

**“La simbiosis con endófitos del género *Neotyphodium* y su impacto en
la interacción del pasto hospedante con otros hongos”**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Luis Ignacio Perez

Licenciado en Ciencias Biológicas - Universidad de Buenos Aires - 2008

Lugar de trabajo: IFEVA - Cátedra de Ecología - Facultad de Agronomía- UBA



FAUBA Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano



Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

Director de tesis

Marina Omacini

Licenciada en Ciencias Biológicas – Universidad CAECE

Doctora en Ciencias Agropecuarias- Universidad de Buenos Aires

Co-director

Pedro Gundel

Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires

Doctor en Ciencias Agropecuarias- Universidad de Buenos Aires

Consejero de Estudios

Claudio Ghera

Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Marina Omacini

Licenciada en Ciencias Biológicas – Universidad CAECE

Doctora en Ciencias Agropecuarias- Universidad de Buenos Aires

JURADO

Victoria Novas

Licenciada en Ciencias Biológicas – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

Doctora en Ciencias Biológicas- Universidad de Buenos Aires

JURADO

Cecilia Carmaran

Licenciada en Ciencias Biológicas – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

Doctora en Ciencias Biológicas- Universidad de Buenos Aires

JURADO

Sofía Noemí Chulze

Licenciada en Microbiología - Universidad Nacional de Río Cuarto, Doctora en Ciencias Biológicas - Universidad Nacional de Río Cuarto

Fecha de defensa de la tesis: 17 de Marzo de 2014

Agradecimientos

A los que me guiaron:

Formalmente,

A Marina Omacini. Pilar de esta tesis. En ningún momento me dejó bajar los brazos.

A Gundel, que más que co-director, fue un amigo.

A Claudio Ghera, por las charlas camino a Eco del paisaje y por enseñarme que uno puede (y debe) saber sobre todas las cosas.

E informalmente,

Gonzalo Irisarri, quien además es un gran amigo.

A mi Familia,

A Frida

Torretta y Hugo, por el ánimo y las charlas.

A Adelia,

A Lucía,

A Malezas, primera puerta que siempre golpeé en momentos de ansiedad. Juanma, Vicky, Grisel, Tomás, Durante, Lu Dacunto, Soledad.

A Analía Menendez, por bancarme y por el mate nuestro de cada día.

A Mariano. De a poco nos vamos entendiendo...

A Marta Telesnicki, por la ayuda en estas instancias finales.

A Julián, que siempre está aunque esté al otro lado del mundo.

A Damián,

A Matías, Juan, Lupo.

Al Laucha y Dieguito.

A Pato,

A Emilia, por creer en mí más de lo que yo mismo creo,

A Walter, Roberto y Carlitos,

A Andy Ueno,

A Male Druille,

A Marcos Texeira,

A Fer Biganzoli,

A Ceci Casas,

A Gonza Molina,

A los Simbiontes: María Semmartin, Lucho Boyero, Romina Cavagnaro, Laura Ventura.

A Martín Aguiar, por la ayuda y la seguridad.

A mis amigos/compañeros de campañas a San Claudio: Picasso, Della Chiessa, Danilo,

Montes, que sigan las aventuras. A Sandra, por sus desayunos, almuerzos y cenas de charlas.

A los que remararon y la remararon conmigo:

Esteban Fernandez, Milena Manzur, Pablito García Parisi.

A Gabo Ferro, Ariel Minimal, Lisandro Aristimuño, Carlos y a los miles de músicos que sonaron a lo largo de este tiempo.

A ANPCyT y CONICET por la financiación de esta tesis.

Declaración.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1 La simbiosis entre pastos y endófitos	5
1.2 Rol del ambiente en la interacción entre la planta hospedante y sus simbiontes	7
1.3 Efectos del endófito sobre la interacción del pasto hospedante con otros hongos	7
1.4 Objetivo general e hipótesis	8
1.5 Modelo de Estudio: Simbiosis entre <i>Lolium multiflorum</i> y <i>Neotyphodium occultans</i>	10
1.6 Esquema de la tesis	10
Capítulo 2	13
EN BUSCA DE UN PATRÓN GENERAL: ANALISIS ESTADÍSTICO DE LA BIBLIOGRAFÍA	13
2.1 Introducción	15
2.2 Materiales y métodos	17
2.2. a. Búsqueda y selección de trabajos	17
2.2. b. Cálculo de efectos y análisis estadísticos	18
2.3 Resultados	19
2.4 Discusión	21
Capítulo 3	23
EFECTO DEL ENDÓFITO SOBRE LA INFECCIÓN POR PATÓGENOS A NIVEL INDIVIDUAL Y POBLACIONAL Y EL ROL DEL AMBIENTE COMO MODULADOR DE ESTA INTERACCIÓN	23
3.1 Introducción	25
3.2 Materiales y métodos	26
3.2. a Material vegetal	26
3.2. b Experimento 1	27
3.2. c Experimento 2	27
3.3 Resultados	28
3.3. a Experimento 1	28
3.3. b Experimento 2	30
3.4 Discusión	32
Capítulo 4	35
IMPACTO DEL MUTUALISMO SOBRE PATÓGENOS EN COMUNIDADES VEGETALES	35
4.1 Introducción	37

4.2	Materiales y métodos.....	38
4.2. a	Material vegetal.....	38
4.2. b	Suelos con historia de pastizal natural y de poblaciones de <i>Lolium multiflorum</i> . 39	
4.2. c	Selección de especies vecinas.....	39
4.2. d	Selección de patógenos.....	39
4.2. e	Inoculaciones.....	40
4.2. f	Experimento 1.....	40
4.2. g	Experimento 2.....	40
4.2. h	Experimento 3.....	41
4.3	Resultados.....	42
4.3. a	Experimento 1.....	42
4.3. b	Experimento 2.....	43
4.3. c	Experimento 3.....	45
4.4	Discusión.....	48
Capítulo 5	51
	MECANISMOS ECOLÓGICOS DE LA RESISTENCIA A PATÓGENOS.....	51
5.1	Introducción.....	53
5.2	Materiales y métodos.....	55
5.2. a	Material vegetal.....	55
5.2. b	Esclerocios de <i>Claviceps purpurea</i>	56
5.2. c	Establecimiento de las parcelas utilizadas en ambos ensayos.....	56
5.2. d	Experimento 1.....	57
5.2. e	Experimento 2.....	57
5.3	Resultados.....	59
5.3. a	Experimento 1.....	59
5.3. b	Experimento 2.....	62
5.4	Discusión.....	64
Capítulo 6	67
	DISCUSIÓN GENERAL.....	67
6.1	Introducción.....	69
6.2	Conclusión.....	74
	BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Trabajos detectados en los que se estudió la interacción entre plantas, endófitos y patógenos. Estos se encuentran ordenados en función del apellido del primer autor. Solo aquellos marcados con un asterisco pudieron ser incluidos en el análisis

Cuadro 3.1. Número de espigas, espiguillas por espiga, semillas y peso medio de las semillas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+) y no simbióticas (E-) con el endófito *Neotyphodium occultans* bajo dos niveles de estrés por herbicidas [Sin herbicida (control) y Herbicida (70 g ai/ha)] pertenecientes al experimento 2.

Cuadro 4.1. Valores F correspondientes al análisis de la varianza para los valores de crecimiento de los patógenos *Fusarium acuminatum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* sembrados en medio Agar-Papa-Glucosa junto a semillas de *L. multiflorum* asociadas (barras grises) y no asociadas (barras blancas) a hongos endofitos. (* = $p < 0,05$)

Cuadro 5.1. Proporción de órdenes y diversidad de artrópodos (D) y (H) extraídos de suelo en parcelas sembradas con semillas de *L. multiflorum* simbióticas (E+) o no simbióticas (E-) con el endófito *N. occultans* y porcentaje de biomasa remanente en las bolsas de descomposición conteniendo material muerto de *L. multiflorum* simbiótico (Broza+) o no simbiótico (Broza-) con el endófito *N. occultans*, colocadas en parcelas sembradas con plantas de *L. multiflorum* asociadas (E+) o libres de endófitos (E-).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo de vida de un pasto anual (línea continua) y su hongo endófito de transmisión exclusivamente vertical (línea interrumpida). Los asteriscos representan los flujos de individuos simbióticos a no simbióticos que resultan a causa de imperfecciones en la transmisión.

Figura 1.2. Ciclo de vida de un pasto anual (línea continua), su hongo endófito de transmisión exclusivamente vertical (línea interrumpida) y tres tipos de hongos que infectan distintos tejidos y que podrían causar distintos impactos en la demografía de cada integrante de la asociación: (C) castradores como es *C. purpurea*, (K) asesinos, como lo son *Pythium sp* y *Rhizoctonia sp.* y (D) debilitadores como es *Puccinia graminis*. Los signos de pregunta representan los flujos de individuos simbióticos a no simbióticos que resultan de la infección por patógenos.

Figura 2.1. Esquema de las interacciones propuestas en este capítulo. D) Efectos directos del endófito sobre el patógeno o a través de cambios en su hospedante; I) Efecto indirecto del endófito sobre el patógeno modificando elementos del ambiente, tanto biótico como abiótico. Modificada de Burdon (1987).

Figura 2.2. Efecto de la asociación con endófitos sobre la incidencia de patógenos de acuerdo al tipo de aproximación experimental elegida para poner a prueba la hipótesis (a) y el grupo funcional de patógenos utilizado (b). Los valores entre paréntesis representan el número de ensayos para esa variable ($p < 0,05$).

Figura 2.3. Efecto de la asociación con endófitos sobre la incidencia de patógenos de acuerdo a la interacción pasto endófito utilizada (a) y de acuerdo a la identidad del patógeno (b). Los valores entre paréntesis representan el número de ensayos para esa variable ($p < 0,05$).

Figura 3.1. Biomasa vegetativa y reproductiva de plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* pertenecientes al experimento 1. Los valores representan a la media y al error estándar. ($n = 7$). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

Figura 3.2. Número de espigas por parcela sembrada con plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* pertenecientes al experimento 1. Los valores representan a la

media y al error estándar. (n = 7). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

Figura 3.3. Porcentaje de espigas (A) y semillas (B) infectadas por *Claviceps purpurea* en plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* pertenecientes al experimento 1. Los valores representan a la media y al error estándar. (n = 7). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

Figura 3.4. Supervivencia de plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* bajo dos niveles de estrés por herbicidas [Sin herbicida (control) y Herbicida (70 g ai/ha)] pertenecientes al experimento . Los valores representan a la media y al error estándar (n = 3). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable (test de Tukey, $p < 0,05$)

Figura 3.5. Porcentaje of plantas (A) y espigas (B) infectadas por *Claviceps purpurea* plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* bajo dos niveles de estrés por herbicidas [Sin herbicida (control) y Herbicida (70 g ai/ha)] pertenecientes al experimento 2. Los valores representan a la media y al error estándar (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable (test de Tukey, $p < 0,05$)

Figura 4.1. Foto de cajas de Petri correspondiente al experimento número 2. (s) semilla, (p) patógeno. Los números en blanco representan las horas transcurridas desde del inicio del experimento.

Figura. 4.2. Bandejas correspondientes al experimento número 3 al momento de la siembra (a), a los 10 días de iniciado el ensayo (b) y al momento de la cosecha (c),

Figura 4.3. Emergencia de plántulas de *L. multiflorum* simbióticas (barras grises) y no simbióticas (barras blancas) con hongos endófitos y sembradas en suelo sin patógenos Control (Ctrl) o inoculado con: *Fusarium acuminatum* (Fa); *Fusarium graminearum* (Fg); *Fusarium oxysporum* (Fo); *Pythium ultimum* (Py); *Rhizoctonia solani* (Rhi). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

Figura 4.4. Crecimiento de los patógenos *Fusarium acuminatum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* sembrados en medio Agar-Papa-Glucosa junto a semillas de *L. multiflorum* simbióticas (Puntos negros) y no simbióticas (puntos vacíos) con hongos endófitos. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Figura 4.5. Diversidad vegetal estimada mediante el índice de Simpson en bandejas sembradas con *Bromus unioloides*, *Stipa neesiana* y *Briza minor* junto a semillas de *L. multiflorum* simbióticas (barras grises) y no simbióticas (barras blancas) con el endófito *N. occultans* y cubiertas con material muerto de *L. multiflorum* simbióticas (Br+) y no simbióticas (Br-) con hongos endofitos en: a. suelo proveniente de pastizal dominado por *L. multiflorum* y b. suelo proveniente de pastizal nativo inoculadas con *F. acuminatum*. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

Figura 4.6. Emergencia de plántulas de *L. multiflorum*, *Bromus unioloides*, *Stipa neesiana* y *Briza minor* sembradas junto a semillas de *L. multiflorum* simbióticas (barras grises) y no simbióticas (barras blancas) con hongos endofitos y sembradas en: **a.** suelo proveniente de parches de comunidad sucesional dominados por *L. multiflorum* sin patógenos (Control) o inoculado con: *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*. **b.** suelo proveniente de un relicto de pastizal nativo sin patógenos (Control) o inoculado con; *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*. Letras diferentes y asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

Figura 5.1. Esquema de las interacciones propuestas en este capítulo enmarcadas en el patosistema (Modificada de Burdon (1987). 1) Efecto del endófito sobre la planta hospedante; 2) cambios en los atributos morfológicos y ecológicos de la planta como resultado de la interacción con el endófito; 3) cambios producidos por la simbiosis en la comunidad de insectos que impactan sobre la ecología del patógeno. H: Hipótesis estudiadas en ese grupo de organismos.

Figura 5.2. Grupos de 10 Esclerocios de *C. purpurea* incluídos en cada bolsa de tul (1x) (a) y esclerocio germinado (5x) (b).

Figura 5.3. Bolsas de tul con esclerocios de *C. purpurea* colocadas en la parcela (a). Bolsa conteniendo material muerto de *L. multiflorum* (b). Parcela sembrada con *L. multiflorum* simbiótica con endófitos, en la que se colocaron bolsas con esclerocios de *C. purpurea* y material muerto de *L. multiflorum* por encima de ellas (c). Parcelas sembradas con semillas provenientes de plantas simbióticas o no simbióticas (d).

Figura 5.4. Imagen de los dispositivos de Tullgren utilizados en la extracción de mesofauna.

Figura 5.6. Incidencia (a) y la severidad (b) (medias y error estándar) de *C. purpurea* en parcelas sembradas con plantas de *L. multiflorum* simbióticas (barras negras) o no simbióticas (barras blancas) con endófitos con tratamiento de exclusión de vectores

(V+) o o sin exclusión (V-). Las letras representan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$)

Figura 5.7. Emisión de volátiles (medias y error estándar) detectado por 8 sensores (S1 a S8) en parcelas sembradas con plantas de *L. multiflorum* simbióticas (barras negras) o no simbióticas (barras blancas) con endófitos. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$)

Figura 5.8. Recuperación (a) y número de fructificaciones por esclerocio (b) (medias y error estándar) de esclerocios de *C. purpurea* colocados bajo bolsas de malla vacías (sin broza) o conteniendo material muerto de *L. multiflorum* simbióticas (Broza E+) o no simbióticas (Broza E-) con endófitos, en parcelas sembradas con plantas de *L. multiflorum* simbióticas (barras negras) o no simbióticas (barras blancas) con endófitos. Las letras representan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$)

Figura 6.1. Esquema de las interacciones estudiadas en esta tesis. 1) Cambios en los atributos morfológicos y ecológicos de la planta como resultado de la interacción con el endófito que modifican su interacción con patógenos; 2) Cambios en las condiciones ambientales (estrés abiótico) que modulan la interacción de la simbiosis con el patógeno; 3) Efectos negativos de la simbiosis sobre el patógeno que impacta en otras especies que no forman simbiosis con endófitos de la comunidad; 4) cambios producidos por la simbiosis en la comunidad de vectores de patógenos que impactan en su ecología y su relación con la planta hospedante; 5) Efectos de la simbiosis en la comunidad microorganismos del suelo e impactan en su supervivencia modificando ecología y su relación con la planta hospedante. Las líneas punteadas representan el efecto generado por la interacción entre la planta y el endófito. Modificada de Burdon (1987)

Figura 6.2. Ciclo de vida de un pasto anual (línea continua), su hongo endófito de transmisión exclusivamente vertical (línea interrumpida) y dos grupos de hongos podrían causar distintos impactos en la demografía de cada integrante de la asociación. (C). castradores como es *C. purpurea* y, (K) asesinos, como lo son *Pythium sp* y *Rhizoctonia sp*.

Publicaciones derivadas de la tesis

- Capítulo 3.

Pérez L.I., Gundel P.E., Ghera C.M., Omacini M. (2013) Family issues: fungal endophyte protects host grass from the closely related pathogen *Claviceps purpurea*. *Fungal Ecology*, 6(5):379-386.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2013.06.006> .

Impact factor: 2.854

- Capítulo 1. Introducción

Pérez, L. I., Gundel, P.E. & Omacini M.(2013) Symbiosis Between Grasses y Clavicipitaceous Endophytes: Ecological Significance Across Levels of Organization. Encyclopedia of Pest Management. Taylor & Francis. (en prensa) Manuscript number: 120010001 (Capítulo de Libro)

Abreviaturas

E+: Planta o semilla asociada a endófitos. En el texto también me refiero a ellas como simbióticas.

E-: Planta o semilla no asociada a endófitos. En el texto también me refiero a ellas como simbióticas.

H+: Historia de suelo. En este caso suelo dónde en la estación anterior crecieron plantas de *L. multiflorum* asociadas a endófitos.

H-: Historia de suelo. En este caso suelo dónde en la estación anterior crecieron plantas de *L. multiflorum* no asociadas a endófitos.

Br+: Material vegetal (broza) producida por plantas de *L. multiflorum* asociadas a endófitos.

Br-: Material vegetal (broza) producida por plantas de *L. multiflorum* no asociadas a endófitos.

V+: Plantas o espigas en las que se excluyeron a los vectores de *Claviceps purpurea*.

V-: Plantas o espigas en las que no se excluyeron a los vectores de *Claviceps purpurea*.

Fa: *Fusarium acuminatum*

Fg: *Fusarium graminearum*

Fo: *Fusarium oxysporum*

Py: *Pythium ultimum*

Rhi: *Rhizoctonia solani*

ANOVA: Análisis de Varianza

P: Probabilidad

χ^2 : Valor de la tabla Chi

ES: Error estándar

t: Valor de la tabla de t de student

n: Número de repeticiones. En el capítulo número 2 lo utilizamos como número de estudios independientes.

\bar{X}^c : Valores de medias del control utilizado en el meta-análisis realizado en el capítulo 2.

\bar{X}^e : Valores de medias del tratamiento utilizado en el meta-análisis realizado en el capítulo 2.

S: es la varianza pooleada.

J: Factor de corrección utilizado en el meta-análisis realizado en el capítulo 2.

Q: Heterogeneidad entre estudios

n_{fs} : *Fail safe number*

Ea: Estancia

Pdo: Partido

Ha: Hectárea

Pcia. Provincia

m²: Metro cuadrado

cm: centímetro

F1: primer descendencia

Resumen

En los pastizales naturales se encuentran muchas especies de gramíneas asociadas a endófitos asexuales del género *Neotyphodium*. La persistencia de la simbiosis en las comunidades ha sido asociada a los beneficios que el endófito le confiere al hospedante frente a situaciones de herbivoría y estrés abiótico. El objetivo general de esta tesis es evaluar el impacto de la presencia del endófito sobre el desarrollo de otros hongos que forman asociaciones patogénicas con el mismo pasto hospedante y estudiar de qué manera esta triple interacción se relaciona con el resto de la comunidad y el ambiente abiótico. Como sistema de estudio se utilizó a la gramínea anual *Lolium multiflorum*, su endófito *Neotyphodium occultans* y hongos con estrategias de vida contrastantes que colonizan distintos tejidos en distintos estadios del hospedante y generan cambios diversos en su demografía y ecología. La hipótesis general de esta tesis es que la presencia de endófitos altera tanto de manera directa como indirecta la interacción entre la planta hospedante y la comunidad de patógenos, y que estos cambios impactan sobre la permanencia de la simbiosis y su interacción con el resto de la comunidad vegetal. A través de un meta-análisis y experimentos manipulativos en laboratorio, invernáculo y a campo demostramos que el mutualismo reduce la infección por diversos hongos patógenos a través de mecanismos tanto fisiológicos como ecológicos, e impacta sobre otras especies de pastos. La conclusión general de esta tesis es que esta triple interacción está lejos de ser simple como fue planteado en sus inicios. Esta interacción es compleja e incluye a otros organismos de la comunidad, tanto como mediadores de la infección o como beneficiarios de los efectos de la simbiosis.

Abstract

In natural grasslands, many cool season grasses are associated to endophytes from the genus *Neotyphodium*. The persistence of these symbioses within the community suggests that there must be underlying mechanism favoring these associations. Among these mechanisms, the most studied have been the resistance to herbivores and abiotic stresses. The main objective of this thesis is to evaluate the impact of this symbiosis with *Neotyphodium* endophytes on the development of other microorganisms that establish pathogenic associations with host plant and to study the ways in which this triple interaction relates with the rest of the community and the environment. Our studies were performed using annual grass, *Lolium multiflorum*, its endophyte *Neotyphodium occultans* and pathogens that infect host grass in different stages of its life cycle and generate changes in its demography and ecology. The general hypothesis of this thesis postulate that symbioses with endophytes modify directly and indirectly the interaction between host plant and pathogen community, and that these changes impact on the persistence of the symbiosis between grasses and endophytes and its interaction with the rest of the community. Through a Meta-analysis and manipulative experiments we demonstrate that symbioses with *Neotyphodium* endophytes reduce the infection by pathogens in host plant. The mechanisms by which this occurs are either physiological or ecological and impact on other species within the community. The main conclusion of this thesis is that interaction between grasses, endophytes and pathogens is far from being a simple interaction as was proposed in its origins. This interaction is complex and includes other members of the community, either as mediators of disease, or as beneficiaries of the negative effect of the symbiosis on pathogen.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 La simbiosis entre pastos y endófitos

Las comunidades de pastizal constituyen una compleja red de interacciones entre grupos de organismos con diferentes hábitos alimentarios. Los pastos cumplen un papel fundamental en la estructura y la dinámica de los pastizales puesto que son un recurso tanto para los organismos subterráneos como para los que viven en la parte aérea. En consecuencia, cualquier alteración en las características de las plantas debido a su interacción con su ambiente biótico o abiótico puede repercutir sobre las redes subterráneas al modificar la cantidad y la calidad del material vegetal vivo y muerto que ingresa al suelo (De Deyn et al. 2003, Wardle et al. 2004a, Van Der Putten et al. 2007a, Van Der Putten et al. 2007b). A su vez, el efecto sobre las comunidades edáficas puede generar una retroalimentación positiva o negativa sobre el establecimiento y el desarrollo de las plantas, y sobre sus interacciones con los niveles tróficos superiores (Van Der Putten et al. 2001, Wardle et al. 2004b).

Durante los últimos años ha crecido el interés por entender cómo y en qué medida la interacción entre las plantas y diversos microorganismos puede determinar la composición y la estructura de las comunidades vegetales y animales (Hudson et al. 2006, Mitchell et al. 2006, Borer et al. 2007). Tanto las interacciones mutualísticas, asociaciones en las que ambos miembros se benefician, como las parasíticas o patogénicas, en la que uno solo se beneficia mientras que el otro se perjudica, son de gran importancia y pueden conducir a cambios en procesos ecológicos fundamentales que podrían tener consecuencias en procesos evolutivos (Thrall et al. 2007). Estos efectos pueden ser tanto directos como indirectos (Omacini et al. 2001, Borer et al. 2007, Omacini et al. 2012). La influencia directa es la que ejerce una especie sobre otra, mientras que los efectos indirectos ocurren cuando el impacto de una especie sobre otra está mediado por una o más especies intermediarias como, por ejemplo, cuando los patógenos influyen directamente sobre enemigos naturales de las plantas y, por lo tanto, las benefician disminuyendo los efectos negativos de sus enemigos.

La mayoría de las especies vegetales forman simbiosis mutualísticas con una gran variedad de hongos que se alojan en sus tejidos y que, sin generar daños visibles, modifican la interacción del hospedante con su ambiente (Hartley y Gange 2009). Los hongos mutualistas pueden clasificarse en dos grupos: *protectores* y *proveedores*. Dentro del primer grupo podemos mencionar a los endófitos foliares que infectan numerosas especies de pastos de estación fría y que, por medio de la producción de alcaloides, disminuyen el consumo de la planta hospedante por herbívoros (Clay 1988). Los proveedores son aquellos que proveen algún componente que se encuentra reducido o no disponible para ser adquirido por la planta hospedante (Thrall et al. 2007). Entre estos el caso más conocido es el de los hongos formadores de micorrizas.

En pastizales templados, los hongos asexuales del género *Neotyphodium* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) crecen de forma sistémica y asintomática en las partes aéreas de numerosos pastos. A estos hongos se los denomina endófitos foliares (Glenn et al. 1996). A diferencia de otros hongos con estadíos sexuales, estos endófitos se transmiten sólo verticalmente dado que colonizan el ovario sin alterar el desarrollo de la

semilla (Schardl et al. 2004) (Fig. 1.1). La transmisión de planta madre a semilla suele ser muy eficiente, perfecta cuando todas las semillas están infectadas por lo cual se ha tenido poco en cuenta el impacto de este proceso sobre la persistencia de la simbiosis (Gundel et al. 2008a, Gundel et al. 2008b). Sin embargo, estudios recientes demuestran que bajo determinadas condiciones ambientales puede ser imperfecta con consecuencias sobre el nivel de infección de la población (Gundel et al. 2009a). Por lo general, a la interacción entre pastos y endófitos del género *Neotyphodium* se la considera mutualista sin dejar en cuenta que la magnitud de los beneficios, es decir la efectividad del mutualismo, depende de los genotipos de ambos miembros, de del ambiente abiótico y de las interacciones bióticas con otras especies (Müller y Krauss 2005).

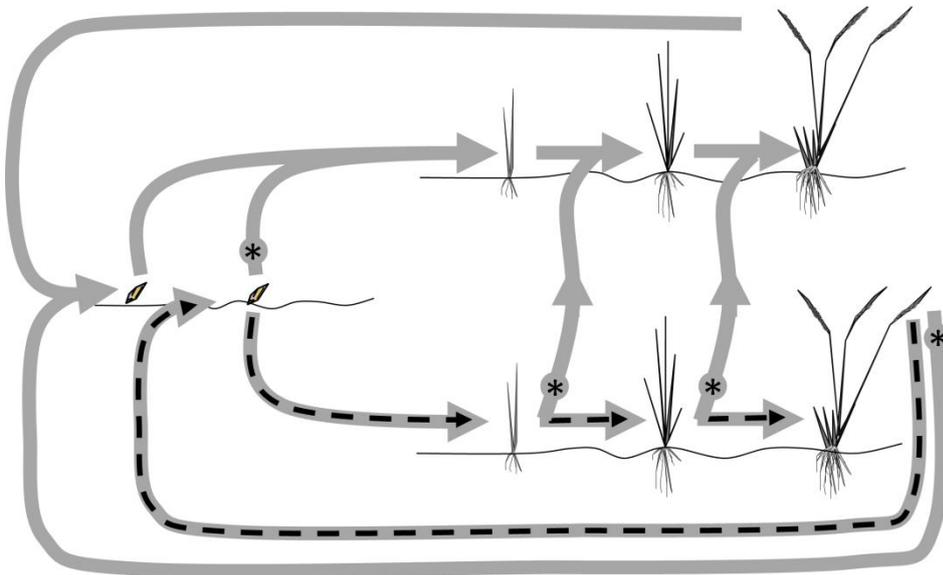


Figura 1.1. Ciclo de vida de un pasto anual (línea continua) y su hongo endófito de transmisión exclusivamente vertical (línea interrumpida). Los asteriscos representan los flujos de individuos simbióticos a no simbióticos que resultan a causa de imperfecciones en la transmisión.

La presencia del endófito modifica la morfología y química de los tejidos tanto aéreos como subterráneos, con consecuencias sobre la interacción de las plantas con el ambiente abiótico y biótico (Malinowski y Belesky 2000). Un porcentaje elevado de los estudios sobre interacciones entre pastos, endófitos y otros factores bióticos están enfocados en la resistencia a la herbivoría y en sus consecuencias sobre la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas (Omacini et al. 2004). Por ejemplo, se ha observado que la acumulación de alcaloides tóxicos en los tejidos de plantas infectadas

(E+) reduce la abundancia de ciertas especies de herbívoros afecta el flujo de energía a través de las cadenas tróficas aéreas y subterráneas (Omacini et al. 2001, Kunkel et al. 2004). Además, el material muerto producido por las plantas E+ no sólo se descompone más lentamente que el de las plantas no infectadas (E-) (Omacini et al. 2004, Rudgers et al. 2004) sino que puede afectar el establecimiento de la siguiente generación de plantas (Omacini et al. 2009) y su interacción con los hongos micorrícicos (Antunes et al. 2008).

1.2 Rol del ambiente en la interacción entre la planta hospedante y sus simbioses

En los últimos años ha aumentado el interés sobre el rol del ambiente sobre las interacciones mutualistas. Si bien las condiciones ambientales tienen larga data dentro de las interacciones parasíticas como uno de los tres ángulos de los pato-sistemas (Rotem 1975, Taylor et al. 1997, Guyader et al. 2013), en el caso de las interacciones mutualísticas, estas han sido recientemente incorporadas como un factor determinante del carácter de la asociación (Kiers et al. 2010, Davitt et al. 2011). Los modelos surgidos a partir de los nuevos estudios sugieren que el mutualismo solo es una sección del continuo entre mutualismo y el parasitismo (Karst et al. 2008). Gran parte de las interacciones entre plantas y microorganismos puede ser explicada como un balance entre los costos y los beneficios que representa la interacción para cada uno de los organismos involucrados (Davitt et al. 2010). En determinadas condiciones ambientales, la asignación de recursos a mantener la asociación puede verse comprometida. Factores abióticos como la sequía, la inundación, o compuestos fitotóxicos, así como factores bióticos como la herbivoría, pueden generar una realocación de recursos en la planta destinada a resistir dicha condición (Davitt et al. 2011, García Parisi et al. 2012). Estas situaciones pueden generar una ruptura de la simbiosis, una disminución de los beneficios provistos por el microorganismo simbiote (García Parisi et al. 2012, Pérez et al. 2013), o incluso tener efectos negativos sobre la planta hospedante (Cheplick et al. 1989).

1.3 Efectos del endófito sobre la interacción del pasto hospedante con otros hongos

El efecto de la presencia de *Neotyphodium* sobre la colonización de otros microorganismos se ha comenzado a estudiar recientemente. Suelos en los que crecieron plantas E+ mostraron cambios en la estructura de la comunidad bacteriana por medio de cambios en las rizodeposiciones de la planta hospedante (Casas et al. 2011). Estos cambios en la comunidad rizosférica podrían producir cambios en el desarrollo aquellos hongos que cumplen parte de su ciclo de vida en el suelo (Lemons et al. 2005). Algunos resultados indican que la presencia de endófitos foliares puede afectar de forma negativa la colonización por hongos micorrícicos arbusculares en varias especies forrajeras (Omacini et al. 2006, Mack y Rudgers 2008, Uchitel et al. 2011). Contrariamente, otros resultados muestran que en pastos nativos también pueden estimularla (Novas et al. 2005b).

Hasta el presente se ha estudiado muy poco la resistencia al ataque de hongos patógenos en plantas hospedantes del hongo endófito (Popay y Bonos 2008, Tian et al. 2008). Tian y colaboradores (2008) observaron una disminución en el número y el tamaño de las lesiones por distintas especies de hongos patógenos foliares en presencia del endófito en *L. perenne*. En cambio, Krauss et al. (2006) encontraron que esta puede promover la infección por *Claviceps purpurea* en ese mismo pasto hospedante. Otros autores detectaron que plantas de festuca infectadas con endófitos fueron menos afectadas por *Puccinia graminis* en ensayos de invernáculo aunque estos resultados no los pudieron observar a campo (West et al., 1989).

A pesar de que existen pocos datos y que los resultados son a menudo contradictorios, el conocimiento actual sugiere que existen mecanismos directos e indirectos por los cuales el endófito afectaría la relación entre la planta y otro hongo de transmisión horizontal y que, por lo tanto, coloniza una vez que el endófito está en la planta. Los efectos directos están relacionados con ensayos de inhibición de crecimiento *in Vitro* en los que se demostró el impacto negativo de los extractos de pastos con endófitos sobre el desarrollo de agentes patógenos (Siegel y Latch 1991, Christensen 1996). Los efectos indirectos involucran a una tercera especie que es afectada por la presencia del endófito y que podría afectar a los hongos patógenos. Así, por ejemplo, el impacto negativo de la presencia del endófito sobre la actividad de las hormigas cortadoras (Tibbets y Faeth 1999, Omacini et al. 2009), podría tener implicancias indirectas sobre la dispersión de esporas de otros hongos como *C. purpurea*.

1.4 Objetivo general e hipótesis

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar el impacto, tanto directo como indirecto, de la simbiosis con endófitos del género *Neotyphodium* sobre la interacción del pasto hospedante con otros microorganismos que forman asociaciones patogénicas con el mismo, e interpretar el efecto que estas modificaciones tienen sobre la persistencia de la simbiosis en la población y la relación de la planta hospedante con el resto de la comunidad.

La hipótesis general postula que la asociación con endófitos reduce tanto el porcentaje de plantas asociadas a simbiontes patogénicos como la colonización a nivel individual. Esto ocurriría a través de cambios tanto morfológicos como fisiológicos y fenológicos en la planta hospedante (efectos directos), y/o al modificar el ambiente con las señales que deja la planta asociada con endófitos o su broza (ef. Indirectos) y que pueden modificar la interacción del patógeno con otras especies. Sobre la base de la biología de las especies, se espera que la intensidad del efecto varíe en función del tejido que coloniza cada hongo y del estadio ontogénico y/o de los requerimientos de cada hongo para su desarrollo y dispersión.

Para cumplir el objetivo se realizaron estudios descriptivos y manipulativos que incluyen a *Lolium multiflorum*, su endófito *Neotyphodium occultans*, hongos patógenos que atacan a las plántulas o las inflorescencias del hospedante en estadio de planta adulta. Se realizaron estudios a diferentes escalas, desde ensayos en cajas de Petri hasta experimentos a campo en poblaciones naturales. El distinto grado de manipulación de

las condiciones nos permitió discriminar los mecanismos que operan a nivel de planta de los que operan a escala de comunidad.

Para estudiar esta triple interacción optamos por clasificar a los patógenos en grupos funcionales de acuerdo con el impacto que producen en el hospedante en: *Castradores*, aquellos que reducen la fecundidad de los individuos sin efecto aparente sobre el crecimiento vegetativo (p.ej. *Claviceps* spp., *Ustilago* spp.) (Fig. 1.2); *asesinos*, aquellos que causan muerte pre o post emergencia de las plantas (p.ej. *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp) (Fig. 1.2) y *debilitadores*, aquellos que causan lesiones discretas con efecto reducido sobre el hospedante (p.ej. *Puccinia* spp., *Plasmopara* spp.) (Burdon 1993, Dobson y Crawley 1994) (Fig. 1.2). Estos grupos de patógenos pueden modificar la abundancia de especies vegetales en la comunidad y el flujo de energía, generando cambios inmediatos que pueden ser perceptibles incluso varios años después del ataque o la invasión del patógeno (Burdon 1993, Hudson et al. 2006, Mitchell et al. 2006).

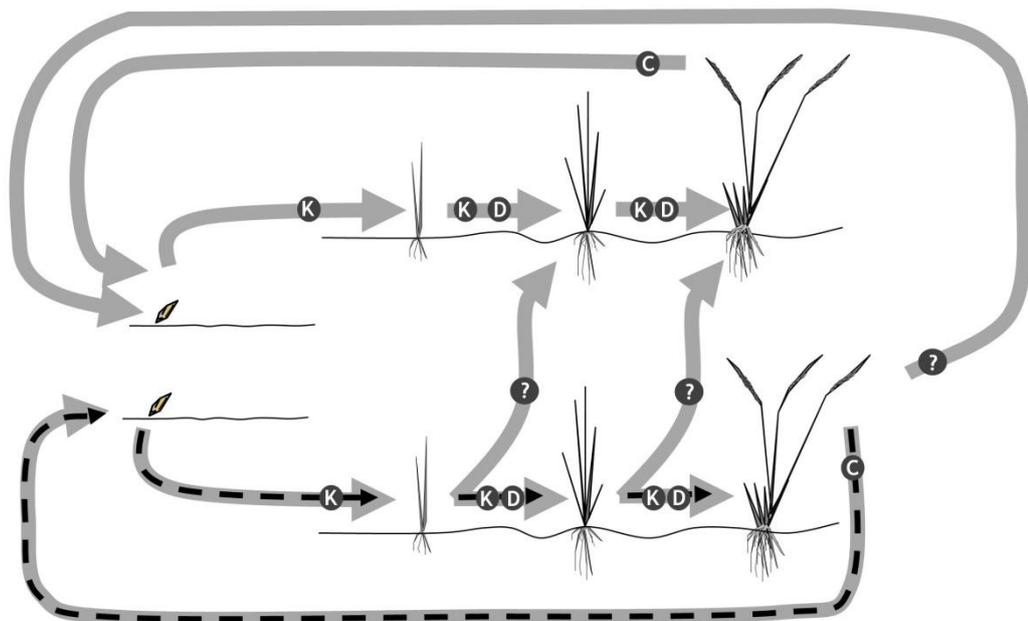


Figura 1.2. Ciclo de vida de un pasto anual (línea continua), su hongo endófito de transmisión exclusivamente vertical (línea interrumpida) y tres tipos de hongos que infectan distintos tejidos y que podrían causar distintos impactos en la demografía de cada integrante de la asociación. (C). castradores como es *C. purpurea* y, (K) asesinos, como lo son *Pythium sp* y *Rhizoctonia sp.* y (D) Debilitadores como puede ser *Puccinia graminis*. Los signos de pregunta representan los flujos de individuos simbióticos a no simbióticos que resultan de la infección por patógenos.

1.5 Modelo de Estudio: Simbiosis entre *Lolium multiflorum* y *Neotyphodium occultans*

En esta tesis se utilizaron poblaciones de *Lolium multiflorum* naturalmente asociadas a endófitos del género *Neotyphodium* (Vila-Aiub et al. 2005). *Lolium multiflorum* Lam. (ryegrass anual) es un pasto exótico naturalizado de gran dominancia dentro de los pastizales de la región pampeana (Soriano 1992). Caracterizado como una especie competitiva-ruderal, su éxito en la invasión de los pastizales Pampeanos ha sido asociada a la presencia del endófito *Neotyphodium occultans* y a la producción de una capa gruesa de broza que reduce la germinación y el establecimiento de plántulas de otras especies. (Vila-Aiub et al. 2005, Gundel et al. 2009a, Omacini et al. 2009).

En esta gramínea, el endófito coloniza la porción basal de las vainas (entre 1 y 3 cm por encima del entrenudo) y una vez inducida la floración, este crece dentro de las cañas colonizando el ovario de las semillas en formación. En su interacción con *L. multiflorum*, *N. occultans* produce alcaloides de la familia de las Lolinas, los cuales tienen efectos negativos sobre los consumidores de *L. multiflorum*.

Esta tesis no solo contribuye a entender la triple interacción pastos-endófitos-patógenos, sino que además nos permite verla en una escala de comunidad incluyendo a otros actores que pueden modular la infección, como es la comunidad de artrópodos del suelo, que interactúa con el patógeno durante una parte de su ciclo de vida, o los insectos vectores responsables de la dispersión de propágulos del patógeno; y a otros organismos que pueden beneficiarse con esta interacción como son las plantas vecinas.

1.6 Esquema de la tesis

Esta tesis fue estructurada de manera tal de ir subiendo de nivel de organización a medida que se avanza en el texto. En primer lugar realicé una revisión de la bibliografía publicada sobre el tema (Capítulo 2). A partir de aquellos trabajos en los que se informó valor de media, desvío estándar y número de repeticiones se realizó un metaanálisis. A través de este pude estudiar los efectos del tipo de aproximación utilizada, los grupos funcionales de patógenos y la identidad de las especies involucradas sobre el resultado de la triple interacción entre pastos, endófitos y patógenos. Luego evalué el efecto de la asociación con endófitos sobre el ataque del patógeno castrador *Claviceps purpurea* y el efecto de las condiciones ambientales sobre esta triple interacción (Capítulo 3). Más tarde, en el capítulo 4 evalué si el efecto protector conferido por la asociación con endófitos podría propagarse a plantas no simbióticas dentro de la comunidad, modificando así su estructura. En este capítulo también estudié los mecanismos que podrían estar operando por detrás de este resultado. Finalmente estudié cómo, produciendo cambios en la comunidad de invertebrados, la simbiosis con endófitos podría reducir la infección en la población. Para esto, se excluyeron del sistema aquellos insectos que podrían estar dispersando al patógeno *C. purpurea* y evalué el efecto de la exclusión sobre plantas simbióticas y no simbióticas (Capítulo 5). En este capítulo estudié también si los cambios producidos en la comunidad rizosférica, impactan sobre el ciclo de vida de un patógeno que cumple una parte de su ciclo en la superficie del suelo. Por último, en el capítulo 6 resumí los resultados correspondientes a cada

aproximación y se elaboré un modelo conceptual final integrando a cada uno de los elementos descritos en los capítulos anteriores. Los resultados de esta tesis indican que la simbiosis con endófitos interactúa de maneras complejas con la comunidad de patógenos, reduciendo el efecto de estos sobre la planta hospedante y favoreciendo en consecuencia la persistencia de la simbiosis.

Capítulo 2

EN BUSCA DE UN PATRÓN GENERAL: META-ANÁLISIS DE LA BIBLIOGRAFÍA.

2.1 Introducción

Estudiar el efecto de la simbiosis con hongos endófitos sobre la infección de la planta hospedante con un patógeno es una tarea de gran dificultad tanto conceptual como experimental e implica conjugar dos sistemas que ya de por sí son complejos de manera aislada (Mitchell 2003). Desde hace ya varias décadas se ha propuesto que la simbiosis podría tener efectos negativos sobre el ataque de patógenos (Christensen 1996, Clay y Schardl 2002, Cheplick y Faeth 2009). Sin embargo, este aspecto ha sido relativamente poco estudiado en comparación con otros como son la resistencia a la herbivoría o al estrés abiótico (Christensen 1996, Tian et al. 2008, Rodríguez et al. 2009b). La mayoría de los trabajos publicados al respecto soportan la hipótesis que postula que la simbiosis con endófitos reduce la infección por patógenos a pesar de que en otros estudios no se encontraron efectos (Trevathan 1996) o incluso se observó una promoción de la infección (Krauss et al. 2007, Gundel et al. 2013b). Las revisiones realizadas por Latch (2009) y Zabalgoeazcoa (2008) dan cuenta de esta heterogeneidad, sin embargo no han identificado los factores que la podrían estar generando.

En otros tipos de interacciones con organismos como son los herbívoros o los hongos micorrícicos, se ha asociado la heterogeneidad observada a diversos factores como son la identidad de la planta hospedante, del endófito, y de la tercera especie, así como también del efecto que produce esta última sobre la simbiosis (herbívoros masticadores, chupadores, etc.) (Saikkonen et al. 2010). El efecto de la simbiosis con endófitos sobre la interacción de la planta hospedante, no solo depende de la identidad de la simbiosis y el herbívoro involucrado, sino que cambia su valor dependiendo del tipo de explotación que realiza este de su hospedante (Saikkonen et al. 2010). Un caso análogo y quizás más cercano a los patógenos es el efecto de la interacción entre la planta y el endófito sobre el establecimiento de simbiosis con hongos formadores de micorrizas. Al respecto, muchos autores han encontrado promoción (Novas et al. 2005a, Popay y Jensen 2005, Novas et al. 2009) e inhibición de este mutualismo (Chu-Chou et al. 1992, Omacini et al. 2006, Omacini et al. 2012).

Se han propuesto dos vías para explicar de qué manera la simbiosis con microorganismos podría reducir la infección por patógenos (Capítulo 1) (Wehner et al. 2010). Por un lado las vías *directas* que incluyen la competencia por interferencia a través de la producción de compuestos fungistáticos por parte del endófito y la competencia por explotación en la que ambos organismos consumen el mismo recurso y el consumo por parte de uno impide que este sea aprovechado por el otro (Fig. 2.1 (D))(Wehner et al. 2010). Por otro lado, las vías *indirectas*, en las que la reducción de la infección pueden estar asociadas a cambios generados por el endófito sobre el ambiente, tanto biótico como abiótico, que impactan en la ecología del patógeno y su interacción con la planta hospedante (Fig. 2.1 (I)) (Pérez et al. 2013, Rúa et al. 2013). El análisis de las aproximaciones experimentales de los trabajos previos permite evaluar la importancia relativa de cada una de estas vías. Por un lado, el análisis de los ensayos realizados en caja de Petri y a nivel de planta individual, nos permite aislar los efectos

directos del endófito. Por el otro lado, los ensayos realizados en condiciones de campo nos indican el grado de realismo de los mecanismos observados en caja de petri, e integrar a los efectos indirectos mediados por la interacción de la simbiosis con otros miembros de la comunidad. Sin embargo, cabe destacar que si bien medida que aumenta la complejidad (Fig. 2.1 (I)), hay una mayor probabilidad de que nuestras observaciones tengan un mayor realismo, esto ocurre a expensas de precisión en los resultados.

El endófito cambia su distribución a lo largo del ciclo de la planta colonizando nuevos tejidos a medida que la planta hospedante avanza en su ontogenia, por lo que la importancia relativa de cada vía y el impacto sobre la simbiosis puede depender del tipo de tejido que explota el patógeno y del estadio ontogénico en que la planta se encuentra (Burdon 1993, Dobson y Crawley 1994). Dado que el éxito de la simbiosis a nivel poblacional depende del número de nuevos individuos simbióticos que puede aportar una planta simbiótica a la siguiente generación (Gundel et al. 2009b, Gundel et al. 2010, Gundel et al. 2011), podrían existir distintos tipos de respuestas dependiendo de si el patógeno es debilitador, castrador o asesino (Burdon 1993, Dobson y Crawley 1994). Por ejemplo, un patógeno *debilitador* que reduzca la tasa fotosintética, probablemente compita por fotosintatos con el endófito, y de acuerdo al resultado de esta la competencia, reduzca o no la transmisión del endófito a la próxima generación, al igual que ocurre con algunos herbívoros (García Parisi et al. 2012). Por otro lado, un patógeno *asesino*, que mate a su hospedante, para realizar un consumo saaprófito del mismo, directamente, eliminará una fuente de propágulos para el endófito. Finalmente, los *castradores* que reduzcan la fertilidad del hospedante van a impactar reduciendo el número de propágulos del endófito dentro de la población del endófito, de la misma forma que lo haría un granívoro (Knoch et al. 1993, Barger y Tannenbaum 1998). Sin embargo estos aspectos generalmente no son tenidos en cuenta al evaluar el efecto de la simbiosis sobre el proceso de infección por patógenos.

En este capítulo se estudió a través de meta-análisis de los trabajos publicados el efecto que tiene la simbiosis con endófitos sobre la infección de la planta hospedante por hongos patógenos. Asimismo se estudian algunos de los mecanismos que podrían estar involucrados. Las hipótesis asociadas a este capítulo son: a) el mutualismo con endófitos tiene efectos negativos sobre la interacción de la planta hospedante con hongos patógenos; b) este efecto puede cambiar en magnitud dependiendo de la escala en la que se realizó el experimento; c) el efecto de la simbiosis sobre la interacción depende del grupo funcional de patógenos que infectan a la planta hospedante (debilitadores; asesinos; castradores); d) este efecto varía con la identidad de las tres especies involucradas. Para ello los trabajos se agrupan según la aproximación experimental elegida (laboratorio, invernáculo o campo), el grupo funcional de patógeno que infectan la planta hospedante y o la identidad de las especies involucradas en la interacción.

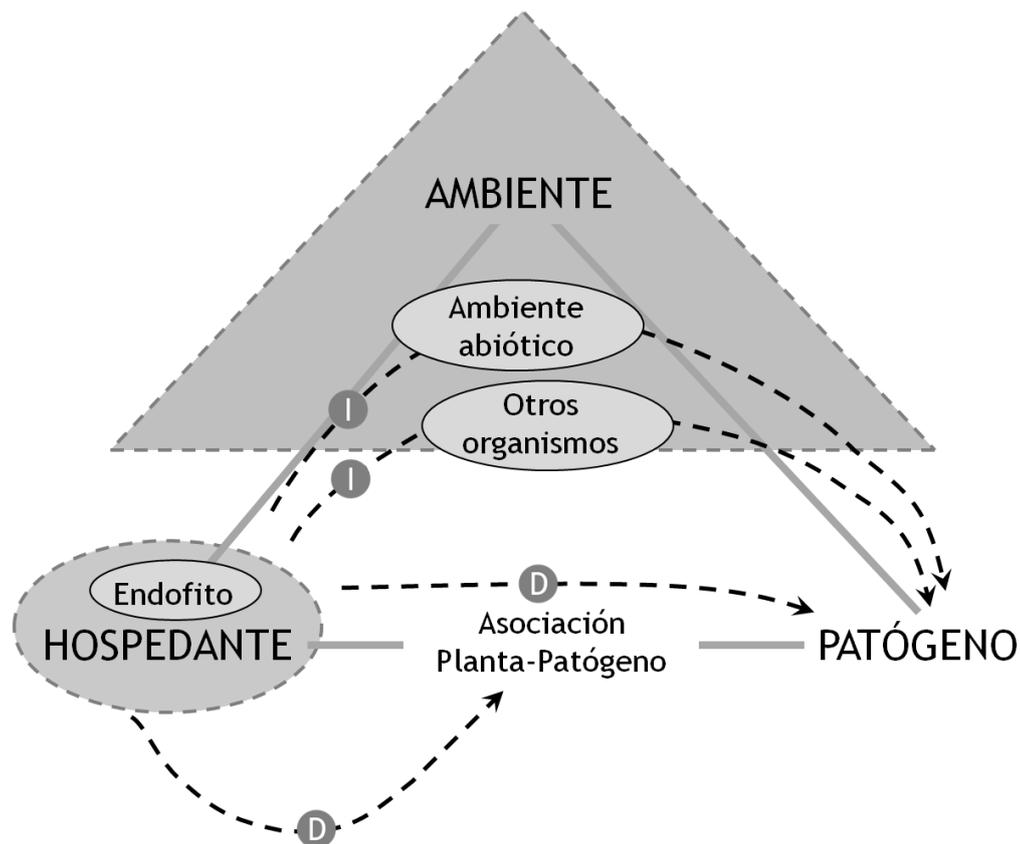


Figura 2.1. Esquema de las interacciones propuestas en este capítulo. D) Efectos directos del endófito sobre el patógeno o a través de cambios en su hospedante; I) Efecto indirecto del endófito sobre el patógeno modificando elementos del ambiente, tanto biótico como abiótico; Modificada de Burdon (1987).

2.2 Materiales y métodos

2.2. a. Búsqueda y selección de trabajos

Las búsquedas de los trabajos fueron realizadas a través del motor de búsqueda Scopus utilizando todas las combinaciones de las palabras claves: “endophyte” o “*Neothyphodium*” o “*Epichloe*”, “*Acremonium*” o “grass endophytes” y “disease” o “pathogens” o “parasitic”. A partir de los trabajos encontrados se realizó una búsqueda en la bibliografía de los mismos con el objetivo de incluir trabajos que pudieran no haber aparecido en la búsqueda anterior. Se conservaron solamente aquellos trabajos que brindaban la siguiente información estadística: media, desvío, error estándar o alguna otra medida de error, F y valor-p y número de repeticiones.

De los más de 40 trabajos que devolvió la búsqueda, 17 abordaban experimentalmente esta triple interacción y solo 9 de estas cumplieron con las condiciones necesarias para ser incluidos en el análisis (Cuadro 2.1). La información incluida en figuras fue digitalizada utilizando el software GetData Graph Digitizer V.2.24. De estos 9 trabajos se extrajeron 56 pares de datos independientes entre sí.

2.2. b. Cálculo de efectos y análisis estadísticos

Los análisis fueron llevados a cabo utilizando Metawin 2.0 (Rosenberg et al. 2000). El tamaño del efecto fue calculado utilizando Hedges' d (Rosenberg et al. 2000). Hedges' d fue calculado como

$$d = \frac{\bar{X}^c - \bar{X}^e}{S} \times J$$

dónde \bar{X}^c y \bar{X}^e son las medias del control y del tratamiento respectivamente, S es la varianza pooleada y J es un factor de corrección para tamaños muestrales reducidos (Rosenberg et al. 2000). El tamaño del efecto acumulado, los intervalos de confianza y la heterogeneidad total (Q_i) fue calculado para cada grupo de estudios (Hedges y Olkin 1985). El tamaño del efecto acumulado fue considerado significativo si el intervalo de confianza del 95% no se superponía con el cero (Rosenberg et al. 2000). Si el tamaño del efecto era significativamente distinto de cero, se calculó el "fail safe number" (n_{fs}) que nos sirvió como indicadores de sesgo en la publicación (2005). Este número estima la cantidad de trabajos nulos necesarios como para volver el valor del tamaño del efecto no significativo. Un n_{fs} mayor $5n + 10$, donde "n" representa al número de estudios incluidos en el análisis es un indicador fuerte de la ausencia de sesgo en la publicación.

Cuadro 2.1. Trabajos detectados en los que se estudió la interacción entre plantas, endófitos y patógenos. Estos se encuentran ordenados en función del apellido del primer autor. Solo aquellos marcados con un asterisco pudieron ser incluidos en el análisis

Autores	Título	Año	Revista	
Bonos et al.	Suppression of red thread in fine fescues through endophyte-mediated resistance.	2005	App Turfgrass Sci	*
Chu Chou et al.	Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the <i>Acremonium coenophialum</i> endophyte.	1992	Soil Biol. Biochem.	*
Clarke et al.	Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues	2006	Plant Disease	*
Hamilton C.E. Faeth S.H.	Asexual <i>Neotyphodium</i> endophytes in Arizona fescue: A test of the seed germination y pathogen resistance hypothesis	2005	Symbiosis	
Krauss et al.	Fungal grass endophytes, grass cultivars, nitrogen deposition y the associations with colonizing insects.	2007	6th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses	*
LI et al.	Interactions of <i>Neotyphodium gansuense</i> , <i>Achnatherum inebrians</i> y plant-pathogenic fungi	2007	Mycological Research	
Pañka et al.	Susceptibility of tall fescue to <i>Rhizoctonia zeae</i> infection as affected by endophyte symbiosis	2013	Annals of Applied Biology	
Pañka et al.	Production of phenolics y the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (<i>Lolium perenne</i> L.)/ <i>Neotyphodium lolii</i> association as a response to infection by <i>Fusarium poae</i>	2013	Journal of Plant Physiology	
Pérez et al.	Family issues: fungal endophyte protects host grass from the closely related pathogen <i>Claviceps purpurea</i>	2013	Fungal Ecology	*
Rúa et al.	Fungal endophyte infection y host genetic background jointly modulate host response to an aphid-transmitted viral pathogen	2013	Journal of Ecology	
Sabzaljan et al.	Reaction to powdery mildew fungus <i>Blumeria graminis</i> in endophyte-infected y endophyte-free tall y meadow fescues	2012	Australasian Plant Pathology	
Steinebrunner et al	Ecological role of volátiles produced by <i>Epichloe</i> : diferencias in antifungal toxicity	2008	FEMS Microbiol. Ecol.	*
Tian et al.	Effect of the endophyte <i>Neotyphodium lolii</i> on susceptibility y host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens	2008	European Journal of Plant Pathology	
Vignale et al.	Epichloid endophytes confer resistance to the smut <i>Ustilago bullata</i> in the wild grass <i>Bromus auleticus</i> (Trin.)	2013	Biological Control	
Wäli et al.	Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds)	2006	Canadian Journal of Botany	*
Welty y Azevedo	Occurrence of <i>Puccinia graminis subsp. graminicola</i> in Chewings fescue in Oregon	1995	Plant Disease	*
Xie et al.	A comparative study of the inhibitive effect of fungal endophytes on turf grass fungus pathogens	2008	Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica	*

2.3 Resultados

Los experimentos que cumplieron con los criterios de inclusión fueron realizados principalmente in-vitro (46%) a través ensayos de inhibición del crecimiento del patógeno y a campo (50 %). La simbiosis con endófitos tuvo un efecto principal negativo sobre los patógenos ($n_{fs}=761,5 > (5*n)+10= 290$) (Fig. 2.2.a.). El efecto varió de acuerdo a la aproximación experimental encontrándose diferencias significativas entre los distintos tipos de ensayos incluidos en el análisis. Sólo se encontraron efectos negativos significativos para los ensayos realizados en condiciones de laboratorio ($Q_b=11,6927$, $p= 0,002$, $df= 2$) si bien hubo una tendencia a un efecto negativo en los ensayos a campo. Cabe destacar que solo se pudieron incluir dos ensayos en

invernáculo en los que no se detectaron efectos del endófito sobre la relación entre los patógenos y el hospedante.

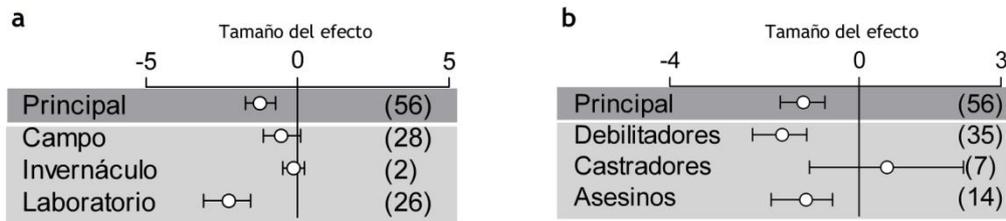


Figura 2.2. Efecto de la asociación con endófitos sobre la incidencia de patógenos de acuerdo al tipo de aproximación experimental elegida para poner a prueba la hipótesis (a) y el grupo funcional de patógenos utilizado (b). Los valores entre paréntesis representan el número de ensayos para esa variable.

La simbiosis con endófitos afectó de manera distinta a los patógenos debilitadores y asesinos que a los castradores. Mientras que en plantas simbióticas se observó una reducción en la incidencia de debilitadores y asesinos, no se observaron diferencias significativas en las plantas infectadas con patógenos que reducen la fertilidad de la planta hospedante ($Q_b = 10,5103$, $p = 0,00522$, $df = 2$) (Fig. 2.2.b.).

Se observaron asimismo diferencias en cuanto a la identidad de la simbiosis (planta hospedante x endófito). Si bien algunas especies mostraron efectos neutros, no se observaron casos en los que la presencia del endófito estimulara la infección por patógenos. Se encontró una heterogeneidad significativa entre las distintas simbiosis ($Q_b = 70,5491$, $p = 0,00$, $df = 6$) (Fig. 2.3.a.). La escasa cantidad de trabajos no nos permiten separar el efecto de la identidad de las especies de las metodologías adoptadas por cada grupo de investigación.

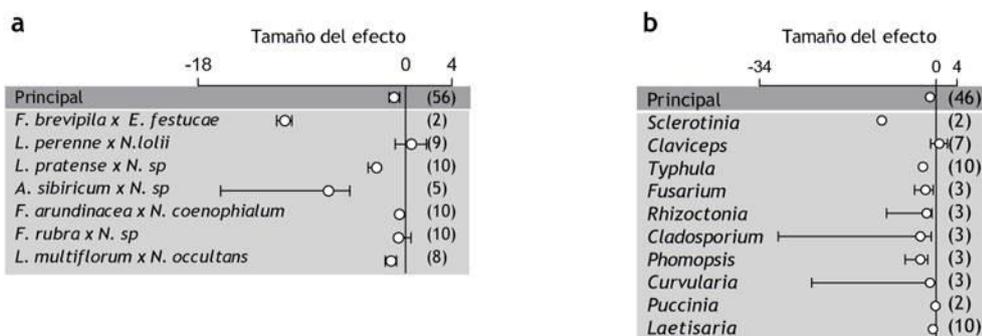


Figura 2.3. Efecto de la asociación con endófitos sobre la incidencia de patógenos de acuerdo a la interacción pasto endófito utilizada (a) y de acuerdo a la identidad del patógeno (b). Los valores entre paréntesis representan el número de ensayos para esa variable.

Finalmente se observó una gran heterogeneidad en cuanto al efecto sobre los distintos géneros de patógenos ($Q_b=44,0227$, $p=0,00$, $df= 9$) (Fig. 2.2.b). No se observó una repetición de patógenos entre distintos grupos de investigación, por lo que no podemos diferenciar el efecto del patógeno de la aproximación metodológica adoptada por cada grupo.

2.4 Discusión

Nuestros resultados demuestran que, tal como se enuncia frecuentemente, la simbiosis con endófitos tiene un efecto negativo sobre la infección por patógenos. La heterogeneidad asociada al tipo de experimento es quizás uno de los resultados más interesantes de este análisis ya que indicaría el efecto que tienen las condiciones ambientales sobre la interacción y el bajo grado de correspondencia entre lo observado en los ensayos realizados en laboratorio y en condiciones a campo (Cook y Baker 1983). Sumado a esto, es importante remarcar, que los ensayos realizados en condiciones de laboratorio podrían tener un sesgo hacia aquellos patógenos que pueden ser cultivados *in vitro*, y no pudiendo evaluar a los biótrosos en este tipo de experimentos, mientras que los ensayos llevados a cabo en condiciones naturales incluirían esta interacción.

Las diferencias observadas entre las distintas aproximaciones podrían estar relacionadas con el efecto del ambiente sobre el funcionamiento del sistema (Fig. 2.1 (I)). Tal como se ha observado en varios estudios recientes, el efecto de la simbiosis sobre la infección de la planta hospedante por hongos patógenos se encuentra modulada por el ambiente, tanto biótico como abiótico. Por ejemplo, Rúa et al. (2013) mostraron que el efecto protector de la simbiosis sobre la infección por virus se manifiesta solo en presencia de áfidos que actúan como vectores del virus y que son sensibles a la presencia del endófito en la planta. Paralelamente, Pérez et al. (2013) encontraron que un efecto protector del endófito ante el ataque de patógenos puede disolverse al someter a la planta hospedante a condiciones de estrés.

Si bien el número de ensayos realizados con cada grupo funcional de patógenos no es equitativo, nuestros resultados indican que podría haber diferencias entre grupos. El efecto de las simbiosis sobre los castradores no mostró diferencias significativas, sin embargo este grupo se diferenció de los demás. Estos patógenos tienen un vínculo más estrecho con el endófito que los debilitadores o los asesinos, ya que deben competir con el endófito por el ovario, y dado que estos últimos son transmitidos exclusivamente de manera vertical, el resultado de la interacción entre la planta hospedante y estos dos hongos parecería ser un punto crítico para asegurar su persistencia dentro de las poblaciones del hospedante (Pérez et al. 2013).

Paralelamente, se observó una gran heterogeneidad asociada a la identidad de las especies tanto de hospedante como de patógeno (Siegel y Latch 1991, Christensen 1996, Wäli et al. 2006). Esta estaría asociada a los sistemas planta-endofito- patógeno utilizados por los distintos grupos de investigación. El bajo número de trabajos publicados, no permitió una mayor exploración del sistema, y la discusión de los

resultados arrojó nuevas preguntas que deberían ser consideradas al momento de realizar nuevos experimentos sobre esta interacción. Un estudio reciente publicado por Vignale et al. (2013) no encontró diferencias en la transmisión causadas por la infección por el patógeno castrador *Ustilago bullata*. Sin lugar a dudas, el efecto de la infección por patógenos sobre la transmisión del endófito, es una cara de esta triple interacción a la que no se le ha prestado atención hasta el momento y que debería ser incluida en futuras investigaciones.

En síntesis, en este capítulo se realizó un meta-análisis de la bibliografía publicada sobre la triple interacción entre pastos, endófitos y patógenos que reveló que existe un efecto general robusto de la simbiosis reduciendo la infección por patógenos en la planta hospedante. Sin embargo, se observó existe una gran heterogeneidad asociada a diversos factores como son el tipo de aproximación experimental y la identidad de los organismos. El análisis realizado permitió generar hipótesis asociadas con el rol del ambiente y otros organismos de la comunidad que fueron puestas a prueba en otros capítulos de esta tesis. La triple interacción entre plantas, endófitos y patógenos aún se encuentra en sus inicios y son necesarios nuevos estudios que aborden algunas las preguntas que surgieron de este análisis.

Capítulo 3

EFECTO DEL ENDÓFITO SOBRE LA INFECCIÓN POR PATÓGENOS A NIVEL INDIVIDUAL Y POBLACIONAL Y EL ROL DEL AMBIENTE COMO MODULADOR DE ESTA INTERACCIÓN

3.1 Introducción

Las tasas vitales asociadas al estadio seminal -producción de semillas y germinación- son determinantes de la dinámica poblacional del pasto hospedante y también del hongo endófito de transmisión verticalmente (Ravel et al. 1997, Gundel et al. 2008a). De esta manera, la semilla es un órgano clave para la transmisión del endófito a la siguiente generación (Philipson y Christey 1986, Majewska-Sawka y Nakashima 2004, Gundel et al. 2008a) y cualquier patógeno que infecte este órgano constituye una amenaza para la persistencia del endófito en la población (Pérez et al. 2013). El grupo funcional de patógenos denominados castradores reducen la fecundidad de las plantas sin causar efectos aparentes sobre el crecimiento vegetativo (por ejemplo, carbones, choke, o ergot) (Burdon 1993). Por lo tanto, la infección de una planta asociada a endófitos por parte de patógenos castradores resultaría en una interacción más estrecha que la que se establece con otros patógenos como son los debilitadores o los asesinos. En este capítulo se explora el efecto de la simbiosis con endófito sobre la interacción entre la planta hospedante y el patógeno “castrador” *Claviceps purpurea*.

El hongo *C. purpurea* es un patógeno biótrofo que causa la enfermedad denominada “ergot” en distintas especies de pastos, muchas de ellas cultivos, malezas y forrajes (Alderman 1993). Históricamente se ha estudiado debido a sus consecuencias negativas sobre los rendimientos de los cultivos y las intoxicaciones en el ganado debido al consumo de plantas infectadas. Estos efectos tóxicos están estrechamente ligados a la producción de ergotamina y otros alcaloides (Diekman y Green 1992, Alderman et al. 1998). La infección de la planta hospedante se produce cuando una ascospora germina sobre la flor de un pasto y crece hacia el interior del ovario, produciendo inicialmente solución azucarada saturada en conidios que puede ser dispersada por el viento, agua o por los insectos que llegan a la flor en busca de azúcar y causar nuevas infecciones. Durante la maduración de las semillas, las flores infectadas eventualmente desarrollan una estructura fúngica denominada esclerocio. Durante el proceso de infección no se observan síntomas de necrosis pero sí un redireccionamiento de fotoasimilados hacia las flores infectadas (Bacon y Luttrell 1982).

A pesar de que no se ha descrito el proceso de infección simultánea, es interesante que en el mismo momento en el que *C. purpurea* infecta la flor, el endófito *Neotyphodium* se encuentra creciendo hacia adentro del ovario (Philipson y Christey 1986, Majewska-Sawka y Nakashima 2004). Esto crea una oportunidad única para la interacción de éstos dos hongos altamente emparentados (familia Clavicipitaceae (Ascomycota); (Moon et al. 2002)). Dado que los endófitos *Neotyphodium* se transmiten exclusivamente de manera vertical, el resultado de la interacción entre la planta hospedante y estos dos hongos durante la colonización del ovario parece ser un punto crítico para su persistencia dentro de las poblaciones del hospedante.

En este capítulo se exploró la relación entre dos especies de hongos estrechamente relacionados filogenéticamente pero con efectos opuestos sobre el pasto hospedante *Lolium multiflorum*: *Neotyphodium occultans*, un endófito mutualista, y *C. purpurea*, un patógeno castrador. Las hipótesis propuestas en este capítulo son: a) la simbiosis

entre pastos y endófitos inhibe la infección por hongos patógenos, especialmente porque compiten por el mismo órgano, esencial para su reproducción; b) la protección contra el ataque de los patógenos conferida por la asociación con endófitos se rompería al someter a las primeras a condiciones de estrés. Estas hipótesis fueron puestas a prueba a través de dos experimentos en los cuales se sometió a plantas simbióticas y no simbióticas de *L. multiflorum* a infección natural por *C. purpurea*. Considerando que la susceptibilidad a patógenos puede ser mayor en plantas sometidas a condiciones de estrés, y que el mutualismo podría romperse en estas condiciones (Katan y Eshel 1973, Altman y Campbell 1977, Kiers et al. 2010, Gundel et al. 2012b), las plantas fueron expuestas a dosis sub-letales del herbicida diclofop-methyl. Estudios previos muestran que la simbiosis *L. multiflorum* - *N. occultans* aumenta la tolerancia de la planta hospedante a herbicidas (Vila-Aiub et al. 2003, Martínez-Ghersa et al. 2004, Gundel et al. 2012b), pero que su efecto protector ante los herbívoros se reduce en las plantas sobrevivientes al estrés (Gundel et al. 2012b). Este estudio nos brinda nuevas herramientas para entender las relaciones ecológicas y evolutivas entre dos organismos muy relacionados que con efectos antagónicos compiten por el mismo recurso.

3.2 Materiales y métodos

3.2. a Material vegetal

Lolium multiflorum Lam. (ryegras anual) es un pasto exótico naturalizado de gran dominancia en de los pastizales de la región pampeana (Soriano 1992). Caracterizado como una especie competitiva-ruderal, su éxito en la invasión de los pastizales Pampeanos ha sido asociada a la presencia del endófito *Neotyphodium occultans* y a la producción de una capa gruesa de broza que reduce la germinación y el establecimiento de plántulas de otras especies (Gundel et al. 2009a, Omacini et al. 2009).

Semillas maduras de *L. multiflorum* fueron recolectadas de poblaciones naturalizadas de la región Pampeana, Argentina (34°06'S, 60°25'W). Una evaluación preliminar mostró que estas semillas presentaban un 95% de asociación con endófito (en base a 100 semillas teñidas con una solución de Rosa de Bengala (Etanol 5 ml, Rosa de Bengala 0,5 g y agua destilada 95 ml) y observadas en microscopio óptico 40x (Bacon y White 1994)). Las semillas no simbióticas se generaron a partir del tratamiento de las semillas simbióticas con el fungicida sistémico Triadimenol (150 g p.a. kg⁻¹; dosis: 5 mg por gramo de semilla). Las semillas tratadas (E-) y no tratadas (E+) con fungicida, fueron cultivadas en parcelas independientes pero adyacentes de 1 m² en el campo experimental de la facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Ambas poblaciones fueron cultivadas más de una generación para disminuir cualquier efecto fitotóxico del herbicida. Se permitió el flujo de polen entre ambas poblaciones con el objetivo de evitar cualquier tipo de divergencia genética entre las mismas (Gundel et al. 2012b). Previo a la utilización de las semillas en los experimentos, se tomaron 100 semillas para determinar la proporción de asociación con endófitos utilizando la misma técnica anterior (Bacon y White 1994). Los porcentajes

de infección fueron 90% de semillas simbióticas para las no tratadas (E+) y 15% para las tratadas (E-).

3.2. b Experimento 1

El experimento 1 fue llevado a cabo en campo experimental de la Facultad de Agronomía para evaluar el efecto de la simbiosis con endófitos sobre la infección por el patógeno *C. purpurea* en plantas de *L. multiflorum*. Se establecieron 14 parcelas de 1 m² separadas entre sí por pasillos de 0,5 m. La mitad de las parcelas fueron sembradas con semillas E+ y la otra con semillas E-. La asignación de las parcelas a uno u otro biotipos fue al azar. La siembra se realizó en otoño (Marzo) a razón de 8 gramos de semillas (\approx 4000 semillas) por parcela. Las semillas fueron cubiertas con una fina capa de tierra para asegurar el establecimiento. Además se colocó por encima de las semillas una red de 0,5 mm de malla para evitar el consumo de las mismas por parte de aves. La tasa efectiva de germinación fue de aproximadamente 500 plantas/m⁻² para ambos biotipos. Las parcelas se mantuvieron libres de malezas y se las regó según la demanda. Al momento de la madurez de las plantas (Diciembre), se tomaron dos sub muestras de biomasa aérea de cada parcela con la ayuda de un aro de alambre ($r = 15$ cm) colocado al ras del suelo. El material cosechado fue secado en estufa a 70° C por 7 días. En cada sub muestra se separaron y pesaron hojas por un lado y semillas, espigas y cañas por el otro. El número de espigas por parcela también fue registrado. La incidencia natural de *C. purpurea* fue estimada como el porcentaje de espigas con al menos un esclerocio, mientras que la severidad fue estimada como la proporción de esclerocios dentro de cada espiga (Fisher et al. 2005).

3.2. c Experimento 2

El experimento 2 fue llevado a cabo para evaluar el efecto de la simbiosis con *N. occultans* sobre la resistencia del pasto hospedante *L. multiflorum* a la infección por *C. purpurea* en condiciones normales y bajo estrés ambiental por aplicación de herbicidas. Para esto se llenaron 12 macetas (25 L capacidad) con una mezcla de tierra, arena y turba (50/25/25). La mitad de ellas fueron sembradas con semillas simbióticas (E+) y la otra mitad con semillas no simbióticas (E-) a razón de 9 plantas por maceta. Al momento en el que las plantas tenían entre 2 y 3 hojas expandidas, a la mitad de las macetas con plantas simbióticas y la mitad de las no-simbióticas se le aplicó mediante aspersion una dosis sub-letal de herbicida diclofop-methyl (70 g pa ha⁻¹). El herbicida fue aplicado mediante aspersion manual a presión constante. El mecanismo de acción de este herbicida en las plantas blanco es mediante la inhibición de la biosíntesis de lípidos y estrés oxidativo (Vila-Aiub et al. 2003, Martínez-Ghersa et al. 2004, Gundel et al. 2012b). El experimento se mantuvo en el exterior durante toda la estación de crecimiento de la planta y las macetas fueron regadas a demanda. En la madurez, las espigas de cada planta fueron individualmente recolectadas. Se registraron variables reproductivas como número de espigas, espiguillas por espiga, número de semillas por

planta y peso de las semillas, y variables asociadas a la infección como son número de plantas infectadas por *C. purpurea* y número de espigas infectadas por planta.

Todas las variables medidas en el experimento 1 fueron analizadas por medio de un ANOVA con el nivel simbiótico como factor. Las variables medidas en el experimento 2 fueron analizadas mediante un ANOVA de dos factores, con el nivel simbiótico y el herbicida como factores. La severidad fue transformada con Log_{10} para lograr homocedasticidad. La supervivencia fue transformada utilizando $\text{arcsen}(\text{Raíz}^2(p))$ para alcanzar homocedasticidad. El número de semillas por planta fue transformado utilizando LN para alcanzar homocedasticidad.

3.3 Resultados

3.3. a Experimento 1

La biomasa vegetativa fue mayor en las plantas simbióticas que en las no simbióticas ($F_{1,12} = 5,10$; $p = 0,043$), sin embargo no se encontraron diferencias en cuanto a biomasa reproductiva (Fig. 3.1).

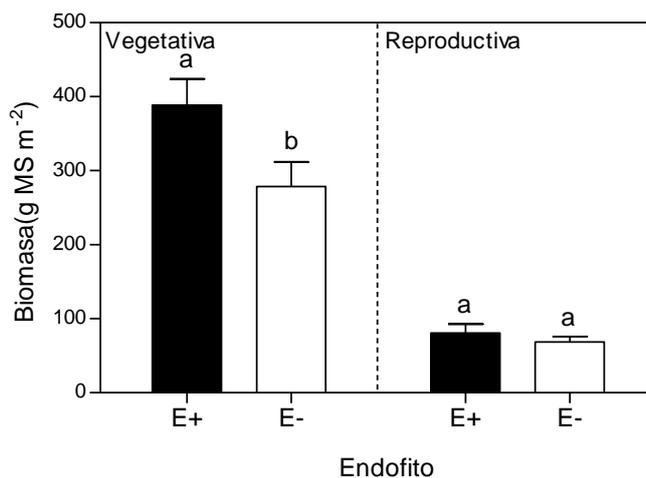


Figura 3.1. Biomasa vegetativa y reproductiva de plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* pertenecientes al experimento 1. Los valores representan a la media y al error estándar. ($n = 7$). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

La incidencia de *C. purpurea* en plantas de *L. multiflorum* fue reducida significativamente por la asociación simbiótica con el endófito *N. occultans*. El número de espigas fue tres veces mayor en las parcelas con plantas simbióticas en relación a las no simbióticas ($F_{1,12} = 28,49$; $p < 0,001$, Fig. 3.2), sin embargo, el porcentaje de espigas con esclerocios de *C. purpurea* fue tres veces menor en las parcelas E+ que en las E- ($F_{1,12} = 21,52$; $p < 0,001$; Fig. 3.3a).

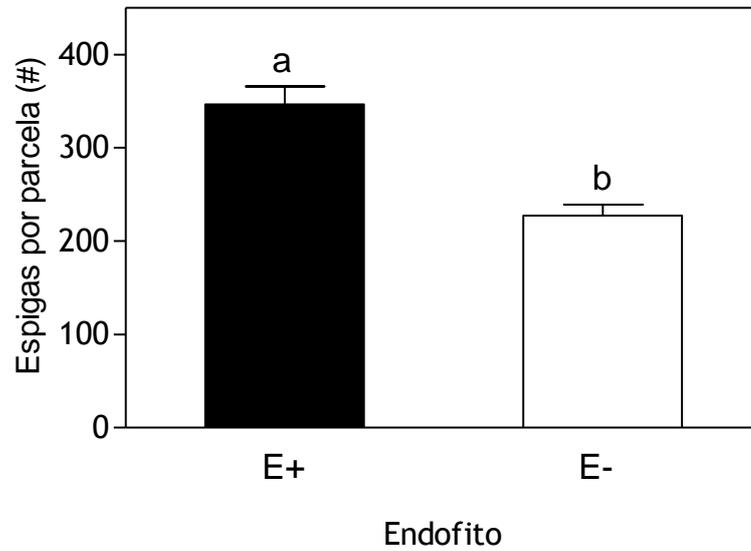


Figura 3.2. Número de espigas por parcela sembrada con plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* pertenecientes al experimento 1. Los valores representan a la media y al error estándar. (n = 7). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable.

De la misma manera, a nivel de espiga la infección fue menor en las plantas asociadas a endófitos que en las no asociadas ($F_{1,12} = 18,40$; $p = 0,001$; Fig. 3.3b).

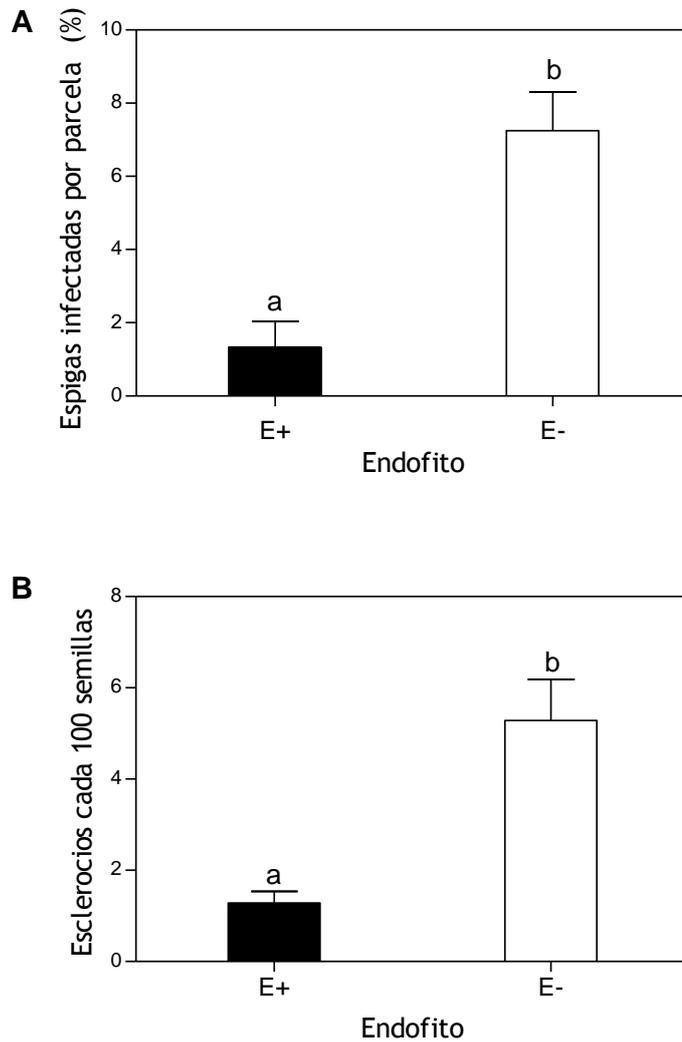


Figura 3.3. Porcentaje de espigas (A) y semillas (B) infectadas por *Claviceps purpurea* en plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* pertenecientes al experimento 1. Los valores representan a la media y al error estándar. (n = 7). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

3.3. b Experimento 2

Independientemente del nivel de asociación, la supervivencia de las plantas a las plantas a las cuales se le aplicó herbicida fue un 50% menor que en el control ($F_{1,8} = 150$; $p < 0,001$)(Fig. 3.4).

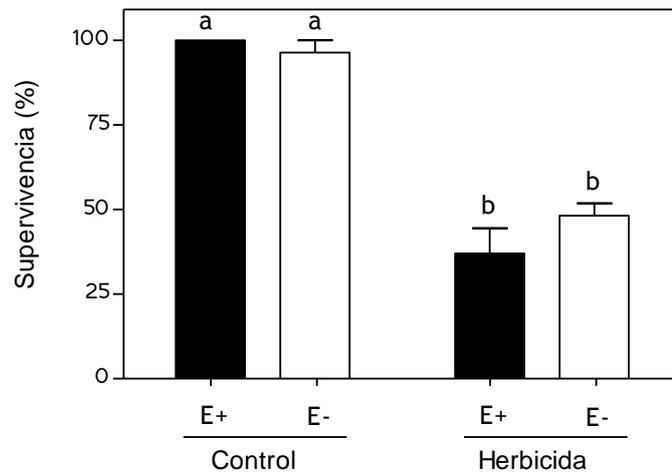


Figura 3.4. Supervivencia de plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* bajo dos niveles de estrés por herbicidas [Sin herbicida (control) y Herbicida (70 g ai/ha)] pertenecientes al experimento. Los valores representan a la media y al error estándar (n = 3). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable (test de Tukey, $p < 0,05$)

Se observó un aumento en el número de espigas y de semillas en plantas tratadas con herbicida independientemente del estado endofítico, mientras que no se observaron diferencias en cuanto al número de espiguillas y peso de las semillas (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Número de espigas, espiguillas por espiga, semillas y peso medio de las semillas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+) y no simbióticas (E-) con el endófito *Neotyphodium occultans* bajo dos niveles de estrés por herbicidas [Sin herbicida (control) y Herbicida (70 g ai/ha)] pertenecientes al experimento 2.

Endofito	Herbicida	n	Espigas por planta		Espiguillas por espiga		Semillas por planta		Peso de semillas (g)					
			Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES				
E-	0	3	12,5	2,37	a	18,89	0,388	a	915,4	285,3	a	0,0020	0,0001	a
	70	3	43	3,18	b	20	0,444	a	2537	199,4	ab	0,0022	0,0002	a
E+	0	3	10,3	0,541	a	19,84	0,692	a	620,3	115,2	a	0,0024	0,0001	a
	70	3	48,6	5,78	b	25,64	2,909	a	3920	1140	b	0,0025	0,0001	a

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada (test de Tukey, $p < 0,05$)

El número de semillas producidas por las plantas tratadas con herbicida duplicó al de las no tratadas tanto en plantas simbióticas como en no simbióticas ($F_{1,8} = 5,86$; $p = 0,042$; Cuadro 1). La incidencia de *C. purpurea* en las macetas con plantas simbióticas fue tres veces menor a aquellas observadas en las macetas con plantas no simbióticas ($F_{1,8} = 9,69$; $p = 0,014$; Fig. 3.5a). Esta diferencia no se observó con la aplicación de

herbicida ($F_{1,8} = 9,69$; $p = 0,014$; Fig. 3.5a). A nivel individual no hubo un efecto significativo del endófito sobre la infección (Fig. 3.5b).

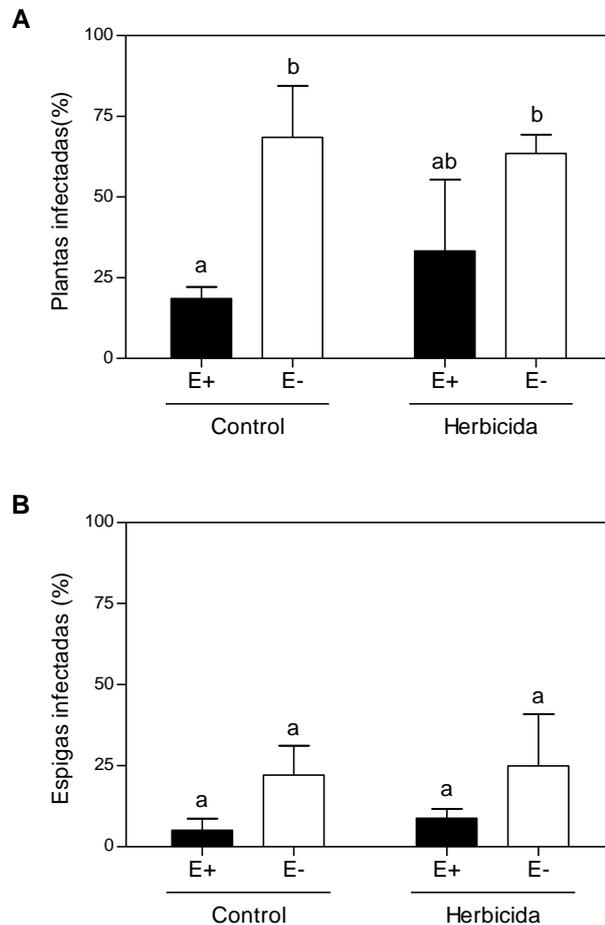


Figura 3.5. Porcentaje of plantas (A) y espigas (B) infectadas por *Claviceps purpurea* plantas de *Lolium multiflorum* simbióticas (E+: barras negras) y no simbióticas (E-: barras blancas) con el endófito *Neotyphodium occultans* bajo dos niveles de estrés por herbicidas [Sin herbicida (control) y Herbicida (70 g ai/ha)] pertenecientes al experimento 2. Los valores representan a la media y al error estándar (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable (test de Tukey, $p < 0,05$)

3.4 Discusión

Este experimento muestra que la simbiosis entre pastos y hongos endófitos de transmisión vertical modifica la interacción del pasto hospedante con hongos patógenos. En particular, en nuestro sistema tripartito, la simbiosis con *N. occultans* estuvo asociada con una menor incidencia del patógeno *C. purpurea* por medio de una reducción en los parámetros poblacionales de la infección. A pesar de la claramente mayor resistencia a la infección observada en las plantas simbióticas, no hubo efectos de que esta última modificara la producción de semillas. Esto podría interpretarse como

que las plantas no simbióticas pudieron compensar las semillas abortadas mediante una mayor producción de flores. Estas estrategias contrastantes entre plantas simbióticas y no simbióticas podrían reflejar el compromiso entre resistencia y tolerancia durante la evolución de la asociación (Karban y Baldwin 1997, Partida-Martinez y Heil 2011). Estas mismas estrategias se han observado en la respuesta a la defoliación por parte de herbívoros (Saari et al. 2010, Partida-Martinez y Heil 2011). Además, nuestros resultados señalan que la resistencia al ataque de *C. purpurea* mediada por la asociación con endófitos fue altamente dependiente de las condiciones ambientales, lo que concuerda con la idea generalizada de que el balance de la relación mutualista podría verse afectada negativamente ante situaciones estresantes o restrictivas en términos de recursos (Hahn et al. 2008, Gundel et al. 2012b)

Nuestros resultados concuerdan con la hipótesis que postula que los endófitos podrían tener un rol protector que va más allá de la producción de alcaloides de efecto anti-herbivoría (Bush et al. 1997, Clay y Schardl 2002), y que podría ser efectivo contra enfermedades. Esto se encuentra robustamente soportado por los resultados de experimentos realizados in vitro que muestran actividad antifúngica en los extractos de plantas simbióticas (Siegel y Latch 1991, Clay y Schardl 2002, Popay y Bonos 2008, Rodríguez et al. 2009b). Otra explicación podría estar basada en una mayor producción de antioxidantes (White Jr y Torres 2010, Hamilton et al. 2012). Este mismo mecanismo serviría para explicar la mayor tolerancia de plantas simbióticas a las condiciones de estrés en general y a las causadas por herbicidas en particular (Martínez-Ghersa et al. 2004, Gundel et al. 2012b). Sin embargo, el balance entre mecanismos alternativos o el efecto cruzado del mismo mecanismo podría romperse, tal como se ha observado con la aplicación de sequía y herbicidas, afectando la producción de alcaloides y la efectividad de los mecanismos anti-herbivoría (Hahn et al. 2008, Gundel et al. 2012b).

Considerando los atributos ecológicos de *C. purpurea*, sería esperable que los mecanismos detrás de la reducción de la infección en plantas simbióticas, estén vinculados a interacciones ecológicas en lugar de fisiológicas. La infección podría estar modulada por cambios fenotípicos generados por el endófito en la planta hospedante, como pueden ser cambios en el número de flores, producción de polen, tamaño y número de espigas. Todos esos atributos pueden finalmente modificar la incidencia y la severidad de un patógeno en una población (Thakur y Williams 1980). Por ejemplo, la carga de polen y su relación con el proceso de floración puede ejercer algún control sobre la severidad ya que *C. purpurea* a menudo compete con el polen por la llegada al ovario. *N. occultans* coloniza el ovario previo a la germinación del grano de polen en el estigma y crece a lo largo de la formación de la semilla (Philipson y Christey 1986, Majewska-Sawka y Nakashima 2004). Alternativamente, las ascosporas de *C. purpurea* germinan en el estigma y comienzan a crecer hacia el óvulo (Bacon y Luttrell 1982). De esta manera, la flor se convierte en el campo de batalla para la interacción entre estos dos hongos, estrechamente emparentados, pero con efectos opuestos sobre el hospedante. En esta instancia, los efectos fungistáticos que se han observado en experimentos in vitro pueden tener un rol importante (Siegel y Latch 1991, Yue et al.

2000b, Ren et al. 2009). A esto se le suman los cambios en la biomasa, asociados a una mayor producción en las plantas simbióticas que en las no simbióticas (Vila-Aiub et al. 2005, Gundel et al. 2012a, Gundel et al. 2013a). De acuerdo con esto resultaría interesante observar de qué manera estos cambios impactan en la estructura del canopeo y por ende en el comportamiento de insectos que podrían estar transportando esporas de *C. purpurea* (Prom et al. 2003, Prom y Lopez Jr 2004, Prom et al. 2005). Finalmente, otros aspectos de la simbiosis con endófitos del género *Neotyphodium* como es la repulsión de insectos que podrían transportar ascosporas de *C. purpurea*, podría ser un mecanismo que explique estos resultados (ver Steinebrunner et al. (2008a, b)) .

Estudios recientes sugieren que el efecto del genotipo podría ser más importante que el generado por el endófito. En un experimento llevado a cabo en Suiza, la incidencia de *C. purpurea* en *Lolium perenne* (raigrás perenne) fue mayor en las plantas simbióticas, pero también dependiente del cultivar utilizado (Krauss et al. 2007). En otro experimento llevado a cabo en Finlandia, la incidencia del mismo patógeno sobre *Schedonorus phoenix* (festuca alta) también demostró ser dependiente del genotipo de la planta y su asociación con endófitos (Gundel et al. 2012a). Ninguno de los experimentos incluyó la manipulación del patógeno como un tratamiento. Futuros experimentos deberían apuntar al control del inóculo y la manipulación de la identidad genética de todos los miembros de la interacción.

En resumen, nuestros resultados señalan que los endófitos podrían tener un rol crítico sobre la epidemiología de *C. purpurea* en poblaciones de las poblaciones de *L. multiflorum* en escenarios ecológicos. El rol del endófito sobre las interacciones entre el pasto hospedante y hongos patógenos ha sido explorado principalmente en condiciones controladas sugiriendo que la fungistasis sería el principal mecanismo operando detrás de esta triple interacción. Dado que el patrón de respuesta se vio modificado por la aplicación de estrés, los futuros experimentos deberían explorar los mecanismos cruzados entre la protección generada por el endófito y la respuesta a situaciones de estrés. Esto resulta de vital importancia al momento de intentar predecir la manera en la que los cambios climáticos impactarán sobre las interacciones positivas (Thompson 2005, Kiers et al. 2010). Se deberá prestar especial atención a las relaciones filogenéticas entre los simbiosistas y al ambiente abiótico, como factores que podrían modificar el resultado de esta triple interacción planta- endófito- patógeno.

Capítulo 4

IMPACTO DEL MUTUALISMO SOBRE PATÓGENOS EN COMUNIDADES VEGETALES.

4.1 Introducción

La simbiosis con microorganismos tiene efectos sobre la interacción de la planta hospedante con su entorno por diversas vías (Rudgers et al. 2005, Omacini et al. 2006, Rudgers y Clay 2007, Rudgers et al. 2007, Omacini et al. 2009). Los cambios producidos por la simbiosis en el ambiente biótico están frecuentemente mediados por cambios generados en el ambiente abiótico (Van Der Heijden et al. 2006). Por ejemplo, la asociación con rizobios puede aumentar la disponibilidad de nutrientes que puede ser aprovechado por otras plantas no simbióticas (Van Der Heijden et al. 2006, Pirhofer-Walzl et al. 2012). Este y otros cambios en el ambiente rizosférico pueden modular el éxito de otras especies vecinas (Omacini et al. 2006, Rudgers y Clay 2007, 2008, Kothamasi et al. 2009, Rudgers et al. 2010). En el caso de asociaciones parasíticas, la presencia de patógenos también puede promover cambios importantes tanto en la estructura como en el funcionamiento de comunidades vegetales por estas vías (Burdon 1987, 1993, Gilbert 2002, Alexander 2010). Por ejemplo, un patógeno que afecte a las especies dominantes, aumentará indirectamente la proporción de otras especies dentro de la comunidad, mientras que por el contrario, aquellos que ataquen solo a las especies raras, disminuirán la diversidad en la comunidad (Holt 1984, Alexander y Holt 1998).

A la simbiosis con endófitos se la asocia en numerosas ocasiones con cambios en la comunidad vegetal, sin embargo los mecanismos involucrados rara vez son establecidos (Rudgers et al. 2004, Rudgers et al. 2005, Omacini et al. 2006, Rudgers et al. 2007, Omacini et al. 2009, Rudgers et al. 2010). Estos cambios son asociados principalmente a incrementos en la habilidad competitiva de la planta hospedante, y a una mayor acumulación de biomasa al final de la estación de crecimiento, interfiriendo con la emergencia y el crecimiento de otras especies de la comunidad (Marks et al. 1991, Matthews y Clay 2001). Sin embargo, esta simbiosis puede tener numerosos efectos sobre otras especies vegetales a través de su interacción con la comunidad de microorganismos del suelo. Si bien esto fue observado por numerosos autores, el impacto de estos sobre otras plantas no asociadas a endófitos solo fue sugerido por Omacini et al. (2006) y más tarde por Novas (2009; 2011) y Rudgers y Orr (2009). Esta última señala que el efecto indirecto negativo del endófito sobre el desarrollo de plantas de otras especies podría estar mediado por cambios en la comunidad de microorganismos del suelo, en particular micorrizas y patógenos que afecten el éxito de individuos no simbióticos vecinos.

Los mecanismos propuestos para explicar en qué forma endófitos interactúan con microorganismos del suelo son numerosos. Si bien el efecto negativo del endófito sobre la micorrización de la planta hospedante y sus vecinas ha sido observado en numerosas ocasiones, no existen trabajos que evalúen los mecanismos detrás de este efecto. Se ha sugerido que este patrón podría deberse a la producción de compuestos secundarios por parte del endófito (Bush et al. 1997, Denison et al. 2003). En cuanto a el efecto sobre patógenos de suelo, solo el estudio realizado por Chu-Chou et al. (1992) cuantificó el efecto de la simbiosis con endófito sobre el número de esporas de patógenos sin

encontrar diferencias entre los tratamientos. Sin embargo no se estimó el efecto de estos cambios sobre la planta hospedante o sus vecinas.

En este capítulo se estudió el rol de la simbiosis con endófitos en la resistencia a patógenos causantes de muerte pre- emergencia en *L. multiflorum*, y los efectos de esta triple interacción sobre otras especies dentro de la comunidad vegetal. Asimismo se estudiaron algunos de los mecanismos que podrían estar involucrados. Las hipótesis asociadas a este capítulo son: a) La asociación con hongos endófitos tendrá un efecto negativo sobre los patógenos que podría impactar sobre la emergencia de la planta hospedante; b) Esta inhibición del crecimiento de los patógenos podría impactar positivamente sobre la emergencia de otras especies dentro de la comunidad vegetal; c) Estos cambios estarían modulados en parte por las señales en el ambiente por la biomasa de *L. multiflorum*. Este capítulo consta de tres experimentos. En los tres experimentos se manipuló presencia de endófitos para generar poblaciones con alto y bajo nivel de asociación. El experimento 1 incluyó la manipulación de la identidad de los patógenos Para estimar su efecto sobre plantas simbióticas y no simbióticas. En el experimento 2 se buscó determinar los mecanismos que podrían estar operando detrás de la resistencia de las plantas asociadas a endófitos al ataque de patógenos. Para esto se manipuló la presencia de inóculo de distintas especies de patógenos. Se estudió el efecto de la presencia del endófito sobre el crecimiento de los patógenos durante la germinación. En el experimento 3 se investigó cuál podría ser el efecto de la inhibición del patógeno sobre el establecimiento de otras especies. Para esto se utilizaron 3 especies de pastizal nativo, y dos combinaciones de condiciones ambientales: tipos de suelo (pastizal nativo vs suelo dominado por *L. multiflorum*) y Broza de plantas E+ o E-

4.2 Materiales y métodos

4.2. a Material vegetal

Lolium multiflorum Lam. (ryegras anual) es un pasto exótico naturalizado de gran dominancia dentro de los pastizales de la región pampeana (Soriano 1992). Caracterizado como una especie competitiva-ruderal, su éxito en la invasión de los pastizales Pampeanos ha sido asociada a la presencia del endófito *Neotyphodium occultans* y a la producción de una capa gruesa de broza que reduce la germinación y el establecimiento de plántulas de otras especies. (Vila-Aiub et al. 2005, Gundel et al. 2009a, Omacini et al. 2009).

Las semillas maduras de *L. multiflorum* fueron recolectadas de poblaciones naturalizadas de la región Pampeana, Argentina (34°06'S, 60°25'W). Una evaluación preliminar mostró que estas poblaciones tenían un porcentaje de plantas asociadas a endófitos de un 95% (basado en la observación a microscopio óptico de 100 semillas teñidas con una solución de Rosa de Bengala (Etanol 5 ml, Rosa de Bengala 0,5 g y agua destilada 95 ml) (Bacon y White 1994). Las semillas no simbióticas se generaron a partir del tratamiento de las semillas simbióticas con el fungicida sistémico Triadimenol (150 g p.a. kg⁻¹; dosis: 5 mg por gramo de semilla). Ambos biotipos, simbióticas (E+) y

no simbióticas (E-) fueron cultivados en monocultivo en parcelas adyacentes de 1 m² en el campo experimental de la facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires más de una generación para disminuir cualquier efecto fitotóxico del herbicida. Se permitió el flujo de polen entre ambas poblaciones con el objetivo de evitar cualquier tipo de divergencia genética entre las mismas (Gundel et al. 2012b). De cada población se tomaron 100 semillas y se estudió la eficiencia del tratamiento mediante la tinción y observación de las semillas bajo microscopio óptico (Bacon y White 1994). Este procedimiento se repitió para cada ensayo y los porcentajes de infección fueron: más de 90% de infección para semillas no tratadas y menor a 15% en semillas tratadas (E+ y E- respectivamente). Estas semillas fueron utilizadas para ambos experimentos. El material muerto restante en las parcelas fue mantenido en pie hasta el momento de su utilización.

4.2.b Suelos con historia de pastizal natural y de poblaciones de *Lolium multiflorum*.

Los suelos con historia de pastizal natural fueron extraídos de un relicto ubicado en la localidad de Carlos Casares, provincia de Buenos Aires (35°54'11.29"S 61°12'40.86"O). Estos corredores, de 60 metros de ancho por 400 metros de largo, linderos a las vías abandonadas del ferrocarril se encuentran dominados por *Paspalum quadrifarium* Lam., una planta nativa que acumula el 90% de la biomasa en pie de la comunidad (Facelli et al. 1988). El resto de la biomasa es aportada por especies menos dominantes como son *Bromus catharticus*, *Brisa minor*, y *Stipa neesiana*. Los suelos con historia de *Lolium multiflorum* fueron extraídos de las poblaciones experimentales descritas anteriormente para la obtención de semillas. Ambos sitios se encuentran separadas por una distancia de 5 km. De ambos sitios se retiraron los primeros 10 centímetros de suelo los que fueron conservados en bandejas en invernáculo durante 4 meses hasta la realización del experimento (de Diciembre a Marzo).

4.2.c Selección de especies vecinas

Las especies seleccionadas para la realización de este experimento fueron: *Bromus catharticus*, *Brisa minor*, y *Stipa neesiana*. Al seleccionar estas 3 especies se buscaron pastos que realicen una explotación similar de recursos a *L. multiflorum* y que por lo tanto, su persistencia dentro de la comunidad pudiera verse amenazada por la entrada de una especie invasora como *L. multiflorum*. Dentro de estas tres especies, *B. catharticus* tiene una dinámica de la germinación similar a la de *L. multiflorum*, y a menudo se la encuentra compartiendo el mismo pastizal sucesional. Mientras tanto *B. minor* y *S. neesiana* son especies con una dinámica más lenta de germinación, típicas de los pastizales prístinos de la región Pampeana, que son raramente encontradas en pastizales sucesionales (Tognetti et al. 2010, Tognetti y Chaneton 2012).

4.2.d Selección de patógenos

Para la selección de los patógenos se buscaron especies de hongos que infecten al menos una de las especies de pastos mencionadas anteriormente y a *L. multiflorum*. Esta búsqueda se realizó a través de la base de datos del Laboratorio de Micología

Sistemática y Microbiología dependiente del Servicio de Investigación en Agricultura del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Se seleccionaron los siguientes patógenos: *Fusarium acuminatum* (fa); *Fusarium graminearum* (fg); *Fusarium oxysporum* (fo); *Pythium ultimum* (pu); *Rhizoctonia solani* (rs). Se comprobó mediante los postulados de Koch (inoculación, infección, re-aislamiento a partir de plantas infectadas) que las especies utilizadas tuvieran un efecto sobre *L. multiflorum*.

4. 2. e Inoculaciones

Las soluciones utilizadas para las inoculaciones con las distintas especies de *Fusarium* fueron realizadas siguiendo el protocolo propuesto por Lichtenzveig et al. (2006). Para la inoculación con *Pythium ultimum* y para *Rhizoctonia solani* se adaptó el método propuesto en Lichtenzveig et al. (2006). Una muestra de 1 ml de cada solución fue sometida a disoluciones sucesivas en agua destilada estéril y 1 ml década una de las mismas se sembró en medio Agar- Papa- Dextrosa. Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (ufc). Las concentraciones de las soluciones fueron: *Fusarium acuminatum* $2,35 \times 10^6$ ufc; *Fusarium graminearum* $6,7 \times 10^5$ ufc; *Fusarium oxysporum* $2,67 \times 10^6$ ufc; *Pythium ultimum* $6,12 \times 10^4$ ufc; *Rhizoctonia solani* $1,23 \times 10^5$ ufc. Se utilizó medio Papa- Dextrosa sin inocular como control de todos los patógenos. Cada solución fue diluida 1:4 en agua destilada. Los métodos de inoculación fueron evaluados en pre-ensayos.

4. 2. f Experimento 1

Para poner a prueba la hipótesis a) se realizó un ensayo en bandejas de plástico de 30 cm x 20 cm en las que se sembraron 40 semillas de *L. multiflorum* simbiótico o no-simbiótico con hongos endófitos. Como sustrato se utilizó suelo proveniente de parcelas dominadas por *L. multiflorum* (Fig. 4.1). Al momento de la siembra, cada una de estas bandejas fue inoculada con 40 ml de las soluciones de cada uno de los siguientes patógenos: *F. acuminatum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *P. ultimum* y *R. solani*. Las bandejas que fueron utilizadas como control se inocularon con medio de cultivo estéril. Se determinó el porcentaje de plantas emergidas por bandeja. Los resultados se analizaron con un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos factores con la presencia de endófitos y de patógenos como factores. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones.

4. 2. g Experimento 2

Para poner a prueba los mecanismos involucrados en la hipótesis a) se realizó un ensayo de germinación en caja de petri. En medio de cultivo APG (Agar-Extracto de papa-Glucosa), se colocó a 30 milímetros de distancia una semilla de *L. multiflorum* asociada o no asociada a endófitos y un taco circular de medio centímetro de diámetro de APG en el cual previamente había crecido alguno de los siguientes patógenos: *F. acuminatum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *P. ultimum* y *R. solani* (Fig. 4.1.). Las cajas de Petri fueron escaneadas y analizadas utilizando el programa WinRhizo. Mediante el mismo se determinó diariamente el crecimiento en área para cada patógeno.

Los resultados se analizaron con un Análisis de Varianza (ANOVA) con la asociación a endófitos como factor. Se realizaron análisis por separado para cada día. Cada tratamiento contó con 10 repeticiones. Las cajas correspondientes a *P. ultimum* fueron descartadas del experimento por contaminación.

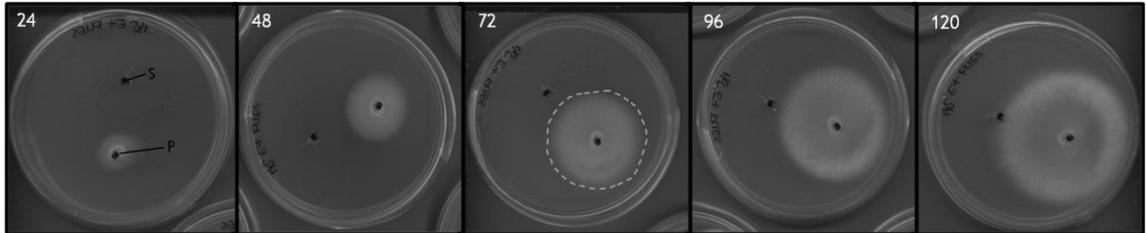


Figura 4.1. Foto de cajas de Petri correspondiente al experimento número 2. (s) semilla, (p) patógeno. Los números en blanco representan las horas transcurridas desde del inicio del experimento.

4. 2. h Experimento 3

Para poner a prueba las hipótesis b) y c) se realizó un experimento en el que se llenaron bandejas de 30 x 20 cm con suelo proveniente de un pastizal de *L. multiflorum* o relicto de pastizal natural. Cada una de estas bandejas se inoculó con 40 ml de cultivo en medio líquido de los siguientes patógenos: *F. graminearum*, *P. ultimum* y *R. solani*. A las bandejas control se les agregó medio de cultivo estéril. En cada bandeja se sembraron 20 semillas de tres plantas del pastizal natural de la Pampa Húmeda (*Bromus catharticus*, *Stipa neesiana* y *Briza minor*) junto a 20 semillas de *Lolium multiflorum* E+ o E-. Finalmente la superficie del suelo fue cubierta con broza proveniente de plantas asociadas o no asociadas a endófitos. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones. Al final del experimento se evaluó la emergencia de cada una de las especies sembradas y de *L. multiflorum* (Fig. 4.2.). Con los valores totales de emergencia se calculó el índice de Simpson para cada bandeja. Los resultados de los porcentajes de emergencia se analizaron mediante un Análisis de Varianza Multivariado (MANOVA) de dos factores con endófito y broza como factores. Se analizó cada patógeno por separado. Luego se realizaron los ANOVAS protegidos para cada patógeno. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones. El índice de Dominancia se analizó con un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos factores con endófito y broza como factores.

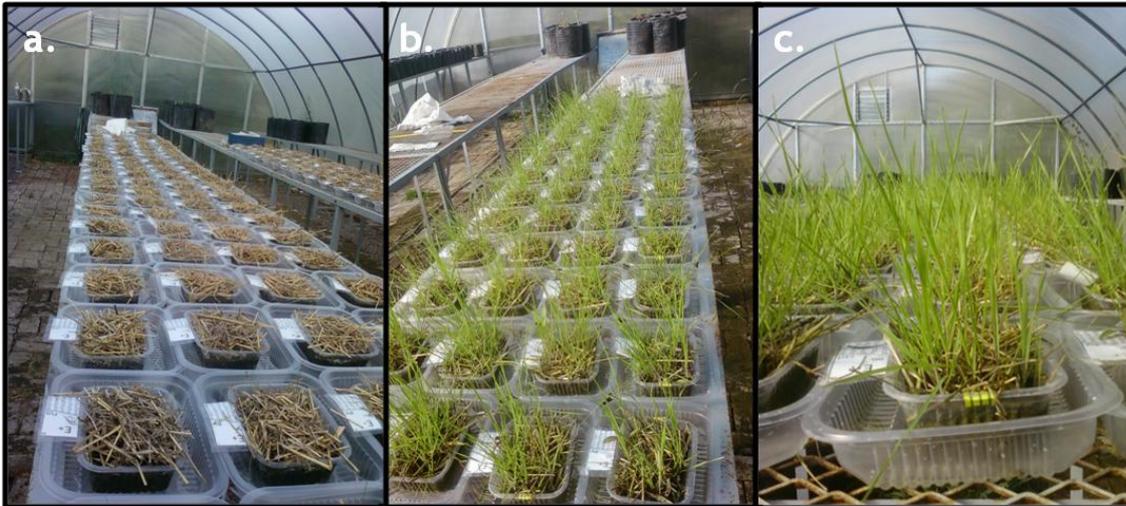


Figura. 4.2. Bandejas correspondientes al experimento número 3 al momento de la siembra (a), a los 10 días de iniciado el ensayo (b) y al momento de la cosecha (c),

4.3 Resultados

4.3.a Experimento 1

La emergencia de *L. multiflorum* fue afectada significativamente por la presencia del endófito y la identidad del patógeno utilizado ($F_{5, 118} = 4,45$, $p=0,001$). En términos generales se observó que la presencia de patógenos redujo la emergencia de plántulas no simbióticas. En particular, la presencia de *F. graminearum* y *R. solani* redujo significativamente la emergencia de las plántulas no asociadas a endófitos, mientras que aquellas asociadas no difirieron significativamente de las no inoculadas con patógenos (Fig. 4.3).

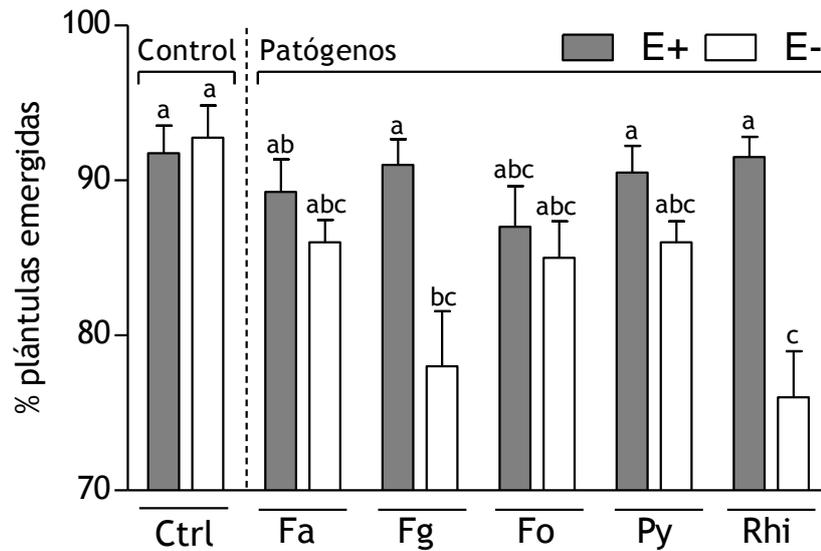


Figura 4.3. Emergencia de plántulas de *L. multiflorum* simbióticas (barras grises) y no simbióticas (barras blancas) con hongos endofitos y sembradas en suelo sin patógenos Control (Ctrl) o inoculado con: *Fusarium acuminatum* (Fa); *Fusarium graminearum* (Fg); *Fusarium oxysporum* (Fo); *Pythium ultimum* (Py); *Rhizoctonia solani* (Rhi). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

4.3.b Experimento 2

Solo se analizaron las cajas correspondientes a *F. acuminatum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *R. solani*. Las cajas inoculadas con *P. ultimum* fueron descartadas debido a que varias semillas presentaron contaminación con otros hongos. La presencia de endófitos en las semillas redujo significativamente el crecimiento de dos de los patógenos. El crecimiento de *F. acuminatum* tuvo una reducción cercana al 5% que se tornó significativa a partir del día 3. (Fig. 4.4a; Cuadro 4.1). En el caso de *R. solani* la reducción del crecimiento del patógeno se tornó significativa a partir del día 3 y se mantuvo hasta el día 5 (Fig. 4.4d; Cuadro 4.1). Cabe señalar que en el caso de *R. solani*, al día 5 el micelio ya había colonizado gran parte de la caja incluyendo a la semilla. El resto de los patógenos evaluados no mostraron diferencias significativas en ninguna de las fechas.

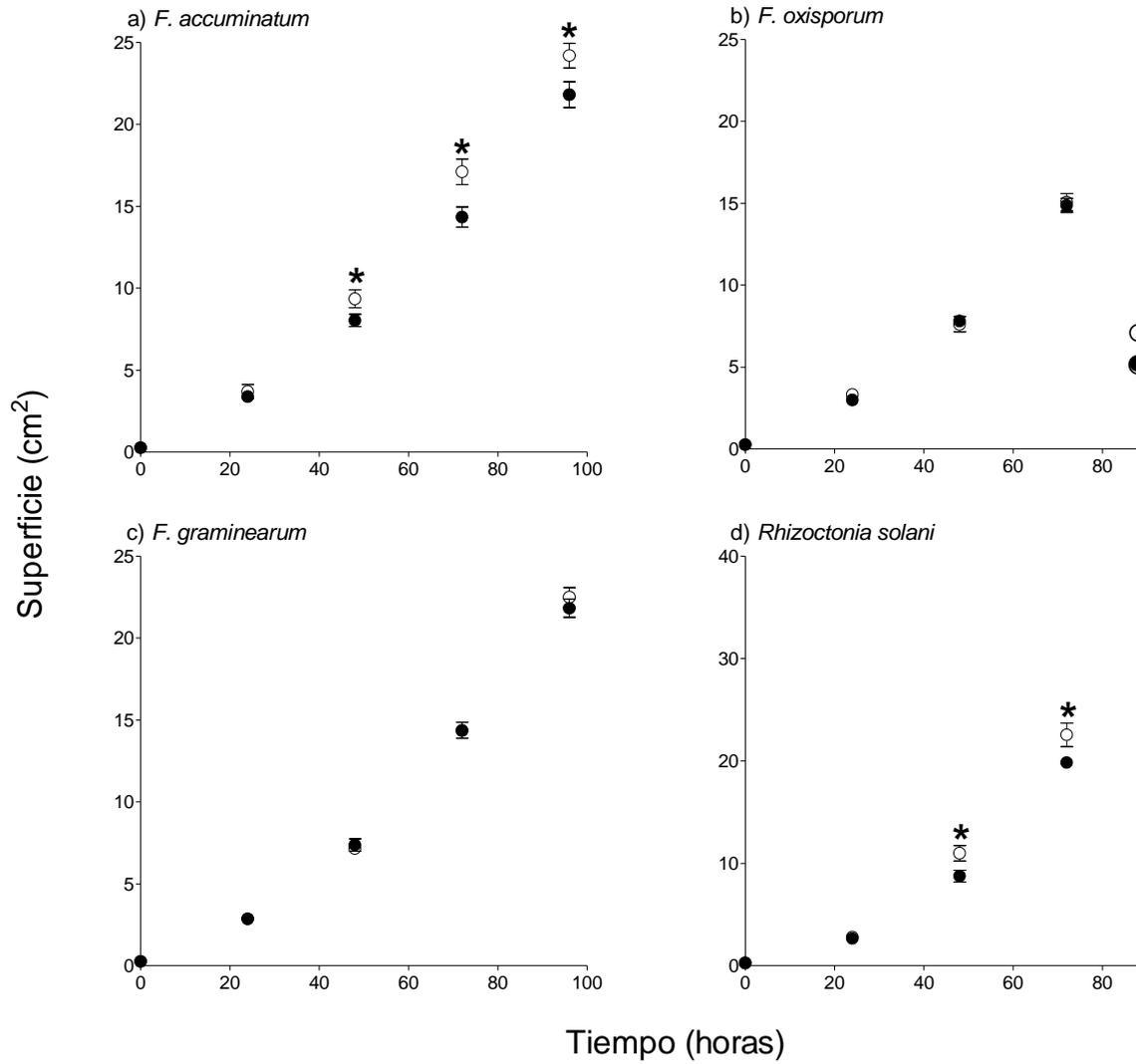


Figura 4.4. Crecimiento de los patógenos *Fusarium acuminatum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* sembrados en medio Agar-Papa-Glucosa junto a semillas de *L. multiflorum* simbióticas (Puntos negros) y no simbióticas (puntos vacíos) con hongos endofitos. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Cuadro 4.1. Valores F correspondientes al análisis de la varianza para los valores de crecimiento de los patógenos *Fusarium acuminatum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* sembrados en medio Agar-Papa-Glucosa junto a semillas de *L. multiflorum* simbióticas (barras grises) y no simbióticas (barras blancas) con hongos endofitos. (* = $p < 0,05$)

Horas	n	<i>F. acuminatum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>
0	10	0,20	0,00	0,62	0,16
24	10	0,12	0,00	1,61	0,00
48	10	2,93 *	0,24	0,14	7,47 *
72	10	5,30 *	0,00	0,07	4,75 *
96	10	5,89 *	0,69	1,07	0,41

4.3.c Experimento 3

En términos de porcentajes de emergencia, la presencia de endófitos en las semillas de *L. multiflorum* tuvo efectos significativos, independientemente de la identidad de las especies sembradas. Este efecto significativo se observó en suelo proveniente de pastizal dominado por *L. multiflorum* en ausencia de patógenos ($F_{3,13}=3,86$; $p=0,0280$) y en presencia de *R. solani* ($F_{3,13}=4,27$; $p=0,0201$). En cuanto al suelo proveniente de pastizal nativo, solo se observó interacción entre la presencia del endófito en la planta viva y en el material muerto en presencia de *F. acuminatum* ($F_{3,13}=3,83$; $p=0,0286$).

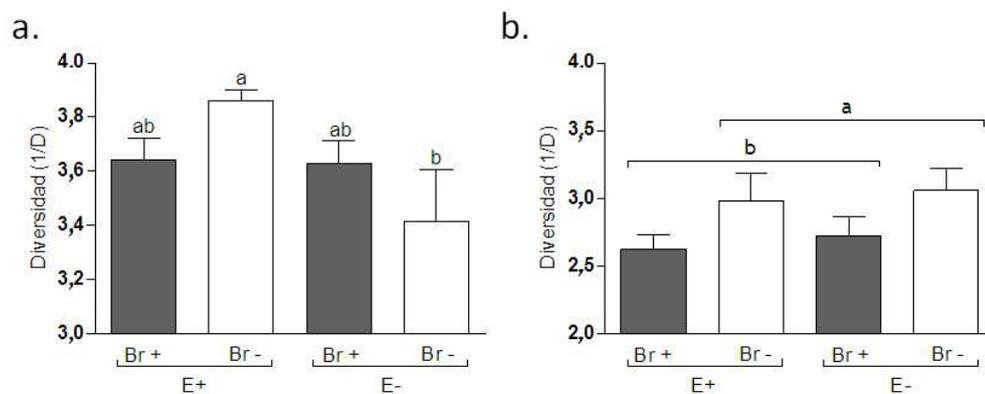


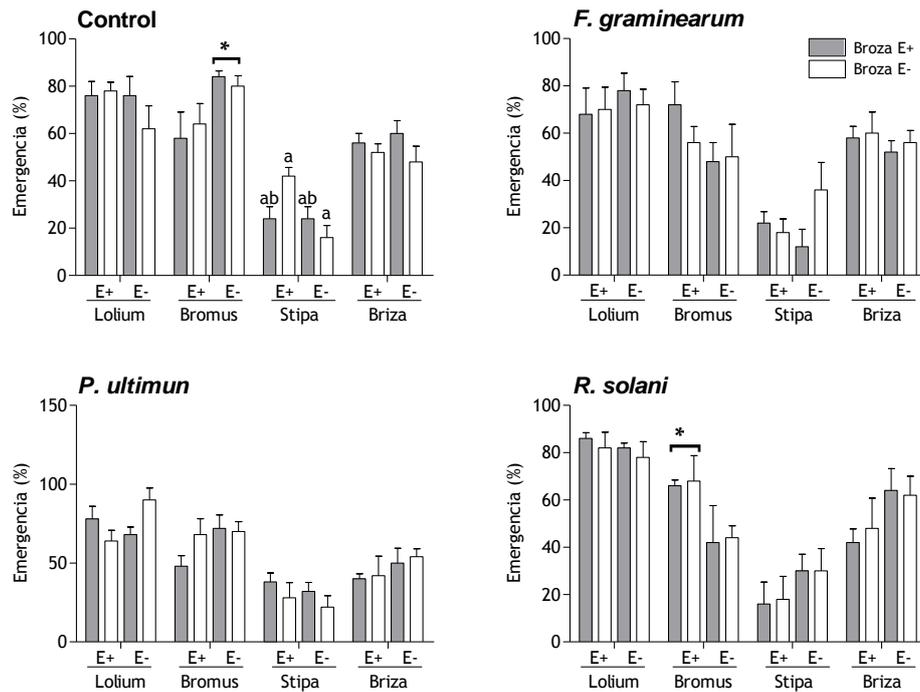
Figura 4.5. Diversidad vegetal estimada mediante el índice de Simpson en bandejas sembradas con *Bromus uniolooides*, *Stipa neesiana* y *Briza minor* junto a semillas de *L. multiflorum* simbióticas (barras grises) y no simbióticas (barras blancas) con el endófito *N. occultans* y cubiertas con material muerto de *L. multiflorum* simbióticas (Br+) y no simbióticas (Br-) con hongos endófitos en: a. suelo proveniente de pastizal dominado por *L. multiflorum* y b. suelo proveniente de pastizal nativo inoculadas con *F. acuminatum*. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

A nivel de especie, en ausencia de patógenos, la asociación con endófitos redujo la emergencia de la especie nativa *B. catharticus* en suelo proveniente de pastizal dominado por *L. multiflorum* ($F_{3,16}=7,81$; $p=0,0130$). Sin embargo estas diferencias se borraron en presencia de patógenos, con la excepción de *R. solani*, en el cuál se observó un efecto del endófito promoviendo la emergencia de *B. uniolooides* ($F_{3,16}=5,91$; $p=0,0272$) (Fig. 4.6a). En este mismo suelo y en ausencia de patógenos se observó una interacción entre la asociación con endófitos en la planta viva y en el material vegetal muerto, promoviendo la emergencia de *B. minor* en compañía de plantas de *L. multiflorum* simbióticas pero solo en presencia de broza de plantas no asociada a endófitos ($F_{3,16}=7,35$; $p=0,0154$) (Fig. 4.6a). En las bandejas con suelo proveniente de un relicto de pastizal nativo se observaron diferencias debidas a la presencia del

endófito sobre la germinación de *B. catharticus* y *L. multiflorum* en presencia de *P. ultimum* ($F_{3,16}=4,18$; $p=0,0577$ y $F_{3,16}=5,60$; $p=0,0309$)(Fig. 4.4b).

La presencia de endófitos redujo significativamente la dominancia dentro de las bandejas con suelo proveniente de pastizal dominado por *L. multiflorum* en presencia de material muerto de plantas no simbióticas ($F_{3,16}=4,63$ $p=0,0470$)(Fig. 4.5a) . Por otro lado, la presencia del endófito en el material muerto de *L. multiflorum* redujo la dominancia en las bandejas con suelo proveniente de pastizal nativo inoculadas con *F. acuminatum* ($F_{3,16}=4,62$; $p=0,0475$) (Fig. 4.5b).

a. Suelo dominado por *Lolium multiflorum*



b. Suelo de relictos de pastizal nativo

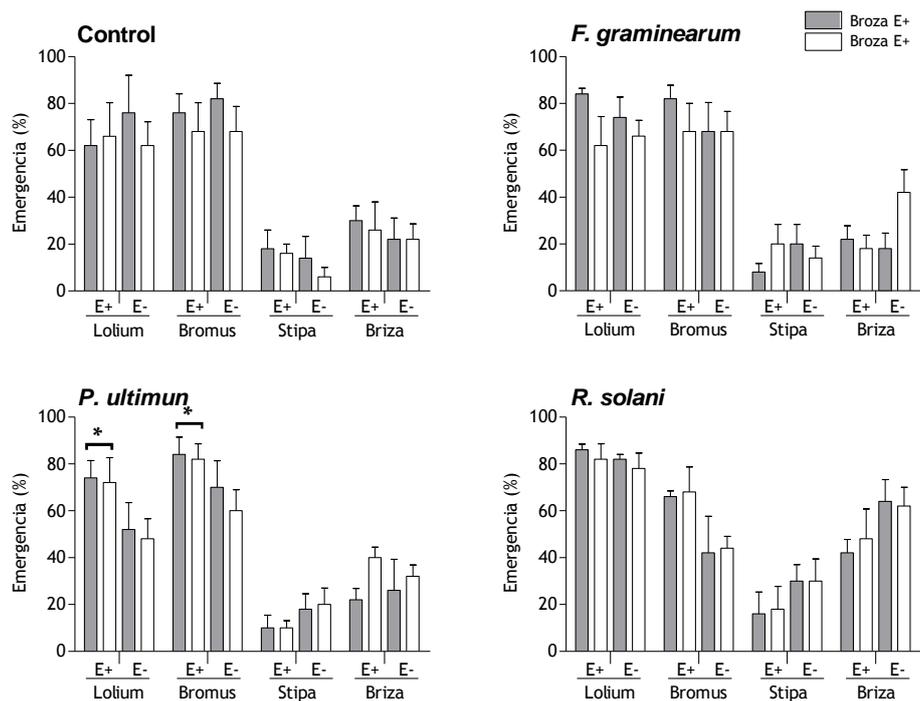


Figura 4.6. Emergencia de plántulas de *L. multiflorum*, *Bromus unioloides*, *Stipa neesiana* y *Briza minor* sembradas junto a semillas de *L. multiflorum* simbióticas (barras grises) y no simbióticas (barras blancas) con hongos endófitos y sembradas en: **a.** suelo proveniente de parches de comunidad sucesional dominados por *L. multiflorum* sin patógenos (Control) o inoculado con: *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*. **b.** suelo proveniente de un relictos de pastizal nativo sin patógenos (Control) o inoculado con; *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*. Letras diferentes y asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos para cada variable ($p < 0,05$).

4.4 Discusión

Los resultados de los experimentos de este capítulo muestran que la asociación entre *L. multiflorum* y hongos endófitos tiene efectos sobre la capacidad de los patógenos de infectar a esta especie y a otras especies de la comunidad. La simbiosis redujo la muerte pre-emergencia en *L. multiflorum*, en particular en los suelos inoculados con *F. graminearum* y *R. solani*. El ensayo de inhibición realizado en caja de Petri nos permitió relacionar el efecto observado en el experimento número 1 con un efecto de inhibición del endófito presente en la semilla sobre el crecimiento de los patógenos, al menos en el caso de *R. solani*. Este efecto protector del endófito se propagó a otras especies de la comunidad, de manera más clara cuando el suelo utilizado tenía historia de *L. multiflorum*.

La heterogeneidad observada a nivel de patógenos y planta puede explicarse a través de los atributos ecológicos de las especies estudiadas. Por un lado la dinámica de la germinación de *B. catharticus* es comparable a la de *L. multiflorum*, con una emergencia cercana al 60% en los primeros 7 días, mientras que los individuos de *S. neesiana* y *B. minor* comenzaban a emerger a los 5 días, llegando al 60% alrededor de los 15 días (Observación personal). De acuerdo con esta hipótesis, las especies vecinas con una alta tasa de germinación podrían aprovechar la ventana generada por la asociación a endófitos al reducir el crecimiento del patógeno. Esto modificaría la estructura y el funcionamiento de la comunidad. Por otro lado, este efecto nodriza, sería dependiente de la densidad de *L. multiflorum* y de la frecuencia de asociación con endófitos de la población. El otro factor que moduló la protección de los endófitos sobre las especies vecinas fue la identidad de los patógenos utilizados. Si bien detectamos efectos sobre *L. multiflorum* en los pre-ensayos, y en el experimento número 1, esperaríamos que el efecto del endófito sea mayor cuando los patógenos utilizados provengan de las mismas poblaciones de las que se obtuvieron las semillas utilizadas en los ensayos. Nuestra hipótesis es que la co-evolución entre las plantas asociadas a endófitos y los patógenos, aumentaría la magnitud de los resultados observados.

Los resultados obtenidos en el ensayo en caja de Petri muestran un retraso en el crecimiento de dos de los cuatro patógenos evaluados, sin embargo no nos es posible establecer si este efecto es producido por un el endófito o es resultado de la interacción del mismo con la semilla durante el proceso de germinación. Estudios previos revelaron que la concentración de alcaloides en semillas es elevada en las semillas y que una proporción cercana al 20% se pierde por lixiviación durante la fase de imbibición (Justus et al. 1997). Numerosos autores sugieren que estos alcaloides podrían tener un efecto sobre la resistencia a la infección por otros hongos, tanto patogénicos como mutualistas (Mack y Rudgers 2008). Por otro lado, nuestros resultados sugieren que habría un efecto mediado por los cambios que el endófito genera en el ambiente a través de la deposición del material muerto y de la historia de *L. multiflorum* asociado a endófitos dentro de la comunidad.

Si bien el efecto del endófito sobre la interacción del pasto hospedante con hongos que afectan la emergencia de plántulas se ha estudiado a nivel poblacional (Chu-Chou et

al. 1992, Bacon et al. 1997, Pańka et al. 2013) y más brevemente a nivel de comunidad (Rudgers y Orr 2009), hasta este momento no se habían realizado estudios que integren estos niveles y los mecanismos involucrados. En este capítulo se investigaron los efectos en distintos niveles de organización. En primer lugar se observó que el endófito tendría para algunos patógenos efecto a nivel poblacional, luego, al poner a prueba los mecanismos que podrían llegar a estar involucrados, se concluyó que estos efectos podrían extenderse a niveles superiores, modificando así la estructura y el funcionamiento de la comunidad. Finalmente, con el tercer ensayo se puso a prueba dicha hipótesis, observándose que tal como habíamos propuesto, el endofito podría alterar la relación de otras especies no simbióticas de la comunidad con hongos patógenos. Futuros experimentos deberían concentrarse en buscar un mayor realismo en el sistema de estudio, mediante la experimentación en comunidades naturales, con estudios a largo plazo y utilizando patógenos aislados de estos sitios.

Capítulo 5

MECANISMOS ECOLÓGICOS DE LA RESISTENCIA A PATÓGENOS.

5.1 Introducción

A menudo, la interacción entre plantas y patógenos se encuentra modulada por la interacción de ambos con otros miembros de la comunidad. (Fig. 5.1). (Burdon 1987). Incluso en aquellos períodos en los que el patógeno no se encuentra estrechamente ligado a su hospedante, este debe sobrevivir a los cambios en el ambiente, tanto biótico como abiótico (Burdon 1987, Johnston et al. 1996, Sabatini y Innocenti 2000a, b, 2001, Sabatini et al. 2004). Los hongos patógenos presentan ciclos de vida complejos debiendo algunos cumplir parte de estos sobre uno hospedante o más hospedantes y otra parte en la cual debe persistir como estructura de resistencia en el suelo (Agrios 2005a). Durante su permanencia en el suelo, las estructuras de resistencia de estos patógenos tienen que atravesar situaciones de fungivoría tanto por artrópodos como por nematodos (Sabatini y Innocenti 2000a, Sabatini et al. 2002, Innocenti et al. 2011) o de estrés generado por disturbios como un incendio o una inundación (Johnston et al. 1996). Finalmente, la posibilidad de que estas estructuras de resistencia y dispersión infecten a una planta sana, dependerá en algunos casos organismos vectores que transporte los propágulos (Kluth et al. 2002, Purcell y Almeida 2005).

En el capítulo 3 se demostró que la simbiosis de *L. multiflorum* con hongos endófitos puede reducir la incidencia y la severidad del patógeno *Claviceps purpurea* (Perez et al. 2013). Resultados similares fueron observados por otros autores en distintos patosistemas (Welty et al. 1991, Wäli et al. 2006, Li et al. 2007, Tian et al. 2008). Sin embargo se ha observado mucha variabilidad en los resultados, encontrando efectos neutros e incluso positivos, atribuibles al tipo de aproximación, identidad de las especies, y grupo funcional de patógenos (Capítulo 2). Por lo general, las hipótesis propuestas se enfocan en efectos directos del endófito sobre el patógeno o a lo sumo mediados por cambios en la química de la planta (West y Gwinn 1993, Yue et al. 2000b, Wäli et al. 2006). Sin embargo, la simbiosis con endófitos genera numerosos cambios en la ecología de la planta hospedante que podrían impactar en la dinámica de la infección del patógeno, como son la manipulación de la biología reproductiva de la planta hospedante (Gorischek et al. 2013) o en las interacciones con insectos a través de la producción de compuestos volátiles (Schiestl et al. 2006) (Fig. 5.1).

Son numerosos los insectos que visitan plantas y tienen la potencialidad de ser vectores de enfermedades (Agrios 2005b, Gilbert 2007). En este contexto, un efecto negativo del endófito sobre vectores de patógenos que infectan a la planta hospedante, podría impactar positivamente sobre esta última (Lehtonen et al. 2006, Pérez et al. 2013). Esta hipótesis ha sido considerada recientemente por Rúa et al. (2013), quienes observaron que la asociación con endófitos podría reducir indirectamente la infección de virus a través de afectar negativamente a los herbívoros vectores, en este caso, áfidos.

La simbiosis con endófitos modifica numerosos atributos de la planta hospedante que modulan la forma en la que la planta se relaciona con la comunidad de artrópodos

tanto aéreos como subterráneos (Clay 1988, Omacini et al. 2001, Miranda et al. 2011, Omacini et al. 2012). Si bien el caso más estudiado es la interacción con herbívoros aéreos, existen numerosas interacciones con artrópodos que son moduladas por la interacción entre la planta y el endofito, variando de acuerdo con la identidad del artrópodo, su posición en la cadena trófica (Faeth y Shochat 2010, Faeth y Saari 2012, Omacini et al. 2012). Por un lado, Jani et al. (2010) encontraron que la simbiosis con endófitos aumentó tanto la abundancia como la diversidad de artrópodos asociados a *Achnatherum robustum*. Por el otro lado, Faeth y Shochat (2010) encontraron una mayor riqueza de artrópodos en plantas de *Festuca arizonica* cuando esta se encontraba asociada a endófitos. Son numerosos los cambios que se producen en las características morfológicas, fisiológicas y químicas de las plantas hospedantes que podrían explicar las diferencias en la respuesta de los insectos (Justus et al. 1997, Yue et al. 2000a, Yue et al. 2001, Rasmussen et al. 2008a, Rasmussen et al. 2008b). Si bien no son claros los mecanismos, algunos autores postulan que la producción de alcaloides podrían estar modulando estos resultados sin embargo también se ha postulado que estos efectos podrían estar mediados por otros mecanismos como es por ejemplo, la síntesis de compuestos volátiles (Steinebrunner et al. 2008b, a, Zhi-Lin et al. 2012). Algunos de estos mecanismos pueden expresarse en tejidos donde no se encuentra presente el endófito. Alcaloides como las peraminas, ergovalina y lolitrem B, aunque en bajas concentraciones, fueron detectados en raíces de *L. perenne* hospedante de *N. lolii* (Ball et al. 1997). Por otro lado estos efectos pueden superar el tiempo de vida de la planta, dejando señales aún cuando la planta ya cumplió su ciclo dentro de la comunidad. Alcaloides como la ergovalina y en menor medida lolitrem B pueden permanecer en el material vegetal aún después de la muerte de la planta (Clark et al. 1996, Thom et al. 1999). Estos cambios podrían modificar la permanencia del patógeno en el suelo, modulando el impacto que estos tendrían posteriormente sobre la planta.

En este capítulo se evaluaron los mecanismos mediados por otros miembros de la comunidad por los cuales la asociación con endófitos podría en condiciones naturales reducir la infección de la planta hospedante causada por el patógeno *Claviceps purpurea* (Fig. 5.1). Las hipótesis asociadas a este capítulo son que la simbiosis con endófitos, por un lado, a) reduce la tasa de visitas de insectos vectores de *C. purpurea* a través de la producción de compuestos volátiles (Hip. A) y por otro lado, b) que estas plantas y/o su broza generan cambios en el suelo que impactan sobre la supervivencia de los esclerocios de *C. purpurea* durante su estadía en el suelo (Hip. B).

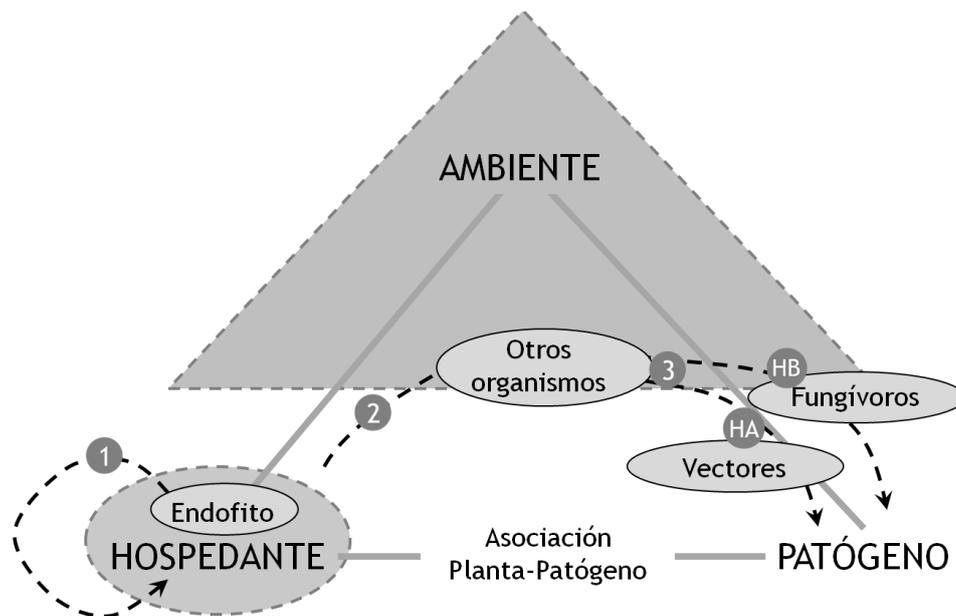


Figura 5.1. Esquema de las interacciones propuestas en este capítulo enmarcadas en el patosistema (Modificada de Burdon, 1987). 1) Efecto del endófito sobre la planta hospedante; 2) cambios en los atributos morfológicos y ecológicos de la planta como resultado de la interacción con el endófito; 3) cambios producidos por la simbiosis en la comunidad de insectos que impactan sobre la ecología del patógeno. H: Hipótesis estudiadas en ese grupo de organismos.

Para poner a prueba estas hipótesis se realizaron dos experimentos a campo. En un primer ensayo se estimó el efecto de los vectores en plantas simbióticas y no simbióticas a través de la exclusión de los mismos. Se estimó la producción de compuestos volátiles por medio de una “nariz electrónica” que brinda una medida de los cambios mediados por el endófito en las señales emitidas por las plantas y que podría funcionar como un mecanismo indirecto sobre la tasa de visitas de insectos. En un segundo experimento se estimó el efecto “legado” de la simbiosis con endófito a través del suelo (si estuvo cultivado con plantas E+ o E-) y a través de la broza (generada por plantas E+ o E-), sobre la supervivencia y viabilidad de esclerocios de *C. purpurea*.

5.2 Materiales y métodos

5.2.a Material vegetal

Lolium multiflorum Lam. (ryegrás anual) es un pasto exótico naturalizado de gran dominancia dentro de los pastizales de la región pampeana (Soriano 1992). Caracterizado como una especie competitiva-ruderal, su éxito en la invasión de los pastizales Pampeanos ha sido asociada a la presencia del endófito *Neotyphodium occultans* y a la producción de una capa gruesa de broza que reduce la germinación y el establecimiento de plántulas de otras especies (Vila-Aiub et al. 2005, Gundel et al. 2009a, Omacini et al. 2009).

Las semillas maduras de *L. multiflorum* fueron recolectadas de poblaciones naturalizadas de la región Pampeana, Argentina (34°06'S, 60°25'W). Una evaluación preliminar mostró que estas poblaciones tenían un porcentaje de plantas asociadas a endófitos de un 95% (basado en la observación a microscopio óptico de 100 semillas teñidas con una solución de Rosa de Bengala (Bacon y White 1994). Las semillas no simbióticas se generaron a partir del tratamiento de las semillas simbióticas con el fungicida sistémico Triadimenol (150 g p.a. kg⁻¹; dosis: 5 mg por gramo de semilla). Ambas poblaciones, simbióticas (E+) y no simbióticas (E-) fueron cultivadas en monocultivo en parcelas adyacentes de 1 m² en el campo experimental de la facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Ambas poblaciones fueron cultivadas más de una generación para disminuir cualquier efecto fitotóxico del herbicida. Se permitió el flujo de polen entre ambas poblaciones con el objetivo de evitar cualquier tipo de divergencia genética entre las mismas (Gundel et al. 2012b). De cada población se tomaron 100 semillas y se estudió la eficiencia del proceso mediante la tinción y observación de las semillas bajo microscopio óptico (Bacon y White 1994). Este procedimiento se repitió para cada ensayo y los porcentajes de infección fueron: más de 90% de infección para semillas no tratadas y menor a 10% en semillas tratadas (E+ y E- respectivamente). Estas semillas fueron utilizadas para ambos experimentos. El material muerto restante en las parcelas fue mantenido en pie hasta el momento de su utilización para obtener broza de plantas simbióticas y no simbióticas (broza E+ y E- respectivamente).

5. 2. b Esclerocios de *Claviceps purpurea*

Los esclerocios de *C. purpurea* fueron cosechados de poblaciones naturalizadas de *Lolium multiflorum* ubicadas en la localidad de Carlos Casares, provincia de Buenos Aires (35°55'13.36"S 61° 9'35.12"O) durante diciembre del año anterior a la realización del experimento número 2. Los mismos fueron conservados en las espigas, y separados individualmente al momento de instalar el experimento.

5. 2. c Establecimiento de las parcelas utilizadas en ambos ensayos.

Para poner a prueba las hipótesis mencionadas anteriormente se establecieron en la Ea. San Claudio 35°55'13.36"S 61° 9'35.12"O) 16 parcelas ordenadas en 8 bloques de dos parcelas cada uno. En noviembre se removió todo el material vegetal en las parcelas y se realizó una solarización del suelo cubriéndolas con polietileno negro. De esta manera se evitó el aporte de semillas de las poblaciones vecinas al banco y el crecimiento de otras plantas y se redujo la supervivencia de las semillas presentes en el banco. En marzo del año siguiente cada parcela fue destapada y 15 días después sembrada al azar con 5 gramos de semillas de *L. multiflorum* asociado a hongos endófitos o libres. Las semillas fueron cubiertas con una fina capa de arena y cubiertas con redes para evitar el consumo de las semillas por parte de aves. Estas redes se removieron después de un mes.

5. 2. d Experimento 1

Para poner a prueba la hipótesis A, una vez alcanzado el estadio reproductivo, pero previo a la antesis, se dividió cada parcela en dos y se clausuraron las espigas presentes en una de las subparcelas con una bolsa de tul que impide la entrada de insectos pero permite el flujo de polen y esporas a través del viento (Neal y Anderson 2004). Una vez completado el ciclo de la planta, esas bolsas fueron retiradas y se determinó la incidencia y la severidad como el porcentaje de espigas con al menos un esclerocio en cada sub-parcela y el porcentaje de semillas reemplazadas por esclerocios dentro de cada espiga, respectivamente. Complementariamente estimó el número de espigas por tratamiento.

Se midió por medio de una nariz electrónica (AgriNose, CNEA, Buenos Aires, AR) la producción de volátiles en cada una de las parcelas (Branca et al. 2003, D'Alessandro y Turlings 2006). Este dispositivo evalúa la complejidad de olores de manera similar a la realizada por la nariz de un animal. La nariz electrónica está conformada por un arreglo de 8 sensores y un procesador central que compara la reacción de cada sensor a aquella de un valor de referencia que en este caso fue aire puro tomado a una altura de 2 mts (ver metodología descrita por Szpeiner et al. (2009)). Para esto se colocó el sensor en el medio de la parcela a la mitad de la altura de los pastos presentes. Los valores de incidencia, severidad y número de espigas por parcela se analizaron por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) con un diseño de bloques con parcelas divididas con el factor asociación con endófitos a nivel de parcela y exclusión de vectores a nivel de sub-parcela. La emisión de volátiles se analizó con un test de t pareado para cada sensor.

5. 2. e Experimento 2

A) Persistencia y recuperación de esclerocios de *C. purpurea*

Al momento de la siembra, en cada una de las parcelas se colocaron 6 bolsas de 5 x 5 cm. de tul conteniendo 10 esclerocios de *C. purpurea* en cada parcela (Fig. 5.2). Un tercio de las bolsas fue cubierto con bolsas de 10 cm x 10 cm de tamaño de malla de 2 mm x 2 mm conteniendo broza de plantas E+ y la otra mitad con bolsas con broza de plantas E- y las dos restantes con bolsas vacías (Fig. 5.3). Los porcentajes de asociación con endófitos del material vegetal fueron 96% y 0% para las E+ y las E- respectivamente.

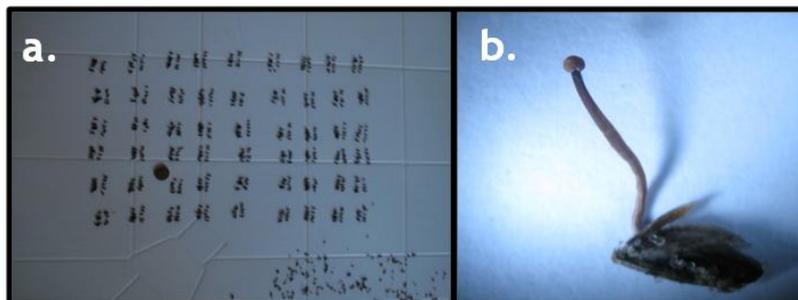


Figura 5.2. Grupos de 10 Esclerocios de *C. purpurea* incluidos en cada bolsa de tul (1x) (a) y esclerocio

La germinado (5x) (b).

relación

hojas:cañas fue $0,65 \pm 0,23$ y $0,47 \pm 0,07$ para las E+ y las E- respectivamente ($F_{1,2}=0,52$; $p=0,5105$). Las bolsas conteniendo esclerocios de *C. purpurea* se retiraron en dos fechas de extracción: a los 4 y a los 9 meses de sembradas las parcelas (esta última fecha corresponde al final del ciclo de vida de la planta hospedante). En cada una de las fechas los esclerocios fueron removidos, limpiados con pincel para remover restos de suelo y esterilizados superficialmente mediante la inmersión en una solución 0,5% de hipoclorito de sodio por 2 minutos seguida de una inmersión en agua destilada estéril por 30 segundos. Posteriormente fueron sometidos a estratificación a 5°C por 70 días y luego colocados en cámara 23° C por 50 días (Johnston et al. 1996). Pasado este período se registró la germinación de los esclerocios y el número de estromas generados.

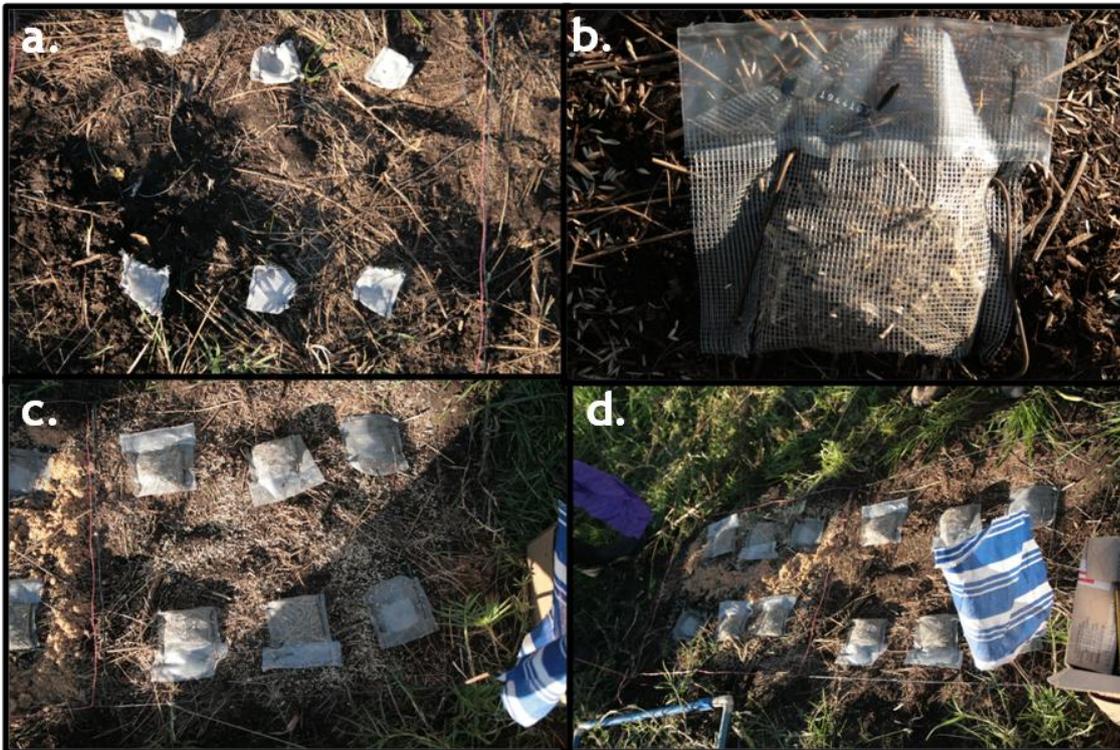


Figura 5.3. Bolsas de tul con esclerocios de *C. purpurea* colocadas en la parcela (a). Bolsa conteniendo material muerto de *L. multiflorum* (b). Parcela sembrada con *L. multiflorum* simbiótica con endófitos, en la que se colocaron bolsas con esclerocios de *C. purpurea* y material muerto de *L. multiflorum* por encima de ellas (c). Parcelas sembradas con semillas provenientes de plantas simbióticas o no simbióticas (d).

B) Estimación de los cambios en la comunidad de artrópodos y su efecto sobre la persistencia de los esclerocios.

Durante la primavera se tomó una muestra de suelo de 10 cm de profundidad en cada una de las parcelas simbióticas y no simbióticas y se la mantuvo refrigerada a 4°C hasta iniciar el proceso de extracción. Para extraer los organismos se utilizó el método

de embudos Tullgren modificado (Crossley Jr y Blair 1991). Las muestras permanecieron en dicho dispositivo por un período de 7 días (Fig. 5.4).



Figura 5.4. Imagen de los dispositivos de Tullgren utilizados en la extracción de mesofauna.

Los especímenes adultos fueron contados e identificados a nivel de orden. Para estos datos se calcularon los índices de Simpson ($D = \sum(p^2)$) y Shannon ($H = \sum(p \cdot \ln(p))$). Al final del período de crecimiento se retiraron las bolsas conteniendo material muerto y se estimó la pérdida de biomasa.

El número de estromas producidos por esclerocio recuperado se analizó por medio de un Análisis de la varianza (ANOVA) con la simbiosis con endófitos en las plantas vivas como parcela principal y en la broza como sub-parcela, para un diseño de bloques con parcelas divididas. La abundancia de cada orden de insectos y los valores obtenidos para cada índice fueron analizados mediante un test de t pareado. La descomposición, expresada como proporción de material remanente fue analizado por medio de un Análisis de la varianza (ANOVA) con la simbiosis con endófitos en las plantas vivas y en el material muerto como factores, para un diseño de bloques con parcelas divididas.

5.3 Resultados

5.3.a Experimento 1

Los valores netos de incidencia no difirieron entre clausura y no clausura en el caso de las E+ y entre estas y las E- clausuradas. Sin embargo, las plantas E- sin clausurar triplicaron los valores de los otros tratamientos ($F_{1,5}=35,10$; $p=0,0020$) (Fig. 5, 6a.) En cuanto a la severidad, solo se observaron diferencias significativas debidas a la clausura en las plantas no asociadas a endófitos ($F_{1,5}=8,82$; $p=0,0311$) (Fig. 5.6b.). En las plantas asociadas a endófitos, el efecto de la exclusión fue más de cuatro veces menor que en las plantas no asociadas a endófitos tanto para la incidencia como para la severidad ($t = -4,35$; $p = 0,0074$ y $t = 4,32$; $p = 0,0075$). A pesar de esto no se observaron

diferencias significativa en el número de espigas entre los tratamientos ($F_{1,16}=0,33$; $p=0,5752$)

En cuanto a la emisión de compuestos volátiles, la asociación con endófitos, generó cambios que fueron detectados por tres de los sensores de la nariz electrónica ($t=-3,03$ $p=0,0192$; $t=3,56$ $p=0,0088$; $t=2,46$ $p=0,0437$) (Fig. 5. 7.)

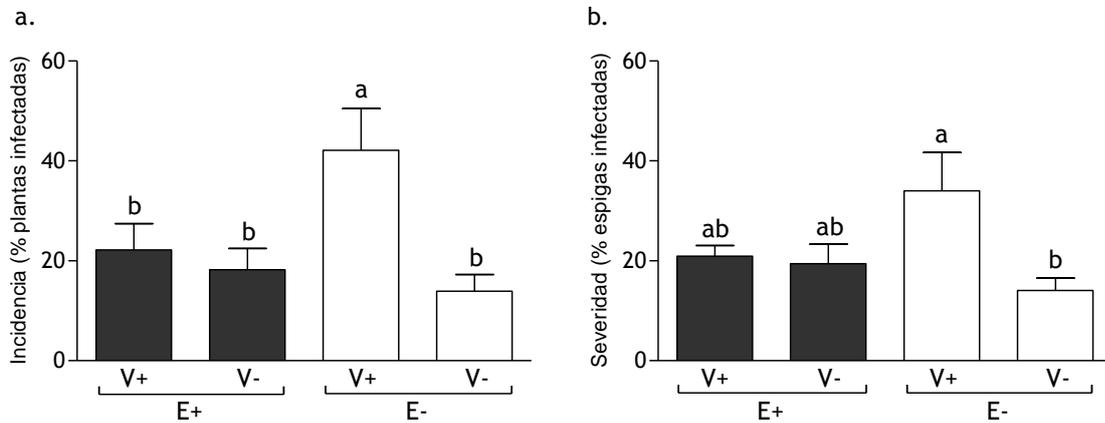


Figura 5.6. Incidencia (a) y la severidad (b) (medias y error estándar) de *C. purpurea* en parcelas sembradas con plantas de *L. multiflorum* asociadas (barras negras) o libres de endófitos (barras blancas) con tratamiento de exclusión de vectores (V-) o o sin exclusión (V+). Las letras representan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$)

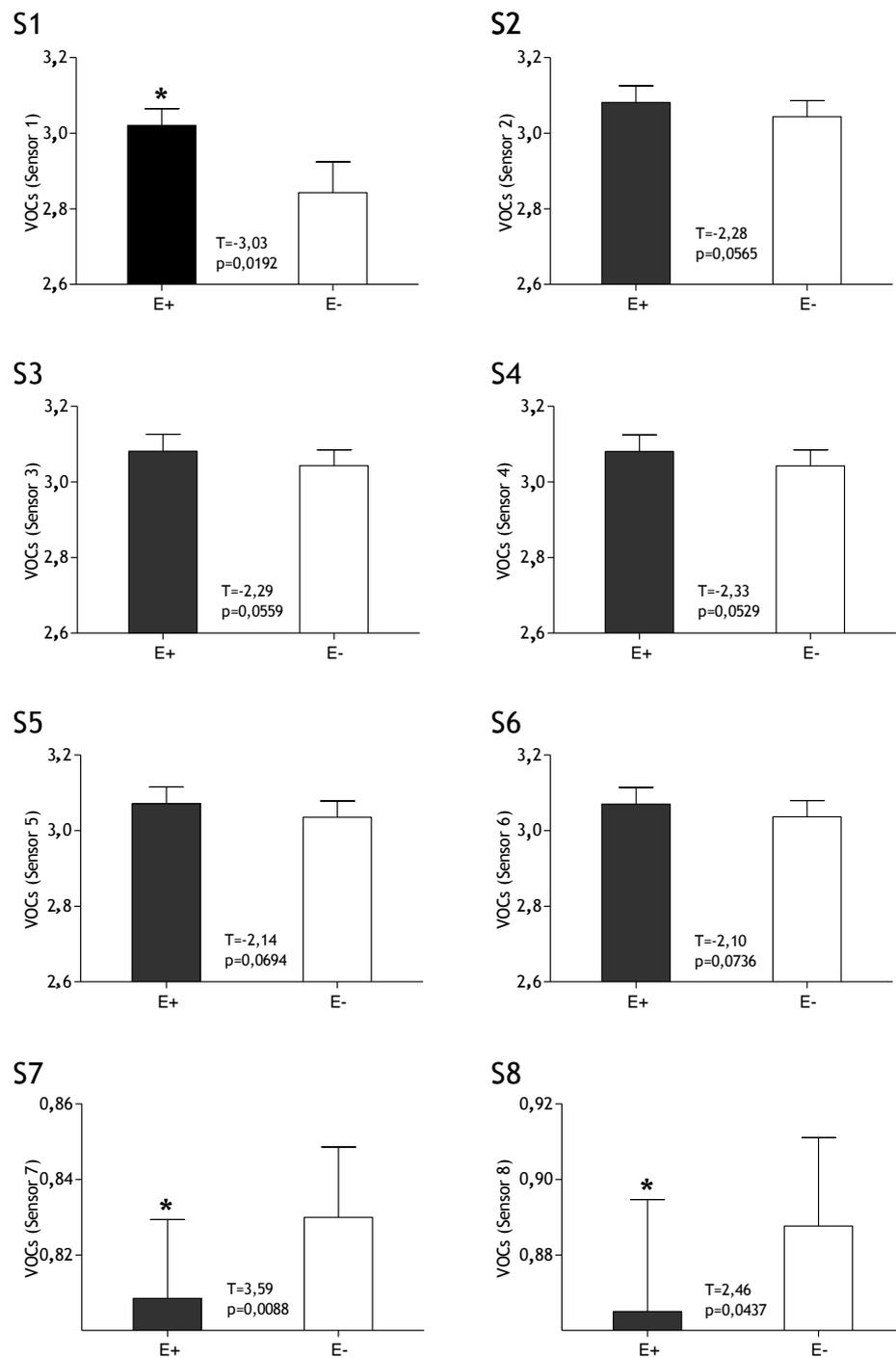


Figura 5.7. Emisión de volátiles (medias y error estándar) detectado por 8 sensores (S1 a S8) en parcelas sembradas con plantas de *L. multiflorum* simbióticas (barras negras) o no simbióticas (barras blancas) con endófitos. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$)

5.3.b Experimento 2

A) En todos los tratamientos se recuperaron cerca del 60% de los esclerocios colocados. Si bien no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la germinación de los mismos generados por la asociación con endófitos (Fig. 5.8, a y b), se observó un efecto de la presencia de broza sobre la germinación de los esclerocios ($F_{2,14} = 3,62$; $p = 0,0542$), observándose una mayor proporción de fructificaciones por esclerocio en aquellas que fueron cubiertas con bolsas sin broza.

B) No se observaron cambios en la diversidad y composición de la comunidad de artrópodos del suelo ni en las tasas de descomposición del material muerto (Cuadro 5.1). La simbiosis con endófitos no provocó cambios en la abundancia ni en la diversidad de órdenes de insectos presentes en las parcelas (Cuadro 5.1). En cuanto a la descomposición de la broza, no se observaron diferencias relacionadas con el origen de la misma (Cuadro 5.1).

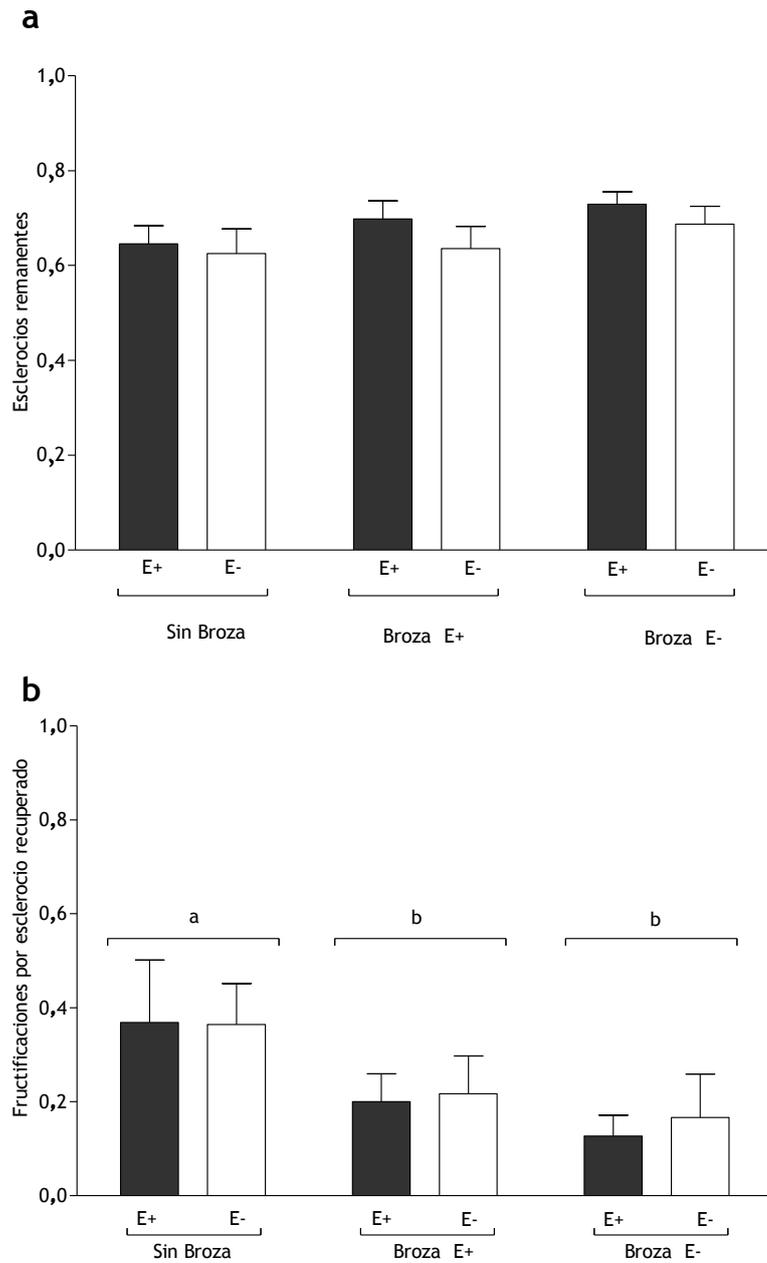


Figura 5.8. Recuperación (a) y número de fructificaciones por esclerocio (b) (medias y error estándar) de esclerocios de *C. purpurea* colocados bajo bolsas de malla vacías (sin broza) o conteniendo broza de *L. multiflorum* asociado (Broza E+) o no asociado (Broza E-) a endófitos, en parcelas sembradas con plantas de *L. multiflorum* asociadas (barras negras) o libres de endófitos (barras blancas). Las letras representan diferencias significativas entre los tratamientos de adición de broza ($p < 0,05$)

Cuadro 5.1. Proporción de órdenes y diversidad de artrópodos (D) y (H) extraídos de suelo en parcelas sembradas con semillas de *L. multiflorum* simbióticas (E+) o no simbióticas (E-) con el endófito *N. occultans* y porcentaje de biomasa remanente en las bolsas de descomposición conteniendo material muerto de *L. multiflorum* simbiótico (Broza+) o no simbiótico (Broza-) con el endófito *N. occultans*, colocadas en parcelas sembradas con plantas de *L. multiflorum* asociadas (E+) o libres de endófitos (E-).

	Descomposición								
	Collembola	Acari	Larva insecta	Psocoptera	Formicidae	D	H	Broza E+ Media (ES)	Broza E- Media (ES)
E+	0,52 (0,1)	0,38 (0,07)	0,04 (0,03)	0 (0)	0,06 (0,06)	1,84 (0,1)	2,05 (0,13)	0,08 (0,04)	0,14 (0,03)
E-	0,36 (0,11)	0,46 (0,09)	0,12 (0,04)	0 (0)	0,05 (0,03)	2,05 (0,19)	2,34 (0,21)	0,16 (0,03)	0,13 (0,03)

5.4 Discusión

El efecto de la clausura a vectores sobre la incidencia indicaría que esta reducción en la infección podría estar ocurriendo a través de un efecto negativo del endófito sobre los vectores. Las plantas simbióticas mostraron una reducción en la infección comparable en magnitud a aquella obtenida mediante la colocación de redes de exclusión en las plantas no simbióticas. No pudimos observar diferencias significativas en cuanto al número de esclerocios recuperados ni a la viabilidad de los mismos, lo que indicaría que el endófito no generó cambios en la abundancia del patógeno durante su estadía en el suelo.

Son numerosas las especies que pueden tener un rol en la dispersión de *C. purpurea*. Estudios realizados en estas mismas parcelas experimentales revelan que existe una gran diversidad de insectos que podrían cumplir función de vectores (Marrero 2013). La producción de azúcares post infección es un gran atractivo para insectos que luego, al irse, se llevan conidios de *C. purpurea*, y los depositan en espigas sanas durante el forrajeo (Alderman 1993, Prom et al. 2003, Prom y Lopez Jr 2004, Prom et al. 2005). Otro mecanismo alternativo de dispersión mediante vectores es la transmisión entre momentos de reposo, lo que es muy frecuente entre algunas especies de múscidos (Marrero, com. pers.). Las diferencias en el patrón de emisión de compuestos volátiles sugieren que estos podrían estar teniendo un efecto sobre los vectores reduciendo la infección de la planta hospedante.

Resultó llamativa la ausencia de diferencias significativas en la recuperación de esclerocios durante el segundo experimento. Numerosos autores encontraron una relación inversa entre la actividad de microorganismos del suelo y la supervivencia de patógenos en el suelo (Sabatini y Innocenti 2000a, b, Sabatini et al. 2002, Sabatini et al. 2004), por lo que sería esperable que en nuestro caso la ausencia de efectos sobre los esclerocios haya estado relacionada con la falta de efectos sobre la comunidad de microorganismos o con el efecto de la malla sobre el ingreso de insectos de mayor tamaño. Otro factor que pudo haber estado involucrado fueron los períodos en los que

se llevó a cabo el experimento. Si bien *L. multiflorum* germina entre los meses de marzo y mayo, *C. purpurea* entra en contacto con el suelo a partir de diciembre, por lo que estaría influenciado, durante todo el verano por los cambios generados por la generación anterior de *L. multiflorum*. Numerosos autores observaron cambios en la comunidad del suelo asociados a la simbiosis con endófitos. En particular, en el caso de la simbiosis entre *L. multiflorum* y *N. occultans*, Casas (2012) encontró que dicha asociación generó un aumento en la riqueza y diversidad de organismos del suelo, en particular de fungívoros y omnívoros. Al observar los valores obtenidos en este capítulo para número de individuos por gramos de suelo, y tasas de descomposición, observamos que estos difieren considerablemente de los publicados por otros autores que experimentaron en el mismo sistema (Omacini et al. 2004, Casas et al. 2011, Casas 2012). Estas diferencias podrían ser atribuidas al pre-tratamiento de solarización del suelo, aplicado para evitar la entrada de semillas a las parcelas y remover los individuos de *L. multiflorum* que podrían haber permanecido en el banco (Gill y McSorley 2010).

Nuestros resultados señalan que la simbiosis con endófitos puede reducir la infección por el patógeno *C. purpurea*, sin embargo, los mecanismos por los cuales esto ocurre no se ajustan a los mecanismos usualmente propuestos para explicar este efecto. A menudo, el escape a un patógeno es el mecanismo responsable de la falta de infección en plantas susceptibles (Burdon 1987). A diferencia de la evasión o de la resistencia, en este mecanismo la reducción de la infección se debe a una combinación de circunstancias que evitan la llegada y el contacto entre el patógeno y la planta hospedante. En el caso particular de *C. purpurea*, la supervivencia del patógeno y la posterior infección depende de numerosos factores tanto bióticos como abióticos, como son la lluvia, el viento y los insectos. Estos agentes son entre otras cosas, responsables del transporte de conidios de una planta infectada a una sana y por lo tanto son factores que regulan la dinámica de la enfermedad en poblaciones de la planta hospedante. Cualquier mecanismo sin base genética que actúe reduciendo la llegada del patógeno a la planta durante el período en el cual esta es susceptible a ser infectada puede ser interpretado como un mecanismo de escape. Durante este capítulo pude demostrar que la simbiosis entre *L. multiflorum* y *N. occultans*, podría promover el escape de la planta hospedante a la infección por el patógeno *C. purpurea*, interactuando negativamente con uno de los factores responsables de la dispersión como son los vectores. Esto sería una alternativa a los mecanismos tradicionales de resistencia inducida o producción de compuestos fungistáticos propuestos hasta el momento por otros autores para explicar la reducción en la infección por patógenos en plantas infectadas (West y Gwinn 1993, Yue et al. 2000b, Wäli et al. 2006).

Capítulo 6

DISCUSIÓN GENERAL

6.1 Introducción

La principal intención de esta tesis fue examinar la triple interacción entre plantas, hongos endófitos y enemigos naturales de las plantas como son los hongos patógenos, y el impacto que esta puede tener sobre el éxito del hospedante y la simbiosis y sobre la estructura de la comunidad vegetal. A lo largo de la tesis se demostró que la simbiosis con endófitos tiene efectos tanto directos como indirectos sobre la interacción del pasto hospedante con ciertos hongos patógenos, y que estos efectos pueden propagarse hacia otros componentes de la comunidad vegetal. Asimismo, la búsqueda de los mecanismos sugirió que los efectos del endófito sobre la incidencia o severidad de la infección podrían estar mediados por la respuesta de otros organismos como son los insectos vectores de patógenos a la presencia de la simbiosis pasto-endófito. Los resultados de esta tesis sugieren que el resultado de la interacción planta-endófito-patógeno es extremadamente compleja e involucra a numerosos agentes tanto bióticos como abióticos que no habían sido considerados hasta el momento.

En numerosos trabajos se ha propuesto, que los patógenos poseen un impacto sobre las poblaciones que supera ampliamente a aquel causado por los herbívoros (Mitchell 2003, Mitchell et al. 2006). Sin embargo, existe una gran escasez de información empírica, principalmente debido a las dificultades experimentales que estos plantean (Mitchell 2003). La inclusión de la simbiosis con endófitos, lejos de simplificarlo, le sumó complejidad a este problema. A pesar de los interrogantes que plantea esta triple interacción, el abordaje ha sido reducido, y las aproximaciones han sido a menudo limitadas. Los estudios publicados han soportado la hipótesis de que la simbiosis con endófitos podría tener un efecto negativo sobre la infección por patógenos (Capítulo 2) (Pérez et al. 2013). En esa línea, pero en contraposición a las aproximaciones clásicas, esta tesis propone que la simbiosis pasto endófito se ubica en un contexto de comunidad que puede tener un rol en la interacción con los patógenos (Figura 6.1).

En esta tesis estudié la interacción entre plantas, endófitos y patógenos a través de dos grandes aproximaciones: Por un lado mediante la revisión y análisis de los trabajos publicados sobre el tema a través de un meta-análisis (Capítulo 2) y por el otro, mediante la experimentación con plantas simbióticas y no simbióticas y patógenos pertenecientes a dos grupos funcionales: *Asesinos* y *Castradores* (Fig. 6.1 (1)) (Burdon 1993, Dobson y Crawley 1994). En los capítulos experimentales las aproximaciones variaron de acuerdo a las hipótesis que se buscó poner a prueba. Se realizaron ensayos en parcelas experimentales en la Facultad de Agronomía de los cuales surgieron hipótesis mecanísticas que fueron puestas a prueba mediante ensayos de laboratorio (Capítulo 4). Posteriormente realicé ensambles de comunidades en invernáculo para evaluar si los mecanismos observados en los ensayos a laboratorio podrían llevar a que

el endófito extienda sus efectos a plantas vecinas no endofíticas (Fig. 6.1 (3)) (Capítulo 4). Finalmente realicé un ensayo a campo, integrando a otros miembros de la comunidad de pastizal que podrían tener efectos sobre esta triple interacción, como son los insectos vectores y los microorganismos del suelo (Fig. 6.1 (4) y (5)) (Capítulo 5).

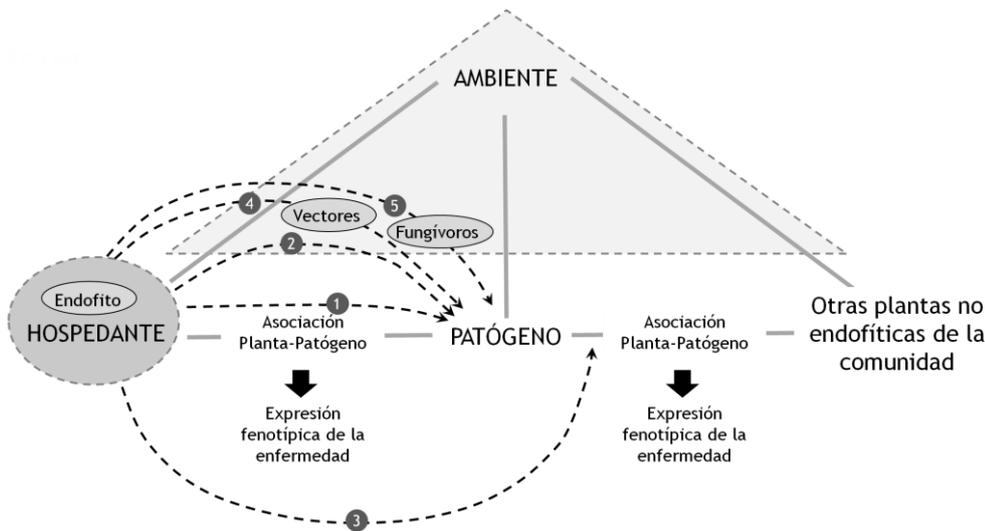


Figura 6.1. Esquema de las interacciones estudiadas en esta tesis. 1) Cambios en los atributos morfológicos y ecológicos de la planta como resultado de la interacción con el endófito que modifican su interacción con patógenos; 2) Cambios en las condiciones ambientales (estrés abiótico) que modulan la interacción de la simbiosis con el patógeno; 3) Efectos negativos de la simbiosis sobre el patógeno que impacta en otras especies que no forman simbiosis con endófitos de la comunidad; 4) cambios producidos por la simbiosis en la comunidad de vectores de patógenos que impactan en su ecología y su relación con la planta hospedante; 5) Efectos de la simbiosis en la comunidad microorganismos del suelo e impactan en su supervivencia modificando ecología y su relación con la planta hospedante. Las líneas punteadas representan el efecto generado por la interacción entre la planta y el endófito. Modificada de Burdon (1987)

Los resultados del Meta-análisis realizado en el Capítulo 2 señalan que la simbiosis con endófitos tiene un efecto negativo sobre la infección por patógenos. Este se encuentra influenciado en gran parte por el resultado negativo de los ensayos realizados *in vitro* (Siegel y Latch 1991, Clay y Schardl 2002, Popay y Bonos 2008, Rodríguez et al. 2009b), y por el grupo funcional de patógenos con los que se realizaron los ensayos, en particular asesinos y debilitadores (Fig. 6.2). Los mecanismos propuestos para explicar este resultado son, principalmente la producción de compuestos con actividad antifúngica y la mayor producción de antioxidantes en plantas simbióticas (White Jr y Torres 2010, Hamilton et al. 2012). Sin embargo, y tal como se observa en los resultados de este meta-análisis, estos mecanismos no son herramientas suficientes para predecir de qué manera ocurriría la interacción en sistemas naturales (Cook y Baker 1983).

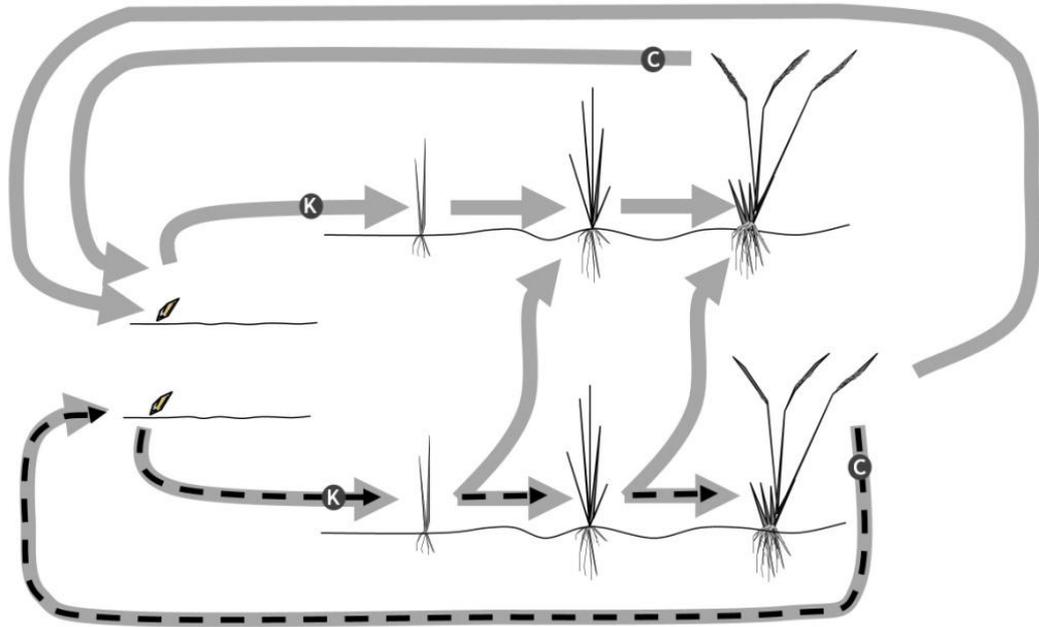


Figura 6. 2. Ciclo de vida de un pasto anual (línea continua), su hongo endófito de transmisión exclusivamente vertical (línea interrumpida) y dos grupos de hongos podrían causar distintos impactos en la demografía de cada integrante de la asociación. (C). Castradores como es *C. purpurea* y, (K) Asesinos, como lo son *Pythium sp* y *Rhizoctonia sp*.

A pesar de este claro efecto existen varias fuentes de heterogeneidad que fueron incorporados al momento de llevar a cabo los ensayos que se muestran en los capítulos experimentales. En particular se observó una gran heterogeneidad asociada al tipo de experimento que nos señala el efecto que tienen las condiciones ambientales sobre la triple interacción y el bajo grado de correspondencia entre lo observado en los ensayos realizados en laboratorio e indica que la extrapolación de estos resultados a sistemas naturales podría llevar a la tergiversación de lo que realmente ocurre en estos sistemas. A la vez, estas diferencias resaltan el rol que el ambiente y otros miembros de la comunidad, tienen sobre la interacción entre las plantas, los endófitos y el ambiente (Pérez et al. 2013, Rúa et al. 2013). Por otro lado, existe un sesgo de los ensayos realizados en laboratorio que podrían estar inclinando la balanza de la interacción. Los ensayos in vitro solo pueden ser realizados utilizando aquellos patógenos que no realizan una explotación exclusivamente del hospedante vivo. Otra limitación de los ensayos realizados en condiciones de laboratorio no nos permiten detectar los cambios que ocurren como consecuencia de la interacción entre plantas y endófitos (Rodríguez et al. 2009a) (Christensen, Com. Pers.) . Se observaron asimismo diferencias asociadas al grupo funcional de patógenos utilizados. En particular, el efecto de las simbiosis sobre los castradores no mostró diferencias significativas, sin embargo este grupo se diferenció significativamente de los demás. Esto resulta llamativo, ya que estos

patógenos tienen un vínculo más estrecho con el endófito que los debilitadores o los asesinos, ya que deben competir con el endófito por el ovario. El endófito es transmitido exclusivamente de manera vertical, por lo que el resultado de la interacción entre este, la planta hospedante, y los castradores parecería ser un punto crítico para asegurar la persistencia de la simbiosis dentro de las poblaciones del hospedante. Por último, se observó gran heterogeneidad asociada con la identidad de las especies tanto de hospedante y endófito como de patógeno. En el caso particular de esta triple interacción, y a causa del bajo número de experimentos, resultó imposible separar el efecto de la identidad de las especies, de las aproximaciones metodológicas adoptadas por cada grupo de trabajo. Otras fuentes de heterogeneidad fueron el grupo funcional de patógenos y el tipo de aproximación utilizada.

El balance de esta triple interacción es el resultado de la relación entre los organismos y el ambiente. En particular en la infección por patógenos castradores, nuestros resultados sugieren que el ambiente abiótico modula los efectos del endófito sobre la infección de la planta hospedante (Capítulo 3, Pérez et al. 2013). Los resultados de este primer capítulo experimental nos indican que el ambiente abiótico puede tener efectos sobre la incidencia y severidad del patógeno. En condiciones control, la incidencia y severidad de *C. purpurea* fue considerablemente menor cuando las plantas se encontraban asociadas a hongos endófitos. Sin embargo, al someter el sistema a condiciones de estrés, este efecto se borró, igualando los valores para plantas simbióticas y no simbióticas. Esto se asociaría a la hipótesis que propone que el balance de la interacción depende de las condiciones ambientales (García Parisi et al. 2012, Pérez et al. 2013). Por un lado, mutualismo podría romperse al someter a la planta hospedante a condiciones de estrés (Katan y Eshel 1973, Altman y Campbell 1977, Kiers et al. 2010, Gundel et al. 2012b). Por el otro lado, muchos patógenos dependen de elementos del ambiente tanto biótico como abiótico para su dispersión e infección. Si las diferencias entre las plantas simbióticas y no simbióticas se encuentran asociadas a un efecto del endófito sobre estos, un cambio en estos elementos pueden llevar a que uno no detecte diferencias debidas a la asociación con el endófito (Pérez et al. 2013, Rúa et al. 2013).

En el capítulo 4 señalamos que la asociación entre *L. multiflorum* y hongos endófitos tiene efectos sobre la capacidad de los patógenos de infectar a esta especie y a otras especies de la comunidad. Se realizaron experimentos incluyendo distintos niveles de organización. En primer lugar se observó que el endófito tendría, para algunos patógenos, efecto a nivel poblacional aumentando la emergencia de plantas simbióticas de *L. multiflorum* en suelo inoculado con respecto a aquellas no asociadas a endófitos. De este experimento derivó la hipótesis de que la interacción entre plantas y endófitos tendría, durante la germinación, un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno. Al poner a prueba los mecanismos que podrían llegar a estar involucrados mediante un ensayo en condiciones de laboratorio, se concluyó que estos efectos podrían extenderse a niveles superiores, modificando así la estructura y el funcionamiento de la comunidad. Finalmente, con el tercer ensayo realizado en invernáculo incluyendo otras especies de

la comunidad como son *B. catharticus*, *B. minor* y *S. neesiana* se puso a prueba dicha hipótesis, observándose algunas de las predicciones propuestas.

Patógenos generalistas como los causantes de muerte pre-emergencia utilizados en el capítulo 4, generalmente están asociados a interacciones de competencia aparente especies vegetales dentro de la comunidad vegetal (Hudson et al. 2006). Al comparar con situaciones control, la presencia de patógenos, cambia la emergencia de las especies de la comunidad. Una observación superficial de estas situaciones nos podrían llevar a pensar que existen interacciones de competencia aparente entre las dos especies de mayor dominancia dentro de la comunidad: *L. multiflorum* y *B. catharticus* (Tognetti y Chaneton 2012). Al introducir al endófito al sistema, se observaron cambios en la relación entre estas dos especies, lo que podría llevar a cambios en la estructura de la comunidad vegetal. Probablemente, el éxito de las especies dentro de la comunidad pase a estar determinado por la habilidad competitiva de cada una. En este aspecto, numerosos autores han sugerido que la asociación con endófitos podría otorgarle ventajas competitivas a la planta hospedante (Malinowski et al. 1997, Omacini et al. 2006, Vázquez-de-Aldana et al. 2013). Aunque no se ha puesto a prueba, este mecanismo se corresponde con los patrones observados en los pastizales de la pampa ondulada donde *L. multiflorum* se encuentra naturalizada y domina junto a *B. catharticus* (Tognetti y Chaneton 2012).

El efecto del endófito sobre la interacción del pasto hospedante con patógenos que causan muerte pre-emergencia en plántulas se ha estudiado a nivel poblacional (Chu-Chou et al. 1992, Bacon et al. 1997, Pańka et al. 2013) y más brevemente a nivel de comunidad (Rudgers y Orr 2009). En esta tesis (Capítulo 4) hemos analizado la interacción a través de distintos niveles de organización. Pusimos a prueba los mecanismos que podrían estar involucrados, y establecimos nuevas hipótesis acerca de cómo podría impactar finalmente la simbiosis sobre la estructura y el funcionamiento de la comunidad.

Numerosos patógenos tienen una interacción estrecha con el ambiente, dependiendo de este para su supervivencia y dispersión (Burdon 1987, Sabatini y Innocenti 2000b, 2001, Kluth et al. 2002, Purcell y Almeida 2005), lo que permitiría pensar que los cambios producidos por la simbiosis con endófitos sobre el ambiente podrían impactar en la biología del patógeno reduciendo la infección en la planta hospedante. A lo largo del capítulo 5 nos dedicamos a estudiar de qué manera los cambios en el ambiente, tanto biótico como abiótico, podrían impactar sobre la dinámica de la infección por *C. purpurea*. Esto lo realicé a través de dos aproximaciones, por un lado, estudié la interacción entre la simbiosis planta-endófito y los insectos que podrían transportar esporas de este patógeno. Por otro lado, estudié el impacto de los cambios generados por la simbiosis con endófitos sobre la comunidad de microorganismos del suelo sobre la persistencia y germinación de esclerocios de *C. purpurea*.

El tratamiento de exclusión de vectores no mostró diferencias en la infección de las plantas simbióticas, sin embargo en las plantas no simbióticas, las plantas no embolsadas tuvieron valores de incidencia y severidad que duplicaron a las simbióticas

y a las no simbióticas embolsadas. Estos resultados podrían estar asociados a las diferencias observadas en la emisión de compuestos volátiles entre plantas simbióticas y no simbióticas. En estudios anteriores realizados con *C. purpurea* tanto Krauss et al. (2007) como Gundel et al. (2012a) encontraron que en poblaciones de la incidencia del patógeno fue mayor en plantas simbióticas. Estos resultados podrían ser atribuidos al hecho de que en ambos experimentos estos resultados fueron observados en cultivares comerciales y condiciones experimentales en las que probablemente no se hubieran seleccionado interacciones entre el patógeno y sus vectores. En nuestro caso el experimento fue instalado dentro de poblaciones de *L. multiflorum* asociadas a endófitos con más de 10 años de antigüedad en el sitio. Para la instalación de las parcelas se utilizaron semillas provenientes de las mismas poblaciones, a las que se le removió el endofito, siempre permitiendo el flujo génico entre plantas simbióticas y no simbióticas. De esta manera se intentó reducir el efecto que podría tener el genotipo sobre las interacciones.

En cuanto al efecto de los cambios generados sobre la comunidad del suelo y su efecto en la supervivencia de *C. purpurea*, nuestros experimentos no nos permitieron detectar diferencias. De la comparación de nuestros resultados con aquellos obtenidos por otros investigadores (Omacini et al. 2004, Casas et al. 2011, Casas 2012) podemos concluir que esta falta de efecto sobre *C. purpurea* pudieron haber sido, en parte una consecuencia de las bajas tasas de descomposición del material vegetal y la diversidad de microorganismos. Las diferencias entre los valores obtenidos y los descriptos por otros autores podrían llegar a estar asociados con los pre-tratamientos aplicados para reducir la entrada de semillas de *L. multiflorum* al banco (Gill y McSorley 2010).

6.2 Conclusión

A través del desarrollo de la tesis he demostrado que la simbiosis modifica a través de diversas vías y distintos niveles de organización la interacción de la planta hospedante con los patógenos. Los resultados de esta tesis demuestran que el endófito puede tener un efecto negativo sobre la infección por patógenos que afectan el éxito del pasto hospedante en diversos estadios fenológicos. Sin embargo, el análisis de la bibliografía reveló que existen numerosas fuentes de heterogeneidad entre los ensayos, atribuible entre otras cosas a la aproximación experimental, y el grupo funcional utilizado para poner a prueba esta hipótesis (Capítulo 2). El pasaje de la escala de laboratorio a una escala de campo viene acompañado por un mayor efecto de las condiciones ambientales sobre la simbiosis y también de la simbiosis sobre el ambiente. El balance de la simbiosis sobre la infección por patógenos se encuentra fuertemente influenciado por las condiciones ambientales. En condiciones normales, la simbiosis con endófitos redujo significativamente la infección por el patógeno castrador *Claviceps purpurea*, sin embargo este efecto protector se borró al someter a la planta a condiciones estresantes (Capítulo 3). También a escala poblacional, la simbiosis redujo la mortalidad pre-emergencia de plántulas de *L. multiflorum*. El mecanismo aparente por detrás de este efecto fue una inhibición del patógeno causado por las semillas simbióticas en germinación. Esta reducción provocó una reducción en algunas especies

vecinas que pudieron utilizar ese período “ventana” para escapar a la infección (Capítulo 4). Finalmente, al investigar los mecanismos que redujeron la infección por *C. purpurea* en las plantas simbióticas encontramos que la simbiosis tiene efectos negativos sobre insectos que podrían estar transportando esporas del patógeno.

Esta tesis no solo aporta al conocimiento de la simbiosis entre pastos y endófitos, y entre plantas y microorganismos en general, sino que brinda nuevos elementos para la comprensión de la complejidad de las interacciones dentro de las comunidades de pastizal. Por otro lado, esta tesis nos muestra como, con relativamente poco tiempo desde su invasión, la simbiosis con endófitos estableció numerosas interacciones con otros miembros de la comunidad. Finalmente, algunas de estas interacciones podrían ser aprovechadas agrónomicamente al momento de establecer pasturas (monofíticas o polifíticas con alta resistencia a los patógenos como así también para reducir los efectos negativos que tiene la infección por *C. purpurea* sobre el ganado debido a la baja infección de este hongo en las plantas simbióticas.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Agrios, G. N. 2005a. *Plant Pathology*. Elsevier Science.
- Agrios, G. N. 2005b. Transmission of Plant Diseases by Insects. Pages 2291-2317 *Encyclopedia of Entomology*. Springer Netherlands, Netherlands.
- Alderman, S. C. 1993. Aerobiology of *Claviceps purpurea* in Kentucky bluegrass. *Plant Disease* **77**:1045-1049.
- Alderman, S. C., D. D. Coats, F. J. Crowe y M. D. Butler. 1998. Occurrence and distribution of ergot and estimates of seed loss in Kentucky bluegrass grown for seed in central Oregon. *Plant Disease* **82**:89-93.
- Alexander, H. M. 2010. Disease in natural plant populations, communities, and ecosystems: Insights into ecological and evolutionary processes. *Plant Disease* **94**:492-503.
- Alexander, H. M. y R. D. Holt. 1998. The interaction between plant competition and disease. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **1**:206-220.
- Altman, J. y C. L. Campbell. 1977. Effect of Herbicides on Plant Diseases. *Annual Review of Phytopathology* **15**:361-385.
- Antunes, P. M., J. Miller, L. M. Carvalho, J. N. Klironomos y J. A. Newman. 2008. Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. *Functional Ecology* **22**:912-918.
- Bacon, C. y E. Luttrell. 1982. Competition between ergots of *Claviceps purpurea* and rye seed for photosynthates. *Phytopathology* **72**:1332-1336.
- Bacon, C. W., M. D. Richardson y J. F. White Jr. 1997. Modification and uses of endophyte-enhanced turfgrasses: A role for molecular technology. *Crop Science* **37**:1415-1425.
- Bacon, C. W. y J. F. J. White. 1994. *Stains, media, and procedures for analyzing endophytes*. CRC Press, Boca Raton.
- Ball, O. J. P., G. M. Barker, R. A. Prestidge y J. M. Sprosen. 1997. Distribution and accumulation of the mycotoxin lolitrem B in *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass. *Journal of Chemical Ecology* **23**:1435-1449.
- Barger, J. L. y M. G. Tannenbaum. 1998. Consumption of endophyte-infected fescue seeds and osmoregulation in white-footed mice. *Journal of Mammalogy* **79**:464-474.
- Borer, E. T., P. R. Hosseini, E. W. Seabloom y A. P. Dobson. 2007. Pathogen-induced reversal of native dominance in a grassland community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:5473-5478.
- Branca, A., P. Simonian, M. Ferrante, E. Novas y R. M. Negri. 2003. Electronic nose based discrimination of a perfumery compound in a fragrance. *Sensors and Actuators B: Chemical* **92**:6.
- Burdon, J. J. 1987. *Diseases and plant population biology*. CUP Archive.
- Burdon, J. J. 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology* **31**:305-323.
- Bush, L. P., H. H. Wilkinson y C. L. Schardl. 1997. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology* **114**:1-7.
- Casas, C. 2012. *La simbiosis entre pastos y hongos endofitos: su impronta aérea y subterránea en distintos contextos agroecológicos* Universidad de Buenos Aires.
- Casas, C., M. Omacini, M. S. Montecchia y O. S. Correa. 2011. Soil microbial community responses to the fungal endophyte *Neotyphodium* in Italian ryegrass. *Plant and Soil* **340**:347-355.

- Clark, D. A., E. R. Thom y C. D. Waugh. 1996. Milk production from pastures and pasture silage with different levels of endophyte infection. *New Zealand Society of Animal Production*.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**:10-16.
- Clay, K. y C. Schardl. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* **160**:S99-S127.
- Cook, R. J. y K. F. Baker. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- Crossley Jr, D. A. y J. M. Blair. 1991. A high-efficiency, "low-technology" Tullgren-type extractor for soil microarthropods. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **34**:187-192.
- Cheplick, G. P., K. Clay y S. Marks. 1989. Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytologist* **111**:89-97.
- Cheplick, G. P. y S. H. Faeth. 2009. *Ecology and Evolution of the Grass-Endophyte Symbiosis*. Oxford University Press, USA.
- Christensen, M. J. 1996. Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloë* endophytes. *Australasian Plant Pathology* **25**:186-191.
- Chu-Chou, M., B. Guo, Z. Q. An, J. W. Hendrix, R. S. Ferriss, M. R. Siegel, C. T. Dougherty y P. B. Burrus. 1992. Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the *accremonium coenophialum* endophyte. *Soil Biology and Biochemistry* **24**:633-637.
- D'Alessandro, M. y T. C. Turlings. 2006. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. *Analyst* **131**:24-32.
- Davitt, A. J., C. Chen y J. A. Rudgers. 2011. Understanding context-dependency in plant-microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. *Environmental and Experimental Botany* **71**:137-145.
- Davitt, A. J., M. Stansberry y J. A. Rudgers. 2010. Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability? *New Phytologist* **188**:824-834.
- De Deyn, G. B., C. E. Raaijmakers, H. R. Zoomer, M. P. Berg, P. C. De Ruiter, H. A. Verhoef, T. M. Bezemer y W. H. Van der Putten. 2003. Soil invertebrate fauna enhances grassland succession and diversity. *Nature* **422**:711-713.
- Denison, R. F., C. Bledsoe, M. Kahn, F. O'Gara, E. L. Simms y L. S. Thomashow. 2003. Cooperation in the rhizosphere and the 'free rider' problem. *Ecology* **84**:838-845.
- Diekman, M. A. y M. L. Green. 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science* **70**:1615-1627.
- Dobson, A. y M. Crawley. 1994. Pathogens and the structure of plant communities. *Trends in Ecology and Evolution* **9**:393-397.
- Facelli, J. M., C. M. Montero y R. J. C. Leon. 1988. Effect of different disturbance regimen on seminatural grasslands from the subhumid Pampa. *Flora; morphologie, geobotanik, oekophysiologie*. **180**:241-249.
- Faeth, S. H. y S. Saari. 2012. Fungal grass endophytes and arthropod communities: Lessons from plant defence theory and multitrophic interactions. *Fungal Ecology* **5**:364-371.

- Faeth, S. H. y E. Shochat. 2010. Inherited microbial symbionts increase herbivore abundances and alter arthropod diversity on a native grass. *Ecology* **91**:1329-1343.
- Fisher, A. J., J. M. DiTomaso y T. R. Gordon. 2005. Intraspecific groups of *Claviceps purpurea* associated with grass species in Willapa Bay, Washington, and the prospects for biological control of invasive *Spartina alterniflora*. *Biological Control* **34**:170-179.
- García Parisi, P. A., C. Casas, P. E. Gundel y M. Omacini. 2012. Consequences of grazing on the vertical transmission of a fungal *Neotyphodium* symbiont in an annual grass population. *Austral Ecology* **37**:620-628.
- Gilbert, G. S. 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **40**:13-43.
- Gilbert, J. 2007. *Insect Transmission Of Plant Diseases*. Daya Publishing House.
- Gill, H. K. y R. McSorley. 2010. Effect of Integrating Soil Solarization and Organic Mulching on the Soil Surface Insect Community. *Florida Entomologist* **93**:308-309.
- Glenn, A. E., C. W. Bacon, R. Price y R. T. Hanlin. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* **88**:369-383.
- Gorischek, A. M., M. E. Afkhami, E. K. Seifert y J. A. Rudgers. 2013. Fungal symbionts as manipulators of plant reproductive biology. *American Naturalist* **181**:562-570.
- Gundel, P., L. Garibaldi, M. Helander y K. Saikkonen. 2013a. Symbiotic interactions as drivers of trade-offs in plants: effects of fungal endophytes on tall fescue. *Fungal Diversity* **60**:5-14.
- Gundel, P., M. Helander, C. Casas, C. Hamilton, S. Faeth y K. Saikkonen. 2012a. *Neotyphodium* fungal endophyte in tall fescue (*Schedonorus phoenix*): a comparison of three Northern European wild populations and the cultivar Kentucky-31. *Fungal Diversity*:1-10.
- Gundel, P., M. Helander, C. Casas, C. Hamilton, S. Faeth y K. Saikkonen. 2013b. *Neotyphodium* fungal endophyte in tall fescue (*Schedonorus phoenix*): a comparison of three Northern European wild populations and the cultivar Kentucky-31. *Fungal Diversity* **60**:15-24.
- Gundel, P., M. Martínez-Ghersa, M. Omacini, R. Cuyeu, E. Pagano, R. Ríos y C. Ghersa. 2012b. Mutualism effectiveness and vertical transmission of symbiotic fungal endophytes in response to host genetic background. *Evolutionary Applications* **5**:838-849.
- Gundel, P. E., W. B. Batista, M. Texeira, M. A. Martínez-Ghersa, M. Omacini y C. M. Ghersa. 2008a. *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, P. E., L. A. Garibaldi, P. M. Tognetti, R. Aragón, C. M. Ghersa y M. Omacini. 2009a. Imperfect vertical transmission of the endophyte *neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the flooding pampa. *Microbial Ecology* **57**:740-748.
- Gundel, P. E., M. A. Martínez-Ghersa, W. B. Batista y C. M. Ghersa. 2010. Dynamics of *Neotyphodium* endophyte infection in ageing seed pools: Incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non-infected seed. *Annals of Applied Biology* **156**:199-209.

- Gundel, P. E., M. A. Martínez-Ghersa, L. A. Garibaldi y C. M. Ghersa. 2009b. Viability of *Neotyphodium* endophytic fungus and endophyte-infected and noninfected *Lolium multiflorum* seeds. *Botany* **87**:88-96.
- Gundel, P. E., M. Omacini, M. A. Martínez-Ghersa y C. M. Ghersa. 2008b. Herbivory mediates grass-endophyte relationships: Comment. *Ecology* **89**:3542-3545.
- Gundel, P. E., J. A. Rudgers y C. M. Ghersa. 2011. Incorporating the process of vertical transmission into understanding of host-symbiont dynamics. *Oikos* **120**:1121-1128.
- Guyader, S., J. Crombez, M. Salles, F. Bussière y T. Bajazet. 2013. Modelling the effects of temperature and leaf wetness on monocyclic infection in a tropical fungal pathosystem. *European Journal of Plant Pathology* **136**:535-545.
- Hahn, H., M. T. McManus, K. Warnstorff, B. J. Monahan, C. A. Young, E. Davies, B. A. Tapper y B. Scott. 2008. *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany* **63**:183-199.
- Hamilton, C. E., P. E. Gundel, M. Helander y K. Saikkonen. 2012. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: A review. *Fungal Diversity* **54**:1-10.
- Hartley, S. E. y A. C. Gange. 2009. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: Mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology* **54**:323-342.
- Holt, R. D. 1984. Spatial Heterogeneity, Indirect Interactions, and the Coexistence of Prey Species. *The American Naturalist* **124**:377-406.
- Hudson, P. J., A. P. Dobson y K. D. Lafferty. 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution* **21**:381-385.
- Innocenti, G., M. Montanari, S. Ganassi y M. A. Sabatini. 2011. Does substrate water content influence the effect of Collembola-pathogenic fungus interaction on plant health? A mesocosm study. *Bulletin of Insectology* **64**:73-76.
- Miranda, M.I., M. Omacini y E. J. Chaneton. 2011. Environmental context of endophyte symbioses: Interacting effects of water stress and insect herbivory. *International Journal of Plant Sciences* **172**:499-508.
- Jani, A. J., S. H. Faeth y D. Gardner. 2010. Asexual endophytes and associated alkaloids alter arthropod community structure and increase herbivore abundances on a native grass. *Ecology Letters* **13**:106-117.
- Johnston, W. J., C. T. Golob, J. W. Sitton y T. R. Schultz. 1996. Effect of temperature and postharvest field burning of Kentucky bluegrass on germination of sclerotia of *Claviceps purpurea*. *Plant Disease* **80**:766-768.
- Justus, M., L. Witte y T. Hartmann. 1997. Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*. *Phytochemistry* **44**:51-57.
- Karban, R. y I. Baldwin. 1997. *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago, IL
- Karst, J., L. Marczak, M. D. Jones y R. Turkington. 2008. The mutualism-parasitism continuum in ectomycorrhizas: a quantitative assessment using meta-analysis. *Ecology* **89**:1032-1042.
- Katan, J. y Y. Eshel. 1973. Interactions between herbicides and plant pathogens. Pages 145-177 in F. Gunther y J. Gunther, editors. *Residue Reviews*. Springer New York.

- Kiers, T. E., T. M. Palmer, A. R. Ives, J. F. Bruno y J. L. Bronstein. 2010. Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecology Letters* **13**:1459-1474.
- Kluth, S., A. Kruess y T. Tschardt. 2002. Insects as vectors of plant pathogens: Mutualistic and antagonistic interactions. *Oecologia* **133**:193-199.
- Knoch, T. R., S. H. Faeth y D. L. Arnott. 1993. Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. *Oecologia* **95**:470-473.
- Kothamasi, D., E. Toby Kiers y M. G. A. van der Heijden. 2009. Mutualisms and community organization. Oxford University Press, Oxford.
- Krauss, J., D. A. Harri, L. Bush, S. A. Power y C. B. Muller. 2007. Fungal grass endophytes, grass cultivars, nitrogen deposition and the associations with colonizing insects. Pages 53-57 in 6th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses, "From Lab To Farm". , Christchurch, NZ.
- Kunkel, B. A., P. S. Grewal y M. F. Quigley. 2004. A mechanism of acquired resistance against an entomopathogenic nematode by *Agrotis ipsilon* feeding on perennial ryegrass harboring a fungal endophyte. *Biological Control* **29**:100-108.
- Latch, G. C. M. 2009. Diseases and Endophytes. *Agronomy Monographs*:121-127.
- Lehtonen, P. T., M. Helander, S. A. Siddiqui, K. Lehto y K. Saikkonen. 2006. Endophytic fungus decreases plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pratense*). *Biology Letters* **2**:620-623.
- Lemons, A., K. Clay y J. A. Rudgers. 2005. Connecting plant-microbial interactions above and belowground: A fungal endophyte affects decomposition. *Oecologia* **145**:595-604.
- Li, C. j., J. h. Gao y Z. b. Nan. 2007. Interactions of *Neotyphodium gansuense*, *Achnatherum inebrians*, and plant-pathogenic fungi. *Mycological Research* **111**:1220-1227.
- Lichtenzweig, J., J. P. Anderson, G. Thomas, R. P. Oliver y K. B. Singh. 2006. Inoculation and growth with soil-borne pathogenic fungi. in M. U., editor. *The Medicago truncatula handbook*. Noble Foundation, Journet EP, Summer LW. USA.
- Mack, K. M. L. y J. A. Rudgers. 2008. Balancing multiple mutualists: Asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. *Oikos* **117**:310-320.
- Majewska-Sawka, A. y H. Nakashima. 2004. Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: Immunodetection of fungal antigens. *Fungal Genetics and Biology* **41**:534-541.
- Malinowski, D., A. Leuchtman, D. Schmidt y J. NÅ¶sberger. 1997. Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* endophyte may increase the competitive ability of meadow fescue. *Agronomy Journal* **89**:833-839.
- Malinowski, D. P. y D. P. Belesky. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* **40**:923-940.
- Marks, S., K. Clay y G. P. Cheplick. 1991. Effects of fungal endophytes on interspecific and intraspecific competition in the grasses *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. *Journal of Applied Ecology* **28**:194-204.
- Marrero, H. J. 2013. Efecto de la agriculturización y la heterogeneidad ambiental sobre el servicio de polinización en agroecosistemas pampeanos. University of Buenos Aires.

- Martínez-Ghersa, M. A., M. M. Vila Aiub, C. M. Ghersa, P. Gundel y E. H. Satorre. 2004. Herbicide selection of Italian ryegrass under different levels of UVB radiation. *Journal of Environmental Quality* **33**:1376-1386.
- Matthews, J. W. y K. Clay. 2001. Influence of fungal endophyte infection on plant-soil feedback and community interactions. *Ecology* **82**:500-509.
- Mitchell, C. E. 2003. Trophic control of grassland production and biomass by pathogens. *Ecology Letters* **6**:147-155.
- Mitchell, C. E., A. A. Agrawal, J. D. Bever, G. S. Gilbert, R. A. Hufbauer, J. N. Klironomos, J. L. Maron, W. F. Morris, I. M. Parker, A. G. Power, E. W. Seabloom, M. E. Torchin y D. P. Vázquez. 2006. Biotic interactions and plant invasions. *Ecology Letters* **9**:726-740.
- Moon, C. D., C. O. Miles, U. Järlfors y C. L. Schardl. 2002. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. *Mycologia* **94**:694-711.
- Müller, C. B. y J. Krauss. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* **8**:450-456.
- Neal, P. R. y G. J. Anderson. 2004. Does the 'old bag' make a good 'wind bag'? Comparison of four fabrics commonly used as exclusion bags in studies of pollination and reproductive biology. *Annals of Botany* **93**:603-607.
- Novas, M. V., D. Cabral y A. M. Godeas. 2005a. Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis* **40**:23-30.
- Novas, M. V., S. Fracchia, A. Menéndez, D. Cabral y A. Godeas. 2005b. *Glomus patagonicum* sp. nov. (Glomerales), a new arbuscular mycorrhizal fungus from Argentina. *Nova Hedwigia* **80**:533-539.
- Novas, M. V., L. J. Iannone, A. M. Godeas y D. Cabral. 2009. Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycological Progress* **8**:75-81.
- Novas M.V., L.J. Iannone, A.M. Godeas y J.M. Scervino: Evidence for leaf endophyte regulation of root symbionts: Effect of *Neotyphodium* endophytes on the pre-infective state of mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 2011, 55(1):19-28.
- Omacini, M., E. J. Chaneton, L. Bush y C. M. Ghersa. 2009. A fungal endosymbiont affects host plant recruitment through seed- and litter-mediated mechanisms. *Functional Ecology* **23**:1148-1156.
- Omacini, M., E. J. Chaneton, C. M. Ghersa y C. B. Müller. 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* **409**:78-81.
- Omacini, M., E. J. Chaneton, C. M. Ghersa y P. Otero. 2004. Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos* **104**:581-590.
- Omacini, M., T. Eggers, M. Bonkowski, A. C. Gange y T. H. Jones. 2006. Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology* **20**:226-232.
- Omacini, M., M. Semmartin, L. I. Pérez y P. E. Gundel. 2012. Grass-endophyte symbiosis: A neglected aboveground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology* **61**:273-279.
- Pańka, D., C. P. West, C. A. Guerber y M. D. Richardson. 2013. Susceptibility of tall fescue to *Rhizoctonia zeae* infection as affected by endophyte symbiosis. *Annals of Applied Biology* **163**:257-268.

- Partida-Martinez, L. P. P. y M. Heil. 2011. The microbe-free plant: fact or artefact? *Frontiers in Plant Science* **2**.
- Pérez, L. I., P. E. Gundel, C. M. Ghersa y M. Omacini. 2013. Family issues: fungal endophyte protects host grass from the closely related pathogen *Claviceps purpurea*. *Fungal Ecology* **6**:379-386.
- Philipson, M. N. y M. C. Christey. 1986. The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*. *New Zealand Journal of Botany* **24**:125-134.
- Pirhofer-Walzl, K., J. Rasmussen, H. Høgh-Jensen, J. Eriksen y K. Søgaard. 2012. Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. *Plant and Soil* **350**:71-84.
- Popay, A. J. y S. A. Bonos. 2008. Biotic responses in endophytic grasses. Pages 163-185 *Neotyphodium in Cool-Season Grasses*. Blackwell Publishing Ltd.
- Popay, A. J. y J. G. Jensen. 2005. Soil biota associated with endophyte-infected tall fescue in the field. *New Zealand Plant Protection* **58**:117-121.
- Prom, L. K. y J. D. Lopez Jr. 2004. Viability of *Claviceps africana* spores ingested by adult corn earworm moths, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **97**:764-767.
- Prom, L. K., J. D. Lopez Jr y M. A. Lathief. 2003. Transmission of *Claviceps africana* spores from diseased to non-infected sorghum by corn earworm moths, *Helicoverpa zea*. *Journal of Sustainable Agriculture* **21**:49-58.
- Prom, L. K., J. D. Lopez Jr y G. P. Mayalagu. 2005. Passive transmission of sorghum ergot (*Claviceps africana*) by four species of adult stink bugs. *Southwestern Entomologist* **30**:29-34.
- Purcell, A. H. y R. P. Almeida. 2005. Insects as vectors of disease agents. Page 5 *in* R. M. Goodman, editor. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Marcel Dekker.
- Rasmussen, S., A. J. Parsons, K. Fraser, H. Xue y J. A. Newman. 2008a. Metabolic profiles of *Lolium perenne* are differentially affected by nitrogen supply, carbohydrate content y fungal endophyte infection. *Plant Physiology* **146**:1440-1453.
- Rasmussen, S., A. J. Parsons, A. Popay, H. Xue y J. A. Newman. 2008b. Plant-endophyte-herbivore interactions: More than just alkaloids? *Plant Signaling and Behavior* **3**:974-977.
- Ravel, C., Y. Michalakis y G. Charmet. 1997. The effect of imperfect transmission on the frequency of mutualistic seed-borne endophytes in natural populations of grasses. *Oikos* **80**:18-24.
- Ren, A.-Z., Y.-H. Wang y Y.-B. Gao. 2009. Difference in antifungal activity of morphotypes of clavicipitaceous endophytes within and between species. *Acta Ecologica Sinica* **29**:227-231.
- Rodriguez, R. J., D. Carl Freeman, E. D. McArthur, Y. O. Kim y R. S. Redman. 2009a. Symbiotic regulation of plant growth, development and reproduction. *Communicative and Integrative Biology* **2**:141-143.
- Rodriguez, R. J., J. F. White Jr, A. E. Arnold y R. S. Redman. 2009b. Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist* **182**:314-330.
- Rotem, J. 1975. The effect of environmental factors and of environmental-biological interactions on plant diseases in sub-tropical and semi-arid conditions. *Australian Plant Pathology Society Newsletter* **4**:40-41.

- Rúa, M. A., R. L. McCulley y C. E. Mitchell. 2013. Fungal endophyte infection and host genetic background jointly modulate host response to an aphid-transmitted viral pathogen. *Journal of Ecology* **101**:1007-1018.
- Rudgers, J. A. y K. Clay. 2007. Endophyte symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems? *Fungal Biology Reviews* **21**:107-124.
- Rudgers, J. A. y K. Clay. 2008. An invasive plant-fungal mutualism reduces arthropod diversity. *Ecology Letters* **11**:831-840.
- Rudgers, J. A., S. Fischer y K. Clay. 2010. Managing plant symbiosis: Fungal endophyte genotype alters plant community composition. *Journal of Applied Ecology* **47**:468-477.
- Rudgers, J. A., J. Holah, S. P. Orr y K. Clay. 2007. Forest succession suppressed by an introduced plant-fungal symbiosis. *Ecology* **88**:18-25.
- Rudgers, J. A., J. M. Koslow y K. Clay. 2004. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters* **7**:42-51.
- Rudgers, J. A., W. B. Mattingly y J. M. Koslow. 2005. Mutualistic fungus promotes plant invasion into diverse communities. *Oecologia* **144**:463-471.
- Rudgers, J. A. y S. Orr. 2009. Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. *Journal of Ecology* **97**:247-255.
- Saari, S., M. Helander, P. Lehtonen, E. Wallius y K. Saikkonen. 2010. Fungal endophytes reduce regrowth and affect competitiveness of meadow fescue in early succession of pastures. *Grass and Forage Science* **65**:287-295.
- Sabatini, M. A., P. Grazioso, C. Altomare y G. Innocenti. 2002. Interactions between *Onychiurus armatus* and *Trichoderma harzianum* in take-all disease suppression in a simple experimental system. *European Journal of Soil Biology* **38**:71-74.
- Sabatini, M. A. y G. Innocenti. 2000a. Functional relationships between Collembola and plant pathogenic fungi of agricultural soils. *Pedobiologia* **44**:467-475.
- Sabatini, M. A. y G. Innocenti. 2000b. Soil-borne plant pathogenic fungi in relation to some collembolan species under laboratory conditions. *Mycological Research* **104**:1197-1201.
- Sabatini, M. A. y G. Innocenti. 2001. Effects of collembola on plant-pathogenic fungus interactions in simple experimental systems. *Biology and Fertility of Soils* **33**:62-66.
- Sabatini, M. A., M. Ventura y G. Innocenti. 2004. Do Collembola affect the competitive relationships among soil-borne plant pathogenic fungi? *Pedobiologia* **48**:603-608.
- Saikkonen, K., S. Saari y M. Helander. 2010. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Diversity* **41**:101-113.
- Schardl, C. L., A. Leuchtman y M. J. Spiering. 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. Pages 315-340.
- Schiestl, F. P., F. Steinebrunner, C. Schulz, S. Von Reuss, W. Francke, C. Weymuth y A. Leuchtman. 2006. Evolution of 'pollinator'-attracting signals in fungi. *Biology Letters* **2**:401-404.
- Siegel, M. y G. Latch. 1991. Expression of antifungal activity in agar culture by isolates of frass endophytes. *Mycologia* **83**:529-537.
- Soriano, A. 1992. Río de la Plata Grasslands. Elsevier, Amsterdam.
- Steinebrunner, F., F. P. Schiestl y A. Leuchtman. 2008a. Ecological role of volatiles produced by *Epichloë*: Differences in antifungal toxicity. *FEMS Microbiology Ecology* **64**:307-316.

- Steinebrunner, F., F. P. Schiestl y A. Leuchtman. 2008b. Variation of insect attracting odor in endophytic *Epichloë* fungi: Phylogenetic constraints versus host influence. *Journal of Chemical Ecology* **34**:772-782.
- Szpeiner, A., M. A. Martínez-Ghersa y C. M. Ghersa. 2009. Wheat volatile emissions modified by top-soil chemical characteristics and herbivory alter the performance of neighbouring wheat plants. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **134**:99-107.
- Taylor, M. N., D. C. Joyce, A. H. Wearing y D. H. Simons. 1997. Influence of fungal pathogens and environmental conditions on disease severity, flower fall and desiccation of harvested Geraldton waxflower 1. Studies with model packages. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **37**:817-824.
- Thakur, R. P. y R. J. Williams. 1980. Pollination effects on pearl millet ergot. *Phytopathology* **70**:80-84.
- Thom, E. R., D. A. Clark y C. D. Waugh. 1999. Growth, persistence, and alkaloid levels of endophyte-infected and endophyte-free ryegrass pastures grazed by dairy cows in northern New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **42**:241-253.
- Thompson, J. N. 2005. *The Geographic Mosaic of Coevolution*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Thrall, P. H., M. E. Hochberg, J. J. Burdon y J. D. Bever. 2007. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology and Evolution* **22**:120-126.
- Tian, P., Z. Nan, C. Li y G. Spangenberg. 2008. Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **122**:593-602.
- Tibbets, T. M. y S. H. Faeth. 1999. *Neotyphodium* endophytes in grasses: Deterrents or promoters of herbivory by leaf-cutting ants? *Oecologia* **118**:297-305.
- Tognetti, P. M. y E. J. Chaneton. 2012. Invasive exotic grasses and seed arrival limit native species establishment in an old-field grassland succession. *Biological Invasions* **14**:2531-2544.
- Tognetti, P. M., E. J. Chaneton, M. Omacini, H. J. Trebino y R. J. C. León. 2010. Exotic vs. native plant dominance over 20 years of old-field succession on set-aside farmland in Argentina. *Biological Conservation* **143**:2494-2503.
- Trevathan, L. E. 1996. Performance of endophyte-free and endophyte-infected tall fescue seedlings in soil infested with *Cochliobolus sativus*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **18**:415-418.
- Uchitel, A., M. Omacini y E. J. Chaneton. 2011. Inherited fungal symbionts enhance establishment of an invasive annual grass across successional habitats. *Oecologia* **165**:465-475.
- Van Der Heijden, M. G. A., R. Bakker, J. Verwaal, T. R. Scheublin, M. Rutten, R. Van Logtestijn y C. Staehelin. 2006. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology* **56**:178-187.
- Van Der Putten, W. H., J. N. Klironomos y D. A. Wardle. 2007a. Microbial ecology of biological invasions. *ISME Journal* **1**:28-37.
- Van Der Putten, W. H., G. A. Kowalchuk, E. P. Brinkman, G. T. A. Doodeman, R. M. Van Der Kaaij, A. F. D. Kamp, F. B. J. Menting y E. M. Veenendaal. 2007b. Soil feedback of exotic savanna grass relates to pathogen absence and mycorrhizal selectivity. *Ecology* **88**:978-988.

- Van Der Putten, W. H., L. E. M. Vet, J. A. Harvey y F. L. Wäckers. 2001. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends in Ecology and Evolution* **16**:547-554.
- Vázquez-de-Aldana, B. R., I. Zabalgogea, A. García-Ciudad y B. García-Criado. 2013. An *Epichloë* endophyte affects the competitive ability of *Festuca rubra* against other grassland species. *Plant and Soil* **362**:201-213.
- Vignale, M. V., M. M. Astiz-Gassó, M. V. Novas y L. J. Iannone. 2013. Epichloid endophytes confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus* (Trin.). *Biological Control* **67**:1-7.
- Vila-Aiub, M. M., P. E. Gundel y C. M. Ghersa. 2005. Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Austral Ecology* **30**:49-57.
- Vila-Aiub, M. M., M. A. Martinez-Ghersa y C. M. Ghersa. 2003. Evolution of herbicide resistance in weeds: Vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities. *Evolutionary Ecology* **17**:441-456.
- Wäli, P. R., M. Helander, O. Nissinen y K. Saikkonen. 2006. Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds). *Canadian Journal of Botany* **84**:1043-1051.
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. Van Der Putten y D. H. Wall. 2004a. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* **304**:1629-1633.
- Wardle, D. A., G. W. Yeates, W. M. Williamson, K. I. Bonner y G. M. Barker. 2004b. Linking aboveground and belowground communities: The indirect influence of aphid species identity and diversity on a three trophic level soil food web. *Oikos* **107**:283-294.
- Wehner, J., P. M. Antunes, J. R. Powell, J. Mazukatow y M. C. Rillig. 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia* **53**:197-201.
- Welty, R. E., R. E. Barker y M. D. Azevedo. 1991. Reaction of tall fescue infected and noninfected by *Acremonium coenophialum* to *Puccinia graminis* subsp. *graminicola*. *Plant Disease* **75**:883-886.
- West, C. P. y K. D. Gwinn. 1993. Role of *Acremonium* in drought, pest, and disease tolerances of grasses. Pages 131-140 2nd International symposium, *Acremonium/grass interactions*. AG Research , Hamilton.
- White Jr, J. F. y M. S. Torres. 2010. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiologia Plantarum* **138**:440-446.
- Yue, Q., J. Johnson-Cicalese, T. J. Gianfagna y W. A. Meyer. 2000a. Alkaloid production and chinch bug resistance in endophyte-inoculated chewings and strong creeping red fescues. *Journal of Chemical Ecology* **26**:279-292.
- Yue, Q., C. J. Miller, J. F. White Jr y M. D. Richardson. 2000b. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**:4687-4692.
- Yue, Q., C. Wang, T. J. Gianfagna y W. A. Meyer. 2001. Volatile compounds of endophyte-free and infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Phytochemistry* **58**:935-941.
- Zabalgogea, I. 2008. Review. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**:138-146.

Zhi-Lin, Y., C. Yi-Cun, X. Bai-Ge y Z. Chu-Long. 2012. Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. *Critical Reviews in Biotechnology* **32**:363-373.