido de nitrógeno (N) (g/kg) como el de carbono (C) (g/kg) aumentaron ante la presencia de los HMA pero no se observaron diferencias en cuanto al estatus endofítico. Estudios anteriores registraron que no se producían cambios en el C total del suelo ante la presencia de endofitos (Handayani et al. 2011). Sin embargo, otros trabajos han reportado un aumento de C y N en los suelos debido al crecimiento de festuca alta infectada con

endofitos en comparación con plantas no infectadas (E-) (Franzluebbers y Hill 2005; Iqbal et al. 2012).

El contenido de fósforo (P) (mg/kg) fue mayor en los tratamientos sin la aplicación de exudados. La colonización micorrícica ayuda a la absorción de fósforo y utilización por parte de la planta y al ser observado además un aumento en la micorrización, en particular, mayor porcentaje de arbúsculos (siendo estas estructuras las encargadas del intercambio de P entre el hongo y la planta (Smith y Read 2008)) cuando se regó con exudados, podemos decir que el P disminuyó en el suelo debido a la capacidad de las micorrizas de facilitar P a la planta. Hubiese sido interesante medirlo en las raíces de *B. auleticus* para poder corroborar que esa disminución está correlacionada con un aumento de este nutriente en la planta.

Se necesita más investigación para clarificar el aumento o disminución de los nutrientes en suelos asociados a plantas infectadas simultáneamente con endofitos y HMA.

Aunque estos estudios proporcionan una indicación del potencial de los endofitos, hay que tener en cuenta que los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones ambientales controladas y no reflejan el complejo edáfico e interacciones climáticas que se presentan en la naturaleza.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Los resultados obtenidos no apoyan la hipótesis, al menos en el modelo de maceta, que *Epichloë tembladerae* en asociación con su hospedante *Bromus auleticus* favorece la colonización de su contraparte libre de endofitos y de gramíneas vecinas por hongos formadores de micorrizas arbusculares.

- Los exudados de *Epichloë tembladerae* aumentan significativamente la colonización micorrícica y, en particular, la formación de arbúsculos en plantas de *Bromus auleticus* E+. Las plantas de *B. auleticus* colonizadas simultáneamente por micorrizas arbusculares y endofitos *Epichloë* y que a su vez fueron regadas con exudados, presentaron un aumento en el peso seco de su biomasa, así como un incremento en caracteres de interés agronómico como la longitud del vástago y la floración, en comparación con las plantas colonizadas por un único simbionte fúngico y sin riego con exudados.

- No se corroboró la hipótesis que postula que los endofitos *Epichloë* favorecen la producción de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG).

- Se observaron diferencias significativas en la concentración de P debidas al agregado de exudados. No se encontraron diferencias debidas al endofito ni a las micorrizas. Los suelos con micorrizas presentaron un mayor contenido de N y C que los M-. Ni la presencia del endofito ni el suplemento con exudados influyeron en la concentración de estos nutrientes.

- Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis que *Epichloë tembladerae* en asociación con su hospedante *Bromus auleticus* favorece la colonización de gramíneas vecinas seleccionadas agronómicamente por hongos formadores de micorrizas arbusculares. Ni el estatus endofítico de *L. multiflorum* ni los exudados influyeron en este parámetro.

- Las plantas de *B. auleticus* presentan un mayor nivel de micorrización que las de *Lolium multiflorum.* En particular, las plantas E+ con el agregado de exudados y en vecindad con plantas *L. multiflorum* E- fueron las que presentaron mayor micorrización.

- Las plantas de *L. multiflorum* colonizadas simultáneamente por micorrizas arbusculares y endofitos *Epichloë* no presentan un aumento en los caracteres de interés agronómico evaluados, en comparación con las plantas colonizadas por un único simbionte fúngico.

CAPÍTULO 4

"Estudio del efecto de endofitos *Epichloë* en la colonización micorrícica y producción de biomasa de sus vecinas a campo"

INTRODUCCIÓN

Como ya fue mencionado anteriormente, varios estudios realizados en gramíneas de interés agronómico han registrado que la infección endofítica reduce la esporulación y la colonización por HMA (Chu-Chou et al. 1992; Guo et al. 1992; Müller 2003; Omacini et al. 2006; Mack y Rudgers 2008; Liu et al. 2011). Por el contrario, los estudios sobre poblaciones silvestres de pastos nativos sugirieron una asociación positiva entre la colonización de micorrizas y la presencia endofitos (Novas et al. 2005; Novas et al. 2009; Arrieta et al. 2015).

En la última década, los efectos de la infección de los endofitos en el *fitness* de sus hospedantes ha sido ampliamente estudiada en diferentes sistemas endofito-gramíneas como *Lolium perenne* (Clay et al. 1993), *Festuca rubra* (Vázquez-de-Aldana et al. 2013) y *Festuca pratensis* (Takai et al. 2010). Mientras que algunos estudios detectaron efectos negativos o neutros, (Faeth et al. 2004; Cheplick y Faeth 2009; Cheplick et al. 2014; Dirihan et al. 2015) otros detectaron efectos positivos (Guo et al. 2015).

En experimentos controlados, incorporando como factor a los HMA, se observó que la presencia del endofito aumentó la biomasa de *Lolium multiflorum* mientras que los HMA no produjeron cambios en el hospedante (Omacini et al. 2006). Mack y Rudgers (2008) registraron que no había interacción entre endofitos y HMA en el crecimiento de festuca alta mientras que Larimer et al. (2012) y Zhou et al. (2016) encontraron que los endofitos de una gramínea nativa eran beneficiosos para el crecimiento de la planta, pero que en el caso de los HMA, dependiendo de la especie fúngica involucrada, estos pueden tener un efecto positivo, negativo o neutro sobre la biomasa.

Todos estos resultados sugieren que se necesitan más estudios para poder generalizar acerca del efecto de los endofitos y los HMA en la competitividad del hospedante. El efecto benéfico de la asociación puede no ser un mayor crecimiento sino que el hospedante puede invertir sus recursos en defensa o almacenamiento cuando estos son limitantes (Malinowski y Belesky 2000; Wu et al. 2016).

No se han realizado hasta el momento estudios en condiciones de campo diseñados para evaluar el efecto de los endofitos *Epichloë* en asociación con gramíneas nativas sobre la colonización de HMA de gramíneas vecinas de interés agronómico. Por lo expuesto, y teniendo en cuenta la información obtenida en los capítulos anteriores en relación a: i) el efecto de endofitos *Epichloë* sobre la micorrización en *B. auleticus*, ii) el rol de los exudados de endofitos y plantas sobre caracteres pre-infectivos e infectivos de HMA, iii) el efecto de la asociación *B. auleticus* - *Epichloë* sobre la promoción de la micorrización de otras gramíneas, tanto *in vitro* como en maceta, se diseñó un ensayo a campo, utilizando a *B. auleticus,* como modelo de gramínea nativa, para evaluar el

efecto de la asociación con endofitos *Epichloë* sobre la micorrización y biomasa de 3 gramíneas seleccionadas agronómicamente, asociadas o no a *Epichloë*, utilizando el mismo tipo de inóculo y bajo las mismas condiciones que en el Capítulo 1.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Las plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë* favorecen la colonización por HMA de plantas vecinas de interés agronómico como *Lolium multiflorum*, *Schedonorus arundinaceus* y *Bromus catharticus.*

- Las plantas de *Bromus auleticus* colonizadas con endofitos *Epichloë* modifican la emergencia y producción de biomasa, así como otros caracteres de interés agronómico de las plantas vecinas.

OBJETIVOS PARCIALES

- Evaluar la colonización micorrícica de HMA en gramíneas de interés agronómico como *Lolium multiflorum*, *Schedonorus arundinaceus* y *Bromus catharticus* cuando se encuentran en cercanía con *Bromus auleticus* asociado a endofitos *Epichloë* en comparación con plantas no asociadas.

- Analizar la emergencia y productividad a campo de gramíneas de interés agronómico como *Lolium multiflorum*, *Schedonorus arundinaceus* y *Bromus catharticus* en cercanía con *Bromus auleticus* asociado a endofitos *Epichloë* en comparación con plantas no asociadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo a campo (**Fig 4 - 1**) para evaluar el efecto de la presencia de plantas de *Bromus auleticus* asociadas a *Epichloë tembladerae* (Ba+) y no asociadas (Ba-) frente a la emergencia y productividad de dos gramíneas seleccionadas agronómicamente: *Lolium multiflorum* y *Schedonorus arundinaceus* (E+ y E-) en las que sus endofitos inhiben la micorrización y de una gramínea libre de endofitos en la naturaleza: *Bromus catharticus*. Para este ensayo fueron seleccionadas las semillas del ecotipo El Palmar debido a que en el ensayo a campo del Capítulo 1 y en otros ensayos realizados en el laboratorio presentó un mejor rendimiento que el ecotipo La Pampa.

Diseño experimental

Se establecieron parcelas en la EEA-INTA de Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina en donde fueron sembradas semillas de *B. auleticus* E+ o E-. Cada parcela consistió de tres líneas de 2 m en las que se sembraron 12 gramos de semillas/línea de *B. auleticus*. Dentro de las parcelas, que correspondían a cada nivel de estatus endofítico de *Bromus auleticus*, 3 años después, luego de que las plantas se establecieron, fueron sembradas en líneas de 50 cm *L. multiflorun* (E+ y E-), *S. arundinaceus* (E+ y E-) y *B. catharticus* (E-) que fueron consideradas como las vecinas de *Bromus auleticus*. Se sembraron 4 gramos de semillas por línea (**Fig 4 - 1A**).

A los dos meses se midió el porcentaje de emergencia de las plántulas y a los seis meses se cosechó, teniendo como antecedente los resultados obtenidos en el ensayo a campo del Capítulo 1, donde la colonización micorrícica fue mayor en este tiempo. Se analizaron 8 réplicas por tratamiento y 10 plantas de cada especie fueron removidas para medir colonización micorrícica y los parámetros de crecimiento: longitud del vástago y de la raíz; número de hojas y peso seco del vástago.

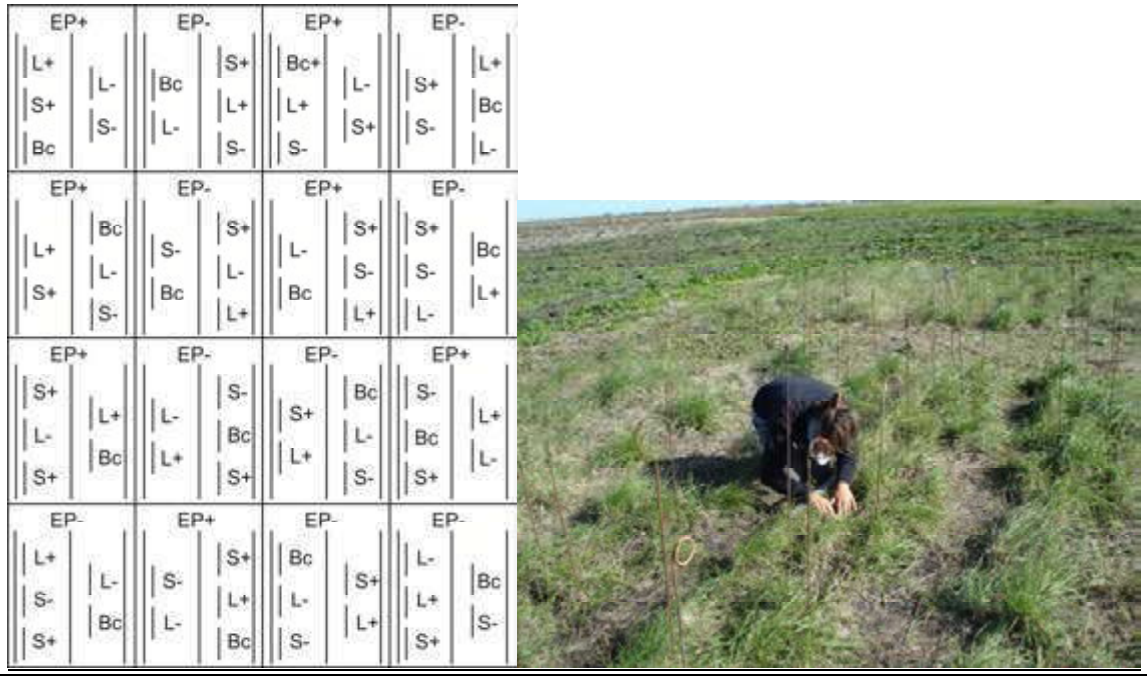

Fig 4 - 1. A-Esquema del ensayo planteado. Los rectángulos grandes representan a las parcelas en donde fueron sembradas las plantas de *Bromus auleticus* del ecotipo EP y entre sus líneas fueron sembradas las diferentes gramíneas: L+= *Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans;* L-=*Lolium multiflorum* sin endofito; S+= *Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala;* S-=*Schedonorus arundinaceus* sin endofito Bc=*Bromus catharticus*. **B-** Analizando la emergencia total de las plántulas en las parcelas a los dos meses desde la siembra.

Emergencia de las plántulas

Dos meses después de la siembra se midió la emergencia total de las plántulas en cada parcela (**Fig 4 - 1B**). Para esto, se consideraron 20 cm de cada línea, se contabilizaron todas las plántulas emergidas y luego se realizó la extrapolación a los 50 cm (longitud de las líneas).

Colonización micorrícica

Para estimar el nivel de colonización micorrícica, a los 6 meses, tres plantas de cada parcela fueron extraídas con su sistema radical. Las raíces fueron lavadas con agua de la canilla para remover el suelo adherido a ellas y fueron inmediatamente teñidas con Tripan Blue (Phillips y Hayman 1970) (ver anexo). Treinta segmentos de 1 cm de largo fueron seleccionados al azar y se midió la colonización micorrícica según (McGonigle et al. 1990).

Parámetros de crecimiento

- **Longitud del vástago y de la raíz**

Se midió la longitud de la hoja más larga y la longitud de la raíz en 10 plantas de cada especie en cada parcela.

- **Número de hojas**

Se registró el número de hojas de 10 plantas de cada especie dentro de cada parcela.

- **Peso seco del vástago**

Luego de la cosecha y de tomar las mediciones mencionadas anteriormente, los vástagos fueron secados a 80°C durante dos días y luego se calculó el peso seco (g).

Estatus endofítico

El estatus endofítico fue chequeado en los lotes de semillas usadas antes de iniciar el experimento y en plantas seleccionadas al azar antes de cosechar y luego de la cosecha como fue descripto en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1.

Análisis estadísticos

El porcentaje de colonización total (M) y el porcentaje de arbúsculos (A) fueron analizados mediante un ANAVA de 2 factores, siendo el acondicionamiento de las parcelas con *B. auleticus* (E+/E-) y las diferentes gramíneas L+= *Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans;* L-=*Lolium multiflorum* sin endofito; S+= *Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala;* S-=*Schedonorus arundinaceus* sin endofito Bc=*Bromus catharticus,* los factores principales.

Los parámetros de crecimiento como longitud del vástago, longitud de la raíz, número de hojas y peso seco fueron registrados y analizados mediante un ANAVA de 2 factores.

El número de hojas fue transformado con la raíz cuadrada y el peso seco con logaritmo natural debido a que no se cumplían los supuestos.

Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia de 0,05 con el paquete estadístico Infostat para Windows versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011). En todos los casos las comparaciones fueron realizadas con el test de Tukey y los supuestos de los análisis fueron chequeados.

RESULTADOS

Emergencia de las plántulas

Al analizar la emergencia de las plántulas a los dos meses de la siembra, no se observaron diferencias significativas entre las gramíneas vecinas a *B. auleticus* tanto en las parcelas acondicionadas con *B. auleticus* E+ como en las de *B. auleticus* E- (F=1,09; *p*=0,2992). No se encontraron diferencias entre las distintas gramíneas dentro de las parcelas (F=0,42; *p*=0,7929) (**Fig 4 - 2**).

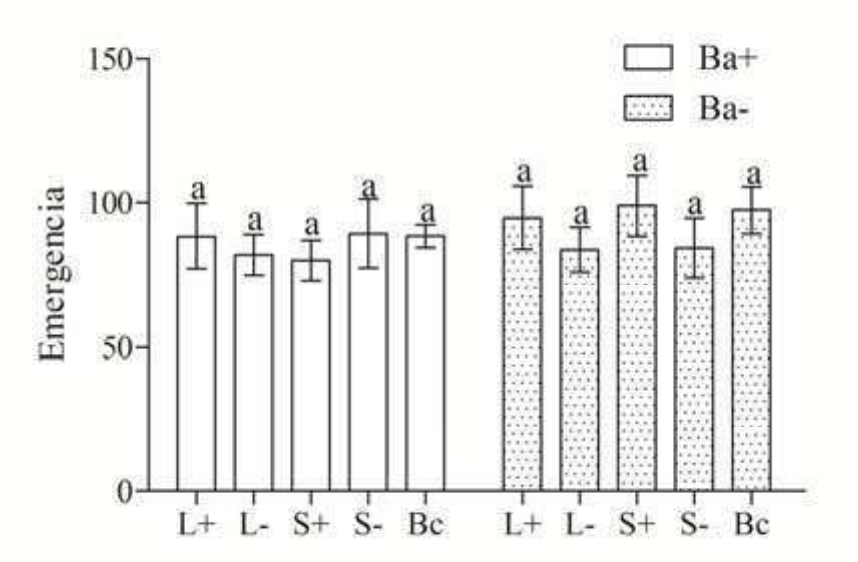

Fig 4 - 2. Emergencia total de plántulas (n°) de las diferentes gramíneas en las parcelas acondicionadas con *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). *L*+= *Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans;* L-=*Lolium multiflorum* sin endofito; *S*+= *Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S*-=*Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc*=*Bromus catharticus*. Letras diferentes significan diferencias significativas (*p*<0,05). Las barras de error representan el EE.

Colonización micorrícica

La colonización micorrícica y en particular el porcentaje de arbúsculos fue significativamente mayor en las plantas que crecieron en las parcelas acondicionadas con *Bromus auleticus* E+ en comparación con aquellas que crecieron en las parcelas de *Bromus auleticus* E- (F_M=29,57, *p*=0,0001; F_A=33,80, *p*=0,0001) (**Fig 4 - 3A y B**). Los porcentajes de micorrización y arbúsculos

fueron 29,31 % y 45,5 % mayores respectivamente en las parcelas de *B. auleticus* E+. No se observaron diferencias entre las especies de gramíneas (F_M=0,66, *p*=62,11; F_A=1,01, *p*=40,92) (**Fig 4 - 3A y B**).

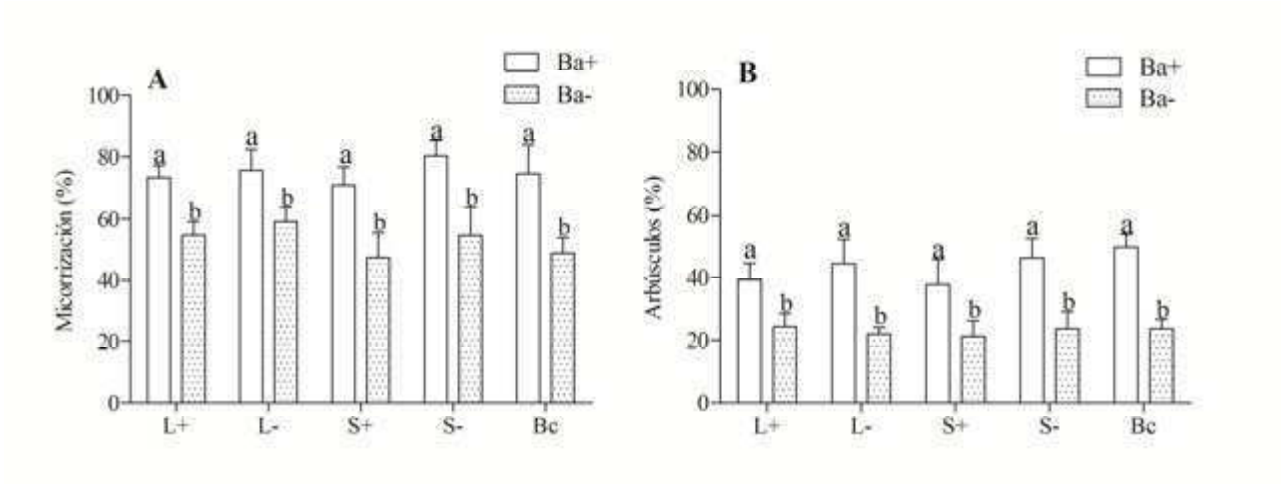

Fig 4 - 3. A- Porcentaje de micorrización y **B-** Porcentaje de arbúsculos en diferentes gramíneas: *L+= Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans; L-=Lolium multiflorum* sin endofito; *S+=Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S-=Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc=Bromus catharticus* que crecieron durante 6 meses en parcelas acondicionadas con plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). Letras diferentes significan diferencias significativas (*p*<0,05). Las barras de error representan el EE.

Parámetros de crecimiento

- **Longitud del vástago y de la raíz**

La longitud del vástago de las diferentes gramíneas registró una interacción significativa entre el acondicionamiento de las parcelas con *Bromus auleticus* y las especies de gramíneas utilizadas (F=2,99, *p*=0,0247) (**Fig 4 - 4A**). En *L. multiflorum*, E+ y E-, como en *B. catharticus*, se observaron valores significativamente mayores en las plantas vecinas a *B. auleticus* E-, mientras que en *S. arundinaceus*, E+ y E-, no se observaron diferencias significativas en los valores. Las raíces crecieron de manera homogénea en los diferentes tratamientos. No se encontraron diferencias en cuanto a la longitud de la raíz (cm) relacionadas con el acondicionamiento de las parcelas (F=3,07, *p*=0,0843) ni con las especies de gramíneas (F=0,68, *p*=0,6077) (**Fig 4 - 4B**).

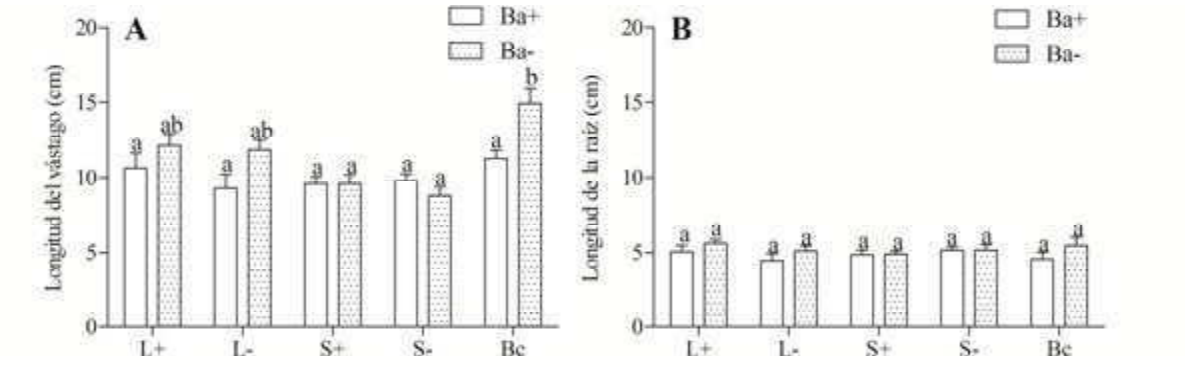

Fig 4 - 4. A- Longitud del vástago (cm) y **B-** Longitud de la raíz (cm) de las gramíneas *L+= Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans; L-=Lolium multiflorum* sin endofito; *S+=Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S-=Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc=Bromus catharticus* que crecieron durante 6 meses en parcelas acondicionadas con plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). Letras diferentes significan diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

– **Número de hojas**

El número de hojas fue mayor en las parcelas acondicionadas con *B. auleticus* E- que en aquellas acondicionadas con *B. auleticus* E+ (F=4,35, p=0,0408) pero no se observaron diferencias entre especies (F=1,43, p=0,2346) (**Fig 4 - 5**).

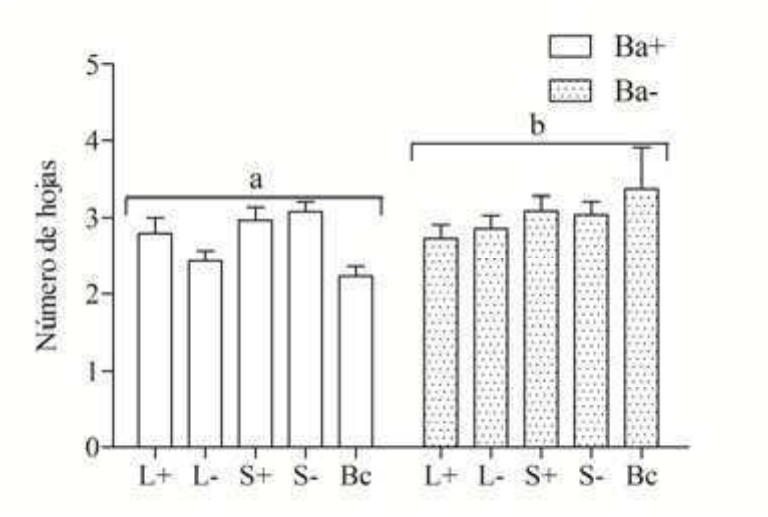

Fig 4 - 5. Número de hojas de las gramíneas *L+= Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans; L-=Lolium multiflorum* sin endofito; *S+=Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S-=Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc=Bromus catharticus* que crecieron durante 6 meses en parcelas acondicionadas con plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). Los corchetes agrupan tratamientos que no presentan diferencias significativas entre ellos. Letras diferentes significan diferencias significativas (p<0,05). Las barras de error representan el EE.

– **Peso seco del vástago**

Las especies de gramíneas difirieron significativamente en el peso seco a los 6 meses de crecimiento (F=7,43, *p*=0,0001) Fig **4 - 6**). Sin embargo, el acondicionamiento del suelo con *Bromus auleticus* de distinto estatus endofítico no influyó en este parámetro (F=0,65, *p*=0,6288). *Bromus catharticus* presentó un peso seco mayor a las demás, en particular en las parcelas acondicionadas con *Ba*-.

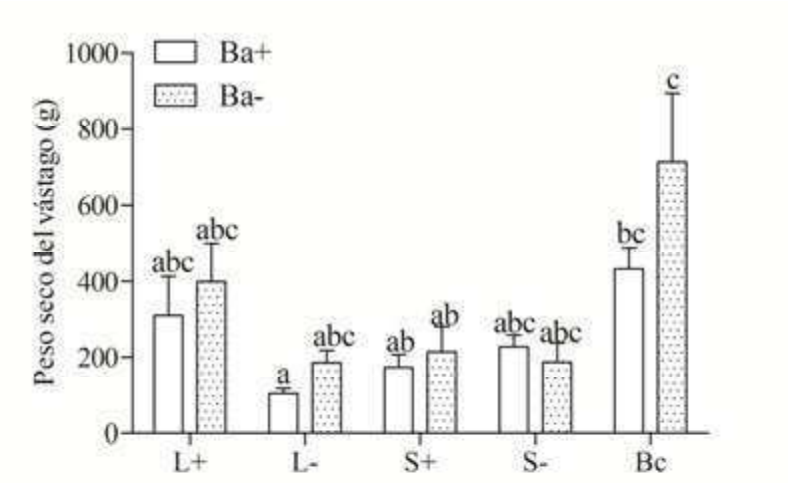

Fig 4 - 6. Peso seco del vástago (g) de las gramíneas *L*+= *Lolium multiflorum* asociada a *Epichloë occultans; L*-=*Lolium multiflorum* sin endofito; *S*+=*Schedonorus arundinaceus* asociada a *Epichloë coenophiala; S*-=*Schedonorus arundinaceus* sin endofito *Bc*=*Bromus catharticus* que crecieron durante 6 meses en parcelas acondicionadas con plantas de *Bromus auleticus* infectadas con *Epichloë tembladerae* del ecotipo El Palmar (Ba+) o plantas sin endofito (Ba-). Letras diferentes significan diferencias significativas (*p*<0,05). Las barras de error representan el EE.

DISCUSIÓN

Colonización micorrícica

Los resultados obtenidos indican claramente que el acondicionamiento del suelo y la cercanía de la gramínea nativa *Bromus auleticus* E+ a las gramíneas seleccionadas agronómicamente aumenta la colonización micorrícica de estas últimas, corroborando los resultados previos.

Se sabe que los exudados de las raíces pueden influir en la estructura de las comunidades de las plantas tanto indirectamente alterando los procesos biogeoquímicos en la rizósfera o directamente a través de la inhibición de la germinación de semillas o disminuyendo el crecimiento de plantas vecinas (Asao et al. 2003; Bais et al. 2006; Kalinova et al. 2007). Los endofitos, en interacción con su hospedante, afectan la composición y función de las comunidades de microorganismos del suelo (Mack y Rudgers 2008; Casas et al. 2011) y participan en el recambio y ciclo de nutrientes. Hasta el momento, se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales, se realizan estos cambios, siendo uno de ellos la producción de compuestos que son liberados en los exudados de las plantas (Antunes et al. 2008). Los ensayos llevados a cabo en el marco de esta tesis han aportado suficiente evidencia para apoyar la hipótesis que los endofitos *Epichloë*, asociados a *Bromus auleticus*, están involucrados en el aumento tanto de la colonización micorrícica total como en el porcentaje de arbúsculos de las plantas vecinas, a través de la liberación de exudados radicales. Sumado a esto, recientemente Guo et al. 2015, registraron diferentes perfiles químicos en los exudados de plantas E+ y E- de *S. arundinaceus*, en concordancia con los resultados de esta tesis.

Parámetros de crecimiento

El aumento en la micorrización de las plantas vecinas a *Bromus auleticus* E+ no se vio reflejado con un aumento de la productividad de las gramíneas con respecto a los parámetros de crecimiento medidos en este ensayo. Estos resultados concuerdan con lo registrado en el Capítulo 3 donde las plantas de *L. multiflorum* sólo presentaron diferencias significativas en los valores de número de macollos en algunos tratamientos y donde no pudimos detectar una tendencia clara. El resto de los parámetros estudiados no mostraron diferencias frente al tratamiento con pantas E+ o E- de *B. auleticus*, por lo que, por ejemplo, el incremento en el número de macollos no se asoció a un incremento en la biomasa del hospedante.

Estudios realizados en otras gramíneas han documentado efectos neutros e incluso negativos en cuanto al crecimiento de los hospedantes infectados (Faeth et al. 2004; Cheplick y Faeth 2009; Cheplick et al. 2014; Dirihan et al. 2015). Los efectos benéficos que los endofitos le otorgan al

hospedante, no siempre se ven reflejados en un cambio en el crecimiento. Se ha registrado que los endofitos conducen al hospedante a invertir sus recursos en defensa o almacenamiento a expensas de reducir el crecimiento del vástago cuando los recursos son limitantes (Malinowski y Belesky 2000). Son pocos los estudios que se han realizado comparando el crecimiento de los hospedantes con la producción de sustancias de almacenamiento entre plantas E+ y E-. Wu et al. (2016) recientemente probaron que cuando el pasto nativo de china *Leymus chinensis* infectado con *Epichloë bromicola* se encontraba en condiciones de estrés hídrico, la producción de biomasa era mayor pero cuando estas plantas recibían una adecuada cantidad de agua, no había diferencia en biomasa entre plantas E+ y E- pero producían mayores concentraciones de compuestos fenólicos en las E+. Esto podría ayudar a las plantas a sufrir menos daños al ser expuestas a herbívoros en los pastizales.

Los presentes resultados apoyan la hipótesis que la simbiosis entre endofitos *Epichloë* y pastos nativos favorece la colonización por HMA en plantas vecinas siendo estas de importancia agronómica, haciendo de este un modelo muy interesante en términos de los beneficios que ambos simbiontes proporcionan al hospedante.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Dado que *Bromus auleticus* asociada a endofitos *Epichloë* tuvo un efecto positivo sobre la micorrización de sus vecinas, *Lolium multiflorum*, *Schedonorus arundinaceus* y *Bromus catharticus*, gramíneas de interés agronómico, se corrobora la hipótesis planteada originalmente.

- Los resultados obtenidos no corroboraron la hipótesis que la vecindad con *Bromus auleticus* E+ influya positivamente en la producción de biomasa, longitud del vástago y raíz y número de hojas en comparación con las plantas en vecindad con *Bromus auleticus* E- y sin endofito.

DISCUSIÓN GENERAL

Los endofitos *Epichloë* contribuyen al establecimiento de sistemas de agricultura sustentable basado en que son simbiontes naturales de muchas gramíneas de importancia agronómica (Clay 1989; Saikkonen et al. 1998). En la mayoría de los estudios, los endofitos de pastos presentan efectos positivos sobre el *fitness* de su hospedante, incrementando su crecimiento, fertilidad, resistencia contra herbívoros, resistencia a enfermedades y mayor tolerancia a estrés biótico y abiótico (Clay 1988; Clarke et al. 2006; Malinowski y Belesky 2006; Oberhofer et al. 2013; Song et al. 2015). Sumado a esto, los microorganismos simbiontes modulan la forma en que sus hospedantes se relacionan con otras plantas dado que tienen múltiples efectos en ellos, que repercuten en la comunidad y en el funcionamiento del ecosistema. La presencia de simbiontes puede afectar a la interacción planta-otros simbiontes y la interacción planta-planta a través de los distintos mecanismos por los que se relacionan.

Endofitos *Epichloë*-HMA

La metodología experimental y el sistema de estudio de esta tesis permitieron poner a prueba la hipótesis de que la asociación gramínea silvestre-endofito *Epichloë* favorece la micorrización no sólo del hospedante sino también de hospedantes vecinos, seleccionados agronómicamente.

Cumpliendo con los objetivos propuestos en el presente trabajo, se detectaron diferentes etapas a través de las cuales la interacción entre gramínea silvestre-endofito *Epichloë* podría modular la relación entre el hospedante y los hongos micorrícicos arbusculares (HMA): i) se corrobora el efecto de los endofitos *Epichloë* sobre los caracteres pre-infectivos ii) se corrobora el efecto sobre la fase extramatrical y esporulación de los HMA, y iii) se esclarece que estos efectos son ejercidos, al menos, vía exudados que las plantas hospedantes liberan al medio a través de sus raíces. Esta interacción se evaluó en 3 escalas experimentales (*in-vitro*/maceta/campo), registrándose en los 3 casos la misma respuesta de la planta a la asociación.

Esta tesis aporta las primeras evidencias de la respuesta diferencial de la asociación gramínea - endofito *Epichloë,* evaluando simultáneamente y bajo las mismas condiciones la micorrización de tres modelos de gramíneas (gramínea silvestre nativa asociada a *Epichloë*, gramínea seleccionada agronómicamente asociada a *Epichloë* y gramínea silvestre nativa no asociada a *Epichloë*), lo que aporta robustez a los resultados.

Si bien, los mecanismos exactos, o los compuestos involucrados no han sido dilucidados todavía, estos resultados tienen un gran potencial de aplicación.

Exudados y propiedades del suelo

Teniendo en cuenta el efecto de las plantas asociadas a endofitos sobre plantas vecinas, sumado a los resultados obtenidos en ensayos *in vitro*, podemos afirmar que los endofitos por sí solos o la asociación planta-endofito producen compuestos que son traslocados a las raíces y liberados al suelo, afectando así a las comunidades microbianas presentes.

Se sabe que la composición química de los exudados puede influir en la estructura de la comunidad microbiana, la función y otros procesos biogeoquímicos importantes dentro de la rizósfera y en última instancia, influir en el ciclo de nutrientes del suelo a largo plazo. Guo et al. (2015) es el único estudio que hasta el momento detalla la composición de exudados de las raíces de diferentes cultivares de festuca alta asociadas a *Epichloë* y detecta que esta composición es única y depende de la asociación particular cultivar-endofito. Muchos de los compuestos ya habían sido registrados como responsables en la adquisición de nutrientes del suelo y de la modificación de la estructura de las comunidades (Bais et al. 2006).

La influencia de los endofitos en la composición de exudados es un potencial mecanismo que explica el aumento observado en esta tesis en la micorrización de pastos nativos.

En este trabajo, además del efecto directo sobre la micorrización, se detectaron cambios en la concentración de nutrientes en el suelo. Estudios previos corroboraron que la infección endofítica aumenta la concentración de compuestos fenólicos en los exudados que pueden estar involucrados en la adquisición de P en el suelo (Malinowski et al. 1998; McNear Jr y McCulley 2012; Guo et al. 2015). En nuestro caso, en los experimentos en maceta no se observaron diferencias en el contenido de P comparando entre E+ y E- pero la concentración disminuyó al ser regadas con exudados de endofitos. Esto puede deberse a que en dicho tratamiento la micorrización fue mayor y debido a que las micorrizas facilitan P a la planta, este nutriente disminuyó en el suelo. Hubiese sido interesante medirlo tanto en las raíces como en los vástagos de *B. auleticus* para poder corroborar que esa disminución está correlacionada con un aumento de este nutriente en la planta. En los análisis del contenido de nitrógeno (N) y el de carbono (C), se observó un aumento en los valores de estos elementos en el suelo. Estudios anteriores han reportado un aumento de C y N en los suelos debido al cultivo de festuca alta infectada con endofitos en comparación con plantas no infectadas (E-) (Franzluebbers y Hill 2005; Iqbal et al. 2012). En este trabajo, sin embargo, no se observaron diferencias debidas al estatus endofítico, pero sí ante la presencia de los HMA. La promoción del desarrollo extramatrical de los HMA, por parte de los endofitos, podría estar relacionada con el incremento en las concentraciones de C y N.

A pesar de no haber encontrado diferencias entre los tratamientos en cuanto a la concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG), hay antecedentes en donde las PSRG disminuyen en cercanía con plantas de festuca alta E+ (Buyer et al. 2011), donde también se detectó una disminución de la micorrización. Por lo tanto, en este caso, con el aumento en la micorrización

esperábamos observar un aumento en las PSRG. Creemos que son necesarios más estudios y mediciones más precisas para poder detectar las diferencias.

Productividad

Este trabajo es uno de los primeros en tener en cuenta los efectos de la interacción entre dos simbiontes fúngicos en el rendimiento de una gramínea nativa como es *Bromus auleticus* y sus vecinos de la misma especie y de gramíneas agronómicamente seleccionadas.

En los ensayos en maceta se observó que la biomasa de *B. auleticus* aumentó cuando las plantas fueron regadas con exudados de *E. tembladerae*. Este resultado es muy llamativo y despierta nuestro interés ante el gran potencial de aplicación agrobiotecnológica.

En los ensayos a campo no se observaron diferencias en la producción de biomasa, aunque a diferencia de los ensayos en maceta, en estos casos aún no fueron realizados los tratamientos con riego de exudados de *Epichloë*.

Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis se generaron numerosos interrogantes que deberán ser abordados en futuros estudios. El principal se basa en los mecanismos e identidad de compuestos involucrados en los procesos observados. Este punto es crucial y sin embargo lo consideramos extremadamente difícil de responder. Si bien hay registros de trabajos que evalúan el efecto de diversos compuestos sobre la interacción estudiada (alcaloides, strigolactonas, flavonoides, volátiles, entre otros), ninguno es concluyente y podría ser imposible integrar todas estas vías experimentalmente.

Otro interrogante serían evaluar si además de un efecto de los exudados en la promoción del desarrollo hifal hay un efecto de atracción en forma directa hacia las raíces y si diferentes especies de micorrizas se asocian diferencialmente a plantas E+ o E-.

Además, nos interesa dilucidar la respuesta neta de esta interacción múltiple incluyendo en el sistema un patógeno. Se sabe que *B. auleticus* asociado a *Epichloë* inhibe significativamente la infección y el desarrollo de la enfermedad producida por *Ustilago bullata* (Vignale et al. 2013), sin embargo no tenemos ningún registro introduciendo en este contexto a los HMA.

CONCLUSIONES GENERALES

- Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de una asociación positiva entre endofitos *Epichloë* y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) en gramíneas nativas. La metodología implementada, así como las diferentes escalas de aproximación robustecen las evidencias obtenidas, destacando la importancia de este modelo para el mejoramiento de pasturas.

- La fertilización del suelo no afecta la colonización de plantas de *B. auleticus* por HMA, al menos en los niveles utilizados, pero sí ejerce un incremento en la biomasa y otros caracteres de interés agronómico en dicha especie.

- La edad de las plantas de *Bromus auleticus* afecta el nivel de micorrización.

- Los exudados obtenidos de la gramínea nativa *Bromus auleticus* en asociación con *Epichloë tembladerae* aumentan la colonización de HMA en raíces transformadas de *Daucus carota* mientras que los exudados de gramíneas seleccionadas agronómicamente disminuyen el desarrollo de HMA *in vitro.*

- Los exudados del endofito *Epichloë tembladerae,* aislado de *Bromus auleticus,* afectan positivamente la fase extramatrical y la esporulación de los HMA y proponemos que este efecto es dependiente de la concentración del exudado dado que a altas concentraciones resultaron inhibitorios. La incorporación de estos exudados en macetas presentó un efecto diferencial sobre el desarrollo vegetativo de las plantas cultivadas dado que sólo se observó un incremento de este parámetro en las plantas E+M+ de *B. auleticus*.

- Los exudados del endofito *E. coenophiala* aislado de *Schedonorus arundinaceus* (gramínea seleccionada agronómicamente) disminuyen el desarrollo de HMA *in vitro.*

- No se observó un efecto diferencial en la concentración de proteínas del suelo relacionadas con la glomalina (PSRG) ni por presencia del endofito ni por el riego con exudados de *E. tembladerae*.

- Las propiedades químicas del suelo son modificadas por la presencia de micorrizas y de exudados de endofitos *Epichloë.*

- La gramínea nativa *Bromus auleticus* asociada a *Epichloë* tuvo un efecto positivo sobre la micorrización de sus vecinas, las gramíneas *Lolium multiflorum*, *Schedonorus arundinaceus* y *Bromus catharticus.*

- La vecindad con *Bromus auleticus* E+ no influyó en la producción de biomasa en comparación con las plantas en vecindad con *Bromus auleticus* E- y sin endofito.

REFERENCIAS

Abbott L, Robson A (1979) A quantitative study of the spores and anatomy of mycorrhizas formed by a species of *Glomus*, with reference to its taxonomy. Aust J Bot 27:363-375

Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hocher V (2012) The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. Plant signal behav 7:636-641

Afkhami ME, Rudgers JA (2008) Symbiosis lost: imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. Am Nat 172:405-416

Akiyama K, Matsuzaki K-i, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature 435:824-827

Allen MF (2001) Modeling arbuscular mycorrhizal infection: is % infection an appropriate variable? Mycorrhiza 10:255-258

Amijee F, Stribley DP, Lane PW (2006) The susceptibility of roots to infection by an arbuscular mycorrhizal fungus in relation to age and phosphorus supply. New Phytol 125:581-586

Antunes PM, Miller J, Carvalho LM, Klironomos JN, Newman JA (2008) Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. Funct Ecol 22:912-918

Arrieta A, Iannone LJ, Scervino J, Vignale M, Novas M (2015) A foliar endophyte increases the diversity of phosphorus-solubilizing rhizospheric fungi and mycorrhizal colonization in the wild grass *Bromus auleticus*. Fungal Ecol 17:146-154

Asao T, Hasegawa K, Sueda Y, Tomita K, Taniguchi K, Hosoki T, Pramanik M, Matsui Y (2003) Autotoxicity of root exudates from taro. Sci hortic 97:389-396

Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza 11:3-42

Ayala W, Bemhaja M, Cotro B, Do Canto J, García J, Olmos F, Real D, Rebuffo M, Reyno R, Rossi C (2010) Forrajeras; catálogo de cultivares 2010. Montevideo, INIA

Bacetty A, Snook M, Glenn A, Noe J, Hill N, Culbreath A, Timper P, Nagabhyru P, Bacon C (2009) Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. Phytopathology 99:1336-1345

Bacon CW, Porter, J.K., Robbins, J.D., Luttrell, E.S (1977) *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. Appl Environ Microbiol 34:576-581

Badri DV, Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. Plant Cell Environ 32:666-681

Badri DV, Chaparro JM, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM (2013) Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that

phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. J Biol Chem 288:4502-4512

Bago B (2000) Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 226:263-274

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol 57:233-266

Balzergue C, Puech-Pagès V, Bécard G, Rochange SF (2011) The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. J Exp Bot 62:1049-1060

Bécard G, Fortin J (1988) Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol 108:211-218

Bécard G, Piché Y (1989) Fungal growth stimulation by CO_2 and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Appl Environ Microbiol 55:2320-2325

Bécard G, Piche Y (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. Techniques for the study of mycorrhiza:89-108

Bernard E, Gwinn K, Pless C, Williver C (1997) Soil invertebrate species diversity and abundance in endophyte-infected tall fescue pastures. *Neotyphodium*/Grass interactions.

Blanke V, Renker C, Wagner M, Füllner K, Held M, Kuhn AJ, Buscot F (2005) Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. New Phytol 166:981-992

Bonfante P, Perotto S (1995) Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytol 130:3-21

Bonkowski M, Roy J (2005) Soil microbial diversity and soil functioning affect competition among grasses in experimental microcosms. Oecologia 143:232-240

Borowicz VA (2001) Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations? Ecol 82:3057-3068

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM (2008) Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. Appl Environ Microbiol 74:738-744

Bronstein JL (1994) Conditional outcomes in mutualistic interactions. Trends Ecol Evol 9:214-217

Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytol 154:275-304

Burkart AE (1969) Flora ilustrada de entre ríos (Argentina).

Bustamante E, Ruiz M, Morici E, Babinec FJ, Pordomingo AB (2012) Biomasa acumulada e indicadores de calidad nutritiva en cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trinius ex Nees). RIA Revista de investigaciones agropecuarias 38:251-256

Buyer JS, Zuberer DA, Nichols KA, Franzluebbers AJ (2011) Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. Plant Soil 339:401-412

Cabral D, Cafaro MJ, Saidman B, Lugo M, Reddy PV, White Jr JF (1999) Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. Mycologia 91:315-325

Carvalhais LC, Dennis PG, Badri DV, Tyson GW, Vivanco JM, Schenk PM (2013) Activation of the jasmonic acid plant defence pathway alters the composition of rhizosphere bacterial communities. PLoS One 8:e56457

Casas C, Omacini M, Montecchia MS, Correa OS (2011) Soil microbial community responses to the fungal endophyte *Neotyphodium* in Italian ryegrass. Plant Soil 340:347-355

Clark E, White J, Patterson R (1983) Improved histochemical techniques for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue and methods of *in vitro* culture of the fungus. J Microbiol Methods 1:149-155

Clarke BB, White Jr JF, Hurley RH, Torres MS, Sun S, Huff DR (2006) Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. Plant Dis 90:994-998

Clay K (1988) Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. Ecol 69:10-16

Clay K (1989) Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. Mycol Res 92:1-12

Clay K (1990) Fungal endophytes of grasses. Annu Rev Ecol Syst 21:275-297

Clay K, Marks S, Cheplick GP (1993) Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. Ecol 74:1767-1777

Clay K, Holah J (1999) Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. Science 285:1742-1744

Clay K, Schardl C (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. Am Nat 160:99-127

Colpas FT, Ono EO, Rodrigues JD, Passos JRdS (2003) Effects of some phenolic compounds on soybean seed germination and on seed-borne fungi. Braz Arch Biol Technol 46:155-161

Cranenbrouck S, Voets L, Bivort C, Renard L, Strullu D-G, Declerck S (2005) Methodologies for *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. In: *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer, pp 341-375

Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM (2013a) Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. PloS one 8:e55731

Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM (2013b) Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. ISME J 8:790-803

Cheplick GP, Faeth S (2009) Ecology and evolution of the grass-endophyte symbiosis. Oxford university press, Oxford

Cheplick GP, Harrichandra AP, Liu A (2014) Competitive outcomes depend on host genotype, but not clavicipitaceous fungal endophytes, in *Lolium perenne* (Poaceae). Am J Bot 101:2068-2078

Christensen MJ, Bennett RJ, Ansari HA, Koga H, Johnson RD, Bryan GT, Simpson WR, Koolaard JP, Nickless EM, Voisey CR (2008) Epichloë endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. Fungal Genet Biol 45:84-93

Chu-Chou M, Guo B, An ZQ, Hendrix J, Ferriss R, Siegel M, Dougherty C, Burrus P (1992) Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the *Acremonium coenophialum* endophyte. Soil Biology and Biochemistry 24:633-637

Dai J, Hu J, Lin X, Yang A, Wang R, Zhang J, Wong MH (2013) Arbuscular mycorrhizal fungal diversity, external mycelium length, and glomalin-related soil protein content in response to long-term fertilizer management. J Soils Sediment 13:1-11

Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C (2011) InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Di Rienzo JA, Guzmán AW, Casanoves F (2002) A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. J Agr Biol Environ Statistics 7:129-142

Diop T, Bécard G, Piché Y (1992) Long-term *in vitro* culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrot. Symbiosis 12:249-259

Dirihan S, Helander M, Saloniemi I, Gundel P, Saikkonen K (2015) Effects of systemic fungal endophytes on the performance of meadow fescue and tall fescue in mixtures with red clover. Grass Forage Sci 70:465-473

Doornbos RF, van Loon LC, Bakker PA (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. Agronomy for Sustainable Development 32:227-243

Douds Jr DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Carbon partitioning, cost, and metabolism of arbuscular mycorrhizas. In: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Springer, pp 107-129

Driver JD, Holben WE, Rillig MC (2005) Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biol Biochem 37:101-106

Dupont PY, Eaton CJ, Wargent JJ, Fechtner S, Solomon P, Schmid J, Day RC, Scott B, Cox MP (2015) Fungal endophyte infection of ryegrass reprograms host metabolism and alters development. New Phytol 208:1227-1240

Eaton CJ, Cox MP, Scott B (2011) What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? Plant science 180:190-195

Eaton CJ, Dupont P-Y, Solomon P, Clayton W, Scott B, Cox MP (2015) A core gene set describes the molecular basis of mutualism and antagonism in *Epichloë* spp. Mol Plant-Microbe Interact 28:218-231

Faeth SH, Helander ML, Saikkonen KT (2004) Asexual *Neotyphodium* endophytes in a native grass reduce competitive abilities. Ecol Lett 7:304-313

Feddermann N, Finlay R, Boller T, Elfstrand M (2010) Functional diversity in arbuscular mycorrhiza–the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. Fungal Ecol 3:1-8

Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H (2012) Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 109:2666-2671

Fernández Suárez K (2012) Los sistemas de cultivo in vitro aplicados al estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Cultivos Tropicales 33:33-43

Finkes LK, Cady AB, Mulroy JC, Clay K, Rudgers JA (2006) Plant–fungus mutualism affects spider composition in successional fields. Ecol Lett 9:347-356

Finlay RD (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. J Exp Bot 59:1115-1126

Fokom R, Adamou S, Teugwa M, Boyogueno AB, Nana W, Ngonkeu M, Tchameni N, Nwaga D, Ndzomo GT, Zollo PA (2012) Glomalin related soil protein, carbon, nitrogen and soil aggregate stability as affected by land use variation in the humid forest zone of south Cameroon. Soil Tillage Res 120:69-75

Fortin JA, Bécard G, Declerck S, Dalpé Y, St-Arnaud M, Coughlan AP, Piché Y (2002) Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. Can J Bot 80:1-20

Fracchia S, Sampedro I, Scervino J, Garcia-Romera I, Ocampo J, Godeas A (2004) Influence of saprobe fungi and their exudates on arbuscular mycorrhizal symbioses. Symbiosis 36:169-182

Frank B (1885) Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernahrung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. Ber dt Bot Ges 3:128-145

Franzluebbers AJ, Hill NS (2005) Soil carbon, nitrogen, and ergot alkaloids with short- and long-term exposure to endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. Soil Sci Soc Am J 69:404-412

Gadkar V, Rillig MC (2006) The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. FEMS Microbiol Lett 263:93-101

Galvagno MA (1976) Ensayos de nutricion en *Ascobolus crenulatus* P. Karst. (Fungi: Ascomycetes). Boletin de la Sociedad Argentina de Botanica 17.

Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD (2003) Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. Mol Plant-Microbe Interact 16:827-834

García-Garrido J, Lendzemo V, Castellanos-Morales V, Steinkellner S, Vierheilig H (2009) Strigolactones, signals for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 19:449-459

García Parisi P, Grimoldi A, Omacini M (2014) Endophytic fungi of grasses protect other plants from aphid herbivory. Fungal Ecol 9:61-64

Garmendia I, Mangas V (2012) Application of arbuscular mycorrhizal fungi on the production of cut flower roses under commercial-like conditions. Spanish Journal of Agricultural Research 10:166-174

Gasser M, Ramos J, Vegetti A, Tivano JC (2005) Digestión de láminas foliares de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees sometidas a diferentes tiempos de incubación ruminal. Agricultura Técnica 65:48-54

Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. Plant Cell 20:1407-1420

Gentile A, Rossi MS, Cabral D, Craven KD, Schardl CL (2005) Origin, divergence, and phylogeny of epichloë endophytes of native Argentine grasses. Mol Phylogenet Evol 35:196-208

Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi A, Logi C (1993) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. New Phytol 125:587-593

Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. New Phytol 151:717-724

Gundel PE, Batista WB, Texeira M, Martínez-Ghersa MA, Omacini M, Ghersa CM (2008) Neotyphodium endophyte infection frequency in annual grass populations: Relative importance of mutualism and transmission efficiency. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 275:897-905

Gundel PE, Garibaldi LA, Tognetti PM, Aragon R, Ghersa CM, Omacini M (2009) Imperfect vertical transmission of the endophyte Neotyphodium in exotic grasses in grasslands of the flooding pampa. Microb Ecol 57:740-748.

Gundel PE, Iannone L, Perez LI, Irisarri JGN Variacion poblacional del pasto perenne *Hordeum comosum* como anfitrion de endofitos *Neotyphodium* en estepas patagonicas. In: IV Reunion Binacional de Ecologia, , XXIV Reunion Argentina de Ecologia, 2010a.

Gundel PE, Martínez-Ghersa MA, Batista WB, Ghersa CM (2010b) Dynamics of *Neotyphodium* endophyte infection in ageing seed pools: Incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non-infected seed. Ann Appl Biol 156:199-209

Gundel PE, Hamilton CE, Seal CE, Helander M, Martínez-Ghersa MA, Ghersa CM, Vázquez de Aldana BR, Zabalgogeazcoa I, Saikkonen K (2012) Antioxidants in *Festuca rubra* L. seeds affected by the fungal symbiont *Epichloë festucae*. Symbiosis 58:73-80

Guo B, Hendrix J, An ZQ, Ferriss R (1992) Role of *Acremonium* endophyte of fescue on inhibition of colonization and reproduction of mycorrhizal fungi. Mycologia 84:882-885

Guo J, McCulley RL, McNear Jr DH (2015) Tall fescue cultivar and fungal endophyte combinations influence plant growth and root exudate composition. Front Plant Science 6:1-13

Gutiérrez HF, Pensiero JF (1998) Sinopsis de las especies Argentinas del género *Bromus* (Poaceae). Darwiniana 35:75-114

Halvorson JJ, Gonzalez JM (2006) Bradford reactive soil protein in Appalachian soils: distribution and response to incubation, extraction reagent and tannins. Plant Soil 286:339-356

Hamilton CE, Gundel PE, Helander M, Saikkonen K (2012) Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. Fungal Divers 54:1-10

Handayani IP, Coyne MS, Phillips TD (2011) Soil organic carbon fractions differ in two contrasting tall fescue systems. Plant Soil 338:43-50

Harris D, Pacovsky R, Paul E (1985) Carbon economy of soybean–*Rhizobium*–*Glomus* associations. New Phytol 101:427-440

Hassan SE, Hijri M, St-Arnaud M (2013) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. New biotech 30:780-787

Helander M, Phillips T, Faeth S, Bush L, McCulley R, Saloniemi I, Saikkonen K (2016) Alkaloid Quantities in Endophyte-Infected Tall Fescue are Affected by the Plant-Fungus Combination and Environment. J Chem Ecol:1-9

Hernández MI (2013) Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosfericas como alternativa a la nutricion mineral del tomate. Cultivos Tropicales 25:5-12

Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC (2010) A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. Ecol Lett 13:394-407

Hosseini F, Mosaddeghi M, Hajabbasi M, Sabzalian M (2014) Aboveground fungal endophyte infection in tall fescue alters rhizosphere chemical, biological, and hydraulic properties in texture-dependent ways. Plant Soil:1-16

Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM (2014) Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities 1. Botany 92:267-275

Iannone L, Irisarri J, Mc Cargo P, Pérez L, Gundel P (2015) Occurrence of Epichloë fungal endophytes in the sheep-preferred grass Hordeum comosum from Patagonia. J Arid Environ 115:19-26

Iannone LJ, Cabral D (2006) Effects of the *Neotyphodium* endophyte status on plant performance of *Bromus auleticus*, a wild native grass from South America. Symbiosis 41:61-69

Iannone LJ, Cabral D, Schardl CL, Rossi MS (2009) Phylogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium* endophyte species in the grass *Bromus auleticus* from South America. Mycologia 101:340-351

Iannone LJ, White Jr JF, Giussani LM, Cabral D, Novas MV (2011) Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. Mycol Prog 10:9-19

Iannone LJ, Mc Cargo PD, Giussani LM, Schardl CL (2012a) Geographic distribution patterns of vertically transmitted endophytes in two native grasses in Argentina. Symbiosis:1-12

Iannone LJ, Novas MV, Young CA, De Battista JP, Schardl CL (2012b) Endophytes of native grasses from South America: Biodiversity and ecology. Fungal Ecol 5:357-363.

Iannone LJ, Pinget AD, Nagabhyru P, Schardl CL, De Battista JP (2012c) Beneficial effects of *Neotyphodium tembladerae* and *Neotyphodium pampeanum* on a wild forage grass. Grass Forage Sci 67:382-390

Iqbal J, Siegrist JA, Nelson JA, McCulley RL (2012) Fungal endophyte infection increases carbon sequestration potential of southeastern USA tall fescue stands. Soil Biology and Biochemistry 44:81-92

Javot H, Pumplin N, Harrison MJ (2007) Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. Plant Cell Environ 30:310-322

Jia Y, Gray VM, Straker CJ (2004) The influence of Rhizobium and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by Vicia faba. Annals of botany 94:251-258

Johnson NC (1993) Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? Bull Ecol Soc Am 3:749-757

Johnson NC, Rowland DL, Corkidi L, Egerton-Warburton LM, Allen EB (2003) Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. Ecology 84:1895-1908

Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytol 163:459-480

Kalinova J, Vrchotova N, Triska J (2007) Exudation of allelopathic substances in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). J Agric Food Chem 55:6453-6459

Keenan M, Rudgers JA (2008) Balancing multiple mutualists: asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. Oikos 117:310-320

Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. Science 333:880-882

Kosuta S, Chabaud M, Lougnon G, Gough C, Dénarié J, Barker DG, Bécard G (2003) A Diffusible Factor from Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induces Symbiosis-Specific MtENOD11 Expression in Roots of *Medicago truncatula*. Plant Physiol 131:952-962

Koulman A, Lane GA, Christensen MJ, Fraser K, Tapper BA (2007) Peramine and other fungal alkaloids are exuded in the guttation fluid of endophyte-infected grasses. Phytochem 68:355-360

Kuldau G, Bacon C (2008) Clavicipitaceous endophytes: their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. Biol Control 46:57-71

Kuldau GA, Tsai H-F, Schardl CL (1999) Genome sizes of *Epichloë* species and anamorphic hybrids. Mycologia 91:776-782

Lambais M, Cardoso E (1990) Response of *Stylosanthes guianensis* to endomycorrhizal fungi inoculation as affected by lime and phosphorus applications. Plant Soil 129:283-289

Larimer AL, Bever JD, Clay K (2012) Consequences of simultaneous interactions of fungal endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi with a shared host grass. Oikos 121:2090-2096

Latch GCM (1993) Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. Agr Ecosyst Environ 44:143-156

Lemons A, Clay K, Rudgers JA (2005) Connecting plant–microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. Oecologia 145:595-604

Lenoir I, Fontaine J, Sahraoui AL-H (2016) Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. Phytochem 123:4-15

Leuchtmann A, Bacon CW, Schardl CL, White JF, Tadych M (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. Mycologia 106:202-215

Lewandowski TJ, Dunfield KE, Antunes PM (2013) Isolate identity determines plant tolerance to pathogen attack in assembled mycorrhizal communities. PloS one 8:e61329

Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. Plant J 50:529-544

Liu Q, Parsons AJ, Xue H, Fraser K, Ryan GD, Newman JA, Rasmussen S (2011) Competition between foliar *Neotyphodium lolii* endophytes and mycorrhizal *Glomus* spp. fungi in *Lolium perenne* depends on resource supply and host carbohydrate content. Funct Ecol 25:910-920

López-Merino L, Serrano O, Adame MF, Mateo MÁ, Cortizas AM (2015) Glomalin accumulated in seagrass sediments reveals past alterations in soil quality due to land-use change. Glob Planet Change 133:87-95

López-Ráez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard G, Mulder P (2008) Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. New Phytol 178:863-874

Luo H, Xie L, Zeng J, Xie J (2015) Biosynthesis and regulation of bioprotective alkaloids in the gramineae endophytic fungi with implications for herbivores deterrents. Curr Microbiol 71:719-724

Ma M, Christensen MJ, Nan Z (2014) Effects of the endophyte *Epichloë festucae* var. *lolii* of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on indicators of oxidative stress from pathogenic fungi during seed germination and seedling growth. Eur J Plant Pathol 141:571-583

Mack KML, Rudgers JA (2008) Balancing multiple mutualists: Asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. Oikos 117:310-320

Maillet F, Poinsot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. Nature 469:58-63

Malinowski DP, Alloush GA, Belesky DP (1998) Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. Plant Soil 205:1-12

Malinowski DP, Belesky DP (2000) Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. Crop Sci 40:923-940

Malinowski DP, Belesky DP (2006) Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. Grassl Sci 52:1-14

Marsh B (1971) Measurement of length in random arrangements of lines. J Appl Ecol:265-267

Marulanda A, Azcon R, Ruiz Lozano JM (2003) Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. Physiol Plant 119:526-533

Matsukura K, Shiba T, Sasaki T, Yoshida K, Matsumura M (2014) Dynamics of *Neotyphodium uncinatum* and N-formylloline in Italian ryegrass, and their relation to insect resistance in the field. J Appl Microbiol 116:400-407

Mc Cargo PD, Iannone LJ, Vignale MV, Schardl CL, Rossi MS (2014) Species diversity of *Epichloe* symbiotic with two grasses from southern Argentinean Patagonia. Mycologia 106:339-352

Mc Cargo PD (2015) Evolución y diversidad de endofitos *Epichloë* de la forrajera nativa *Bromus auleticus*. Tesis Doctoral

McGonigle T, Miller M, Evans D, Fairchild G, Swan J (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 115:495-501

McNear Jr D, McCulley RL (2012) Influence of the *Neotyphodium*-Tall Fescue symbiosis on belowground processes. In: Epichloae, Endophytes of Cool Season Grasses; Implications, Utilization and Biology. pp 94-99

Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, Schneider JH, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PA (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. Science 332:1097-1100

Mercado-Blanco J, Bakker PA (2007) Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. Antonie Leeuwenhoek 92:367-389

Miller TE, Travis J (1996) The evolutionary role of indirect effects in communities. Ecology 77:1329-1335

Millot JC (1999) *Bromus auleticus* Trinius. Otra gramínea forrajera perenne invernal. Revista Oficial del Instituto Nacional de Semillas 2:25

Millot JC (2001) *Bromus auleticus*: una nueva especie domesticada. Documento de recursos fitogenéticos PROCISUR, Diálogo LVI, Montevideo:3-6

Miranda JD, Harris P, Wild A (1989) Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. New Phytol 112:405-410

Miranda JD, Harris P (2006) Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 128:103-108

Mombelli JC, Spada MdC (1996) Adaptación del pastoreo de gramíneas templadas perennes. Gac Agr 15

Moon CD, Craven K, Leuchtmann A, Clement S, Schardl C (2004) Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. Mol Ecol 13:1455-1467

Moraes C, Oliveira J (1990) Avaliação agronômica preliminar de genótipos de *Bromus auleticus* Trinius. EMBRAPA-CNPO

Mosse B (1962) The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. J Gen Microbiol 27:509-520

Moy M, Li HM, Sullivan R, White JF, Belanger FC (2002) Endophytic fungal β-1, 6-glucanase expression in the infected host grass. Plant physiol 130:1298-1308

Müller J (2003) Artificial infection by endophytes affects growth and mycorrhizal colonisation of *Lolium perenne*. Funct Plant Biol 30:419-424

Nagy R, Drissner D, Amrhein N, Jakobsen I, Bucher M (2009) Mycorrhizal phosphate uptake pathway in tomato is phosphorus-repressible and transcriptionally regulated. New Phytol 181:950-959

Nogueira MA, Cardoso EJBN (2003) Mycorrhizal effectiveness and manganese toxicity in soybean as affected by soil type and endophyte. Sci Agricola 60:329-335

Novas MV, Gentile A, Cabral D (2003) Comparative study of growth parameters on diaspores and seedlings between populations of *Bromus setifolius* from Patagonia, differing in *Neotyphodium* endophyte infection. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 198:421-426

Novas MV, Cabral D, Godeas AM (2005) Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. Symbiosis 40:23-30

Novas MV, Collantes M, Cabral D (2007) Environmental effects on grass endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. FEMS Microbiol Ecol 61:164-173

Novas MV, Iannone LJ, Godeas AM, Cabral D (2009) Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. Mycol Prog 8:75-81

Novas MV, Iannone LJ, Godeas AM, Scervino JM (2011) Evidence for leaf endophyte regulation of root symbionts: effect of *Neotyphodium* endophytes on the pre-infective state of mycorrhizal fungi. Symbiosis 55:19-28

Oberhofer M, Güsewell S, Leuchtmann A (2013) Effects of natural hybrid and non-hybrid *Epichloë* endophytes on the response of *Hordelymus europaeus* to drought stress. New Phytol 201:242-253

Oberhofer M, Leuchtmann A (2014) Horizontal transmission, persistence and competition capabilities of *Epichloë* endophytes in *Hordelymus europaeus* grass hosts using dual endophyte inocula. Fungal Ecol 11:37-49

Olmos F (1993) *Bromus auleticus*. INIA Serie Tecnica (Uruguay)

Omacini M, Chaneton EJ, Ghersa CM, Müller CB (2001) Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. Nature 409:78-81

Omacini M, Chaneton EJ, Ghersa CM, Otero P (2004) Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. Oikos 104:581-590

Omacini M, Eggers T, Bonkowski M, Gange AC, Jones TH (2006) Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. Funct Ecol 20:226-232

Omacini M, Semmartin M, Pérez LI, Gundel PE (2012) Grass-endophyte symbiosis: A neglected aboveground interaction with multiple belowground consequences. Appl Soil Ecol 61:273-279

Omacini M (2014) Asexual Endophytes of Grasses: Invisible Symbionts, Visible Imprints in the Host Neighborhood. In: Advances in Endophytic Research. Springer, pp 143-157

Panaccione DG (2005) Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. FEMS Microbiol Lett 251:9-17

Panaccione DG, Beaulieu WT, Cook D (2014) Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. Funct Ecol 28:299-314

Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews Microbiology 6:763-775

Pérez L, Gundel P, Ghersa C, Omacini M (2013) Family issues: fungal endophyte protects host grass from the closely related pathogen *Claviceps purpurea*. Fungal Ecol 6:379-386

Perner H, Schwarz D, Bruns C, Mäder P, George E (2007) Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants. Mycorrhiza 17:469-474

Peterson RL, Massicotte HB, Melville LH (2004) Mycorrhizas: anatomy and cell biology. CABI

Philipson MN, Christey MC (1986) The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*. N Z J Bot 91:315-325

Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. T Brit Mycol Soc 55:158-161

Pieterse CM, Dicke M (2007) Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. Trends Plant Sci 12:564-569

Pineda A, Dicke M, Pieterse CM, Pozo MJ (2013) Beneficial microbes in a changing environment: are they always helping plants to deal with insects? Funct Ecol 27:574-586

Ponce MA, Scervino JM, Erra-Balsells R, Ocampo JA, Godeas AM (2004) Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Phytochem 65:1925-1930

Ponce MA, Bompadre MJ, Scervino JM, Ocampo JA, Chaneton EJ, Godeas AM (2009) Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus. Biochem Syst Ecol 37:245-253

Popay AJ, White Jr J, Torres M (2009) Insect herbivory and defensive mutualisms between plants and fungi. Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis CRC Press, Boca Raton, FL, USA:347-358

Pozo MJ, Jung SC, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C (2010) Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defence mechanisms. In: Arbuscular Mycorrhizas: Physiol Funct. pp 193-207

Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil 321:341-361

Ragonese E (1985) Forrajeras nativas. El desarrollo de las forrajeras en la Región

Rasmussen S, Liu Q, Parsons AJ, Xue H, Sinclair B, Newman JA (2012) Grass–endophyte interactions: a note on the role of monosaccharide transport in the *Neotyphodium lolii–Lolium perenne* symbiosis. New Phytol 196:7-12

Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuninger M (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. Phytochem 68:33-40

Reyna DL, Wall LG (2013) Revision of two colorimetric methods to quantify glomalin-related compounds in soils subjected to different managements. Biol Fertil Soils 50:395-400

Rillig MC, Wright SF, Shaw MR, Field CB (2002) Artificial climate warming positively affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. Oikos 97:52-58

Rillig MC, Ramsey PW, Morris S, Paul EA (2003) Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. Plant Soil 253:293-299

Rillig MC (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Can J Soil Sci 84:355-363

Rillig MC, Aguilar-Trigueros CA, Bergmann J, Verbruggen E, Veresoglou SD, Lehmann A (2015) Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. New Phytol 205:1385-1388

Rodriguez R, Redman R (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. J Exp Bot 59:1109-1114

Rozpądek P, Wężowicz K, Nosek M, Ważny R, Tokarz K, Lembicz M, Miszalski Z, Turnau K (2015) The fungal endophyte *Epichloë typhina* improves photosynthesis efficiency of its host orchard grass (*Dactylis glomerata*). Planta 242:1025-1035

Rudgers JA, Holah J, Orr SP, Clay K (2007) Forest succession suppressed by an introduced plant-fungal symbiosis. Ecol 88:18-25

Rudgers JA, Afkhami ME, Rúa MA, Davitt AJ, Hammer S, Huguet VM (2009) A fungus among us: broad patterns of endophyte distribution in the grasses. Ecol 90:1531-1539

Rudgers JA, Fischer S, Clay K (2010) Managing plant symbiosis: Fungal endophyte genotype alters plant community composition. J Appl Ecol 47:468-477

Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. Plant Physiol 148:1547-1556

Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Aroca R (2006) Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? New Phytol 171:693-698

Ruiz MdlA, Covas GF (2004) Producción de semilla de *Bromus auleticus* Trin. ex Ness. Momento de fertilización y distanciamiento entre hileras. RIA 33

Saari S, Sundell J, Huitu O, Helander M, Ketoja E, Ylönen H, Saikkonen K (2010) Fungal-mediated multitrophic interactions--do grass endophytes in diet protect voles from predators? PloS one 5:e9845

Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan T (1998) Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annu Rev Ecol Syst:319-343

Saikkonen K (2000) Kentucky 31, far from home. Science 287:1887-1887

Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH (2004) Evolution of endophyte–plant symbioses. Trends Plant Sci 9:275-280

Saikkonen K, Lehtonen P, Helander M, Koricheva J, Faeth SH (2006) Model systems in ecology: dissecting the endophyte–grass literature. Trends Plant Sci 11:428-433

Saikkonen K, Wäli PR, Helander M (2010) Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. PloS one 5

Saikkonen K, Gundel PE, Helander M (2013a) Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. J Chem Ecol 39:962-968

Saikkonen K, Ruokolainen K, Huitu O, Gundel PE, Piltti T, Hamilton CE, Helander M (2013b) Fungal endophytes help prevent weed invasions. Agr Ecosyst Environ 165:1-5

Saikkonen K, Young CA, Helander M, Schardl CL (2015) Endophytic *Epichloë* species and their grass hosts: from evolution to applications. Plant Mol Biol:1-11. doi:10.1007/s11103-015-0399-6

Scagel C (2003) Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi alters nutrient allocation and flowering of Freesia x hybrida. J Environ Hortic 21:196-205

Scervino JM, Sampedro I, Ponce MA, Rodriguez MA, Ocampo JA, Godeas A (2008) Rhodotorulic acid enhances root colonization of tomato plants by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi due to its stimulatory effect on the pre-symbiotic stages of the AM fungi. Soil Biology Biochem 40:2474-2476

Scervino JM, Gottlieb A, Silvani VA, Pérgola M, Fernández L, Godeas AM (2009) Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. Soil Biology Biochem 41:1753-1756

Schardl CL, Phillips TD (1997) Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? Plant Dis 81:430-438

Schardl CL, Leuchtmann A, Spiering MJ (2004) Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. Annu Rev Plant Biol 55:315-340

Schardl CL, Grossman RB, Nagabhyru P, Faulkner JR, Mallik UP (2007) Loline alkaloids: Currencies of mutualism. Phytochemistry 68:980-996.

Schardl CL, Young CA, Faulkner JR, Florea S, Pan J (2012) Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. Fungal Ecol 5:331-344

Schardl CL, Young CA, Pan J, Florea S, Takach JE, Panaccione DG, Farman ML, Webb JS, Jaromczyk J, Charlton ND (2013) Currencies of mutualisms: sources of alkaloid genes in vertically transmitted epichloae. Toxins 5:1064-1088

Schubert A, Hayman D (1986) Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. New Phytol 103:79-90

Schubler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol Res 105:1413-1421

Sheng M, Tang M, Chen H, Yang B, Zhang F, Huang Y (2008) Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza 18:287-296

Siegel MR, Bush LP (1996) Defensive chemicals in grass-fungal endophyte associations. In: Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions. Springer, pp 81-119

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. New Phytol 162:511-524

Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press

Smith SE, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. Annu Rev Plant Biol 62:227-250

Soleimani M, Hajabbasi MA, Afyuni M, Mirlohi A, Borggaard OK, Holm PE (2010) Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. Int J Phytorem 12:535-549

Song M, Li X, Saikkonen K, Li C, Nan Z (2015) An asexual *Epichloë* endophyte enhances waterlogging tolerance of *Hordeum brevisubulatum*. Fungal Ecol 13:44-52

St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin J (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. Mycol Res 100:328-332

Stachowicz JJ (2001) Mutualism, Facilitation, and the Structure of Ecological Communities Positive interactions play a critical, but underappreciated, role in ecological communities by reducing physical or biotic stresses in existing habitats and by creating new habitats on which many species depend. Bioscience 51:235-246

Stanton ML (2003) Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. Am Nat 162:S10-S23

Sylvia D, Neal L (1990) Nitrogen affects the phosphorus response of VA mycorrhiza. New Phytol 115:303-310

Tadych M, Ambrose KV, Bergen MS, Belanger FC, White Jr JF (2012) Taxonomic placement of *Epichloë poae* sp. nov. and horizontal dissemination to seedlings via conidia. Fungal Divers 54:117-131

Takai T, Sanada Y, Yamada T (2010) Influence of the fungal endophyte *Neotyphodium uncinatum* on the persistency and competitive ability of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.). Grassl Sci 56:59-64

Tian P, Nan Z, Li C, Spangenberg G (2008) Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. Eur J Plant Pathol 122:593-602

Traverso JE (2001) Colecta, conservación y utilización de los recursos genéticos de interés forrajero nativo y naturalizado. *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (cebadilla chaqueña). Diálogo LVI Los recursos fitogenéticos del género *Bromus* en el cono sur:7-18

Treseder KK (2004) A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO_2 in field studies. New Phytol 164:347-355

Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un systeme radiculaire. Recherche de methodes d'estimation ayant une significantion fonctionnelle. Physiological and genetical aspects of mycorrhizae Proceedings of the 1st European symposium on mycorrhizae:217-221

Vale M, Nguyen C, Dambrine E, Dupouey J (2005) Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. Soil Biol Biochem 37:2329-2333

van der Heijden MG, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396:69-72

van der Heijden MG, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. New Phytol 205:1406-1423

Vandegrift R, Roy BA, Pfeifer-Meister L, Johnson BR, Bridgham SD (2015) The herbaceous landlord: integrating the effects of symbiont consortia within a single host. PeerJ 3:e1379

Vázquez-de-Aldana BR, Zabalgogeazcoa I, García-Criado B (2013) An *Epichloë* endophyte affects the competitive ability of *Festuca rubra* against other grassland species. Plant Soil 362:201-213

Vierheilig H, Lerat S, Piché Y (2003) Systemic inhibition of arbuscular mycorrhiza development by root exudates of cucumber plants colonized by *Glomus mosseae*. Mycorrhiza 13:167-170

Vignale MV, Astiz-Gassó MM, Novas MV, Iannone LJ (2013) Epichloid endophytes confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus* (Trin.). Biol Control 67:1-7

Wang P, Liu JH, Xia RX, Wu QS, Wang MY, Dong T (2011) Arbuscular mycorrhizal development, glomalin-related soil protein (GRSP) content, and rhizospheric phosphatase activitiy in citrus orchards under different types of soil management. J Plant Nutr Soil Sci 174:65-72

Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Mazukatow J, Rillig MC (2010) Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? Pedobiologia 53:197-201

White JF, Torres MS (2010) Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? Physiol Plant 138:440-446

White Jr J (1987) Widespread distribution of endophytes in the Poaceae. Plant Dis 71:340-342

White Jr JF (1988) Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. Mycologia:442-446

Wilson GW, Rice CW, Rillig MC, Springer A, Hartnett DC (2009) Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. Ecol Lett 12:452-461

Wright S, Franke-Snyder M, Morton J, Upadhyaya A (1996) Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant Soil 181:193-203

Wright S, Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 198:97-107

Wright S, Anderson R (2000) Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. Biol Fertil Soils 31:249-253

Wu L, Ren A, Jing Y, Zhou Y, Wang X, Qin J, Gao Y (2016) Endophytic benefit for a competitive host is neutralized by increasing ratios of infected plants. Acta Oecol 70:112-120

Xia C, Zhang X, Christensen MJ, Nan Z, Li C (2015) *Epichloë* endophyte affects the ability of powdery mildew (*Blumeria graminis*) to colonise drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*). Fungal Ecol 16:26-33

Young CA, Felitti S, Shields K, Spangenberg G, Johnson RD, Bryan GT, Saikia S, Scott B (2006) A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. Fungal Genet Biol 43:679-693

Yue Q, Miller CJ, White Jr JF, Richardson MD (2000) Isolation and Characterization of Fungal Inhibitors from *Epichloë festucae*. J Agric Food Chem 48:4687-4692

Zaurov D, Bonos S, Murphy J, Richardson M, Belanger F (2001) Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. Crop Sci 41:1981-1984

Zhang X, Fan X, Li C, Nan Z (2010) Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a *Neotyphodium* endophyte. Plant Growth Regul 60:91-97

Zhang X, Xia C, Nan Z (2015) Effects of symbiotic *Epichloë gansuensis* endophyte on drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) growth and seed production. N Z J Agric Res 58:234-240

Zhou Y, Li X, Qin J, Liu H, Chen W, Niu Y, Ren A, Gao Y (2016) Effects of simultaneous infections of endophytic fungi and arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of their shared host grass *Achnatherum sibiricum* under varying N and P supply. Fungal Ecol 20:56-65

Zhu Y-G, Miller RM (2003) Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil–plant systems. Trends Plant Sci 8:407-409

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

Agar Papa Glucosado con cloranfenicol (APG_c)

Papa……..300 g
Glucosa……..10 g
Agar……20 g
Cloranfenicol…100 mg
Agua destilada..1000 ml

Glucosa-Asparagina (GA)

Glucosa……..10 g
Asparagina……..4 g
$MgSO_4.7H_2O$……..0,5 g
HK_2PO_4……..0,6 g
H_2KPO_4……..0,5 g
Agua destilada……..1000ml
Solución de micronutrientes A*....2 ml
Solución de micronutrientes B*…2 ml
Tiamina**……100 µl
Biotina**……..50µl

*SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES A (ver guía Micología Experimental – FCEyN-UBA)

*SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES B (ver guía Micología Experimental – FCEyN-UBA)

MEDIO MÍNIMO (Bécard y Fortin, 1988)

$MgSO_4$……731 mg
KNO_3……..80 mg
ClK……..65 mg
KH_2PO_4……..4,8 mg
$Ca(NO_3)_2$……..288 mg
NaFe EDTA……8 mg
KI……..0,75 mg
Cl_2Mn……6 mg
$ZnSO_4$……2,65 mg
H_3BO_3……1,5 mg
$CuSO_4$……0,13 mg
MoO_4Na_2……..0,002 mg
Glicina……..3 mg
Tiamina……0,1 mg
Piridoxina……..0,1 mg
Nicotina……..0,5 mg
Myoinositol……50 mg
Agua destilada..1000 ml

Sacarosa……10 g
Calentar y agitar
Gel Gro……..3,5 g
Ajustar a pH 5,8-6

SOLUCIÓN NUTRITIVA (Ponce et al., 2004)

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$…….0,46 g
$MgSO_4$……....0,04 g
H_2KPO_4……..0,06 g
$Fe_2(SO_4)_3$……..0,00025 g
H_3BO_3……0,0001 g
$ZnSO_4$……0,0001 g

SOLUCIÓN ESTERILIZANTE DE ESPORAS (Mosse, 1962)

Cloramina T……...1 g
Estreptomicina……0,01 g
Tween 80……4 gotas
Agua destilada…….50 ml

TINCIÓN DE RAÍCES COLONIZADAS CON HMA (Phillips y Hayman, 1970)

- Se lavaron las raíces bajo agua para eliminar los restos de fijador.
- Se clarificaron sumergiéndolas en una solución de KOH 10 % y se dejaron por una hora a 90 °C.
- Se enjuagaron con agua de la canilla.
- Las raíces se sumergieron en una solución de HCl 1 % para neutralizar los restos de KOH y se las dejó 3 minutos.
- Fueron sumergidas en una solución de azul de Tripán (0,05 %) al lactofenol por 15 minutos a 90 °C.
- Las raíces fueron sumergidas en lactofenol para eliminar restos de colorante.
- Finalmente fueron guardadas en lactofenol para su posterior observación.

TABLAS ESTADÍSTICAS

➢ CAPÍTULO 1

Micorrización y Arbúsculos

Fuente de variación	GL	Micorrización Valor F	Valor p	Arbúsculos Valor F	Valor p
Ecotipo	1	1,42	0,2528	1,45	0,2484
Fertilización	1	0,05	0,8297	0,05	0,8301
Estatus endofítico	**1**	**57,76**	**<0,0001**	**59,23**	**<0,0001**
Tiempo	**2**	**61,33**	**<0,0001**	**50,52**	**<0,0001**
Bloque	2	1,60	0,2360	1,33	0,2955
Ecotipo x Fertilización	1	3,53	0,0814	3,00	0,1050
Ecotipo x Estatus endofítico	1	1,50	0,2408	1,58	0,2296
Ecotipo x Tiempo	2	2,25	0,1221	1,83	0,1764
Fertilización x Estatus endofítico	1	1,05	0,3230	0,65	0,4325
Fertilización x Tiempo	2	0,53	0,4098	0,16	0,8541
Estatus endofítico x Tiempo	**2**	**3,76**	**0,0343**	**6,18**	**0,0054**
Ecotipo x Fertilización x Estatus endofítico	1	0,72	0,4098	0,75	0,3997
Ecotipo x Fertilización x Tiempo	2	0,32	0,7269	0,69	0,5074
Ecotipo x Estatus endofítico x Tiempo	2	0,21	0,8103	0,40	0,6721
Fertilización x Estatus endofítico x Tiempo	2	0,13	0,8811	0,10	0,9094
Ecotipo x Fertilización x Estatus endofítico x Tiempo	2	0,46	0,6346	0,36	0,6998

Biomasa

Fuente de variación	GL	Valor F	Valor p
Ecotipo	1	0,35	0,6157
Fertilización	**1**	**83,16**	**0,0008**
Endofito	1	0,28	0,6140
Ecotipo x Fertilización	1	1,80	0,2508
Ecotipo x Endofito	**1**	**11,60**	**0,0093**
Fertilización x Endofito	1	1,12	0,3215
Ecotipo x Fertilización x Endofito	1	0,87	0,3787

Producción de semillas

Fuente de variación	GL	LP Valor F	LP Valor p	EP Valor F	EP Valor p
Estatus endofítico	1	0,06	0,8052	0,06	0,8058
Fertilización	1	0,14	0,7204	0,09	0,7727
Estatus endofítico x Fertilización	1	4,35	0,0705	0,65	0,443

➢ CAPÍTULO 2

Exudados de endofitos

E. tembladerae

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamientos	Medias	D.E.	Medianas	H	p
long hifal est	C1	0,12	0,54	0,47	19,11	0,0003
long hifal est	C2	0,46	0,45	0,43		
long hifal est	C3	-0,44	0,59	-0,53		
long hifal est	C4	-0,97	0,03	-0,98		

Trat.	Ranks			
C4	5,63	A		
C3	12,33	A	B	
C1	20,22		B	C
C2	23,43			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamientos	Medias	D.E.	Medianas	H	p
esporas est	C1	-0,23	0,48	-0,38	20,06	0,0001
esporas est	C2	0,77	0,94	0,39		
esporas est	C3	-0,69	0,51	-0,87		
esporas est	C4	-0,99	0,02	-1,00		

Trat.	Ranks			
C4	6,25	A		
C3	11,42	A	B	
C1	18,83		B	C
C2	25,29			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

E. coenophiala

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
long hifal est	C1	-0,31	0,38	-0,31	15,10	0,0016
long hifal est	C2	-0,56	0,35	-0,60		
long hifal est	C3	-0,86	0,02	-0,85		
long hifal est	C4	-1,00	0,00	-1,00		

Trat.	Ranks			
C4	3,00	A		
C3	9,80	A	B	
C2	13,83		B	C
C1	17,67			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
esporas est	C1	-0,64	0,40	-0,68	5,49	0,0455
esporas est	C2	-0,67	0,52	-1,00		
esporas est	C3	-1,00	0,00	-1,00		
esporas est	C4	-1,00	0,00	-1,00		

Trat.	Medias	Ranks	
C4	-1,00	8,00	A
C3	-1,00	8,00	A
C2	-0,67	13,67	A
C1	-0,64	15,17	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Exudados de plantas

Bromus auleticus EP

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamientos	Medias	D.E.	Medianas	H	p
long hifal estandarizado	C1	0,08	0,27	0,03	17,55	0,0015
long hifal estandarizado	C2	0,18	0,34	0,03		
long hifal estandarizado	C3	0,55	0,38	0,47		
long hifal estandarizado	C4	0,97	0,12	0,97		
long hifal estandarizado	C5 (E-)	0,02	0,24	-0,01		

Trat.	Medias	Ranks		
C5	0,02	8,75	A	
C1	0,08	10,50	A	B
C2	0,18	11,58	A	B
C3	0,55	20,33	B	C
C4	0,97	26,33		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamientos	Medias	D.E.	Medianas	H	p
esporas estandarizado	C1	0,94	1,16	0,71	13,45	0,0091
esporas estandarizado	C2	2,15	2,18	1,77		
esporas estandarizado	C3	2,05	1,39	1,63		
esporas estandarizado	C4	4,17	2,60	3,85		
esporas estandarizado	C5 (E-)	0,08	0,90	-0,22		

Trat.	Ranks			
C5	6,58	A		
C1	11,50	A	B	
C2	17,50		B	C
C3	18,25		B	C
C4	23,67			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Lolium multiflorum

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
long hifal est	C1	-0,30	0,10	-0,27	16,38	3,91	0,4172
long hifal est	C2	-0,37	0,19	-0,39	12,80		
long hifal est	C3	-0,46	0,34	-0,39	11,30		
long hifal est	C4	-0,49	0,15	-0,46	8,00		
long hifal est	C5 (E-)	-0,32	0,08	-0,36	14,80		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
esporas	C1	-0,56	0,09	-0,57	10,65	0,0281
esporas	C2	-0,85	0,09	-0,85		
esporas	C3	-0,87	0,12	-0,85		
esporas	C4	-0,92	0,18	-1,00		
esporas	C5 (E-)	-0,81	0,15	-0,90		

Trat.	Medias	Ranks		
C4	-0,92	6,60	A	
C3	-0,87	10,80	A	
C2	-0,85	12,20	A	
C5	-0,81	13,00	A	B
C1	-0,56	21,75		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

➢ CAPÍTULO 3

Parte A

Micorrización

Fuente de variación	GL	Micorrización total		Arbúsculos		Hifas	
		F	p	F	p	F	p
Estatus endofítico	3	**3,92**	**0,0207**	**3,43**	**0,0329**	**3,71**	**0,0253**
Exudados	1	0,66	0,4261	4,23	0,0507	0,0001	0,9905
Estatus endofítico x Exudados	3	1,33	0,2886	3,49	0,0313	0,48	0,6970

Parámetros de crecimiento

Fuente de variación	GL	Pseco v		Pseco raíz		Long. v	
		F	p	F	p	F	p
Estatus endofítico	3	0,91	0,4451	0,50	0,6818	1,65	0,1913
Exudados	1	**10,35**	**0,0023**	**10,70**	**0,020**	0,03	0,8623
Micorriza	1	0,04	0,8395	0,07	0,7926	**7,87**	**0,0072**
Estatus endofítico x Exudado	3	0,15	0,9274	0,13	0,9427	1,10	0,3583
Estatus endofítico x Micorriza	3	0,45	0,7153	1,37	0,2628	0,26	0,8524
Exudados x Micorriza	1	0,96	0,3319	0,23	0,6357	0,14	0,7118
Estatus endofítico x Exudados x Micorriza	3	0,27	0,8485	0,55	0,6538	0,19	0,9024

Macollos

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	micorriza	endofito	exudado	Medias	D.E.	Medianas	H	p
n macollos	M-	E-/E+	EXU-	6,00	2,58	6,00	32,61	0,0047
n macollos	M-	E-/E+	EXU+	9,25	1,71	9,50		
n macollos	M-	E-	EXU-	6,25	1,32	6,00		
n macollos	M-	E-	EXU+	8,13	1,11	8,00		
n macollos	M-	E+/E-	EXU-	5,75	1,50	6,00		
n macollos	M-	E+/E-	EXU+	9,50	1,00	9,00		
n macollos	M-	E+	EXU-	7,75	1,04	7,75		
n macollos	M-	E+	EXU+	8,00	0,82	8,00		
n macollos	M+	E-/E+	EXU-	7,00	1,41	7,50		
n macollos	M+	E-/E+	EXU+	9,00	2,94	9,00		
n macollos	M+	E-	EXU-	6,63	0,85	6,75		
n macollos	M+	E-	EXU+	7,63	2,06	7,75		
n macollos	M+	E+/E-	EXU-	9,75	2,06	9,50		
n macollos	M+	E+/E-	EXU+	9,75	2,22	10,00		
n macollos	M+	E+	EXU-	6,13	0,85	6,25		
n macollos	M+	E+	EXU+	10,50	1,96	10,25		

Análisis del suelo

Fuente de variación	**GL**	**Fósforo**		**Nitrógeno**		**Carbono**	
		F	**p**	**F**	**p**	**F**	**p**
Estatus endofítico	2	2,17	0,1372	0,48	0,6242	0,06	0,9388
Exudados	1	**10,07**	**0,0042**	0,83	0,3704	0,04	0,8453
Micorriza	1	0,0032	0,9556	**63,50**	**<0,0001**	**13,60**	**0,0012**
Estatus endofítico x Exudado	2	0,12	0,8893	1,55	0,2334	0,41	0,6694
Estatus endofítico x Micorriza	2	1,80	0,1881	2,20	0,1333	0,14	0,8701
Exudados x Micorriza	1	2,59	0,1214	2,50	0,1275	0,0041	0,9494
Estatus endofítico x Exudados x Micorriza	2	1,84	0,1816	0,64	0,5373	0,49	0,6161

<u>Parte B</u>

***Bromus auleticus* (vecino: *Lolium multiflorum*)**

Micorrización

Fuente de variación	**GL**	**Micorrización total**		**Arbúsculos**	
		F	**p**	**F**	**p**
Estatus endofítico	1	**32,03**	**<0,0001**	**32,06**	**<0,0001**
Estatus endofítico vecino (Vecino)	1	0,52	0,4826	**10,31**	**0,0054**
Exudados	1	2,77	0,1158	**11,41**	**0,0038**
Estatus endofítico x Vecino	1	**7,29**	**0,0158**	**21,07**	**0,0003**
Estatus endofítico x Exudados	1	0,17	0,6834	**7,90**	**0,0125**
Vecino x Exudados	1	**7,37**	**0,0153**	**15,87**	**0,0011**
Estatus endofítico x Vecino x Exudados	1	**6,67**	**0,0200**	**9,76**	**0,0065**

Parámetros de crecimiento

Fuente de variación	GL	Macollos		Long v		Pseco v	
		F	p	F	p	F	p
Estatus endofítico	1	0,78	0,3811	0,12	0,7299	7,16	0,0095
Estatus endofítico vecino (Vecino)	1	0,09	0,7606	0,003	0,9566	1,88	0,1756
Exudados (Exu)	1	1,73	0,1936	0,00003	0,9952	1,46	0,2315
Micorriza (Mico)	1	0,41	0,5232	1,07	0,3043	1,62	0,2080
Estatus endofítico x Vecino	1	1,05	0,3088	0,0018	0,9660	3,31	0,0735
Estatus endofítico x Exu	1	0,13	0,7156	1,15	0,2884	3,45	0,0681
Estatus endofítico x Mico	1	0,96	0,3318	0,03	0,8583	0,48	0,4896
Vecino x Exu	1	2,13	0,1498	3,92	0,0521	1,14	0,2897
Vecino x Mico	1	0,72	0,4007	0,03	0,8717	3,69	0,0595
Exudado x Mico	1	0,20	0,6542	0,63	0,4300	0,49	0,4873
Estatus endofítico x Vecino x Exu	1	0,17	0,6803	1.40	0,2407	0,08	0,7743
Estatus endofítico x Vecino x Mico	1	0,41	0,5232	0,02	0,8861	1,47	0,2303
Estatus endofítico x Exu x Mico	1	0,25	0,6202	0,0032	0,9552	0,05	0,8257
Vecino x Exu x Micorriza	1	0,01	0,9381	0,82	0,3677	0,01	0,9388
Estatus endofítico x Vecino x Exu x Mico	1	0,03	0,8718	3,16	0,0802	1,08	0,3028

***Lolium multiflorum* (vecino: *Bromus auleticus*)**

Micorrización

Fuente de variación	GL	Micorrización total		Arbúsculos	
		F	p	F	p
Estatus endofítico	1	0,08	0,7826	0,21	0,6500
Estatus endofítico vecino (Vecino)	1	**8,88**	**0,0099**	**7,54**	**0,0158**
Exudados	1	0,14	0,7101	0,23	0,6402
Estatus endofítico x Vecino	1	0,23	0,6409	0,79	0,3878
Estatus endofítico x Exudados	1	1,05	0,3236	**3,62**	**0,0777**
Vecino x Exudados	1	0,06	0,8072	0,01	0,9276
Estatus endofítico x Vecino x Exudados	1	**3,63**	**0,0007**	**3,96**	**0,0666**

Parámetros de crecimiento

Variable	MICORRIZA	EXUDADO	LOLIUM	VECINO	Medias	D.E.	Medianas	H	p
macollos	M-	EXU-	L-	B-	7,00	7,07	7,00	24,23	0,0496
macollos	M-	EXU-	L-	B+	2,50	0,71	2,50		
macollos	M-	EXU-	L+	B-	2,50	0,71	2,50		
macollos	M-	EXU-	L+	B+	2,50	0,71	2,50		
macollos	M-	EXU+	L-	B-	6,50	0,71	6,50		
macollos	M-	EXU+	L-	B+	1,50	0,71	1,50		
macollos	M-	EXU+	L+	B-	2,50	0,71	2,50		
macollos	M-	EXU+	L+	B+	3,00	0,00	3,00		
macollos	M+	EXU-	L-	B-	3,50	2,12	3,50		
macollos	M+	EXU-	L-	B+	3,67	1,53	4,00		
macollos	M+	EXU-	L+	B-	7,50	2,08	7,50		
macollos	M+	EXU-	L+	B+	1,50	0,71	1,50		
macollos	M+	EXU+	L-	B-	3,67	2,08	3,00		
macollos	M+	EXU+	L-	B+	3,00	1,41	3,00		
macollos	M+	EXU+	L+	B-	6,67	2,89	5,00		
macollos	M+	EXU+	L+	B+	7,25	2,07	7,00		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	MICORRIZA	EXUDADO	BROMUS	VECINO	Medias	D.E.	Medianas	H	p
peso seco v	M-	EXU-	L-	B-	4,86	6,04	4,86	23,98	0,0654
peso seco v	M-	EXU-	L-	B+	1,41	0,29	1,41		
peso seco v	M-	EXU-	L+	B-	1,20	1,27	1,20		
peso seco v	M-	EXU-	L+	B+	0,61	0,41	0,61		
peso seco v	M-	EXU+	L-	B-	7,07	0,76	7,07		
peso seco v	M-	EXU+	L-	B+	2,19	0,16	2,19		
peso seco v	M-	EXU+	L+	B-	2,94	0,80	2,94		
peso seco v	M-	EXU+	L+	B+	1,48	1,73	1,48		
peso seco v	M+	EXU-	L-	B-	1,67	2,02	1,67		
peso seco v	M+	EXU-	L-	B+	2,71	2,57	1,99		
peso seco v	M+	EXU-	L+	B-	6,51	1,65	6,70		
peso seco v	M+	EXU-	L+	B+	0,29	0,01	0,29		
peso seco v	M+	EXU+	L-	B-	2,22	2,54	1,42		
peso seco v	M+	EXU+	L-	B+	2,61	0,71	2,61		
peso seco v	M+	EXU+	L+	B-	4,14	1,74	4,19		
peso seco v	M+	EXU+	L+	B+	4,49	1,49	4,56		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	MICORRIZA	EXUDADO	BROMUS	VECINO	Medias	D.E.	Medianas	H	p
peso seco r	M-	EXU-	L-	B-	1,16	1,51	1,16	18,10	0,2559
peso seco r	M-	EXU-	L-	B+	0,38	0,32	0,38		
peso seco r	M-	EXU-	L+	B-	0,40	0,42	0,40		
peso seco r	M-	EXU-	L+	B+	0,55	0,07	0,55		
peso seco r	M-	EXU+	L-	B-	0,83	0,11	0,83		
peso seco r	M-	EXU+	L-	B+	0,74	0,09	0,74		
peso seco r	M-	EXU+	L+	B-	0,85	0,07	0,85		
peso seco r	M-	EXU+	L+	B+	0,36	0,28	0,36		
peso seco r	M+	EXU-	L-	B-	1,11	1,26	1,11		
peso seco r	M+	EXU-	L-	B+	0,12	0,03	0,13		
peso seco r	M+	EXU-	L+	B-	1,35	1,17	1,12		
peso seco r	M+	EXU-	L+	B+	0,23	0,18	0,23		
peso seco r	M+	EXU+	L-	B-	0,23	0,18	0,15		
peso seco r	M+	EXU+	L-	B+	0,65	0,35	0,65		
peso seco r	M+	EXU+	L+	B-	0,58	0,10	0,58		
peso seco r	M+	EXU+	L+	B+	0,49	0,24	0,46		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	MICORRIZA	EXUDADO	LOLIUM	VECINO	Medias	D.E.	Medianas	H	p
long	M-	EXU-	L-	B-	36,00	21,21	36,00	17,45	0,2904
long	M-	EXU-	L-	B+	42,00	1,41	42,00		
long	M-	EXU-	L+	B-	35,00	5,66	35,00		
long	M-	EXU-	L+	B+	45,50	0,71	45,50		
long	M-	EXU+	L-	B-	45,50	3,54	45,50		
long	M-	EXU+	L-	B+	26,00	5,66	26,00		
long	M-	EXU+	L+	B-	31,00	1,41	31,00		
long	M-	EXU+	L+	B+	38,00	2,83	38,00		
long	M+	EXU-	L-	B-	34,50	6,36	34,50		
long	M+	EXU-	L-	B+	47,33	8,14	51,00		
long	M+	EXU-	L+	B-	37,75	6,80	37,50		
long	M+	EXU-	L+	B+	24,50	0,71	24,50		
long	M+	EXU+	L-	B-	34,67	8,14	31,00		
long	M+	EXU+	L-	B+	32,00	22,63	32,00		
long	M+	EXU+	L+	B-	39,67	1,53	40,00		
long	M+	EXU+	L+	B+	38,50	6,86	40,50		

➢ CAPÍTULO 4

Emergencia

Fuente de variación	GL	Valor F	Valor p
Acondicionamiento	1	1,09	0,2992
Hospedante	4	0,42	0,7929
Acondicionamiento x Hospedante	4	0,41	0,7975

Micorrización

Fuente de variación	GL	Micorrización total		Arbúsculos	
		Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
Acondicionamiento	1	**29,57**	**<0,0001**	**33,80**	**<0,0001**
Hospedante	4	0,66	0,6211	1,01	0,4092
Acondicionamiento x Hospedante	4	0,22	0,9282	0,67	0,6118

Parámetros de crecimiento

Fuente de variación	GL	Long. vástago		Long. raíz		N° hojas		Peso seco vástago	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Acondicionamiento	1	**8,00**	**0,0062**	3,07	0,0843	**4,35**	**0,0408**	0,38	0,5424
Hospedante	4	**8,06**	**<0,0001**	0,68	0,6077	1,43	0,2346	**7,43**	**<0,0001**
Acondicionamiento x Hospedante	4	**2,99**	**0,0247**	0,53	0,7151	2,06	0,0959	0,65	0,6288