

**“Propiedades emergentes de la presencia simultánea de simbioses
específicos de gramíneas y leguminosas”**

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

Pablo Adrián García Parisi
Ingeniero Agrónomo – Universidad de Buenos Aires - 2010

Lugar de trabajo: IFEVA-CONICET - FAUBA



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Marina Omacini

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad CAECE)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

Agustín Alberto Grimoldi

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

PhD. (Technische Universität München)

Consejero de Estudios

Fernando Alfredo Lattanzi

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Mar del Plata)

PhD. (Technische Universität München)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Marina Omacini

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad CAECE)

Doctora en Ciencias Biológicas. (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

María Victoria Novas

Licenciada en Ciencias Biológicas – (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas- (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Oscar Adolfo Ruiz

Bioquímico (Universidad Nacional del Nordeste)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Claudio Fabián Valverde

Bioquímico (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor (Universidad Nacional de La Plata)

Fecha de defensa de la tesis: 03 de Marzo de 2015

Dedicatoria

A Jorge y Rocío,
A mi tía Alcira,

“No sabes que lindos son los primeros rayos de sol en la luna”

A Irma y a Flavia, y a los que quedaron para la Eternidad.

Agradecimientos

A mis directores: Marina, Agustín y Fernando

A Belén

A mi Familia: mis padres, hermanos, abuelas, tíos y primos.

A Marina Oleiro, Priscila P, Pablo Chuliver y Gastón Oñatibia,

A Mile y Esteban.

A Fer Reyes, Lau Martínez, Ade González Arzac, Pablo Picasso, Pablo Montes, Mechi Vassallo, María Basualdo, Vicky Piazza, Gonzalo Molina, Analía Giménez, José Clavijo, y Carla DiBella.

A Jesi Barneto, Agustín Repetto, Luli Barriga, Georgi Garcia Inza y Seba Gavilán.

A los Simbioikos: María Semmartin, Pedro Gundel, Luis Pérez, Marta Telesnicki, Luciana D'Acunto, Male Druille, Lucho Boyero, Andrea Ueno, Nacho Hernández, Ceci Casas y Romi Cavagnaro. A Lucía Vivanco

A Laura Ventura.

A Mirta Rabadán, Mirta Tinaro, Cecilia Rosanigo, Martin Hourcastagne y Waly De Nicolás.

A Gustavo González Anta y Pablo Rush

A los miembros del IFEVA y de la Cátedra de Forrajes

A Hans Schnyder, Rudi Schäufele, Karl Auerswald, Monika Kavanová, Xiaoxing Gong, Regina Hirl, Iris Köhler, Julia Hauck, Pablo Zuazo, Fransiska Bucher, y Michael Lauber. A la Technische Universität München y al Deutsche Forschungsgemeinschaft.

A MinCyT, ANPCyT y CONICET por la financiación de esta tesis.

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.

Publicaciones derivadas de la tesis:

García Parisi PA, Grimoldi AA, Lattanzi FA, Omacini M. 2013. Implicancias de las interacciones entre hongos endofitos de pastos y bacterias fijadoras de nitrógeno. En: Diaz-Sorita, Correa, Fernandez Canigia, Lavado (eds) Aportes de la Microbiología a la Producción de los Cultivos. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. pp.125-135.

García Parisi PA, Grimoldi A, Omacini M. 2014. Endophytic fungi of grasses protect other plants from aphid herbivory. *Fungal Ecology*, 9, 61-64.

García Parisi PA, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Omacini M. 2015. Multi-symbiotic systems: functional implications of the coexistence of grass-endophyte and legume-rhizobia symbioses. *Oikos*, 124, 553-560

García Parisi PA, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Druille M, Omacini M. en Prensa. Three symbionts involved in interspecific plant-soil feedback: Epichloid endophytes and mycorrhizal fungi affect the performance of rhizobia-legume symbiosis. *Plant and Soil*
DOI: 10.1007/s11104-016-3054-3

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	iv
Declaración.....	v
Publicaciones derivadas de la tesis.....	vi
Índice General.....	vii
Índice de cuadros.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1 – Interacciones entre plantas.....	2
1.2 – Interacciones positivas entre plantas y microorganismos.....	4
1.3 – La simbiosis pasto – endófito, una simbiosis de protección	6
1.4 – La simbiosis leguminosa – rizobio, una simbiosis de provisión.....	8
1.5 – Interacciones entre múltiples hospedante y simbiosis.....	11
1.6 – Objetivo, hipótesis y estructura de la tesis.....	12
1.7 Modelo de estudio y características comunes de las aproximaciones experimentales.....	14
Capítulo 2: FACILITACIÓN INDIRECTA MEDIADA POR HERBÍVOROS	
2.1 – Introducción.....	18
2.2 – Materiales y Métodos.....	19
2.3 – Resultados.....	20
2.4 – Discusión.....	23
Capítulo 3: FACILITACIÓN DIRECTA E INDIRECTA MEDIADA POR EL AMBIENTE SUBTERRÁNEO	
3.1 – Introducción.....	26
3.2 – Materiales y Métodos.....	27
3.3 – Resultados.....	29
3.4 – Discusión.....	33
Capítulo 4: COMPLEMENTARIEDAD EN EL USO DE LOS RECURSOS Y CONSECUENCIAS DE LA COEXISTENCIA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD	
4.1 – Introducción.....	36
4.2 – Materiales y Métodos.....	37
4.3 – Resultados.....	39
4.4 – Discusión.....	43
Capítulo 5: DISCUSIÓN GENERAL	
5.1 –Introducción.....	46
5.2 –Vías por las que los simbiosis modifican la interacción entre plantas....	48
5.3 –Contribuciones al estado del conocimiento.....	49
5.4 – Perspectivas.....	54
5.5 – Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1: Número de esporas de hongos micorrícicos, N-NO_3^- y NH_4^+ al inicio y después de 9 y 22 días de incubación del suelo acondicionado por plantas de *L. multiflorum* en simbiosis (+) o no (-) con endófitos (HE) y/o hongos micorrícicos (HM). Letras distintas implican diferencias significativas entre tratamientos para cada variable medida. 30

Cuadro 3.2: Significancia de los factores fijos de los modelos ajustados a las variables de la etapa de respuesta determinada mediante la prueba del cociente de verosimilitud (LRT). 33

Cuadro 4.1: Composición isotópica ($\delta^{15}\text{N}$) y porcentaje derivado de fijación estimado ($\%N_{\text{fix}}$) en muestras de *Trifolium* y en plantas de referencia. Media \pm EE y (número de replicas). 39

Cuadro 5.1: Efectos independientes y dependientes de los simbioses (en ausencia o presencia del otro, respectivamente) sobre las distintas variables medidas en sus hospedantes (fondo amarillo) o en las plantas no-hospedante (fondo celeste) de los distintos capítulos de esta tesis. En las variables en las que la interacción resultó estadísticamente significativa (en **negrita**) los efectos independientes fueron diferentes a los dependientes de los simbioses. 50

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Interacción entre plantas según el modelo de efecto y repuesta de Goldberg (1990) donde los intermediarios pueden ser recursos, toxinas o aleloquímicos, y organismos antagonistas o benéficos. 3
- Figura 1.2.** Mecanismos de coexistencia entre dos plantas (Hector *et al.* 1999) utilizando el modelo de efectos y respuesta. La flecha más gruesa indica el sentido de la facilitación. 4
- Figura 1.3:** Hifas del hongo endófito *E. occultans* en semillas de *L. multiflorum*. Observación microscópica x200. Foto: Mirta Rabadán. 7
- Figura 1.4:** Nódulos indeterminados en raíces de *T. repens*. Foto propia. 9
- Figura 1.5:** Mecanismos por los cuales los simbioses de pastos (endófito) y leguminosas (rizobios) podrían afectar a la interacción entre sus hospedantes estudiados en cada uno de los capítulos de resultados. Las llaves () indican los flujos que pueden ser afectados por cada simbiote interactivamente, según el color (Rojo y rayado: endófito, azul y vacío: rizobio). 13
- Figura 1.6:** Distribución potencial de la especie *L. multiflorum* (A) y *T. repens* (B) calculado según modelos que integran los datos de ocurrencia de cada especie registrados con distintas variables ambientales. Rojo: alta probabilidad, azul = baja probabilidad de ocurrencia. <http://data.gbif.org> 15
- Figura 2.1:** Hojas infestadas por áfidos (% , media \pm EE) en plantas de *T. repens* (barras grises, panel izquierdo) inoculadas (R+) o no (R-) con rizobios creciendo en vecindarios de plantas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E+) proporción de individuos endófitos. La proporción de tallos infestados por áfidos (% , media \pm EE) de esas plantas de *L. multiflorum* se encuentran en el panel derecho (barra blancas). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P > 0.05$). Los análisis fueron desarrollados por separado para ambas especies. 21
- Figura 2.2:** Hojas infestadas por áfidos (%) en relación a la concentración foliar de N (%) en plantas de *T. repens* inoculadas (R+, triángulos) o no (R-, círculos) con rizobios creciendo en vecindarios de plantas de *L. multiflorum* con baja (E-, símbolos verdes, vacíos) o alta (E+, símbolos rojos, llenos) proporción de individuos endófitos. Las líneas ajustadas mediante regresión lineal son diferentes entre E- y E+ ($P < 0.05$). 22
- Figura 2.3:** Impronta de volátiles de parcelas con baja (E-, líneas verdes) o alta (E+, líneas rojas) proporción de individuos endófitos obtenida mediante 8 sensores (de S1 a S8). Cada eje corresponde a un sensor mientras que cada vértice de la impronta corresponde al valor medio (línea continua) y el intervalo de confianza (95%, líneas punteadas) inferior (-95% IC) y superior (+95% IC). Valores igual 1 implican que el valor registrado es igual al aire puro. 22
- Figura 3.1:** Producción de biomasa (g, media \pm EE) aérea (barras blancas) y subterránea (barras grises) de plantas de *T. repens* creciendo con baja (R-) o alta (R+) disponibilidad de rizobios en suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* libres (HE-) o asociadas (HE+) a endófitos (panel izquierdo), no asociadas (HM-) o asociadas (HM+) a hongos micorrícicos (panel derecho). Letras distintas implican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada panel, para biomasa aérea (Tukey, $P < 0.05$). 31
- Figura 3.2:** Nitrógeno (mg, media \pm EE) obtenido de fijación (barras blancas) y de absorción del suelo (barras grises) en plantas de *T. repens* creciendo con baja (R-) o alta (R+) disponibilidad de rizobios en suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* libres de endófitos (HE-) o asociadas a endófitos (HE+)(panel izquierdo), no asociadas (HM-) o asociadas (HM+) a hongos micorrícicos (panel derecho). Letras distintas encima de las columnas implican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada panel: A, B, C: total de N; x, y z: N de

fijación; y a, b, c: N del suelo. (Tukey, $P < 0.05$).

31

Figura 3.3: (A) Nitrógeno fijado (% , media \pm EE), (B) nódulos (#.planta⁻¹, media \pm EE) y (C) N fijado por nódulo (mg.nódulo⁻¹, media \pm EE) en plantas de *T. repens* creciendo con baja (R-) o alta (R+) disponibilidad de rizobios en suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* libres de endófitos (HE-) o asociadas a endófitos (HE+) (panel izquierdo), no asociadas (HM-) o asociadas (HM+) a hongos micorrícicos (panel derecho). Letras diferentes (a, b, c; x, y) implican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0.05$). 32

Figura 4.1: (a) Nódulos (número por planta, media \pm EE) y (b) nitrógeno fijado (N fijado; mg por planta de *T. repens*, media \pm EE) en plantas de *T. repens* con bajo (R-) o alto (R+) nivel simbiótico de rizobios, rodeadas por plantas de *L. multiflorum* con bajo (E-) o alto (E+) nivel endofítico. * y ** representan la significancia ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectivamente) de los factores endófito (E), rizobios (R) y la interacción E x R. 40

Figura 4.2: Nitrógeno absorbido del suelo (N_{abs} , flechas negras) o fijado de la atmósfera (N_{fix} , flechas blancas), dividido entre plantas de *T. repens* (cajas blancas) con bajo a alto nivel de rizobios (R- o R+: cajas lisas o rayadas, respectivamente) y plantas de *L. multiflorum* (cajas grises) con bajo o alto nivel endofítico (E- o E+: cajas lisas o rayadas, respectivamente). El número adentro de la caja o la flecha representa la cantidad (g.mesocosmos⁻¹) de N en la biomasa aérea. El ancho de la caja y la flecha son equivalentes a los valores absolutos. Letras diferentes junto a los valores indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. 41

Figura 4.3: Producción de biomasa (g.mesocosmos⁻¹, media \pm EE) de *T. repens* (*Trifolium*, columnas blancas) y *L. multiflorum* (*Lolium*, columnas grises) cuando las plantas de *Trifolium* con bajo (R-) o alto (R+) nivel simbiótico de rizobios, crecieron rodeadas por plantas de *Lolium* con bajo (E-) o alto (E+) nivel endofítico. * y ** representan la significancia ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente) de los factores endófito (E), rizobios (R) y la interacción E x R. 42

Figura 5.1: Vías por las que los simbioses de pastos y leguminosas afectaron la interacción entre sus hospedantes estudiadas en los distintos capítulos. Las llaves indican los flujos que fueron afectados por cada simbiote (rojo y rayado: endófito, azul y vacío: rizobio), y las llaves azules y rojas cruzadas indican efectos interactivos de los simbioses en ese flujo. 47

Figura 5.2: Relación entre la producción de biomasa aérea y la captura de N para las plantas de *L. multiflorum* (■, Lm) y *T. repens* (Tr) creciendo en coexistencia (▲) o en retroalimentación luego del pasto (▼). La relación entre las variables se muestran para los efectos independientes de cada simbiote (es decir relativo al control sin simbiote) sobre su hospedantes (amarillo lleno, R+ sobre *T. repens*, E+ sobre *L. multiflorum*) o sobre la planta no-hospedante (celeste, vacío, R+ sobre *L. multiflorum*, E+ sobre *T. repens*) y para el efecto conjunto de ambos (verde grande, E+R+ sobre ambas especies). Para comparar entre experimentos, los valores expresados (media \pm DE) son relativos al control sin simbioses por lo que los efectos son significativos cuando son distintos de 1:1. 51

Figura 5.3: *Simbiosfera*: área de influencia de la presencia y la interacción de simbioses a distintos niveles de organización. Dentro del rombo se encuentran las poblaciones susceptibles de ser afectadas. El efecto sobre estas poblaciones determinará cambios en los procesos relativos al funcionamiento del ecosistema (vértices horizontales) y en atributos descriptivos de la estructura de las comunidades y ecosistemas (vértices verticales). 56

Propiedades emergentes de la presencia simultánea de simbioses específicas de gramíneas y leguminosas

RESUMEN

La mayoría de los organismos posee al menos un simbionte que afecta su relación con el ambiente con consecuencias para la estructura y el funcionamiento de la comunidad. Los simbioses de plantas incrementan su crecimiento al protegerlas contra herbívoros (p.ej.: hongos endófitos asexuales de pastos) o al proveerles de nutrientes (p.ej. bacterias fijadoras de nitrógeno de leguminosas). El objetivo general de esta tesis fue detectar vías por las cuales la presencia simultánea de dos tipos de simbioses puede modular la relación entre plantas y sus consecuencias sobre procesos clave del ecosistema. La hipótesis fue que la interacción entre simbioses genera beneficios tanto a las plantas hospedantes como no-hospedantes vecinas que favorecerían su coexistencia. Se desarrolló una serie de experimentos en los que se manipuló la presencia del hongo endófito *Epichloë occultans* en *Lolium multiflorum* y de rizobios (*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*) en la leguminosa *Trifolium repens*. Se evaluó la capacidad de los simbioses de modificar la relación entre hospedantes y no-hospedantes al afectar los intermediarios más importantes involucrados en su interacción: nutrientes, herbívoros y otros simbioses. Se demostró que los endófitos y los rizobios afectan interactivamente la herbivoría de sus hospedantes. Además, los cambios en el suelo inducidos por el endófito incrementaron el crecimiento y la adquisición de nutrientes de la leguminosa en condiciones de baja disponibilidad de rizobios. Dado que cada simbionte solo afectó el crecimiento y la adquisición de nitrógeno de su hospedante, la presencia de ambos generó efectos aditivos en términos de captura total de nitrógeno y productividad primaria neta. En conclusión, la presencia simultánea de simbioses en distintos hospedantes indujo múltiples cambios en el ambiente aéreo y subterráneo y propiedades emergentes que contribuyeron a los mecanismos de facilitación y complementariedad en el uso de los recursos de las plantas.

Palabras clave:

Epichloë occultans – *Rhizobium leguminosarum* – simbiosis – rizobios – endófitos – mutualistas – coexistencia de plantas – funcionamiento del ecosistema.

Emergent properties from the simultaneous presence of grasses and legumes specific symbionts

ABSTRACT

Most organisms have at least one symbiont that affects their relationship with the environment with consequences for the structure and functioning of the community. Plant symbionts increase hosts growth by protecting them from herbivores (e.g.: asexual fungal endophytes of grasses) or by providing nutrients (e.g. nitrogen-fixing bacteria of legumes). The objective of this thesis was to identify pathways by which the simultaneous presence of two types of symbionts may modulate the relationship between plants and their consequences on key ecosystem processes. It was hypothesized that the interaction between symbionts generates benefits to both the host and neighboring non-host plants that would promote their coexistence. It was developed a series of experiments in which the presence of the fungal endophyte *Epichloë occultans* in *Lolium multiflorum* and rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* *bv trifolii*) in the legume *Trifolium repens* was manipulated. It was evaluated the ability of symbionts to modify the relationship between host and non-host to affect the most important intermediates involved in their interaction (i.e. nutrients, herbivores and other symbionts) were evaluated. The results demonstrate that endophytes and rhizobia interactively affect herbivory on their hosts. In addition, changes in soil induced by the endophyte increased growth and nutrient acquisition of the legume under low availability of rhizobia. Since each symbiont affected only the growth and nitrogen acquisition of its host, the presence of both symbionts generated additive effects in terms of total catch of nitrogen and net primary productivity. In conclusion, the simultaneous presence of symbionts in different hosts induce multiple changes in aboveground and belowground components and emergent properties that contributed to the mechanisms of facilitation and complementarity in the use of plant resources.

Keywords:

Epichloë occultans – *Rhizobium leguminosarum* – symbiosis – rhizobia – endophytes – mutualisms – plant coexistence – ecosystem functioning

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 – Interacciones entre plantas

Las interacciones ecológicas entre distintas especies constituyen un fenómeno ampliamente extendido en la naturaleza, y de gran importancia dado que su resultado afecta la abundancia, distribución y evolución de las especies involucradas (Chapin *et al.* 1997, Thompson 2005, Agrawal *et al.* 2007). La convivencia influye positiva o negativamente en la forma que crece la población de cada una de las especies presentes en una comunidad. Prácticamente todas las poblaciones, macro y microscópicas, aéreas o subterráneas, se relacionan de algún modo con otras, por lo tanto es necesario conocer tanto el resultado de la interacción entre distintos componentes del ecosistema como los mecanismos involucrados (Abrams 1987, Agrawal *et al.* 2007).

Las poblaciones interactúan cuando las acciones o propiedades de individuos de una población resultan en un cambio en las características de otra población (Abrams 1987). Cada interacción es única, sin embargo, las definiciones y clasificaciones resumen propiedades comunes de un grupo de interacciones que las distinguen de otro tipo de interacciones. Existen dos métodos ampliamente utilizados para definir y clasificar interacciones entre dos poblaciones (Abrams 1987). El primero utiliza el **efecto** que cada especie produce sobre la otra para definir el tipo de interacción. De esta forma, por ejemplo, se considera que una interacción donde ambas especies se benefician es un “mutualismo”. El segundo método para describir las interacciones entre dos poblaciones es a través de los **mecanismos** por los cuales las especies interactúan, y depende en parte de los niveles tróficos a los que pertenecen los organismos involucrados. Así, “depredación”, por ejemplo, puede ser definida como una interacción en la cual un organismo consume a otro, pero cuando éste consume total o parcialmente a una planta se denomina “herbivoría”. A su vez, “competencia por explotación”, según el método mecanístico, puede definirse como una interacción en la que dos poblaciones afectan el consumo de recursos de uso común (Abrams 1987). Aunque las ventajas de uno u otro método dependen del objetivo particular, es necesario reconocer cuándo se habla del mecanismo y cuándo del efecto de una interacción entre dos poblaciones.

Las interacciones entre plantas al condicionar la coexistencia de distintas poblaciones vegetales ocupan un papel central como fuerzas que determinan la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres dado que constituyen la base de las redes tróficas (Polis 1999). Las poblaciones de plantas interactúan a través de un intermediario (Goldberg 1990), también llamado “ambiente” (Harper 1977). Éste sufre cambios ocasionados por la presencia de una planta que a su vez altera el crecimiento o el desarrollo de otra planta y de ella misma (Fig. 1.1). Estos cambios en el ambiente pueden ser debido a una “sustracción” como lo que ocurre típicamente en la competencia por explotación por el consumo de recursos o a una “adición” por ejemplo a través de una sustancia química que genera alelopatía. Entre los distintos intermediarios abióticos o bióticos que constituyen el ambiente los más comunes son los recursos, los organismos antagonistas como herbívoros, parásitos o patógenos y los organismos benéficos como polinizadores o simbioses (Fig. 1.1). Tanto la existencia de recursos limitantes que deriven en competencia como la presencia de otros organismos

benéficos y antagónicos determinarán las distintas vías de interacción entre dos poblaciones de plantas y su resultado.

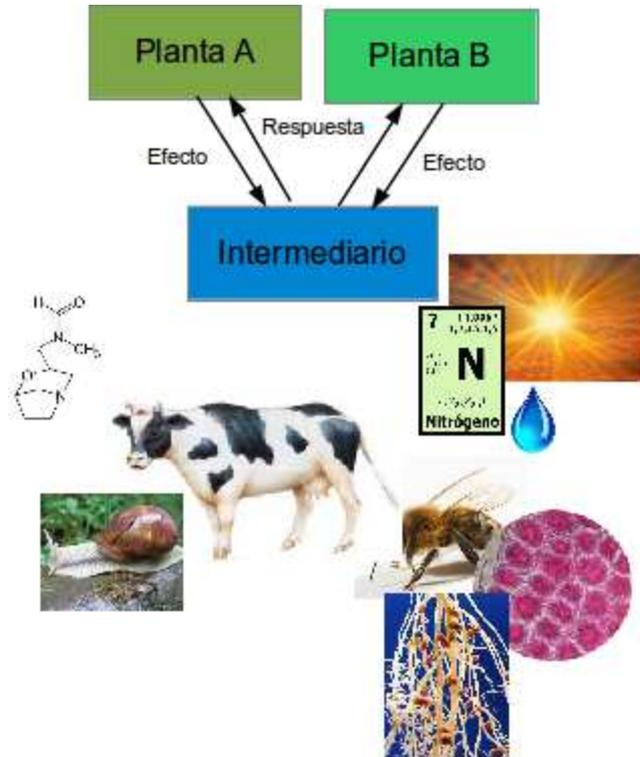


Figura 1.1: Interacción entre plantas según el modelo de efecto y repuesta de Goldberg (1990) donde los intermediarios pueden ser recursos, toxinas o aleloquímicos, y organismos antagonistas o benéficos.

Históricamente la competencia por explotación ha sido propuesta como la principal interacción entre plantas, moduladora de las comunidades vegetales. Dos poblaciones compiten por los recursos escasos pudiendo desencadenar en la exclusión competitiva de la población menos hábil (Grace y Tilman 1990). Sin embargo, recientemente ha incrementado el interés en estudiar los mecanismos por los cuales las especies vegetales coexisten. La “complementariedad” y la “facilitación” son dos tipos de mecanismos, no excluyentes, que permiten la coexistencia de distintas especies en una misma comunidad (Figura 1.2) (Hector *et al.* 1999, Loreau y Hector 2001). La **complementariedad** estipula que un uso complementario de los recursos reduce la competencia por explotación permitiendo una mayor adquisición de las mismos (Tilman *et al.* 2001). Este mecanismo se basa en que un mismo recurso limitante se puede obtener de fuentes espacialmente distintas (p.ej. absorción de nutrientes a distintas profundidades), temporalmente distintas (p.ej. los períodos de máxima demanda de un recurso ubicados en distintos momentos del ciclo de crecimiento) o proceder de distintos tipos de reservorios (p.ej. nitrógeno atmosférico vs. nitrógeno mineral). Por otro lado, la **facilitación** involucra interacciones positivas entre plantas que ocurren

cuando la presencia de una planta incrementa el crecimiento, la supervivencia o la reproducción de otra planta (Callaway 1995). La facilitación puede considerarse directa cuando los efectos benéficos de un individuo sobre el otro se dan a través de intermediarios abióticos, por ejemplo, incrementando la disponibilidad de recursos limitantes o reduciendo el efecto de un agente de estrés abiótico. Alternativamente, la facilitación es indirecta cuando involucra cambios en el ambiente biótico, es decir, modifica los efectos de organismos potencialmente antagonistas (p.ej. competidores, patógenos, parásitos, herbívoros) o benéficos (p.ej. bacterias del suelo, simbios, polinizadores, Callaway 1995). Estos dos mecanismos subyacen en la relación positiva observada entre biodiversidad y procesos del ecosistema (Loreau *et al.* 2001)

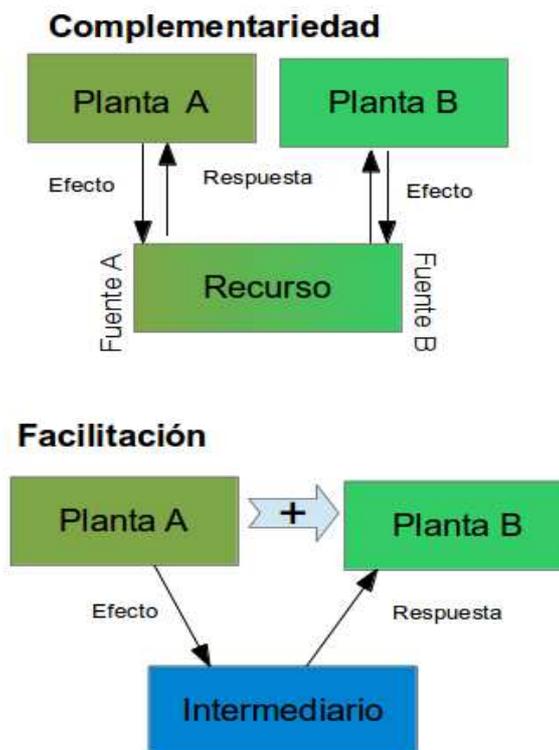


Figura 1.2: Mecanismos de coexistencia entre dos plantas (Hector *et al.* 1999) utilizando el modelo de efectos y respuesta. La flecha más gruesa indica el sentido de la facilitación.

1.2 – Interacciones positivas entre plantas y microorganismos

A pesar de que históricamente ha existido un sesgo hacia el estudio de las interacciones con efectos negativos en alguna población como la competencia y la depredación, actualmente se reconoce que las relaciones en las que ambas se benefician (i.e. los mutualismos) también afectan de manera significativa la estructura de las comunidades y el funcionamiento de los ecosistemas (Bronstein 1994, Agrawal *et al.* 2007, Douglas 2010, Kothamasi *et al.* 2010). El mecanismo en que se basan estas asociaciones mutualistas involucra la modificación de los hábitats, la adquisición de recursos, la dispersión y la protección contra consumidores (Bronstein 1994, Douglas

2010). De esta forma el mutualismo aumenta el éxito reproductivo de ambos socios, por lo cual la desaparición de uno de ellos puede ocasionar la pérdida del otro (Bronstein 1994). Como resultado, este tipo de interacciones puede aumentar la diversidad y afectar la organización de las comunidades (Kothamasi *et al.* 2010).

Dentro de los mutualismos, las simbiosis constituyen un grupo de interacciones con características particulares (Douglas 2010). Esta relación puede ser definida como un *mutualismo persistente*: una relación donde ambos participantes (i.e. hospedante y simbiote) se encuentran en estrecho y permanente contacto (Douglas 2010). A escala de tiempo ontogénico los efectos de un integrante sobre su socio dependen del contexto, pudiendo incluso resultar negativos (Thrall *et al.* 2007, Cheplick y Faeth 2009, Gundel *et al.* 2012). Sin embargo a mayores escalas, la simbiosis resulta positiva para el éxito reproductivo de ambos integrantes ya que de otra forma la relación no sería evolutivamente estable (Denison 2000, Kiers *et al.* 2003, 2011, Kiers y van der Heijden 2006, Thrall *et al.* 2007, Gundel *et al.* 2008, 2012, Kothamasi *et al.* 2010, Sachs *et al.* 2010).

Los microorganismos simbiotes de plantas pueden ser clasificados en protectores y proveedores, según la función principal en su hospedante (Thrall *et al.* 2007). Los simbiotes protectores son aquellos que la protegen contra el ataque de herbívoros, parásitos y patógenos (White y Torres 2010). Por ejemplo, los **hongos endófitos aéreos** son simbiotes *exclusivos* de gramíneas que les otorgan protección contra el ataque de diversos grupos de herbívoros (Clay y Schardl 2002). Los microorganismos proveedores, en cambio, son aquellos que le otorgan a su hospedante la capacidad de obtener recursos escasos o inaccesibles (Douglas 2010, Kothamasi *et al.* 2010). Por ejemplo, las **bacterias fijadoras de nitrógeno**, transforman el nitrógeno atmosférico en nitrógeno mineral que puede ser aprovechado por ellas (Sprent 2007). Otros simbiotes proveedores son los hongos formadores de **micorrizas**: hongos del suelo que establecen asociaciones con las raíces de las plantas y les suministran nutrientes, principalmente fósforo (Johnson *et al.* 1997).

La presencia de microorganismos simbiotes en las comunidades terrestres genera múltiples cambios en su entorno. En principio, cada simbiote afecta la forma en que su hospedante se relaciona con el ambiente ya sea a través de su función principal (proveedores o protectores) (Douglas 2010) o de otros efectos que su presencia induce en el hospedante lo que se conoce como multifuncionalidad (Newsham *et al.* 1995). A partir de ellos, los simbiotes pueden generar cambios en las relaciones de competencia de las plantas y de esta forma aumentar su éxito reproductivo, permitiendo la coexistencia de especies competidoras, o el desplazamiento a los individuos no-simbióticos (Kothamasi *et al.* 2010). Además, los efectos que los simbiotes generan en sus hospedantes pueden desencadenar cambios a mayores niveles de organización afectando la estructura y funcionamiento de comunidades y ecosistemas (van der Heijden *et al.* 1998, Omacini *et al.* 2005, van der Heijden y Wagg 2013).

1.3 – La simbiosis pasto – endófito, una simbiosis de protección

Una simbiosis ampliamente distribuida en los ecosistemas terrestres es la que establecen pastos de la familia de las gramíneas (*Poaceae*) con hongos endófitos aéreos del género *Epichloë* (anteriormente *Neotyphodium*) (Ascomycetes: Clavicipitaceae; Clay *et al.* 1993, Clay y Schardl 2002, Leuchtman *et al.* 2014). Estos hongos habitan los tejidos aéreos de alrededor del 20 – 30 % de las gramíneas (Leuchtman 1992). En Argentina, aproximadamente 35 especies nativas de gramíneas están naturalmente asociadas con las formas asexuales de estos endófitos aéreos (Iannone *et al.* 2011). Además, las gramíneas exóticas de importancia agronómica *Schenodorus phoenix* (festuca alta), *Lolium perenne* (ryegrass perenne) y *Lolium multiflorum* (ryegrass anual) usualmente hospedan estos hongos endófitos y se encuentran en proporciones variables en comunidades herbáceas de Argentina y el mundo (Roberts 2005, Gundel *et al.* 2009).

La simbiosis pasto-endófito es considerada como un mutualismo defensivo debido a que los beneficios atribuidos a la presencia del hongo en la planta se basan principalmente en defensas contra la herbivoría (Clay *et al.* 1993). El hongo induce la producción de alcaloides que se consideran responsables de la resistencia al ataque de distintos herbívoros desde insectos a mamíferos, dependiendo del genotipo del hongo y del hospedante (Bush *et al.* 1997, Clay y Schardl 2002, Faeth 2002). En *L. perenne* y *S. phoenix*, la presencia de endófitos induce la producción de alcaloides que producen intoxicaciones en el ganado doméstico y disminuye marcadamente la preferencia de estos pastos. En cambio, en *L. multiflorum* no se ha detectado que este hongo genere toxicidad al ganado (Gundel *et al.* 2009, Shiba *et al.* 2011) aunque si se ha demostrado que protege contra el ataque de ciertas especies de insectos (Omacini *et al.* 2001). Aunque la producción de alcaloides se ha considerado como responsable de los efectos observados en las plantas, otros mecanismos podrían estar involucrados en la defensa contra la herbivoría. Por ejemplo, las plantas asociadas a endófitos inducen cambios en la producción de compuestos volátiles (Yue *et al.* 2001) que podrían estar involucrados en la protección observada aunque nunca se ha evaluado (Li *et al.* 2014)

Además de la función protectora del simbiote, las plantas en simbiosis con endófitos usualmente muestran mayor tolerancia a diferentes situaciones de estrés abiótico (Malinowski y Belesky 2000, Clay y Schardl 2002, White y Torres 2010). Por ejemplo, se ha encontrado que la tolerancia a sequía es mayor en plantas en simbiosis con el endófito, probablemente a través de influir en el cierre estomático (Malinowski y Belesky 2000). Por otro lado, también se observó que la presencia del endófito aumenta la absorción de nutrientes (Malinowski y Belesky 2000, Belesky *et al.* 2008), lo que podría deberse a cambios en la morfología de raíces (Malinowski y Belesky 2000) o cambios que ocurren en los procesos microbianos del suelo relacionados con la disponibilización de nutrientes (Franzluebbbers *et al.* 1999, Omacini *et al.* 2004, 2012, Franzluebbbers 2006, Bowatte *et al.* 2011, Casas *et al.* 2011, Iqbal *et al.* 2013). De todas formas, ya sea a través de su efecto protector contra herbívoros o a través de otros efectos sobre el hospedante, la simbiosis generalmente resulta en un aumento en la habilidad competitiva de la planta, pudiendo aumentar su crecimiento y/o su reproducción (Clay 1990, Clay *et al.* 1993, Malinowski y Belesky 2000, Clay y Schardl 2002).

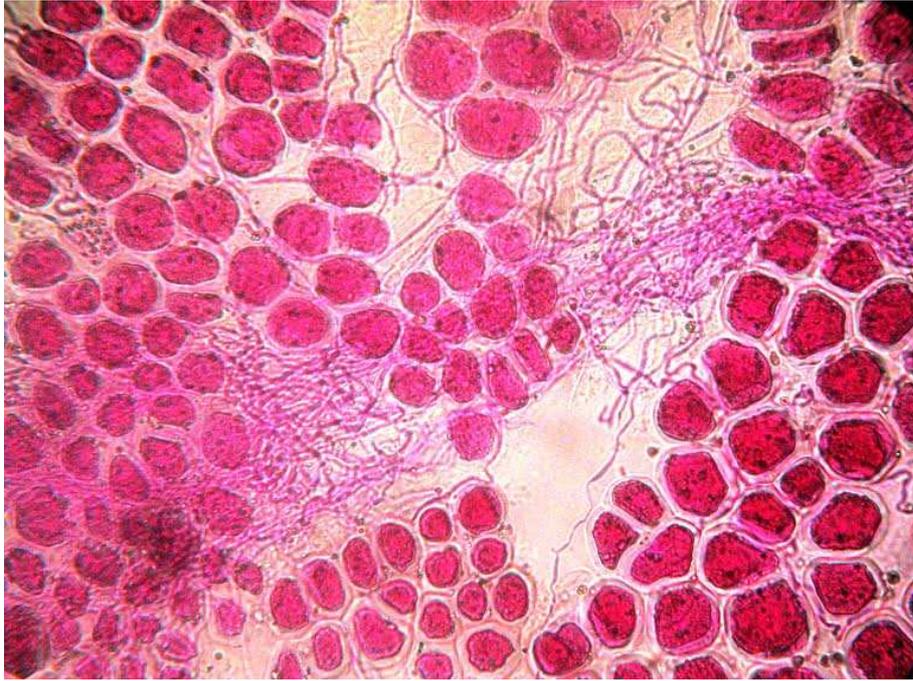


Figura 1.3: Hifas del hongo endófito *E. occultans* en semillas de *L. multiflorum*. Observación microscópica x200. Foto: Mirta Rabadán.

Para el endófito, el beneficio radica en que el pasto le provee nutrición, protección y dispersión (Clay *et al.* 1993, Clay y Schardl 2002). Estos hongos son asexuales y su transmisión es exclusivamente vertical es decir a través de la semilla del pasto hospedante. Hasta el momento no se ha documentado el contagio entre plantas. El hongo se hospeda y crece intercelularmente en la base de las láminas y en semillas dando como resultado una colonización sistémica y asintomática (Clay y Schardl 2002, Fig. 1.3). Cuando la semilla germina, las hifas ubicadas en los espacios intercelulares del embrión colonizan los primordios foliares y se distribuyen por los tejidos aéreos. Las hifas crecen durante la estación de crecimiento del hospedante y luego colonizan los óvulos en crecimiento para alojarse en la semilla, que constituye la unidad de dispersión del hongo y de la planta. Una vez alcanzada la semilla, su persistencia depende de su habilidad por mantenerse vivo durante la etapa seminal. De este modo, el hongo sólo se transmite a la descendencia a través de la semilla de la planta hospedante (Clay y Schardl 2002, Gundel *et al.* 2008, 2009).

Debido a la transmisión exclusivamente vertical del endófito, la estabilidad del mutualismo está determinada por la relación positiva entre el éxito reproductivo de ambos integrantes: cuanto mayor sea la cantidad de semillas que produzca el hospedante, mayor será la nueva cantidad de potenciales hospedantes del hongo (Gundel *et al.* 2008, 2011). Algunos estudios experimentales han demostrado que en determinadas condiciones ambientales altamente estresantes para algunas especies nativas de Norteamérica, el hongo puede resultar un costo para la planta y disminuir su crecimiento y reproducción en comparación con plantas no simbióticas (Faeth *et al.* 2004, Faeth y Cheplick 2009). Sin embargo, debido a la estrecha relación entre la aptitud ecológica del hongo y de la planta, distintos modelos han demostrado que el

resultado de la interacción debe ser mutualista (Ravel *et al.* 1997, Gundel *et al.* 2008). Además, la transmisión del hongo no es perfecta (i.e. plantas simbióticas pueden producir semillas simbióticas o no simbióticas) y es variable entre genotipos y en distintos contextos ecológicos (Gundel *et al.* 2009, 2011, 2012, García Parisi *et al.* 2012). Esto refuerza la idea que la simbiosis debe resultar en un aumento en el éxito reproductivo del hospedante para que la simbiosis se mantenga en las comunidades naturales, aún cuando las mismas presentan distintas proporciones de plantas simbióticas y no simbióticas (Gundel *et al.* 2008, 2009, 2011, 2012).

Los cambios que el endófito aéreo produce en su hospedante impactan en la comunidad al afectar otros miembros de la comunidad (Omacini *et al.* 2005). La presencia del endófito afecta la diversidad de las comunidades al influir negativamente en otras especies vegetales (Clay y Holah 1999, Rudgers *et al.* 2007) y de artrópodos (Rudgers y Clay 2008). De la misma manera, la presencia de plantas en simbiosis con el endófito puede perjudicar a los consumidores de varios niveles tróficos. (Omacini *et al.* 2001, Lehtonen *et al.* 2005, Krauss *et al.* 2007). Por otro lado, aunque el endófito se encuentra en tejidos aéreos, sus efectos también pueden observarse en el ambiente subterráneo (Omacini *et al.* 2012). Se han observado cambios en los distintos reservorios de nutrientes (Franzluebbers *et al.* 1999, Franzluebbers 2006), en las comunidades que participan en los procesos de descomposición y mineralización de nutrientes (Casas *et al.* 2011, Iqbal *et al.* 2013, Bowatte *et al.* 2011) y en los procesos propiamente dichos (Omacini *et al.* 2004, Franzluebbers *et al.* 1999, Franzluebbers 2006, Omacini *et al.* 2012). Incluso los endofitos pueden afectar a simbioses subterráneas, como los hongos formadores de micorrizas (Omacini *et al.* 2006, Antunes *et al.* 2008).

1.4 – La simbiosis leguminosa – rizobio, una simbiosis de provisión

Una simbiosis de impacto ecológico y económico global ocurre entre leguminosas (*Fabaceae*) y rizobios: bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Methylobacterium* o *Azorhizobium* (Sawada *et al.* 2003, Sprent 2007). Más de 15000 especies de leguminosas se asocian con uno o más géneros de rizobios que “fijan” nitrógeno atmosférico al transformarlo en amonio disponible para la planta (de Faria *et al.* 1989, Mylona *et al.* 1995, Sprent 2007). La simbiosis entre plantas y rizobios es responsable de la mayor parte del nitrógeno que ingresa en los ecosistemas terrestres y el 27 % de la producción mundial de cultivos depende de leguminosas asociadas a rizobios (Graham y Vance 2003).

Los rizobios son considerados simbioses proveedores, ya que le otorgan a la planta la capacidad de obtener nitrógeno que de otra forma no estaría disponible para la planta. Estas bacterias viven en nódulos en las raíces de las plantas que se forman luego de la infección con rizobios del suelo (Fig. 1.4). Dentro de los nódulos, las bacterias se diferencian en su forma endosimbiótica, conocida como bacteroides, pierden la capacidad de reproducirse y sintetizan la enzima nitrogenasa. Esta enzima cataliza para

la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+) que es exportado a la planta (Mylona *et al.* 1995). Esencialmente, los bacteroides son responsables de todo el nitrógeno fijado en el nódulo (Denison 2000). Por su parte, el hospedante le otorga carbohidratos a los rizobios del nódulo como fuente de energía (Sprent 2007, Denison 2000).



Figura 1.4: Nódulos indeterminados en raíces de *T. repens*. Foto propia.

Para la planta el mantenimiento de los nódulos y la fijación de N son procesos extremadamente costosos, razón por la cual luego del intercambio de señales y el reconocimiento previo a la infección de las raíces, la nodulación y la tasa de fijación de N es controlada por las plantas mediante varios mecanismos (Mortier *et al.* 2011, Schulze 2004). Distintas señales hormonales producidas por la parte aérea de las plantas pueden determinar la cantidad de nódulos que va a sostener una planta (Mortier *et al.* 2011). A través de distintos mecanismos que involucran la permeabilidad de las membranas de los nódulos, las plantas pueden determinar en cierta medida la supervivencia o muerte de los nódulos (Denison 2000, Kiers *et al.* 2003). Por otro lado, en las plantas existen mecanismos que regulan la actividad de los nódulos, es decir, la cantidad de N que fijan para suplir la demanda de N de la planta en función a su disponibilidad de carbohidratos (Schulze 2004).

La transmisión de los rizobios entre las leguminosas es exclusivamente horizontal. Los rizobios se liberan cuando senescen los nódulos y se propagan así entre las plantas vecinas o entre generaciones (Denison 2000, Simms y Taylor 2002). La forma de

multiplicación de los rizobios está determinada por el tipo de nódulos, determinados o indeterminados, lo que depende de la especie de leguminosa a la que se asocian. Los nódulos determinados, encontrados en géneros de leguminosas subtropicales como *Glycine*, *Lotus* o *Phaseolus*, usualmente detienen el crecimiento luego de unas semanas, mientras que los nódulos indeterminados, encontrados en leguminosas templadas como *Medicago*, *Trifolium* y *Pisum*, continúan creciendo adoptando una forma alargada en lugar de redondeada (Denison 2000). En los nódulos determinados, todas las bacterias que lo formaron se transforman en bacteroides perdiendo su capacidad de reproducirse. Sin embargo, al morir el nódulo, los bacteroides liberados al suelo recuperan su capacidad de multiplicarse y se multiplican en base a la cantidad de sustancias de reserva que acumularon durante su estadio simbiótico. En cambio, en los nódulos indeterminados, no todas las bacterias que lo formaron se diferencian en bacteroides. Algunas continúan indiferenciadas y se multiplican dentro del nódulo a expensas de la planta. Estas bacterias indiferenciadas reconstituyen las poblaciones del suelo al morir el nódulo, dado que la capacidad de multiplicarse de los bacteroides en este tipo de nódulos no se recupera (Denison 2000, Denison y Kiers 2004).

Debido a la transmisión horizontal, y a la posibilidad de encontrar varios genotipos de rizobios en un mismo hospedante, los mecanismos de control implementados por la planta a nivel de nódulo resultan indispensables para la estabilidad de la simbiosis (Denison 2000, Simms y Taylor 2002, Akçay y Simms 2011). Algunos nódulos pueden estar ocupados por cepas de bacterias menos efectivas en la fijación de nitrógeno que otras. En ausencia de sanciones para estas cepas, las bacterias destinarían menos carbono a la fijación de nitrógeno y más a incrementar sus posibilidades de éxito luego de la muerte de la planta (Denison 2000, Akçay y Simms 2011). En los nódulos determinados, este incremento se logra a través de la acumulación de sustancias de reserva que serán utilizadas durante la vida libre de las bacterias en suelo antes de la colonización de una nueva planta. En cambio, en los nódulos indeterminados, este incremento está dado por un aumento en la cantidad de bacterias no diferenciadas creciendo dentro del nódulo que serán posteriormente liberadas al suelo. Sin embargo, las plantas poseen la capacidad de reconocer y sancionar a estos nódulos *tramposos*. De esta manera, las posibilidades de éxito de las cepas poco efectivas de rizobios se ven reducidas cuando las sanciones por parte de la planta son efectivas (Denison 2000, Kiers *et al.* 2003).

La presencia de esta simbiosis también tiene impacto sobre la estructura de las comunidades y el funcionamiento de los ecosistemas (Kothamasi *et al.* 2010). Al fijar N, las leguminosas aumentan la disponibilidad de N en el sistema tanto al liberar los recursos del suelo para ser usados por otras especies como al transferir parte del N fijado a otras plantas (Haynes 1980, Ayres *et al.* 2007, Hodge y Fitter 2013). Así, muchas leguminosas tienen la capacidad de alterar la estructura de las comunidades a través de aumentar los niveles de nitrógeno del suelo. Los cambios en el perfil de nutrientes del suelo pueden afectar las relaciones de competencia entre las especies presentes en la comunidad lo que altera dramáticamente la composición específica de la comunidad, en favor de las especies más demandantes en nitrógeno (Kothamasi *et al.* 2010). Asimismo, las relaciones tróficas que se desarrollan a partir de las leguminosas

se ven afectadas por los cambios en el estado nutricional de la planta debido a la presencia de rizobios (Dean *et al.* 2009, Kempel *et al.* 2009, Heath y Lau 2011). Finalmente, en relación al funcionamiento del ecosistema, la presencia de leguminosas en asociación con rizobios modifica, en general positivamente, la productividad del ecosistema lo que está vinculado principalmente a sus efectos sobre el ciclo del nitrógeno debido al aumentar de su entrada mediante la fijación simbiótica (Sprent 2007).

1.5 – Interacciones entre múltiples hospedantes y simbioses

En las comunidades son raras las relaciones de a pares, dado que en general se encuentran interacciones entre distintos hospedantes y simbioses (Stanton 2003). Mientras que muchos pastos se asocian a endófitos, y las leguminosas se asocian a varios genotipos de rizobios, los hongos micorrízicos arbusculares, relativamente más promiscuos, pueden asociarse a distintas plantas, formando una red de hifas subterráneas (Smith y Read 1997, Hodge *et al.* 2001). A su vez, una misma planta de leguminosa puede estar sosteniendo varios simbioses a la vez, una o más especies de hongos micorrízicos y uno o más genotipos de rizobios (Denison 2000, Larimer *et al.* 2010). Por su parte, una gramínea, asociada o no a su endófito también puede sostener una o varias especies de hongos formadores de micorrizas (Omacini *et al.* 2006, Mack y Rudgers 2008). En las comunidades terrestres, donde los distintos hospedantes y simbioses forman un sistema de asociaciones tan complejo, los resultados de todas las relaciones entre los distintos integrantes no están tan claros. En particular, poco se ha estudiado sobre las consecuencias de la interacción entre distintas simbiosis tanto dentro de una misma planta como entre plantas vecinas.

Dentro de una misma planta se han estudiado los efectos que la coexistencia de dos simbioses tiene entre sí y sobre el crecimiento de su hospedante. Se consideran sinérgicos, aditivos o antagónicos cuando el efecto sobre el crecimiento del hospedante es mayor, igual o menor a la suma de los efectos independientes de cada simbioses, respectivamente (Larimer *et al.* 2010). Los efectos sinérgicos se esperan cuando los distintos simbioses son funcionalmente diferentes: proveen diferentes beneficios los hospedantes (Stanton 2003). Del mismo modo se espera efectos antagónicos cuando la función de los simbioses mismos es equivalente. Sin embargo, no se ha observado claramente este patrón cuando se han estudiado los efectos entre endófitos y micorrizas y entre micorrizas y rizobios (Larimer *et al.* 2010). A su vez, la coexistencia dentro de un mismo hospedante repercute en el funcionamiento y el desempeño de los simbioses (Larimer *et al.* 2010, Omacini *et al.* 2012). Nuevamente se han encontrado efectos tanto positivos como negativos entre micorrizas y rizobios o endófitos (Omacini *et al.* 2006, Liu *et al.* 2011, Mack y Rudgers 2008, Novas *et al.* 2005, 2009, 2011, Larimer *et al.* 2010, 2012, 2014, Niranjana *et al.* 2007, Tajini *et al.* 2011).

Los estudios que evalúan las interacciones entre simbiosis en plantas vecinas son aún más escasos (Omacini *et al.* 2012). Por ejemplo, Omacini y colaboradores (2006) demostraron que la presencia del endófito en una planta hospedante puede aumentar la

micorrización de una planta vecina que no hospeda al endófito. Además, también se observó que los residuos de plantas que hospedaban endófitos afectan la micorrización en otras plantas (Antunes *et al.* 2008). Los estudios que evalúan las posibles interacciones entre las simbiosis pasto-endófito y leguminosa-rizobio son muy escasos y contradictorios (Omacini *et al.* 2005, Omacini *et al.* 2012). Por un lado, Eerens y colaboradores (1998) encontraron que determinados genotipos de endófito pueden aumentar la nodulación en plantas vecinas. A su vez, las leguminosas creciendo en suelos donde crecieron pasos con o sin endófitos presentaron igual nivel de nodulación (Cripps *et al.* 2013). Por otro lado, Snell y Quigley (1993) reportaron que hojas maceradas de plantas con endófito disminuyen la nodulación de plantas leguminosas. Más allá de estos resultados contrapuestos, no se ha estudiado el impacto que pueden tener la simbiosis entre gramíneas y endófitos sobre el funcionamiento de la simbiosis entre rizobios y leguminosas. Y en general, poco se sabe de cómo la coexistencia de varios simbiontes en las comunidades puede afectar las relaciones entre plantas.

Aunque existen diversos trabajos que evalúan el comportamiento de gramíneas y leguminosas en comunidades mixtas, son pocos los trabajos que ponen el foco en el funcionamiento de las distintas simbiosis y sus interacciones entre ellas. Por un lado, la asociación leguminosa-rizobios es clave para la coexistencia de las especies porque induce complementariedad en el uso del N al obtener, al menos una parte, de su N de la atmósfera (Eisenhauer 2012, Hodge y Fitter 2013). Además, la presencia de un pasto en la comunidad puede aumentar la fijación de nitrógeno en una leguminosa vecina ya que el pasto consume el nitrógeno del suelo más efectivamente que la leguminosa, cuya provisión de nitrógeno depende más marcadamente de la atmósfera (Høgh-Jensen y Schjoerring 1997, Karpenstein-Machan y Stuelpnagel 2000). Por otro lado, la presencia del endófito en una gramínea puede suprimir el establecimiento de leguminosas debido a posibles efectos alelopáticos (Sutherland y Hoglund 1989, Sutherland *et al.* 1999, Hoveland *et al.* 1999, Quigley 2000). Sin embargo, los efectos que los distintos simbiontes pueden tener sobre el de la planta vecina podría determinar cambios tanto en las relaciones entre plantas como en la productividad primaria neta y en la fijación de N.

1.6 – Objetivo, hipótesis y estructura de la tesis

El objetivo de esta tesis es detectar vías o procesos a través de los cuales la interacción entre múltiples simbiosis podría modular la relación entre plantas y el funcionamiento del ecosistema. Estas vías consideran la capacidad de los simbiontes de modificar a los intermediarios más estudiados en la relación entre plantas que son los herbívoros y los nutrientes. La hipótesis general es que la presencia simultánea de un simbionte proveedor y un protector genera propiedades emergentes (i.e. efectos distintos del esperado para cada simbionte en particular) que benefician tanto a las plantas hospedantes como a plantas vecinas no-hospedantes y favorecen su coexistencia.

Se predice entonces que la presencia de diferentes tipos de simbiontes afecta la forma en que se relacionan las plantas hospedantes coexistiendo. La presencia de microorganismos simbiontes induce o promueve efectos de facilitación entre las plantas

e incrementa la complementariedad en el uso de los recursos de sus hospedantes, lo que evita un aumento en la intensidad de la competencia por recursos escasos al aumentar el crecimiento de cada hospedante o al inducir efectos alelopáticos. A través de estos mecanismos que permiten la coexistencia de plantas competidoras, la presencia de múltiples simbiosis pueden presentar resultados positivos en términos de productividad primaria y fijación de N al desencadenar propiedades emergentes.

En particular, en esta tesis se estudia la existencia de estas vías en la interacción entre plantas de leguminosas hospedantes de rizobios y de pastos hospedantes de endófitos (Fig. 1.5) inducidas por los simbios. El primer capítulo de resultados (**Capítulo 2**) se centra en la facilitación indirecta mediada por herbívoros por medio de la cual la simbiosis pasto-endófito afecta a la leguminosa vecina en simbiosis con rizobios. En el siguiente capítulo (**Capítulo 3**) se evalúan mecanismos indirectos mediados por componentes del suelo (ya sean negativos: alelopatía, o positivos: facilitación directa o indirecta). Este capítulo se enmarca dentro de los procesos de retroalimentación planta-suelo-plantas (explicados con más detalle en el correspondiente capítulo). En el último capítulo de resultados, (**Capítulo 4**) se verifica el resultado neto de la coexistencia de ambas simbiosis, de manera de incluir procesos de competencia por explotación o de alelopatía y el impacto de los simbios en la complementariedad en el uso de los recursos y en la facilitación directa o indirecta. Al final de ese capítulo se estudian las consecuencias de la coexistencia de las simbiosis pasto-endófito y leguminosa-rizobios en la productividad primaria neta aérea y la dinámica de nitrógeno como procesos clave del funcionamiento del ecosistema.

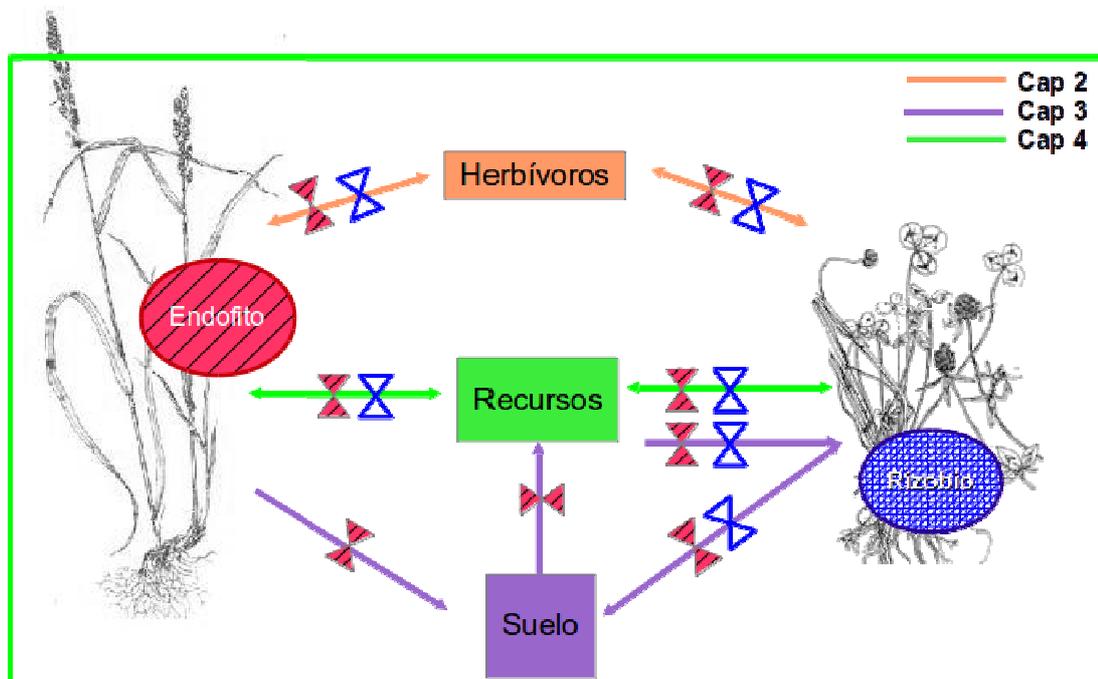


Figura 1.5: Mecanismos por los cuales los simbios de pastos (endófito) y leguminosas (rizobios) podrían afectar a la interacción entre sus hospedantes estudiados en cada uno de los capítulos de resultados. Las llaves (X) indican los flujos que pueden ser afectados por cada simbiote interactivamente, según el color (Rojo y rayado: endófito, azul y vacío: rizobio)

1.7 – Modelo de estudio y características comunes de las aproximaciones experimentales

Para abordar el objetivo general y contrastar la hipótesis se llevaron a cabo experimentos en los que se utiliza como modelo de estudio a la gramínea *Lolium multiflorum* (Lam.) y a la leguminosa *Trifolium repens* (L.). En todos los experimentos de esta tesis se manipulan, entre otros factores, los niveles de asociación con simbiontes de estas dos especies. Se utilizan poblaciones de plantas de *L. multiflorum* con bajo o alto porcentaje de individuos asociados a endofitos (nivel endofítico E- o E+, respectivamente). A su vez, las plantas de *T. repens* también presentan bajo o alto nivel de asociación con rizobios (R- o R+ respectivamente).

El pasto *L. multiflorum* es una gramínea anual invernal nativa de Europa que naturalmente hospeda al endofito *Epichloë occultans* ((C.D. Moon, B. Scott & M.J. Chr.) Schardl, comb. Nov., Leuchtman et al. 2014) - (anteriormente *Neotyphodium occultans* C.D. Moon, B. Scott & M.J. Chr.). Esta gramínea se encuentra ampliamente naturalizada en los pastizales pampeanos (Soriano *et al.* 1991) y presenta una amplísima distribución potencial (Fig 1.6a). Esta simbiosis presenta la particularidad de no generar efectos tóxicos detectables sobre el ganado doméstico, como si lo hacen los pares *Lolium perenne*-*Epichloë lolii* y *Schenodorus phoenix*-*Epichloë coenophialum* (De Batista 2005)

Para obtener las poblaciones de *L. multiflorum* con proporciones contrastantes de plantas simbióticas, un año antes de cada experimento se cosecharon semillas en un pastizal sucesional tardío localizado en la Pampa Interior (Carlos Casares, Argentina 34° 06' S 60°25'O) dominado por plantas de *L. multiflorum* con \approx 95% de individuos asociadas a endofitos (Omacini *et al.* 2004). En estudios anteriores se ha utilizado esta población de *L. multiflorum* para investigar de que manera los endofitos afectar la población hospedante y su interacción con múltiples componentes aéreos y subterráneos del ecosistema (Omacini *et al.* 2001, 2004, 2006, Casas *et al.* 2011). La mitad de las semillas fueron tratadas con el fungicida triadimenol (0.5 g p.a./ 100 g de semillas) para remover al endofitos (Omacini *et al.* 2006, 2009). Las semillas tratadas y no tratadas con fungicida fueron cultivadas en parcelas adyacentes de 1m² en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34°35'S, 58°35'O). Las semillas producidas por esas plantas luego de un ciclo de crecimiento fueron cosechadas y utilizadas en los experimentos. La presencia del endofito fue corroborada en cada caso mediante la observación de una submuestra de 30 semillas teñidas con el colorante rosa de bengala (Bacon y White 1994). Las proporciones de individuos simbióticos y no simbióticos mencionadas en cada capítulo son las resultantes de esas observaciones.

La leguminosa *T. repens* es un trébol invernal que se asocia con rizobios de la especie *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Esta leguminosa también se encuentra ampliamente distribuida en los pastizales pampeanos y presenta una amplia distribución potencial en zonas templadas a frías (Fig. 1.6b). Las semillas de *T. repens* utilizadas fueron obtenidas de un cultivar (cv. Junín) cosechadas el diciembre previo a cada experimento de la parcela demostrativa de la Facultad de Agronomía de la Universidad

de Buenos Aires. Estas semillas fueron inoculadas con un inoculante líquido comercial conteniendo 10^9 bacterias viables de *R. leguminosarum biovar trifolii* por ml para obtener plantas R+ (Ribol, Rizobacter Argentina S.A. $12\mu\text{l}$ inoculante g^{-1} semilla). En contraposición, para obtener las plantas R-, las semillas fueron inoculadas con la misma cantidad del producto previamente esterilizado por autoclavado (20 min, 121°C) para destruir las bacterias. Todas las semillas fueron sembradas 30 minutos luego de la inoculación.

En todos los experimentos el sustrato original utilizado fue una mezcla de suelo y arena limpia (1:1). El suelo fue tinalizado (autoclavado a 1 atm de presión por una hora, 3 veces con intervalo de 24 h) para disminuir la cantidad de microorganismos del suelo, especialmente esporas de hongos micorrícicos capaces de germinar y establecer simbiosis con ambas especies de plantas, y bacterias de rizobios capaces de nodular efectivamente las leguminosas (Colinas *et al.* 1994). Dado que esta esterilización no fue completa, se lograron niveles contrastantes de nodulación cuando se inoculó con rizobios, generando tratamientos con alta y baja disponibilidad de rizobios. Durante su desarrollo, todas las unidades experimentales fueron regadas a capacidad de campo cuando fue necesario.

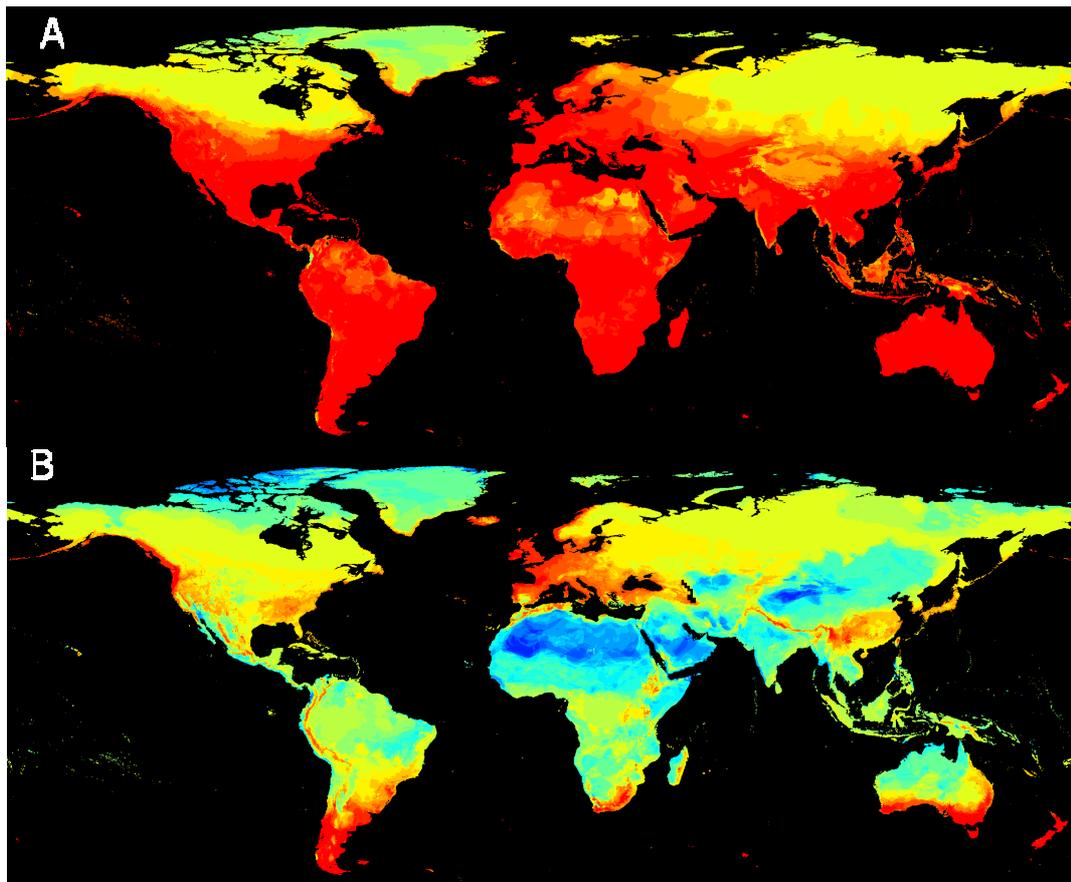


Figura 1.6: Distribución potencial de la especie *L. multiflorum* (A) y *T. repens* (B) calculado según modelos que integran los datos de ocurrencia de cada especie registrados con distintas variables ambientales. Rojo: alta probabilidad, azul = baja probabilidad de ocurrencia. <http://data.gbif.org>

FACILITACIÓN INDIRECTA MEDIADA POR HERBÍVOROS

* García Parisi PA, Grimoldi A, Omacini M. 2014. Endophytic fungi of grasses protect other plants from aphid herbivory. *Fungal Ecology*, 9, 61-64.

2.1 – Introducción

Los herbívoros son uno de los principales intermediarios bióticos de las relaciones entre plantas (Grace y Tilman 1990). Una planta puede modificar la herbivoría sobre una planta vecina al disminuir o incrementar la probabilidad de ser detectada o la vulnerabilidad frente a los herbívoros (Atsatt y O'Dowd 1976, Barbosa *et al.* 2009). A estas propiedades emergentes se las denomina protección o susceptibilidad por asociación respectivamente. En particular, la protección por asociación ha sido ampliamente documentada y constituye un mecanismo de facilitación indirecta que puede favorecer la coexistencia de las plantas (Callaway 1995).

De entre los múltiples cambios que los microorganismos simbiotes, ya sean protectores o proveedores, inducen en sus hospedantes pueden surgir rasgos que generen protección o susceptibilidad por asociación. Los simbiotes de protección inducen defensas de la planta huésped frente a los enemigos naturales, entre los cuales pueden estar los herbívoros (Clay *et al.* 1993, Omacini *et al.* 2001, Clay y Schardl 2002). En cambio, los simbiotes proveedores aumentan el desempeño de sus socios principalmente mediante la mejora de su acceso a nutrientes escasos o inaccesibles. Los cambios en la calidad de los tejidos debido al mayor acceso a los nutrientes pueden determinar cambios en la capacidad de atraer a los herbívoros (Vicari *et al.* 2002, Dean *et al.* 2009, Kempel *et al.* 2009, Koricheva *et al.* 2009). Por ejemplo, los hongos micorrízicos arbusculares y las bacterias fijadoras de nitrógeno (N), los simbiotes proveedores más populares, pueden ser determinantes en los resultados de las interacciones de los hospedantes y sus herbívoros a través de su influencia en el crecimiento de la planta, la nutrición y el sistema de defensa (Kempel *et al.* 2009, Schausberger *et al.* 2012).

Los hongos endófitos del género *Epichloë* (*Clavicipitaceae*) son simbiotes protectores de pastos que pueden inducir múltiples alteraciones en el fenotipo de sus socios (Clay *et al.* 1993, Malinowski y Belesky 2000, Yue *et al.* 2001, Clay y Schardl 2002, Rasmussen *et al.* 2007, White y Torres 2010). Principalmente, los efectos protectores son atribuidos a la síntesis de alcaloides bioactivos en plantas simbióticas que han demostrado ser altamente eficaces en la disuasión de herbívoros vertebrados e invertebrados. Es por ello que esta asociación es considerada generalmente como un mutualismo de protección privado (Rudgers y Clay 2008). Sin embargo, se demostró que esta protección se puede extender a una planta hemiparásita conectada al hospedante que se apropie de los alcaloides (Lehtonen *et al.* 2005), y que los residuos producidos por plantas simbióticas pueden disuadir a los herbívoros de plantas no simbióticas (Omacini *et al.* 2009). Sin embargo, hasta ahora, la protección por asociación mediada por endófitos no ha sido considerada como un mecanismo que afecta el resultado de la herbivoría en plantas vecinas sin acceso a alcaloides.

En este capítulo se estudia si los simbiotes de gramíneas y leguminosas generan protección o susceptibilidad por asociación frente al ataque de herbívoros. Se hipotetiza que (1) las leguminosas obtienen protección contra herbívoros invertebrados en los parches dominados por plantas endofíticas productoras de compuestos volátiles, y que (2) esta protección puede ser modificada por la presencia de un simbiote proveedor

(*Rhizobium leguminosarum*), dado que estos rizobios pueden influir en la abundancia de herbívoros en las leguminosas al modificar la concentración de N en los tejidos (Sprent 2007, Dean *et al.* 2009). Como mecanismo probable de protección o susceptibilidad se midió la concentración de N en los tejidos foliares de ambas especies y la impronta de emisión de compuestos volátiles en plantas de *L. multiflorum*, dado que se ha sugerido que puede ser modificada por la presencia del hongo (Yue *et al.* 2001, Li *et al.* 2014b). El efecto de cada simbionte específico en la herbivoría de la planta vecina generando protección o susceptibilidad por asociación constituye una de las vías por las cuales la presencia de múltiples simbiontes en la comunidad podrían afectar la interacción entre plantas.

2.2 – Materiales y métodos

Para contrastar estas hipótesis, se realizó un experimento manipulativo al aire libre en mesocosmos en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34 ° 35 'S, 58 ° 35' W). El experimento consistió en 24 mesocosmos (macetas de 0.30 m de diámetro y 0.20 m de profundidad), cada uno organizado en dos partes, el centro, donde crecieron cuatro plantas de la leguminosa *T. repens*, y el vecindario donde crecieron 16 plantas del pasto *L. multiflorum*. La leguminosa sembrada presentó niveles contrastantes de asociación con rizobios (R- o R+) lo que se obtuvo mediante inoculación con medio estéril o con inoculante (ver. 1.7). Aunque las plantas R- de *T. repens* presentaron cierta nodulación, el número de nódulos por planta fue significativamente menor que en las plantas de R+ (R-: 11.4 ± 7.0 nódulos por planta, R+: 23.2 ± 2.3 nódulos por planta, prueba de *t*: $P < 0.001$, $t_{2,8} = 4.12$). El número de nódulos fue determinado visualmente en las raíces de *T. repens* cosechadas a mediados de noviembre. Las plantas de *L. multiflorum* sembradas eran provenientes de una población con <10% (E-) o 95% (E+) de los individuos asociados al endófito. De la combinación del nivel endofítico de la población de *L. multiflorum* (E- y E+) con el nivel de rizobios de las plantas de *T. repens* (R- o R+) se obtuvieron cuatro tratamientos que fueron repetidos seis veces.

El experimento se desarrolló entre junio y noviembre (invierno y primavera). Para mantener todas las plantas de los distintos tratamientos del mismo tamaño, se realizaron dos cortes de biomasa a los 7 cm de altura de las plantas. Luego de 16 semanas de sembrado el experimento (mediados de Octubre), se produjo una infestación natural de áfidos en todos los mesocosmos. Se determinó la presencia de áfidos en 10 hojas de *T. repens* y en 10 tallos de *L. multiflorum* de cada mesocosmos. Esta determinación se realizó al comienzo de la estación de crecimiento de los áfidos ya que entonces es posible contarlos y removerlos para detectar otra posible infestación. No hubo una nueva infestación y a mediados de noviembre 20 hojas de *T. repens* y *L. multiflorum* fueron cosechados y analizados para determinar la concentración de nitrógeno (%N).

La impronta de volátiles se midió la con una nariz artificial en parcelas de 1m² dominadas por plantas E+ o E- creciendo al experimento en mesocosmos en el mismo campo experimental, para determinar si la presencia de endófitos induce cambios en el patrón de emisión de estos compuestos. Cuatro parcelas fueron sembradas con 1500 semillas (4.5g) de las poblaciones de *L. multiflorum* E- utilizadas en el experimento de mesocosmos y cuatro parcelas con la misma cantidad de semillas de poblaciones E+.

Cada parcela constituyó un ambiente homogéneo y de tamaño adecuado para estimar la impronta de volátiles utilizando una nariz electrónica portátil (AgriNose, CNEA, Buenos Aires, AR). Esta tecnología permite evaluar la complejidad de olores o gases de manera similar a la de una nariz animal (Branca *et al.* 2003, D'Alessandro y Turlings 2006). Esta nariz artificial consta de un ensamble de 8 sensores de gas y un procesador que compara la reacción de cada sensor con el valor de referencia (aire puro). Aunque no es factible identificar el compuesto volátil al que reacciona cada sensor, es posible determinar diferencias en la impronta de volátiles de los distintos tratamientos.

Análisis estadísticos

Se analizó la infestación total por áfidos dado que el número de áfidos de cada especie registrada (i.e. *Rhopalosiphum padi*, *Sipha maydis*, *Metapholophium festucae*) era demasiado pequeño y variable entre las unidades experimentales como para analizarlos por separado. Los análisis fueron ejecutados con modelos lineales de efectos mixtos del paquete *nlme* (Pinheiro y Bates 2000) con el programa estadístico R (R-cran Project). En primer lugar, en los mesocosmos se analizó la infestación por áfidos en cada especie de planta por separado incluyendo los niveles simbióticos tanto de *T. repens* (R- o R+) como de *L. multiflorum* (E- o E+) como efectos fijos, sin incluir efecto aleatorio. Los datos fueron transformados logarítmicamente (log) previo al análisis. Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluadas posteriormente mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Los datos de %N se correlacionaron mediante una regresión simple con los datos de infestación por áfidos en *T. repens*, por separado según el nivel endofítico del vecindario de esas plantas (E- o E+). Se evaluó mediante una prueba de F la diferencia entre las pendientes de los tratamientos E- y E+. Los datos de la impronta de volátiles obtenidos de la nariz electrónica fueron en primer lugar ordenados mediante un análisis de componentes principales con el programa estadístico InfoStat. Posteriormente, la posición de cada punto en los dos componentes principales fue analizada mediante MANOVA para detectar diferencias entre las parcelas E- y E+.

2.3 – Resultados

El porcentaje de hojas naturalmente infestadas por áfidos en la leguminosa dependió del nivel simbiótico de dichas plantas y de sus vecinas (Rizobio x Endófito: $F_{1,20} = 4.79$, $P = 0.04$). Las plantas de *T. repens* R+ fueron altamente protegidas de los áfidos solamente cuando crecieron rodeadas por plantas de *L. multiflorum* endofíticas (Fig. 2.1, panel izquierdo). En las plantas de *T. repens* R-, la infestación por áfidos fue muy baja (8%) tanto en mesocosmos E- como E+, mientras que en las plantas R+ la infestación por áfidos fue de 26% en los mesocosmos E- y de 8% en los mesocosmos E+. En los mesocosmos, la infestación en las plantas de *L. multiflorum* dependió exclusivamente del propio nivel endofítico de la población (E: $F_{1,20} = 5.81$, $P = 0.02$, Fig. 2.1, panel derecho), dado que resultó ser 3 veces mayor en E- que en E+. Sorprendentemente, la magnitud de esta protección, medida como la disminución en la infestación, fue similar en las dos especies de plantas.

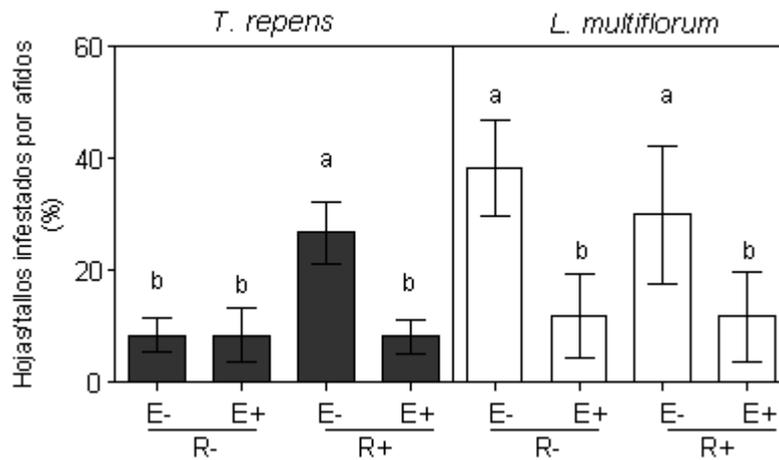


Figura 2.1: Hojas infestadas por áfidos (% , media \pm EE) en plantas de *T. repens* (barras grises, panel izquierdo) inoculadas (R+) o no (R-) con rizobios creciendo en vecindarios de plantas de *L. multiflorum* con baja (E-) o alta (E+) proporción de individuos endófitos. La proporción de tallos infestados por áfidos (% , media \pm EE) de esas plantas de *L. multiflorum* se encuentran en el panel derecho (barra blancas). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0.05$). Los análisis fueron desarrollados por separado para ambas especies.

La concentración de N en hojas de *T. repens* correlacionó positivamente con la infestación por áfidos en dichas plantas sólo en los mesocosmos E-, mientras que en los mesocosmos E+ la variable resultó pobre predictora de la respuesta de los áfidos (E-: $r^2 = 0.60$, $P = 0.007$; E+: $r^2 = 0.10$, $P = 0.33$; Fig. 2.2). La pendiente de las rectas ajustadas fueron significativamente distintas ($F_{1,17} = 4.75$, $P = 0.043$). La impronta de volátiles producidos por las parcelas de poblaciones de *L. multiflorum* con niveles endófitos contrastantes fueron diferentes (Fig. 2.3) Los dos componentes principales del ordenamiento explicaron el 55% y el 22% de la variabilidad en la emisión de volátiles. Al analizar la posición de los puntos en dichos ejes mediante MANOVA se detectaron diferencias significativas entre las improntas de las parcelas E- y E+ ($F_{2,5} = 8.8$, $P = 0.023$). Las diferencias fueron determinadas por los sensores 7 y 8 (Fig. 2.3), dado que el valor relativo medio de las parcelas E+ aumentó 10%, mientras que en las parcelas E- el aumento fue menor al 5% en relación al valor de referencia. En el sensor 1, el valor relativo fue menor a 1 en las parcelas E-, mientras que no fue distinto de 1 en las parcelas E+. Para el resto de los sensores los valores obtenidos fueron iguales al valor de referencia tanto para las parcelas E- como E+ (Fig. 2.3).

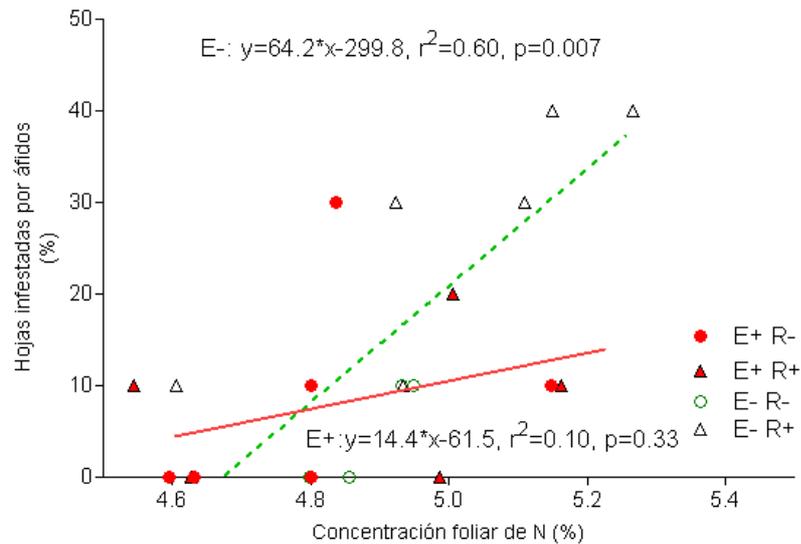


Figura 2.2: Hojas infestadas por áfidos (%) en relación a la concentración foliar de N (%) en plantas de *T. repens* inoculadas (R+, triángulos) o no (R-, círculos) con rizobios creciendo en vecindarios de plantas de *L. multiflorum* con baja (E-, símbolos verdes, vacíos) o alta (E+, símbolos rojos, llenos) proporción de individuos endófitos. Las líneas ajustadas mediante regresión lineal son diferentes entre E- y E+ ($P < 0.05$)

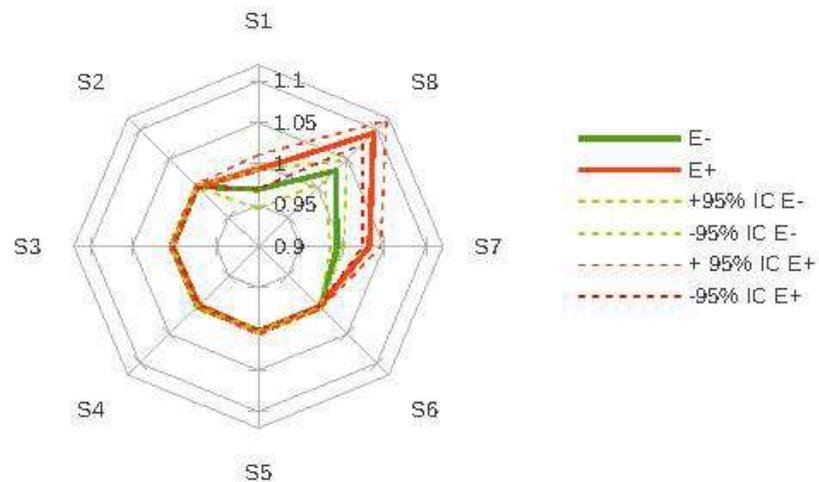


Figura 2.3: Impronta de volátiles de parcelas con baja (E-, líneas verdes) o alta (E+, líneas rojas) proporción de individuos endófitos obtenida mediante 8 sensores (de S1 a S8). Cada eje corresponde a un sensor mientras que cada vértice de la impronta corresponde al valor medio (línea continua) y el intervalo de confianza (95%, líneas punteadas) inferior (-95% IC) y superior (+95% IC). Valores igual 1 implican que el valor registrado es igual al aire puro.

2.4 – Discusión

En este capítulo se detectó que la coexistencia de dos simbioses puede modificar interactivamente la relación entre los hospedantes y sus herbívoros. En este sentido la protección por asociación inducida por el endófito hacia plantas de leguminosas depende de la disponibilidad de rizobios en ellas, apoyando las hipótesis planteadas. Esta es la primera evidencia experimental de que el efecto benéfico de los endófitos puede extenderse a otras poblaciones de plantas coexistiendo con el hospedante. Además, esta protección se dio en plantas que resultaron atractivas para los áfidos por la presencia de su simbionte proveedor. En este sentido, la simbiosis pasto-endófito alteró la respuesta de los áfidos a cambios en la concentración foliar de N en leguminosas. La modificación de la impronta de volátiles en *L. multiflorum* inducida por la presencia del endófito puede constituir uno de los mecanismos involucrados en esta protección por asociación.

Las plantas de *T. repens* atractivas rodeadas por plantas endofíticas de *L. multiflorum* fueron protegidas de la herbivoría por áfidos en magnitudes similares a la que el endófito protege a la propia planta. El impacto negativo del endófito sobre los herbívoros invertebrados se ha documentado desde el siglo pasado (Clay 1988), y se ha sugerido que los alcaloides presentes en los tejidos de plantas hospedantes constituyen el principal mecanismo involucrado (Bush *et al.* 1997, Wilkinson *et al.* 2000, Clay & Schardl 2002, Faeth *et al.* 2002). Sin embargo, el efecto del endófito en la herbivoría de plantas no-hospedantes ha sido poco considerado a escala de comunidad (Lehtonen *et al.* 2005, Omacini *et al.* 2009). Inclusive, nunca se había documentado la protección hacia una planta vecina que no posea los alcaloides. Las emisiones de compuestos volátiles en plantas endofíticas, aunque son menos estudiados que los alcaloides, también pueden ser modificadas por la presencia del endófito y deben considerarse en futuros experimentos. Los cambios en los patrones de emisión de volátiles inducidos por el endófito puede explicar la selección del parche por parte de los herbívoros. En este sentido, los cambios en el patrón de volátiles no solo podrían explicar la protección hacia *T. repens*, sino que además podría contribuir a explicar parte de la propia protección de *L. multiflorum* o la respuesta de los enemigos de sus herbívoros (Omacini *et al.* 2001). Dado que los compuestos volátiles pueden inducir respuestas defensivas en las plantas vecinas (Karban y Maron 2002), esta otra vía de protección no puede ser descartada y debería ser considerada en los próximos estudios.

La variabilidad en la concentración foliar de nitrógeno explica el incremento en la infestación de áfidos cuando *T. repens* creció en vecindarios con poca presencia de endófitos. En cambio, esta relación fue quebrantada por la protección conferida por la presencia del endófito en plantas vecinas. La concentración de nitrógeno puede modificar la herbivoría de diferentes maneras. Por un lado, el nitrógeno es crucial para el desempeño de los insectos herbívoros por lo que es esperable que prefieran consumir tejidos ricos en nitrógeno (Kempel *et al.* 2009). Sin embargo, por otro lado, el nitrógeno adicional provisto por rizobios puede estimular también el sistema de defensa de las plantas dado que algunos compuestos defensivos (p.ej. los compuestos cianogénicos en algunas leguminosas) contienen nitrógeno (Kempel *et al.* 2009). Entonces, aunque el impacto de la presencia de rizobios en su hospedante puede presentar diversos efectos contrastantes en la herbivoría (Dean *et al.* 2009, Kempel *et al.* 2009, Heath y Lau 2011), en las condiciones evaluadas su impacto fue promotor de la herbivoría.

En resumen, es posible sostener que la presencia de rizobios puede promover el ataque de los herbívoros, pero que esta promoción se ve interrumpida por la presencia del endófito en el vecindario. Las leguminosas dependen de rizobios para su nutrición nitrogenada y generalmente coexisten con pastos hospedantes de endófitos en pastizales y pasturas. Por ello, el beneficio compartido por el endófito hacia la leguminosa vecina puede constituir un mecanismo que promueva la coexistencia de ambas especies en un contexto de limitación de nitrógeno o en presencia de herbívoros. La interacción entre ambos simbioses en las relaciones de herbivoría de sus hospedantes constituyen una propiedad emergente de su presencia simultánea que puede afectar la coexistencia de ambos hospedantes.

**FACILITACIÓN DIRECTA E INDIRECTA MEDIADA POR EL AMBIENTE
SUBTERRÁNEO**

3.1 – Introducción

En la última década ha cobrado especial importancia en ecología el estudio de los procesos de retroalimentación planta-suelo por los cuales las plantas afectan el desempeño de otras plantas a través de modificar componentes subterráneos del ecosistema (van der Putten *et al.* 2013). Las plantas condicionan el suelo y de esa manera promueven o inhiben la supervivencia, el crecimiento o el desarrollo de la siguiente generación de plantas mediante cambios que las plantas inducen en su ambiente biótico y abiótico subterráneo (Klironomos 2002, van der Putten *et al.* 2013). Aunque las propiedades químicas o físicas del suelo también pueden estar involucradas (Ehrenfeld *et al.* 2005), cambios en la abundancia o funcionalidad de microorganismos del suelo, y en particular los patógenos, los mutualistas y los descomponedores son reconocidos como componentes importantes mediando esta retroalimentación (Klironomos 2002, van der Heijden *et al.* 2008). Los procesos de retroalimentación planta-suelo constituyen un marco apropiado para estudiar la facilitación entre plantas mediadas por componentes subterráneos, y distinguirla de posibles efectos competitivos o de complementariedad que resultan cuando las plantas crecen juntas (Casper y Castelli 2007, Rodríguez-Echeverría *et al.* 2013).

Los endófitos aéreos de pastos tienen impacto sobre los componentes subterráneos del ecosistema (Omacini *et al.* 2012). Los endófitos pueden alterar las propiedades químicas y biológicas del suelo (Omacini *et al.* 2012) ya sea cambiando la cantidad (Franzluebbbers *et al.* 1999, Franzluebbbers 2006) o la calidad (Siegrist *et al.* 2010) de la biomasa de la planta que ingresa al suelo, o por efectos alelopáticos a través de la exudación radical (Van Hecke *et al.* 2005, Aschehoug *et al.* 2014). De esta forma los endófitos modifican la biota del suelo (Franzluebbbers 2006, Bowatte *et al.* 2011, Buyer *et al.* 2011, Casas *et al.* 2011) y los procesos relacionados a ella (Omacini *et al.* 2004, Siegrist *et al.* 2010).

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y las bacterias fijadoras de N (rizobios) son los dos simbioses más estudiados en su papel de impulsores de retroalimentaciones planta-suelo (van der Putten *et al.* 2013). Estos simbioses también son sensibles a la presencia de endófitos de pastos en el sistema, tanto en el mismo hospedante, como en plantas vecinas (Snell y Quigley 1990, Eerens *et al.* 1998, Omacini *et al.* 2006, 2012, Mack y Rudgers 2008, Novas *et al.* 2009). Sin embargo, se desconoce si existe retroalimentación planta-suelo mediadas por endófitos que actúan sobre otros simbioses (Cripps *et al.* 2013).

El objetivo de este capítulo es evaluar la existencia de retroalimentación planta-suelo de pasto asociados a endófitos y HMA sobre la simbiosis leguminosa-rizobio. Específicamente, la primera hipótesis es que la presencia de endófitos en el pasto *Lolium multiflorum* reduce la disponibilidad de HMA en el suelo, y que esto afecta negativamente el crecimiento de la próxima generación de plantas de la leguminosa *Trifolium repens*. Además, la segunda hipótesis postula que la respuesta de la leguminosa es diferente en las plantas con alta o baja disponibilidad de bacterias fijadoras de nitrógeno, dado que sus beneficios sobre el hospedante pueden ser afectados por las señales del endófito en el suelo o por la presencia de hongos

micorrícicos (Snell y Quigley, 1993, Larimer *et al.* 2010, 2012, 2014)

3.2 –Materiales y métodos

Se realizó un experimento en dos etapas. En la primera etapa, las "plantas acondicionadoras" (el pasto *Lolium multiflorum*) con o sin el endófito *Epichloë occultans* e inoculadas o no con hongos micorrícicos arbusculares, fueron cultivadas en macetas para acondicionar el suelo. En el segundo paso, las "plantas respuesta" (la leguminosa *Trifolium repens*) con alta o baja disponibilidad de bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios) fueron cultivadas en los suelos acondicionados.

Etapas de acondicionamiento del suelo

La etapa de acondicionamiento se llevó a cabo en invernáculo entre junio y diciembre. Las plantas de *L. multiflorum* crecieron en macetas de 1.5 litros, (4 plantas por maceta) llenas con una mezcla de suelo y arena (1:1). En la mitad de las macetas las plantas provenían de una población libre de endófitos (HE-: suelos acondicionados por plantas de una población con 0% de individuos endofíticos) mientras que en la otra mitad las cuatro plantas se encontraban asociadas a endófitos (HE+: suelos acondicionados por plantas de una población con 96% de individuos endofíticos). En combinación con el nivel endofítico de las plantas, las macetas recibieron una mezcla de perlita y vermiculita (25g) con o sin inóculo de hongos micorrícicos (HM+ y HM-, respectivamente). De la combinación de los dos niveles endofíticos y de los dos niveles micorrícicos se obtuvieron cuatro tratamientos que fueron repetidos seis veces. Las macetas se mantuvieron en invernáculo y se regaron hasta mediados de diciembre. El 20 de diciembre se detuvo el riego y una semana después se cosechó la biomasa aérea y se tamizó el suelo para ser utilizado en la etapa de respuesta. Una submuestra de 150 g del suelo acondicionado fue tomada de cada maceta para estimar el número de esporas de hongos micorrícicos, la disponibilidad de nitrógeno inorgánico (N) y la mineralización potencial de N.

Etapas de respuesta

Las plantas respuesta (*T. repens*) se cultivaron en los cuatro tipos de suelos acondicionados. De cada maceta se obtuvieron dos submacetas (dos contenedores aislados de 180 ml cada uno), en cada una de las cuales creció una planta de respuesta. La planta de una de las submacetas fue inoculada con rizobios, mientras que la planta de la otra no fue inoculada, obteniendo alta (R+) y baja (R-) disponibilidad de rizobios, respectivamente. En consecuencia, el experimento presentó un diseño factorial jerárquico en el que se aplicaron los cuatro tratamientos de acondicionamiento a las macetas, y el nivel de rizobios en plantas de *T. repens* se aplicaron a las submacetas obtenidas de cada maceta.

Esta etapa se desarrolló en cámaras de crecimiento durante 3 meses a 20°C y un fotoperíodo de 16:8 horas luz:oscuridad (densidad de flujo de fotones de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las plantas se cosecharon luego de tres meses. El tejido aéreo de cada planta se cortó a nivel del suelo y las raíces fueron lavadas. En las raíces se determinó el número de nódulos activos (determinados por la coloración rosada). Tanto las raíces como los

tejidos aéreos fueron secados en estufa a 60° por 48h y el peso seco resultante fue registrado. En las plantas crecidas en suelos HM+ se observó colonización micorrícica mientras que en las crecidas en HM- no se observaron estructuras fúngicas.

Inóculo de hongos micorrícicos

Las macetas inoculadas con hongos micorrícicos recibieron 25g de una mezcla de raíces, hifas internas, externas y esporas de los hongos *Glomus mosseae*, *G. hoi* y *G. intraradices*. Cada uno de estos inóculos fue obtenido de la multiplicación en plantas de *Plantago lanceolata*, *Lotus tenuis* y *Bromus unioloides* en macetas con perlita y vermiculita, regados con agua destilada la primer semana y con solución de Hoagland modificada (baja concentración de fósforo) el resto del ciclo. Las macetas HM- recibieron el producto resultante de cultivar las mismas especies de plantas en el mismo sustrato sin los hongos micorrícicos.

Suelo acondicionado: número de esporas, N inorgánico y mineralización potencial.

El número de esporas se determinó a partir de una submuestra de suelo de 50g obtenida de cada muestra. El suelo fue secado al aire, tamizado y decantado (Gerdemann y Nicolson 1963) y el sobrenadante fue centrifugado en gradiente de sacarosa (Walker *et al.* 1982). Se contó el número de esporas externamente saludables y se corrigió por el porcentaje de humedad para ser expresado por gramo de suelo seco.

La disponibilidad de N inorgánico en suelos acondicionados se estimó midiendo la concentración de N en forma de amonio (N-NH₄⁺) y nitrato (N-NO₃⁻) después del tamizado (es decir, entre las dos etapas). Posteriormente, para estimar el potencial de mineralización de N, submuestras de 100 g de suelo de cada tratamiento se incubó aeróbicamente y se midió N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻ después de 9 y 22 días de incubación. Para medir N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻, 30 g de suelo homogeneizado se mezcló con 15 ml de una solución de CaCl₂ 0.0125 M, se agitó durante 1 hora y se filtró inmediatamente. Se midió la N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺ en estas soluciones con una determinación reflectométrica usando Reflectoquant® Prueba de Amonio y Reflectoquant® Prueba de Nitrato (Merk KGaA, Darmstadt Alemania).

Adquisición de N en las leguminosas

La contribución de la absorción de N del suelo vs. la fijación de N atmosférico al total de N adquirido por las plantas se estimó con la técnica de abundancia natural de ¹⁵N. Esta técnica se basa en el hecho de que la composición isotópica [$\delta^{15}\text{N}$ (‰) = $((^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{muestra}})/(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{standard}}) - 1) \times 1000$] del N atmosférico difiere del N obtenido de la materia orgánica del suelo (Högberg 1997). La concentración de N y la $\delta^{15}\text{N}$ fue determinada en muestras (0.7g de peso seco) de la biomasa aérea de las plantas de cada especie usando un analizador elemental (NA1500, Carlo Erba Strumentazione, Milan, Italia) en interfase con un espectrómetro de masa de relación isotópica (IRMS, por sus siglas en inglés, Deltaplus, Finnigan MAT, Bremen, Alemania). La precisión del análisis resultó 0.14 ‰ (DS).

La fracción de N derivado de la fijación de N atmosférico (%N_{fij}) fue estimado como:

$$\%N_{\text{fij}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{planta fij}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}} - \text{B}) \quad (1)$$

donde $\delta^{15}\text{N}_{\text{plana fij}}$ es la $\delta^{15}\text{N}$ de la muestra de tejido, B es la $\delta^{15}\text{N}$ de una planta cuya provisión de N depende completamente de la fijación de N atmosférico y $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}}$ es la $\delta^{15}\text{N}$ de una planta no nodulada cuya provisión de N depende del suelo. Los valores de B y de $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}}$ se midieron en una serie de plantas de *T. repens* cultivadas en macetas adicionales. B se midió en plantas inoculadas con rizobios y crecidas en un sustrato de perlita/vermiculita regado con solución de Hoagland modificada sin ningún tipo de fuente de N salvo la atmosférica. Seis de estas macetas recibieron además el sustrato conteniendo inóculo de hongos micorrícicos usado en las macetas del experimento y otras seis macetas no lo recibieron. El valor B medido fue de 2.1 ± 0.49 ‰ (media \pm error estándar). El valor de $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}}$ fue medido en plantas no noduladas crecidas en el mismo sustrato suelo/arena que las plantas de *L. multiflorum*. Seis de estas macetas recibieron además el inóculo de hongos micorrícicos y otras seis macetas no lo recibieron. Los valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}}$ fueron 13.3 ± 0.73 ‰ en plantas micorrícicas y de 15.3 ± 0.84 ‰ en plantas no micorrícicas.

La adquisición de N por las plantas (N_{cont}) y la contribución del suelo (N_{abs}) y de la fijación de N atmosférico (N_{fij}) se calculó como:

$$N_{\text{cont}} (\text{g.planta}^{-1}) = \text{concentración de N (\%)} * \text{biomasa aérea (g.planta}^{-1}) / 100 \quad (2)$$

$$N_{\text{fij}} (\text{g.planta}^{-1}) = N_{\text{cont}} (\text{g.planta}^{-1}) * \%N_{\text{fij}} / 100 \quad (3)$$

$$N_{\text{abs}} (\text{g.planta}^{-1}) = N_{\text{cont}} (\text{g.planta}^{-1}) * (100 - \%N_{\text{fij}}) / 100 \quad (4)$$

Análisis estadísticos

Los análisis se realizaron con modelos lineales de efectos mixtos (*lmer*) y con modelos lineales generalizados de efectos mixtos (*glmer*) con el paquete *lme4* utilizando el software estadístico R (R-cran project). En las variables correspondientes al suelo acondicionado, el número de esporas se analizó incluyendo HE como efecto fijo, y el N inorgánico en suelos incubados se analizó incluyendo HE, HM y tiempo de incubación como efectos fijos. Para las variables de la etapa de respuesta, los modelos incluyeron los tratamientos de acondicionamiento (HE x HM) y el nivel de rizobios (R) como efectos fijos, y la estructura jerárquica (maceta/submaceta) como efecto aleatorio. Los datos que presentaron distribución normal (esporas en el suelo, biomasa aérea y subterránea, cantidad de N adquirido del suelo y de la atmósfera, total de N adquirido, proporción de N fijado y la cantidad de N fijado por nódulo) se analizó con modelos *lmer*. La distribución normal de los residuos y la homogeneidad de varianza se corroboró gráficamente. Los datos de nodulación presentaron distribución *poisson* y se analizaron con modelos *glmer*, incluyendo la especificación de la familia correspondiente. La sobredispersión en este modelo fue analíticamente evaluada. La significatividad de los factores fijos de los modelos se determinó utilizando la prueba de cociente de verosimilitud (LRT, por su siglas en inglés).

3.3 –Resultados

Etapa de acondicionamiento del suelo

Los suelos acondicionados por plantas con agregado de inóculo de hongos

micorrícicos (HM+) presentaron distinta cantidad de esporas según el nivel endofítico de esas plantas (HE). Los suelos HE- tuvieron 33% menos de esporas que los suelos HE+ (42 ± 4 vs. 33 ± 3 esporas.g⁻¹ de suelo, $\chi^2_1 = 39.9$, $P < 0.01$). No se detectaron esporas de hongos micorrícicos en los suelos HM-.

La disponibilidad de N inorgánico fue muy baja en todos los tratamientos (< 1.5 mg N-nitrato.kg⁻¹ de suelo; < 0.4 mg N-amonio.kg⁻¹ de suelo). La producción de nitratos fue afectada por el nivel endofítico de las plantas que acondicionaron ese suelo aunque no por el nivel micorrícico. Ésta fue mayor en los suelos HE+ que en los suelos HE- tanto después de 9 como de 22 días de incubación (HE: $\chi^2_1 = 4.41$, $P = 0.03$, Cuadro 3.1). En cambio, la producción de amonio no mostró diferencias entre los suelos HE- y HE+, y resultó ligeramente mayor en suelos HM+ que en los HM- luego de tres días de incubación (HM x Fecha: $\chi^2_1 = 14.1$, $P < 0.01$).

Cuadro 3.1: Número de esporas de hongos micorrícicos, N-NO₃⁻ y NH₄⁺ al inicio y después de 9 y 22 días de incubación del suelo acondicionado por plantas de *L. multiflorum* en simbiosis (+) o no (-) con endófitos (HE) y/o hongos micorrícicos (HM). Letras distintas implican diferencias significativas entre tratamientos para cada variable medida.

Historia		Esporas	Nitratos (mg.kg ⁻¹ suelo)		Amonio (mg.kg ⁻¹ suelo)	
HE	HM	(#.g ⁻¹ suelo)	9 días	22 días	9 días	22 días
HE-	HM-	0	3.6 (1.1) a	7.5 (0.6) a	1.3 (0.5) a	1.5 (0.3) a
HE-	HM+	42 (4) a	4.4 (0.8) a	8.0 (1.7) a	3.0 (0.3) b	1.5 (0.2) a
HE+	HM-	0	7.0 (1.5) b	9.0 (1.1) b	1.2 (0.3) a	1.2 (0.3) a
HE+	HM+	33 (3) b	6.7 (1.3) b	8.8 (1.1) b	2.0 (0.5) b	0.9 (0.2) a

Etapa de Respuesta

La inoculación con rizobios duplicó el número de nódulos por planta (LRT, R: $\chi^2_1 = 25.7$; $P < 0.01$, Fig. 3.3b). Además, la nodulación aumentó en 60% en HM+ (LRT, R: $\chi^2_1 = 3.7$; $P = 0.05$, Fig. 3.3b) independientemente del nivel endofítico en las plantas que acondicionaron ese suelo, que no afectó la nodulación.

El crecimiento de las plantas de *T. repens* fue afectado por el nivel endofítico de las plantas que acondicionaron el suelo y por la disponibilidad de rizobios. Se observó un efecto positivo del suelo HE+ solo en los tratamientos R-, mientras que en los tratamientos R+ no fue detectado efecto alguno (Cuadro 3.2). En los suelos HE+, el crecimiento de plantas R- fue similar al de las plantas R+ crecidas en cualquier suelo. (Fig. 3.1). El crecimiento de las raíces no fue afectado por los tratamientos (Cuadro 3.2).

La adquisición de N por parte de las plantas (Fig. 3.2) de *T. repens* se asemejó al patrón observado en el crecimiento de las plantas, aunque las diferencias en adquisición de N entre HE- y HE+ no resultó significativa (Cuadro 3.2). El N absorbido del suelo fue generalmente similar en todos los tratamientos. El nivel micorrícico de las plantas que acondicionaron el suelo no mostró efecto en la adquisición de N ni de la atmósfera ni del suelo en *T. repens* (Cuadro 3.2).

La cantidad de N adquirido mediante fijación atmosférica fue afectada por el nivel endofítico de las plantas que acondicionaron el suelo y por la disponibilidad de rizobios.

Se observó un efecto positivo de HE+ en las plantas R-, pero no en las plantas R+ (Fig. 3.2). Sin embargo, este incremento no fue suficiente para alcanzar a los valores de fijación observados en las plantas R+. Como resultado de estos efectos, el total de N adquirido por las plantas aumentó en situaciones de alta disponibilidad de rizobios solo en los suelos HE- (Fig. 3.2).

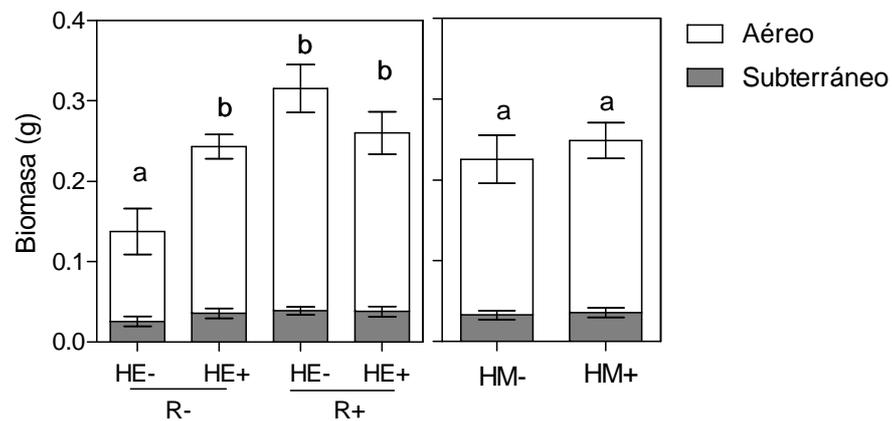


Figura 3.1: Producción de biomasa (g, media \pm EE) aérea (barras blancas) y subterránea (barras grises) de plantas de *T. repens* creciendo con baja (R-) o alta (R+) disponibilidad de rizobios en suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* libres (HE-) o asociadas (HE+) a endófitos (panel izquierdo), no asociadas (HM-) o asociadas (HM+) a hongos micorrícicos (panel derecho). Letras distintas implican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada panel, para biomasa aérea (Tukey, $P < 0.05$).

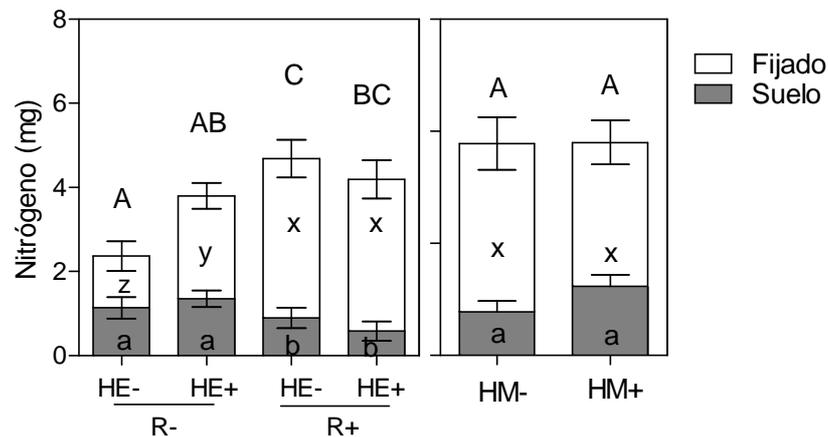


Figura 3.2: Nitrógeno (mg, media \pm EE) obtenido de fijación (barras blancas) y de absorción del suelo (barras grises) en plantas de *T. repens* creciendo con baja (R-) o alta (R+) disponibilidad de rizobios en suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* libres de endófitos (HE-) o asociadas a endófitos (HE+)(panel izquierdo), no asociadas (HM-) o asociadas (HM+) a hongos micorrícicos (panel derecho). Letras distintas encima de las columnas implican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada panel: A, B, C: total de N; x, y, z: N de fijación; y a, b, c: N del suelo. (Tukey, $P < 0.05$).

La proporción del N total que fue adquirido mediante fijación atmosférica fue mayor

en plantas R+ (>80%), independientemente del nivel endofítico en las plantas que acondicionaron el suelo. Aunque en plantas R- fue menor, cuando estas crecieron en suelos HE+ fue mayor que cuando crecieron en suelos HE- (Fig. 3.3a). No se observó diferencia entre plantas crecidas en suelos HM- y HM+. Como consecuencia de las diferentes respuestas en nodulación y en fijación atmosférica de N, la cantidad de N fijado por cada nódulo fue mayor y similar en todas las plantas R+ y en las plantas crecidas en suelos HE+. Notablemente, la cantidad de N fijado por nódulo fue mayor en suelo HM+ que en suelo HM- (Cuadro 3.2, Fig. 3.3c).

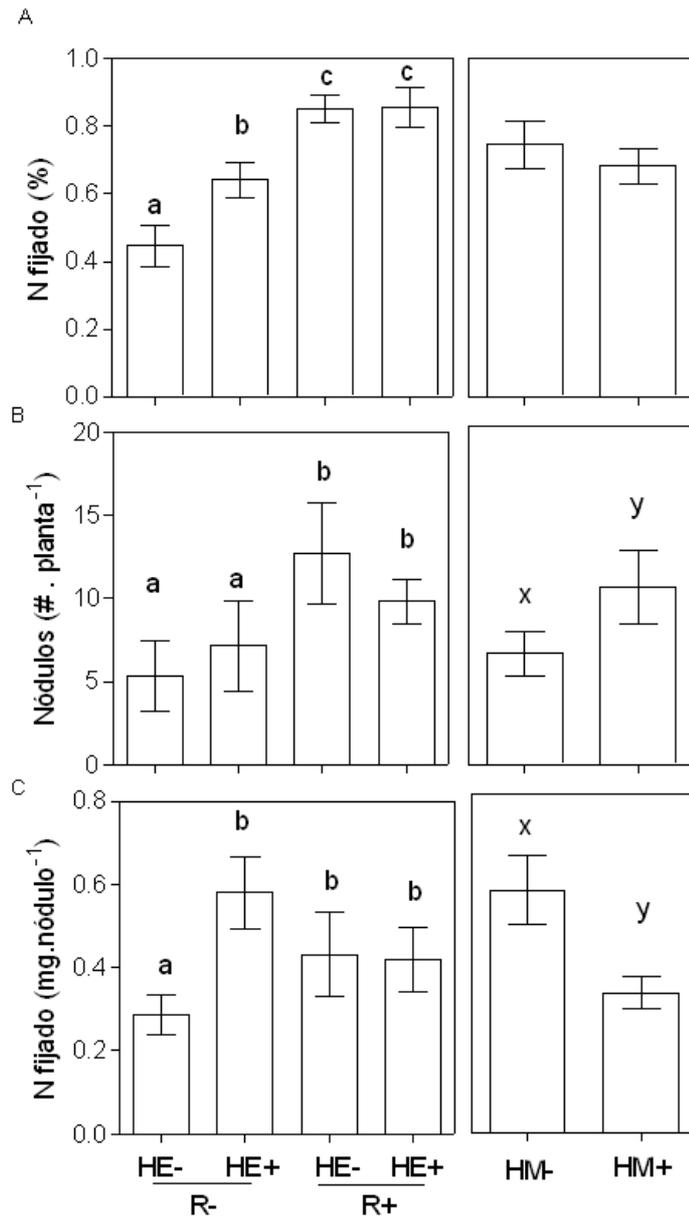


Figura 3.3: (A) Nitrógeno fijado (% , media \pm EE), (B) nódulos (#.planta⁻¹, media \pm EE) y (C) N fijado por nódulo (mg.nódulo⁻¹, media \pm EE) en plantas de *T. repens* creciendo con baja (R-) o alta (R+) disponibilidad de rizobios en suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* libres de endófitos (HE-) o asociadas a endófitos (HE+) (panel izquierdo), no asociadas (HM-) o asociadas (HM+) a hongos micorrícicos (panel derecho). Letras diferentes (a, b, c; x, y) implican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, $P < 0.05$).

Cuadro 3.2: Significancia de los factores fijos de los modelos ajustados a las variables de la etapa de respuesta determinada mediante la prueba del cociente de verosimilitud (LRT).

	g.l.	Biomasa Aérea (g)		Biomasa Subte (g)		Nódulos		N fijado (%)		N fijado (mg)		N del suelo (mg)		N fijado (mg.nod ⁻¹)	
		χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
HE	1	0.27	0.61	1.62	0.20	0.07	0.80	2.82	0.09	0.80	0.37	0.12	0.73	0.19	0.67
HM	1	0.15	0.69	0.08	0.77	3.82	0.04	0.92	0.34	0.17	0.68	3.91	0.05	23.1	<0.01
Rizobio	1	58.38	<0.01	14.84	<0.01	23.51	<0.01	54.21	<0.01	66.51	<0.01	5.86	0.02	393.6	<0.01
HE*HM	1	0.87	0.35	1.94	0.16	0.03	0.86	3.40	0.07	2.44	0.12	0.72	0.40	1.78	0.18
HE*R	1	8.36	<0.01	1.43	0.23	0.08	0.78	5.70	0.02	6.59	0.01	0.89	0.35	7.30	0.01
HM*R	1	2.97	0.08	0.43	0.51	1.08	0.30	0.23	0.63	0.01	0.92	0.00	0.99	3.22	0.07
HE*HM*R	1	1.96	0.16	1.77	0.18	0.02	0.89	0.39	0.53	0.02	0.88	1.61	0.20	0.38	0.54

g.l.: grados de libertad de la prueba de χ^2 . HE: nivel endofítico de las plantas de *L. multiflorum*, HM: nivel micorrícico de esas plantas. R: nivel de rizobios de las plantas de *T. repens*. P: valor P. nod.: nódulo. En **negrita** se marcan los efectos significativos ($p < 0.05$).

3.4 – Discusión

Estos resultados demuestran que los procesos de retroalimentación entre pastos y leguminosas dependen de la interacción entre distintos tipos de simbioses. Aunque se rechaza la primera hipótesis que postula que los efectos de retroalimentación del endófito son mediados por cambios en las micorrizas, se acepta la segunda hipótesis que postula que estos efectos dependen de la disponibilidad de rizobios. Los cambios en el suelo inducidos por plantas micorrícicas no afectaron ni el crecimiento, ni la adquisición ni la fuente de N. En cambio los inducidos por plantas endofíticas incrementaron el crecimiento y la fijación de N, pero sólo en plantas de *T. repens* con baja disponibilidad de rizobios. Este es el primer estudio en el que se evalúa el efecto de retroalimentación de la simbiosis pasto-endófito sobre plantas de otra especie en interacción con otros simbioses específicos como los rizobios, o generalistas como los hongos micorrícicos.

Aunque no se observó un efecto de los hongos micorrícicos, el crecimiento de las plantas fue afectado por la presencia previa o actual de otros simbioses en el sitio. Frente a baja disponibilidad de rizobios, el suelo acondicionado por plantas endofíticas generó un efecto positivo en el crecimiento de las leguminosas, alcanzando valores de productividad similares al de las plantas en los tratamientos con alta disponibilidad. Este incremento en el crecimiento estuvo acompañado de un aumento en la cantidad de N fijado por planta y por nódulo cuando plantas con baja disponibilidad de rizobios crecieron en suelos acondicionados por plantas endofíticas. Las leguminosas son capaces de regular la cantidad de N fijado por cada nódulo (Schulze 2004, Schulze *et al.* 2006). Así, una mayor disponibilidad de C en las plantas crecidas en los suelos en los que previamente crecieron plantas asociadas a endófitos podría haber generado una mayor fijación por nódulo cuando la disponibilidad de rizobios es limitante. Aún cuando el suelo fue tinalizado, la nodulación en plantas no inoculadas y la actividad de microorganismos mineralizadores (Cuadro 3.1) indican que la tinalización no fue completa. Entonces, los cambios que el endófito induce en los microorganismos del suelo, ya sea a través de mayor mineralización de la materia orgánica o a través de cambios en otros microorganismos (p.ej. menor actividad/carga de patógenos) pueden

ser responsables de esta mayor disponibilidad de C en las leguminosas. Es decir, plantas en mejores condiciones son capaces de demandar más N proveniente de fijación a partir de una menor cantidad de nódulos, aumentando su efectividad (Schulze *et al.* 2006).

La interacción entre distintos simbioses aéreos y subterráneos, específicos y generalistas en los procesos de retroalimentación no había sido evaluada previamente. En este estudio los efectos de retroalimentación del endófito no dependieron de los hongos micorrícicos aunque sí de rizobios. Aquí se demostró que la disponibilidad del simbionte específico es determinante en el efecto de retroalimentación. De hecho, es posible afirmar que los cambios en el suelo inducidos por las plantas endofíticas y la alta disponibilidad de rizobios tienen efectos redundantes en el crecimiento de leguminosas ya que el efecto de uno compensa la ausencia/escasez del otro. El efecto del endófito en la retroalimentación planta-suelo se ha estudiado previamente y resultó negativo para árboles, herbáceas, y gramíneas de la misma y diferente especie (Matthews y Clay 2001, Omacini *et al.* 2009, Rudgers y Orr 2009, Cripps *et al.* 2013, Aschehoug *et al.* 2014), aunque fue positivo para *T. repens* según la especie de gramínea hospedante (Cripps *et al.* 2013). En particular, las plantas de *Lolium perenne* con endófitos mostraron efectos de retroalimentación positiva sobre el crecimiento de *T. repens* (Cripps *et al.* 2013). Según nuestros resultados, la interacción con el simbionte específico de la leguminosa puede determinar este cambio de signo entre los distintos trabajos.

En este capítulo se avanzó en identificar el papel de los distintos microorganismos simbioses en los procesos de retroalimentación planta-suelo. El resultado de la retroalimentación desde plantas endofíticas hacia leguminosas dependen de la disponibilidad de rizobios. Los procesos de retroalimentación aquí estudiados involucran efectos de una generación a la siguiente, sin embargo, estos efectos también podrían ser observados cuando las especies coexisten e interactúan con procesos de competencia (Casper y Castelli 2007) o de facilitación (Rodríguez-Echeverría *et al.* 2013). En esos casos estos efectos positivos entre plantas resultantes de la interacción entre simbioses determinan mecanismos que favorecería la coexistencia sus hospedantes (Callaway 1995).

**COMPLEMENTARIEDAD EN EL USO DE LOS RECURSOS Y
CONSECUENCIAS DE LA COEXISTENCIA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD**

* García Parisi PA, Grimoldi AA, Lattanzi FA, Omacini M. 2013. Implicancias de las interacciones entre hongos endofitos de pastos y bacterias fijadoras de nitrógeno. En: Díaz-Sorita, Correa, Fernandez Canigia, Lavado (eds) Aportes de la Microbiología a la Producción de los Cultivos. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. pp.125-135.

García Parisi PA, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Omacini M. Multi-symbiotic systems: functional implications of the coexistence of grass-endophyte and legume-rhizobia symbioses. *Oikos*, 124, 553-560

4.1 – Introducción

Los microorganismos simbioses de plantas afectan a través de múltiples intermediarios las relaciones entre sus hospedantes y otras plantas de la comunidad (Douglas 2010). En general, su presencia en las plantas induce mayor habilidad competitiva e incrementa su crecimiento a través de asegurar la adquisición de recursos limitantes (simbionte proveedor, Thrall *et al.* 2007) o de proteger a su hospedante de antagonistas (simbionte protector, White y Torres 2010) o de otros múltiples efectos sobre sus hospedantes (Newsham *et al.* 1995, Cheplick y Faeth 2009). Sin embargo, los microorganismos simbioses pueden inducir efectos positivos en la relación entre plantas generando mecanismos de complementariedad y de facilitación (Eisenhauer 2012, Hodge y Fitter 2013). Los simbioses pueden inducir efectos de complementariedad al separar los distintos reservorios a los que se accede a un nutriente o inducir efectos de facilitación a través de diversas vías (Capítulos 2 y 3, García Parisi *et al.* 2014). Así, aunque los efectos positivos “privados” sobre sus hospedantes pueden ser importantes y determinar la exclusión competitiva de las otras plantas (Clay 1990, Rudgers *et al.* 2007), también puede desencadenar múltiples mecanismos que permiten la coexistencia (Haynes 1980, Eisenhauer 2012).

Cuando varios simbioses coexisten en una comunidad, la presencia de un simbionte puede modificar el impacto del otro simbionte tanto sobre su hospedante como sobre la vecina (Omacini *et al.* 2006, 2012). Por ejemplo, estudios previos demostraron que los endófitos aéreos y hongos micorrízicos arbusculares pueden interactuar de manera sinérgica (Larimer *et al.* 2012), antagónica (Liu *et al.* 2011) o neutra con respecto al crecimiento de un mismo hospedante (Omacini *et al.* 2006, Mack y Rudgers 2008), dependiendo del contexto ambiental y del genotipo de simbionte y hospedante (Larimer *et al.* 2010, Liu *et al.* 2011). El impacto de la coexistencia de simbioses en distintos hospedantes, y en particular el caso de los simbioses específicos de gramíneas y leguminosas, ha sido escasamente evaluado (Eerens *et al.* 1998, Omacini *et al.* 2006, 2012). A pesar de que la coexistencia de simbioses en las plantas vecinas es altamente probable (por ejemplo, Stanton 2003, Bonfante y Anca 2009), los estudios sobre sus efectos interactivos son raros (Bauer *et al.* 2012).

Las simbiosis pasto endófito usualmente coexiste con la simbiosis leguminosa-rizobios en comunidades herbáceas. En algunas ocasiones las leguminosas son desplazadas por el pasto y tienden a desaparecer (Sutherland y Hoglund 1989, Stevens y Hickey 1990, Vázquez-de-Aldana *et al.* 2013). Dos estudios con resultados contradictorios muestran que los endófitos pueden afectar la interacción entre leguminosas vecinas y bacterias fijadoras de N: mientras que Eerens y colaboradores (1998) encontraron un efecto positivo sobre la nodulación, Snell y Quigley (1993) reportaron que las hojas de plantas endofíticas de *Lolium perenne* disminuyen la nodulación de plántulas de *Trifolium subterraneum*. En cambio, en el capítulo 3 demostramos que la fijación de nitrógeno incrementa en suelos donde crecieron plantas endofíticas. En resumen, no está claro si el funcionamiento de la simbiosis leguminosa-rizobio puede verse afectada por la presencia del endófito en el pasto vecino. Posibles efectos positivos o negativos sobre el establecimiento o el funcionamiento de los rizobios podrían favorecer o perjudicar los efectos de complementariedad en el uso del

N que permitirían la coexistencia de estas dos especies. En este sentido, tampoco se han explorado los posibles efectos interactivos de la presencia simultánea de rizobios y endófitos sobre la dinámica del N y la productividad primaria.

El objetivo de este capítulo es determinar (1) el impacto de la simbiosis pasto-endófito sobre la simbiosis leguminosa-rizobio y la capacidad de inducir complementariedad en el uso del N y (2) las consecuencias de la presencia simultánea de ambos simbioses para la dinámica de N y la productividad primaria. La hipótesis es que los efectos del endófito sobre rizobios modifican su capacidad de inducir complementariedad en el uso del N. Estos y otros efectos interactivos de los simbioses sobre sus hospedantes inducen cambios en las relaciones de competencia, modulando la coexistencia de ambas simbiosis al potenciar efectos de complementariedad y de facilitación.

4.2 –Materiales y métodos

Para contrastar estas hipótesis, entre junio y noviembre se realizó un experimento manipulativo al aire libre en mesocosmos en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34 ° 35 'S, 58 ° 35' O). Al igual que en el capítulo 2, cada mesocosmos (macetas de 0.30 m de diámetro y 0.20 m de profundidad) consistió en cuatro plantas centrales de *Trifolium repens* rodeadas por un vecindario formado por 16 plantas *Lolium multiflorum*. El experimento presentó un diseño factorial completamente aleatorizado con dos factores: el nivel de rizobios en las plantas de *T. repens* (R+: alto nivel de rizobios, R-: bajo nivel de rizobios) y el nivel de endófitos en las plantas del vecindario (E-: plantas de una población con <10% de individuos endofíticos y E+, plantas de una población con 95% de individuos endofíticos). Cada mesocosmos fue repetido 6 veces. En este experimento, la herbivoría aérea fue controlada manualmente o por productos químicos aplicados en el área experimental (Babosil, Metaldehyde 3 %).

Cosechas y determinaciones

En el 6 y el 21 de octubre se cosechó la biomasa aérea por encima de los 7 cm de todos los mesocosmos. Aunque es conocido el hecho de que las remociones de biomasa pueden afectar a los simbioses (Hokka *et al.* 2004, García Parisi *et al.* 2012). En el 22 de noviembre, alrededor de floración se cosechó toda la biomasa aérea de las plantas de ambas especies. Esta cosecha final constituyó más del 80% de la biomasa acumulada durante todo el periodo experimental. La biomasa cosechada se secó en estufa a 60° durante 48h, y fue luego pesada y molida. La producción de biomasa de las plantas consistió en la acumulación de los pesajes de materia seca de cada una de las especies, y la productividad primaria fue la acumulación de la biomasa producida por ambas especies en cada mesocosmos. Las raíces de las cuatro plantas de *T. repens* de cada mesocosmos fueron separadas cuidadosamente y limpiadas con agua. La cantidad de nódulos fue obtenida visualmente y dividida por 4 para estimar el número de nódulos por planta.

Adquisición de N

La contribución de la absorción de N del suelo vs. la fijación de N atmosférico al total de N adquirido por las plantas se estimó con la técnica de abundancia natural de ^{15}N . Esta técnica se basa en el hecho de que la composición isotópica [$\delta^{15}\text{N}$ (‰) = $((^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{muestra}}) / (^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{estandar}}) - 1) \times 1000$] del N atmosférico difiere del N obtenido de la materia orgánica del suelo (Högberg 1997). La concentración de N y la $\delta^{15}\text{N}$ fue determinada en muestras (0.7g de peso seco) de la biomasa aérea de las plantas de cada especie usando un analizador elemental (NA1500, Carlo Erba Strumentazione, Milan) en interfase con un espectrómetro de masa de relación isotópica (IRMS, por sus siglas en inglés, Deltaplus, Finnigan MAT, Bremen, Alemania). La precisión del análisis resultó 0.14 ‰ (DS)

La fracción de N derivado de la fijación de N atmosférico (% N_{fij}) fue estimado como:

$$\%N_{\text{fij}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{planta fij}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}} - B) \quad (1)$$

donde $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta fij}}$ es la $\delta^{15}\text{N}$ de la muestra de tejido, B es la $\delta^{15}\text{N}$ de una planta cuya provisión de N dependa completamente de la fijación de N atmosférico y $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}}$ es la $\delta^{15}\text{N}$ de una planta no nodulada. Para *T. repens*, B se encuentra típicamente en el rango de -2 ‰ a -1 ‰ (Högberg 1997). B no fue medido directamente, pero se asumió igual al mínimo valor de $\delta^{15}\text{N}$ observado en las muestras (-1.3 ‰). Dado que las plantas R- presentaron nodulación la $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}}$ fue medida en cuatro plantas de *T. repens* sin rizobios cultivados en macetas adicionales con el mismo substrato esterilizado una vez más (n=3).

Para detectar posibles transferencias de N fijado de la leguminosa al pasto, se aplicó la ecuación (1) a los datos de *L. multiflorum*. En este caso, la $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta fij}}$ es la $\delta^{15}\text{N}$ de plantas de *L. multiflorum* crecidas en los mesocosmos, y la $\delta^{15}\text{N}_{\text{planta ref}}$ es la $\delta^{15}\text{N}$ de plantas E- y E+ cultivadas en monocultivos (plantas de referencia de *L. multiflorum*). Estos monocultivos (6 mesocosmos E- y 6 mesocosmos E+ en los que crecieron 20 plantas de *L. multiflorum* en cada uno) se desarrollaron paralelamente al experimento y bajo las mismas condiciones. Las plantas en los monocultivos mostraron la misma $\delta^{15}\text{N}$ que las plantas de *L. multiflorum* en los mesocosmos (7.8 ‰ vs. 8.3 ‰, $P > 0.10$). Esto permite concluir que las plantas del pasto obtuvieron toda su provisión de N del suelo.

La fijación de N atmosférico (g.planta^{-1}) en las plantas de *T. repens* se estimó como
 Fijación de N atmosférico (g.planta^{-1} de *T. repens*) = contenido de N (g) * % N_{fij} / 100 / 4 (2)

A nivel de mesocosmos, la adquisición de N por cada especie (N_{cont} g.mescosmos $^{-1}$) y la contribución del suelo a cada especie (N_{abs} g.mescosmos $^{-1}$) y de la fijación de N atmosférico a *T. repens* (N_{fij} g.mescosmos $^{-1}$) se calculó como:

$$N_{\text{cont}} (\text{g}) = \text{concentración de N (\%)} * \text{biomasa de las plantas (g)} / 100 \quad (3)$$

$$N_{\text{abs}} (\text{g}) = N_{\text{cont}} (\text{g}) * (100 - \%N_{\text{fij}}) / 100 \quad (4)$$

$$N_{\text{fij}} (\text{g}) = N_{\text{cont}} (\text{g}) * \%N_{\text{fij}} / 100 \quad (5)$$

Cuadro 4.1: Composición isotópica ($\delta^{15}\text{N}$) y porcentaje derivado de fijación estimado ($\%N_{\text{fij}}$) en muestras de *Trifolium* y en plantas de referencia. Media \pm EE y (número de replicas).

	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\%N_{\text{fij}}$ (%)
E- R-	- 0.96 \pm 0.09 (6)	97.7 \pm 0.75
E- R+	- 0.71 \pm 0.07 (6)	95.6 \pm 0.58
E+ R-	- 0.29 \pm 0.30 (6)	99.0 \pm 0.58
E+ R+	- 0.65 \pm 0.07 (6)	95,1 \pm 0.50
referencia	10.58 \pm 0.01 (3)	

El contenido de N representa la adquisición de N por plantas de *T. repens* y *L. multiflorum* desde el suelo y la atmósfera. El total de N en el mesocosmos integra la adquisición de N de ambas especies de plantas en su biomasa aérea. La biomasa de las plantas, la concentración de N y la $\delta^{15}\text{N}$ corresponden a muestras obtenidas en la cosecha final (22 de noviembre) de manera de integrar el crecimiento y la acumulación de N en tejidos aéreos entre el 21 de octubre y el 22 de noviembre.

Análisis estadísticos

El número de nódulos y la fijación de N atmosférico en las plantas *T. repens*, el N_{abs} y el contenido de N en *L. multiflorum* y en *T. repens*, el total de N en el sistema, la producción de biomasa de *L. multiflorum* y de *T. repens* y la productividad primaria neta aérea se analizó en modelos incluyendo dos factores fijos: el nivel de asociación con rizobios de *T. repens* (R) con dos niveles, y el nivel de asociación con endófitos en el vecindario (E) con dos niveles. Los datos se analizaron con modelos de efectos fijos usando el software estadístico R (paquetes *lme4* y *nlme*, Pinheiro y Bates 2000). El número de nódulos por planta presentó distribución *poisson* y se analizó utilizando modelos *lmer* aplicando la Prueba de Relación de Verosimilitud (LRT, por sus siglas en inglés; paquete *lme4*). Todas las otras variables presentaron distribución *Normal* y se analizaron con los modelos de mínimos cuadrados generalizados (gls, paquete *nlme*).

4.3 –Resultados

Establecimiento y funcionamiento de la simbiosis leguminosa-rizobio

La inoculación con rizobios duplicó tanto el número de nódulos (LRT, R: $\chi^2_1 = 11.19$, $P < 0.001$) como la cantidad de N fijado por planta de *T. repens* (R: $F_{1,20} = 11.79$, $P = 0.002$, Fig. 4.1). El nivel de asociación con endófitos en las plantas del vecindario también afectó el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio: los vecindarios E+ generaron una reducción del 33% y del 50% en el número de nódulos en plantas R- y R+ respectivamente, en comparación con las plantas crecidas en vecindarios E- (LRT, E: $\chi^2_1 = 4.58$, $P = 0.03$, R x E: $\chi^2_1 = 0.68$, $P = 0.40$; Fig. 4.1a). A pesar de ello, la cantidad de N fijado en *T. repens* no difirió según el tipo de vecindario (E: $F_{1,20} = 0.22$, $P = 0.64$, E x R: $F_{1,20} = 0.42$, $P = 0.52$, Fig. 4.1b).

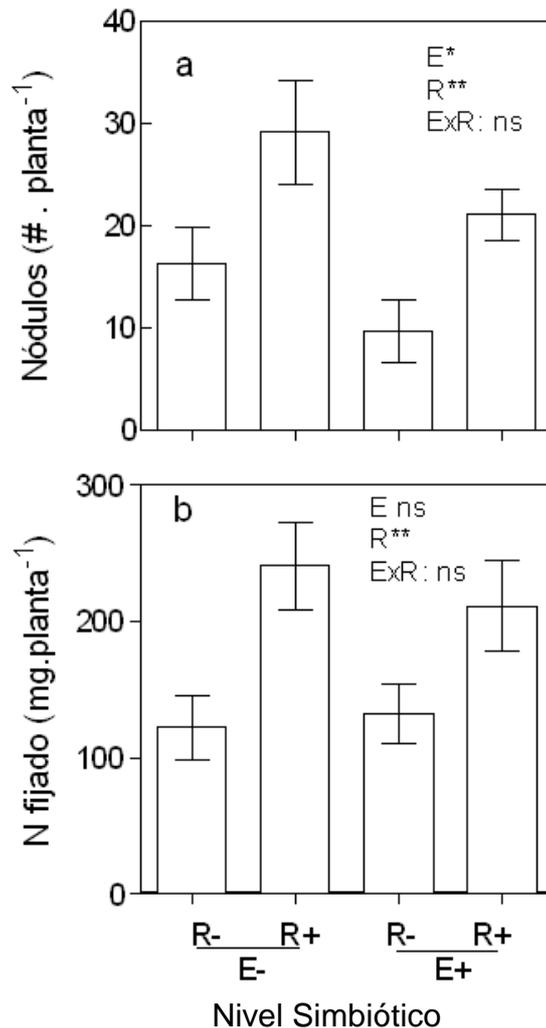


Figura 4.1: (a) Nódulos (número por planta, media \pm EE) y (b) nitrógeno fijado (N fijado; mg por planta de *T. repens*, media \pm EE) en plantas de *T. repens* con bajo (R-) o alto (R+) nivel simbiótico de rizobios, rodeadas por plantas de *L. multiflorum* con bajo (E-) o alto (E+) nivel endofítico. * y ** representan la significancia ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectivamente) de los factores endofito (E), rizobios (R) y la interacción E x R

Dinámica del N

Los tratamientos no modificaron la fuente principal de N de cada planta (Fig. 4.2). La mayoría del N contenido en los tejidos aéreos de *T. repens* fue obtenido a través de fijación (Cuadro 4.1). Todo el N fijado (N_{fij}) se encontró en los tejidos de *T. repens* dado que no se detectó transferencia de N_{fij} hacia plantas de *L. multiflorum* (i.e. no hubo diferencias en la $\delta^{15}N$ entre muestras de *L. multiflorum* obtenidos en los mesocosmos o en los monocultivos, Fig. 4.2). En cambio, el N absorbido del suelo (N_{abs}) se repartió entre ambas especies de plantas pero la gran mayoría (entre el 93 y el 98%) se encontró en las plantas de *L. multiflorum* en todos los tratamientos (Fig. 4.2).

En ausencia de ambos simbioses, la adquisición de N fue similar entre ambas

especies de plantas, indicando que la cantidad de N_{fij} fue similar a la cantidad de N_{abs} (≈ 0.5 g.mesocosmos⁻¹, Fig. 4.2). En los tratamientos con alto nivel de asociación con rizobios se duplicó la cantidad de N obtenida tanto por fijación (ver arriba) atmosférica como por absorción del suelo (N_{abs}) en *T. repens* (R: $F_{1,20} = 19.79$, $P < 0.001$, E: $F_{1,20} = 0.01$, $P = 0.92$, R x E: $F_{1,20} = 0.01$, $P = 0.92$) sin afectar la cantidad de N_{abs} en *L. multiflorum*. El nivel endofítico del vecindario incrementó en aproximadamente 15% la cantidad de N_{abs} por *L. multiflorum* (R: $F_{1,18} = 0.07$, $P = 0.79$, E: $F_{1,18} = 6.01$, $P = 0.02$; R x E: $F_{1,18} = 3.16$, $P = 0.1$) sin afectar la N_{fij} o la N_{abs} en *T. repens*. Considerando el sistema en su conjunto solo el nivel endofítico afectó significativamente la cantidad de N_{abs} (R: $F_{1,18} = 1.56$, $P = 0.26$, E: $F_{1,18} = 6.32$, $P = 0.02$; R x E: $F_{1,18} = 0.35$, $P = 0.79$) mientras que solo el nivel de rizobios determinó la cantidad de N total en la biomasa (R: $F_{1,20} = 11.36$, $P = 0.003$, E: $F_{1,20} = 0.01$, $P = 0.90$, R x E: $F_{1,20} = 1.92$, $P = 0.18$).

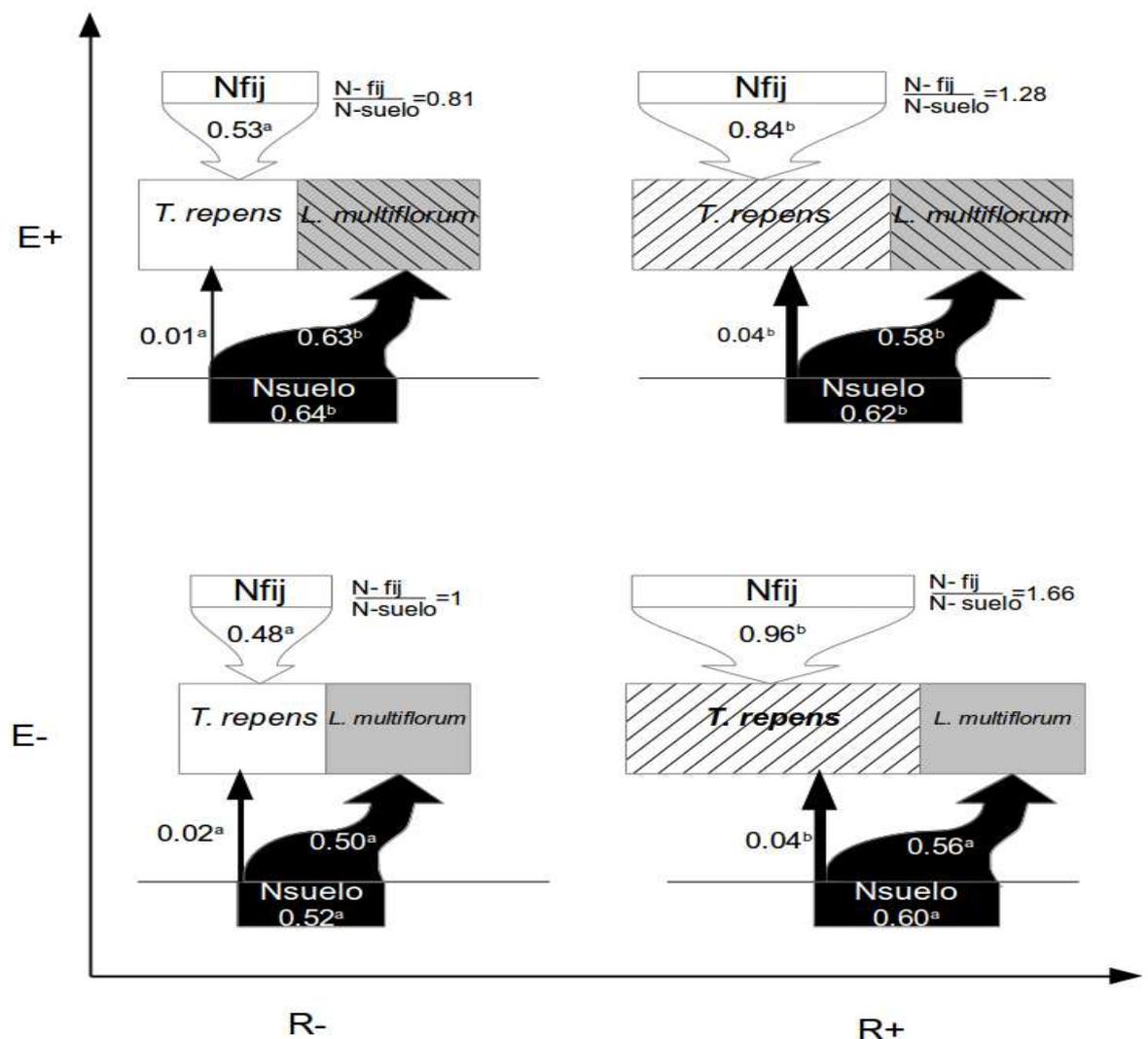


Figura 4.2: Nitrógeno absorbido del suelo (N_{abs} , flechas negras) o fijado de la atmósfera (N_{fij} , flechas blancas), dividido entre plantas de *T. repens* (cajas blancas) con bajo a alto nivel de rizobios (R- o R+: cajas lisas o rayadas, respectivamente) y plantas de *L. multiflorum* (cajas grises) con bajo o alto nivel endofítico (E- o E+: cajas lisas o rayadas, respectivamente). El número adentro de la caja o la flecha representa la cantidad (g.mesocosmos⁻¹) de N en la biomasa aérea. El ancho de la caja y la flecha son equivalentes a los valores absolutos. Letras diferentes junto a los valores indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos.

Producción de Biomasa por especie y productividad por mesocosmos.

El impacto que cada simbiote ejerció en la biomasa de su hospedante determinó efectos aditivos en la productividad del mesocosmos. Los tratamientos con alto nivel de rizobios (R+) duplicaron la producción de biomasa de las plantas de *T. repens* (R: $F_{1,20} = 16.66$, $P < 0.001$; E: $F_{1,20} = 0.11$, $P = 0.73$, R x E: $F_{1,20} = 0.17$, $P = 0.67$, Fig. 4.3, columnas blancas) mientras que los tratamientos de alto nivel de endófitos

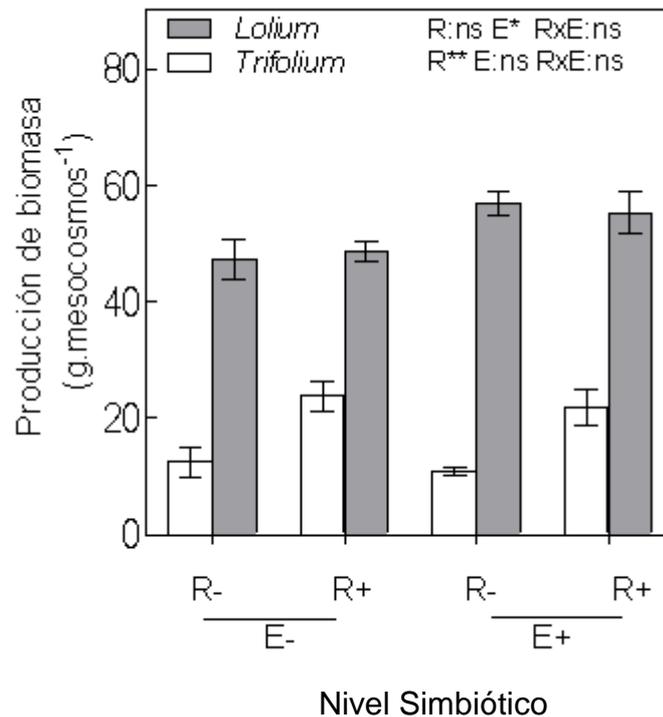


Figura 4.3: Producción de biomasa (g.mesocosmos⁻¹, media \pm EE) de *T. repens* (*Trifolium*, columnas blancas) y *L. multiflorum* (*Lolium*, columnas grises) cuando las plantas de *Trifolium* con bajo (R-) o alto (R+) nivel simbiótico de rizobios, crecieron rodeadas por plantas de *Lolium* con bajo (E-) o alto (E+) nivel endófitico. * y ** representan la significancia ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente) de los factores endófito (E), rizobios (R) y la interacción E x R.

incrementaron la producción de biomasa de las plantas de *L. multiflorum* alrededor de un 16% (R: $F_{1,19} = 0.39$, $P = 0.54$, E: $F_{1,19} = 15.32$, $P < 0.001$, R x E: $F_{1,19} = 0.01$, $P = 0.98$; Fig. 4.3, columnas grises). Ni el nivel de rizobios en *T. repens* afectó la producción de biomasa en *L. multiflorum*, (R: $F_{1,19} = 0.39$, $P = 0.54$, E: $F_{1,19} = 15.32$, $P < 0.001$, R x E: $F_{1,19} = 0.01$, $P = 0.98$), ni el nivel de asociación con endófitos en *L. multiflorum* afectó la producción de biomasa de *T. repens* (R: $F_{1,20} = 16.66$, $P < 0.001$; E: $F_{1,20} = 0.11$, $P = 0.73$, R x E: $F_{1,20} = 0.17$, $P = 0.67$). Por lo tanto, la productividad primaria resultó mayor cuando ambos simbiotes se encontraban en abundancia en el mesocosmos (R: $F_{1,19} = 10.76$, $P = 0.003$, E: $F_{1,19} = 5.54$, $P = 0.02$, R x E: $F_{1,19} = 0.01$, $P = 0.91$), aumentándola en aproximadamente un tercio, de 60 ± 5 a 81 ± 4 g.mesocosmos⁻¹ (media \pm error estándar).

4.4 –Discusión

Este es el primer estudio experimental que vincula la productividad primaria aérea y la dinámica del N con los efectos interactivos de dos tipos diferentes de simbiontes microbianos que habitan los tejidos aéreos y subterráneos de plantas de coocurrentes. Los resultados demuestran que los endófitos de tejidos aéreos de un pasto (*L. multiflorum*) puede afectar el establecimiento de la simbiosis de una leguminosa vecina (*T. repens*) con bacterias fijadoras de nitrógeno, ya que disminuyó el número de nódulos en sus raíces. Curiosamente, este efecto del endófito no redujo los beneficios provistos por los rizobios, al menos en términos de producción de biomasa y fijación de N. Del mismo modo, dado que la simbiosis leguminosa-rizobio no modificó el efecto positivo del endófito en la producción de biomasa y adquisición de N del pasto, la coexistencia de ambas interacciones simbióticas indujo complementariedad entre las especies de plantas, sin efectos antagónicos detectables sobre el funcionamiento de este sistema.

La presencia del endófito redujo el establecimiento de la simbiosis entre rizobios y *T. repens*. Los mecanismos detrás de este cambio en la nodulación pueden estar vinculados a la exudación de sustancias alelopáticas por parte del pasto hospedante que podría afectar la reacciones de reconocimiento entre las raíces de *T. repens* y los rizobios. El incremento observado en la cantidad de exudados producidos por el pasto hospedante y sus consecuencias sobre las propiedades químicas y biológicas del suelo (Malinowski *et al.* 1998, Steinkellner *et al.* 2007, Omacini *et al.* 2012) son consistentes con esta hipótesis. Hipótesis relativas a los aleloquímicos han sido también sugeridas para explicar el efecto de las plantas endofíticas en la interacción entre hongos micorrízicos y plantas no endofíticas (Omacini *et al.* 2006, Antunes *et al.* 2008). De hecho, hasta el momento, sólo Novas y colaboradores (2011) evaluaron el efecto de los exudados en el crecimiento de las hifas de hongos micorrízicos. Sin embargo, otras hipótesis no pueden ser descartadas. Por ejemplo, aunque el incremento en el crecimiento en las plantas endofíticas no redujo la producción de biomasa aérea de la leguminosa puede haber afectado su habilidad de formar nódulos al reducir la partición de C hacia las raíces (Mortier *et al.* 2012, Poorter *et al.* 2012). En el futuro, sería crucial determinar si esta disminución en el número de nódulos podría ocasionar una disminución en la disponibilidad de propágulos de rizobio para la siguiente generación de plantas (Denison 2000, Simms y Taylor 2002), lo que podría incluso afectar la capacidad del pasto de obtener provechos de los vecinos (p.ej. a través de transferencia de N fijado).

Con respecto a la hipótesis, el ensayo no fue capaz de detectar un efecto estadísticamente significativo ni en el funcionamiento de la simbiosis leguminosa-rizobio, ni en la fijación de N atmosférico ni en la productividad de *T. repens*. Entonces, se rechaza la hipótesis de que el endófito puede afectar la capacidad de rizobios de inducir complementariedad entre las dos especies. Como consecuencia, la coexistencia de ambas simbiosis resultó en efectos aditivos en la captura total de N y en la productividad primaria de este sistema limitado en N. Cada par hospedante-simbionte funcionó como entidades independientes. Esto se dio principalmente debido a que las plantas adquirieron su N de fuentes distintas: mientras que el pasto obtuvo todo su N del suelo, la leguminosa obtuvo todo su N de la fijación atmosférica. Este uso diferencial de los recursos entre pastos y leguminosas asociadas a rizobios está considerado (Høgh-Jensen y Schjoerring 1997, Karpenstein-Machan y Stuelpnagen 2000, Hodge y Fitter 2013). Aquí se demuestra que, aunque el endófito afecta la nodulación, este efecto no

modifica la complementariedad en el uso del N que naturalmente ocurre entre gramíneas y leguminosas cuando las últimas están asociadas a rizobios. Al igual que a nivel de individuo (Larimer *et al.* 2010, 2012) el resultado de la interacción entre varios simbiontes puede ser modificado por el contexto ambiental. Para capturar la complejidad y la dependencia de escala de estas interacciones entre componentes aéreos y subterráneos (van der Putten *et al.* 2009) son necesarios más estudios para evaluar a mayores escalas y frente a contextos ambientales alternativos los efectos de complementariedad observados en este capítulo.

En conclusión, los resultados de este capítulo contribuyen al conocimiento de los potenciales factores determinantes de la relación positiva entre biodiversidad y funcionamiento del ecosistema, teniendo en cuenta que los mecanismos asociados con la dinámica del N son fundamentales en definir la productividad vegetal en pastizales limitados por N (Tilman *et al.* 1997, Loreau y Hector 2001, Fornara y Tilman 2009, Eisenhauer *et al.* 2012). Diversos estudios han unido la presencia de microorganismos simbiontes con procesos del ecosistema (van der Heijden *et al.* 1998, Rudgers *et al.* 2004, Wagg *et al.* 2011). Este estudio, además de incluir la complejidad que involucra sistemas multisimbióticos con simbiontes aéreos y subterráneos hospedados por diferentes plantas coexistiendo, demostró que la interacción entre dos simbiontes de plantas, los endófitos y las bacterias fijadoras de N, tienen efectos aditivos en la captura de N y en la productividad primaria, dos procesos importantes del funcionamiento del ecosistema.

DISCUSIÓN GENERAL

5.1 - Introducción

La competencia es considerada como la principal fuerza estructuradora de las comunidades vegetales (Grace y Tilman 1990, Agrawal *et al.* 2007) por ello, los mecanismos que relajan la competencia entre plantas y permiten su existencia han despertado gran interés en las últimas décadas (Hector *et al.* 1999, Loreau y Hector 2001, Loreau *et al.* 2001, Silvertown 2004, Agrawal *et al.* 2007). Por ejemplo, algunas características de las plantas permiten que un mismo recurso limitante pueda ser obtenido de fuentes espacialmente o temporalmente distintas o proceder de distintos tipos de reservorios. Este uso complementario de los recursos reduce la competencia por explotación permitiendo una mayor adquisición de los mismos (Tilman *et al.* 2001). Además, se ha observado que la presencia de una planta puede incrementar la disponibilidad de nutrientes para otra (p.ej. Ayres *et al.* 2007, Li *et al.* 2014a) lo que constituye un mecanismo de facilitación directa mediado por un intermediario abiótico. Con respecto a los intermediarios bióticos, una planta puede modificar a una población de organismos antagónicos o benéficos que a su vez repercuten en la otra planta (Fig. 1.1, Wootton 1994, Callaway 1995). El resultado neto de estos cambios en los distintos intermediarios es variable de modo que la complejidad en la que están inmersas las plantas condiciona el signo y la forma de interacción.

Los microorganismos simbioses modulan la forma en que sus hospedantes se relacionan con otras plantas dado que tienen múltiples efectos en ellos que repercuten en la comunidad y en el funcionamiento del ecosistema. La presencia de simbioses puede afectar a la interacción planta-planta a través de los distintos intermediarios por los que se relacionan. Hasta hace muy poco se ignoraba que un endosimbionte protector podía modificar las relaciones entre plantas a través de su efecto sobre los herbívoros del hospedante o de las plantas vecinas no hospedantes (Clay *et al.* 2005, White y Torres 2010, Capítulo 2). En particular, no se conocían estudios en los que se evaluara si los efectos sobre las vecinas pueden resultar positivos si la protección es compartida o extendida, o negativo, si la protección generada sobre el hospedante no se transfiere sino que incrementa la presión de herbívoros sobre las plantas no protegidas. A su vez, un microorganismo proveedor accede a un reservorio especial de nutrientes al que otras plantas no acceden y entonces la competencia por esos nutrientes se disminuye (Douglas 2010). Una planta vecina se vería perjudicada si el acceso al reservorio especial potencia la posibilidad de las plantas simbióticas de hacerse con los otros recursos por los que compiten (Haynes 1980). Sin embargo, la planta que no está en simbiosis con el proveedor también se vería beneficiada al disponer de mayor disponibilidad relativa del recurso en cuestión (que la planta simbiótica libera al usar un reservorio especial) o si el microorganismo también la provee a través de transferencia de nutrientes (Ayres *et al.* 2007).

La aproximación experimental y el sistema de estudio de esta tesis permitieron poner a prueba la hipótesis de que la presencia simultánea de un simbiote proveedor y un protector genera propiedades emergentes que benefician tanto a las plantas hospedantes como a plantas vecinas no-hospedantes y favorecen su coexistencia. Cumpliendo con el objetivo de esta tesis, se detectaron diferentes vías a través de las cuales la interacción entre múltiples simbiosis podría modular la relación entre plantas. Tanto simbioses

protectores y proveedores interactuaron afectando la relación de las plantas hospedantes y no hospedantes con los herbívoros y su captación de nutrientes (Fig. 5.1). Dado que los herbívoros y los nutrientes son los principales intermediarios en la relación entre plantas, la interacción de los simbiosntes sobre éstos afectan los mecanismos de coexistencia entre plantas. Por ello, el impacto de cada simbiote involucra el cambio en la habilidad competitiva de su hospedante, de la vecina y que además puede depender de la disponibilidad del otro simbiote. Finalmente, los efectos emergentes de la presencia simultánea de simbiosntes y hospedantes contribuyeron a la complementariedad y a la facilitación, mecanismos que favorecen la coexistencia de estas plantas en una comunidad, lo que permite aceptar la hipótesis general. Esta tesis es probablemente uno de los primeros casos en los que se evalúa los mecanismos de interacción por los cuales la presencia de varios simbiosntes en distintos hospedantes pueden favorecer su coexistencia.

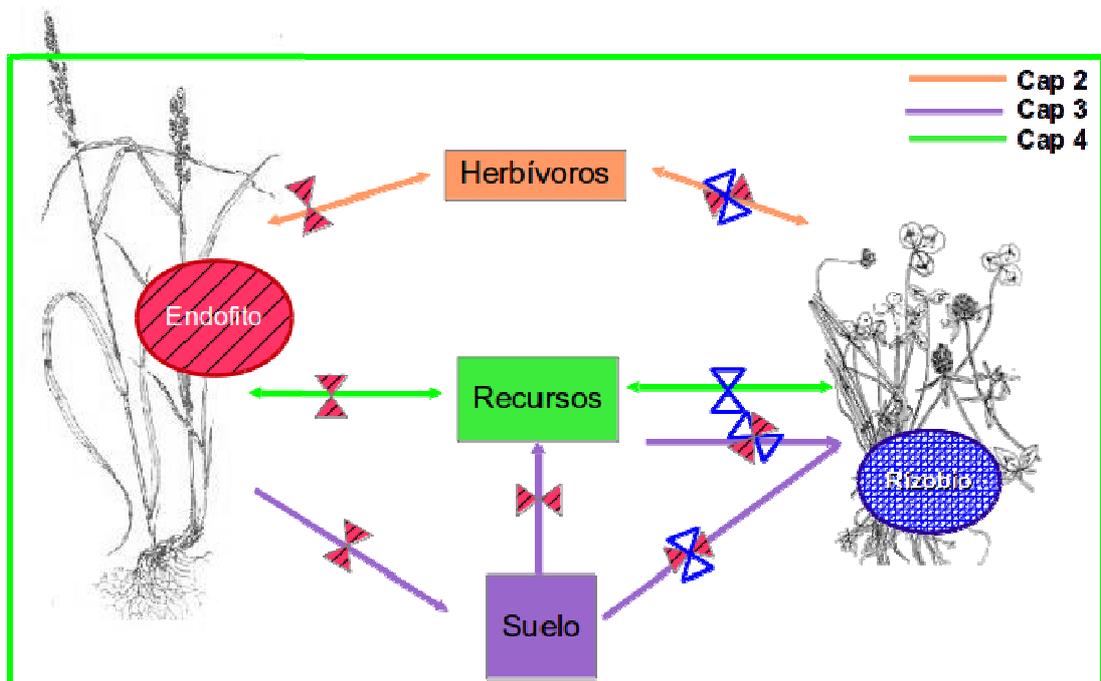


Figura 5.1: Vías por las que los simbiosntes de pastos y leguminosas afectaron la interacción entre sus hospedantes estudiadas en los distintos capítulos. Las llaves indican los flujos que fueron afectados por cada simbiote (rojo y rayado: endófito, azul y vacío: rizobio), y las llaves azules y rojas cruzadas indican efectos interactivos de los simbiosntes en ese flujo.

A continuación se integran los principales resultados que surgen de esta tesis en el contexto del objetivo general, es decir se discuten las vías por las cuales los simbiosntes pueden afectar las relaciones entre plantas y el funcionamiento del ecosistema. Posteriormente se discuten cuales son los aportes de esta tesis para el conocimiento. Finalmente, se mencionan el posible impacto de la tesis sobre nuevas hipótesis a ser probadas en futuras investigaciones.

5.2 –Vías por las que los simbioses modifican la interacción entre plantas

5.2 a- Protección contra antagonistas

Uno de los intermediarios bióticos más importantes que intervienen en la relación entre plantas son los organismos antagonistas, y entre estos, los herbívoros revisten de gran importancia dado que pueden determinar coexistencia o exclusión de las especies (Chesson 2000). En el capítulo 2 se evaluó cómo la presencia de un endófito en un pasto y rizobios en la leguminosa puede modificar la relación de las plantas con insectos herbívoros (García Parisi *et al.* 2014). Como era de esperarse, la presencia del endófito protegió a la propia planta del ataque de insectos. Además esta protección se extendió a la leguminosa vecina cuando esta era atractiva para los insectos. Aunque el impacto negativo del endófito sobre los herbívoros es ampliamente conocido, su efecto sobre la herbivoría de plantas no- hospedantes no había sido prácticamente estudiado (Lehtonen *et al.* 2005, Omacini *et al.* 2009, Capítulo 2).

El simbiote proveedor de la leguminosa también afectó la respuesta de su hospedante a la herbivoría. De hecho, la protección del endófito sobre la leguminosa solo se observó en situaciones con alta disponibilidad de rizobios. Como el nitrógeno es fundamental para los insectos, la presencia de rizobios condiciona la necesidad de protección de las leguminosas al ser más preferidas por herbívoros (Kempel *et al.* 2009, Dean *et al.* 2009). La protección conferida por el endófito a plantas vecinas en simbiosis con rizobios constituye un mecanismo de facilitación por el cual se podría incrementar el éxito de la leguminosa y promover la coexistencia de ambas especies en presencia de herbívoros.

La protección frente a otros antagonistas, que también es considerada un mecanismo de facilitación (Callaway 1995), podría explicar algunos efectos observados. Los efectos positivos sobre el crecimiento de la leguminosa observados en el capítulo 3 podrían estar mediados en cambios sobre otros organismos. Por ejemplo, un efecto represor del endófito en la carga o actividad de los patógenos o la promoción de organismos benéficos también podría incrementar el crecimiento de la leguminosa. En este sentido, la presencia del endófito en la comunidad afecta a los patógenos (Pérez 2014), y puede determinar cambios en la composición de la comunidad vegetal (Rudgers y Orr 2009). Por otro lado, aumentos en la actividad o abundancia de organismos que determinan la disponibilidad de nutrientes (ver 5.2b), o de otros mutualistas (por ejemplo otras bacterias promotoras de crecimiento) podrían mediar la relación entre las plantas.

5.2-b Provisión de nutrientes

Los simbioses proveedores permiten el acceso a nutrientes escasos o inaccesibles (Douglas 2010). En los capítulos 3 y 4, el simbiote proveedor tuvo un efecto positivo muy importante en términos de fijación de N, dado que la alta disponibilidad de rizobios incrementó la provisión de N para las plantas hospedantes. La separación de fuentes de las cuales se obtiene el N relaja la competencia ínter-específica y puede favorecer la coexistencia entre plantas (Haynes 1980, Høgh-Jensen y Schjoerring 1997, Silvertown 2004, Fornara y Tilman 2009, Hodge y Fitter 2013).

Los simbioses considerados protectores también pueden condicionar la adquisición de nutrientes de sus hospedantes (Malinowski y Belesky 2000). En este caso, los pastos

asociados a endófitos absorbieron más N del suelo (Fig. 4.2). Además, el endófito tuvo efectos sobre la simbiosis entre leguminosas y rizobios aun cuando los hospedantes no crecieron juntos. Las señales dejadas por el endófito en el suelo incrementaron la efectividad de los nódulos (Fig. 3.3), aumentando la fijación cuando las plantas tenían poca disponibilidad de rizobios (Fig. 3.2). Por otro lado, cuando crecían juntas, la presencia de endófitos en el pasto no afectó la cantidad de N fijado aunque disminuyó la nodulación (Fig. 4.1 y 4.2). Nuevamente, un efecto distinto a la función principal del simbionte puede inducir cambios en las relaciones entre plantas, en este caso, a través de la adquisición de nutrientes.

Los cambios que el endófito induce en las comunidades microbianas del suelo pueden condicionar la disponibilidad de nutrientes (Omacini *et al.* 2012). En el capítulo 3 se observó que el endófito incrementa la mineralización potencial de N (Cuadro 3.1). Anteriormente se habían observado cambios en los distintos reservorios de nutrientes (Franzluebbbers *et al.* 1999, Franzluebbbers 2006), en las comunidades que participan en la descomposición y mineralización de nutrientes (Casas *et al.* 2011, Bowatte *et al.* 2011, Iqbal *et al.* 2013) y en dichos procesos (Franzluebbbers *et al.* 1999, Omacini *et al.* 2004, Franzluebbbers 2006, Omacini *et al.* 2012). Estos cambios en la disponibilidad y accesibilidad de los recursos constituyen otro mecanismo por el cual la presencia de este simbionte puede permitir la coexistencia de sus hospedantes al inducir facilitación y complementariedad en el uso de los recursos.

5.3 Contribuciones al estado del conocimiento

Los resultados de esta tesis contribuyen a la ecología de las simbiosis, con implicancias para la ecología de comunidades en general. A continuación se describe cómo el estudio de la coexistencia de dos simbiontes con funciones principales distintas en interacción con sus dos hospedantes y varios actores determinó el surgimiento de efectos emergentes de su presencia simultánea y permitió detectar mecanismos que determinan la coexistencia de distintas especies de plantas en una comunidad.

5.3a– Efectos interactivos entre simbiosis

El avance de esta tesis para el conocimiento de las simbiosis entre plantas y microorganismos fue la detección de múltiples efectos resultantes de la interacción entre simbiontes en distintos hospedantes. Las simbiosis entre plantas y microorganismos se encuentran ampliamente distribuidas en los ecosistemas terrestres (Roberts 2005, Douglas 2010) y han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista del par hospedante-simbionte. En las últimas décadas se ha avanzado en entender que los simbiontes tienen no solo una función principal sino múltiples efectos en sus hospedantes (Newsham *et al.* 1995, Thrall *et al.* 2007, Douglas 2010), y que pueden propagarse a niveles jerárquicos superiores (Omacini *et al.* 2005, 2013, Hartley y Gange 2009, Kothamasi *et al.* 2010). Además, recientemente se ha comenzado a estudiar el papel interactivo de dos simbiontes cuando coexisten en un mismo hospedante, cuyo efecto puede resultar aditivo, sinérgico o antagónico con magnitudes variables dependiendo del contexto (Larimer *et al.* 2010, 2012, 2014). En esta tesis se corroboraron los efectos que los simbiontes tienen sobre sus hospedantes, sobre otros componentes del sistema, incluyendo otros simbiontes, y el resultado de la interacción

entre ellos sobre la herbivoría, la adquisición de N y el crecimiento de las plantas.

Cuadro 5.1: Efectos independientes y dependientes de los simbioses (en ausencia o presencia del otro, respectivamente) sobre las distintas variables medidas en sus hospedantes (fondo amarillo) o en las plantas no-hospedante (fondo celeste) de los distintos capítulos de esta tesis. En las variables en las que la interacción resultó estadísticamente significativa (en **negrita**) los efectos independientes fueron diferentes a los dependientes de los simbioses.

			Efectos significativos	Efecto Endofito		Efecto Rizobio		
				Indpte (en R-)	Dpte (en R+)	Indpte (en E-)	Dpte (en E+)	
Retroalimentación	Biomasa de Tr	Aérea	ExR	+	0	+	0	
	Nitrógeno	Fijado	ExR	+	0	+	+	
		del suelo	ExR	0	0	0	-	
Protección contra Herbivoros	en Tr		ExR	0	+	-	0	
	en Lm		E	+	+	0	0	
Coexistencia	Biomasa	Tr	R	0	0	+	+	
		Lm	E	+	+	0	0	
	Nitrogeno	Tr	fijado	R	0	0	+	+
			del suelo	R	0	0	+	+
		Lm	Total	E	+	+	0	0

Lm: el pasto *L. multiflorum*, Tr: la leguminosa *T. repens*. E: endófito, R. Rizobios. + alto nivel del simbionte, - bajo nivel del simbionte

La coexistencia de las simbiosis en una comunidad generó efectos interactivos y aditivos sobre la protección contra herbívoros, el crecimiento de las especies, y su adquisición de N (Cuadro 5.1). El efecto conjunto de la coexistencia de dos simbioses puede resultar aditivo, cuando el mismo resulta similar a la suma de los efectos independientes de cada simbionte, o interactivos cuando es distinto (Morris *et al.* 2007). La distribución de los signos (+, 0 ó -, Cuadro 5.1) permite observar el patrón de sentidos de los efectos independientes (i.e. efecto de un simbionte en ausencia del otro) y dependientes (i.e. efecto de un simbionte en presencia del otro) significativos de cada simbionte para los principales parámetros evaluados en esta tesis (Cuadro 5.1).

Los efectos interactivos observados resultaron sinérgicos en la protección contra la herbivoría en la leguminosa, y redundantes en la producción de biomasa aérea y adquisición de nitrógeno en plantas de *T. repens* creciendo en suelos acondicionados. En primer lugar, existió un efecto interactivo sinérgico en la protección contra los áfidos en *T. repens* dado que los efectos dependientes son mayores que los independientes (Cuadro 5.1, Fig. 2.1), es decir la protección emerge cuando están los dos simbioses presentes (Fig. 5.1). En segundo lugar, en cambio, la interacción en los efectos resultantes de la retroalimentación está dada por la falta de efectos aditivos (efectos dependientes menores a los independientes, Cuadro 5.1). Esto indica que podría existir una superposición o solapamiento en las funciones de los dos simbioses: las señales dejadas por el endófito en el suelo inducen crecimiento y fijación de N en plantas de *T. repens* en condiciones de baja disponibilidad de rizobios, permitiendo que se alcance un crecimiento similar al obtenido en situaciones de alta disponibilidad de rizobios.

Notablemente, cuando las plantas crecían juntas, ni la producción de biomasa de las especies, ni los flujos de N fueron afectados interactivamente por lo que el efecto conjunto de los simbioses fue aditivo. En este caso, los efectos independientes de cada

simbionte son iguales a los dependientes (Cuadro 5.1). De hecho, los simbiontes no tuvieron efectos sobre las variables medidas sobre el otro hospedante. En consecuencia se observó un efecto aditivo de la presencia simultánea de ambos simbiontes a nivel de parche en la producción de biomasa y en la captura de N (Fig. 4.3).

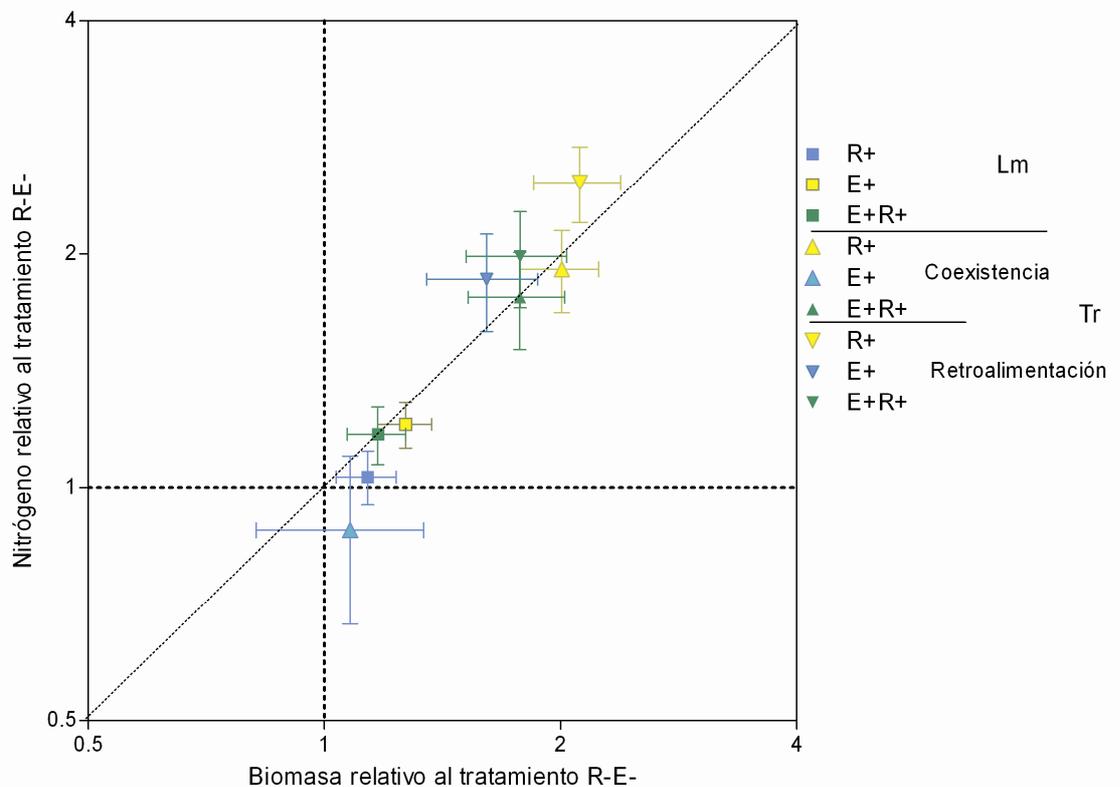


Figura 5.2: Relación entre la producción de biomasa aérea y la captura de N para las plantas de *L. multiflorum* (■, Lm) y *T. repens* (Tr) creciendo en coexistencia (▲) o en retroalimentación luego del pasto (▼). La relación entre las variables se muestran para los efectos independientes de cada simbionte (es decir relativo al control sin simbionte) sobre su hospedantes (amarillo lleno, R+ sobre *T. repens*, E+ sobre *L. multiflorum*) o sobre la planta no-hospedante (celeste, vacío, R+ sobre *L. multiflorum*, E+ sobre *T. repens*) y para el efecto conjunto de ambos (verde grande, E+R+ sobre ambas especies). Para comparar entre experimentos, los valores expresados (media \pm DE) son relativos al control sin simbiontes por lo que los efectos son significativos cuando son distintos de 1:1.

La producción de biomasa de las especies estuvo muy relacionada a su captura de N, tanto cuando la leguminosa creció luego del pasto, como cuando crecieron juntas (Fig. 5.2). En ambos casos, los efectos aditivos o interactivos observados en una variable también se observan en la otra (Cuadro 5.1). Cuando crecieron juntas, cada simbionte afectó el crecimiento y adquisición de N de su hospedante: el pasto solo fue afectado significativamente por el endófito, mientras que la leguminosa solo por rizobios (Fig. 4.3). Dado que cuando ambas plantas crecían en coexistencia solo se detectó efecto significativo de su propio simbiontes, el efecto conjunto se encuentra muy cercano al efecto independiente del simbionte “significativo”. En cambio, para la leguminosa creciendo en retroalimentación, tanto los endófitos como los rizobios tuvieron efectos

significativos, por lo que el efecto conjunto en ambas variables se ubicó en una posición intermedia entre los efectos de cada simbiote. Esto indica que el resultado de la presencia simultánea de ambos simbioses es similar a sus efectos independientes (no a su suma) lo que apoya la idea de la redundancia de funciones de los simbioses al definir la producción o la captura de N.

El logro de esta tesis fue incorporar esta complejidad que involucra la presencia de múltiples simbioses en la interacción entre dos especies de plantas. Como resultado, se observaron entonces efectos emergentes interactivos y que los efectos positivos de cada simbiote sobre su hospedante no se verían afectados. La ausencia de perjuicios, o la aparición de distintos beneficios demuestra que los efectos no son sólo sobre el hospedante y su habilidad competitiva, sino que los impactos a escala de parche sobre otras especies deben ser considerados para poder entender el verdadero significado de la presencia de uno o varios simbioses en las comunidades (Douglas 2010, Hodge y Fitter 2013).

5.3 b Mecanismos de coexistencia entre plantas

Con respecto a la teoría ecológica general, los conceptos relacionados con el entendimiento de los mecanismos que permiten la coexistencia de especies similares yacen en el seno de la ecología de comunidades (Agrawal *et al.* 2007). El desafío consiste en entender que es lo que previene la exclusión competitiva y permite la coexistencia de plantas. En esta tesis, en particular, se involucró a los microorganismos simbioses aéreos y subterráneos como moduladores de estos mecanismos, y se comprobó que ellos inducen principalmente efectos de facilitación y de complementariedad en el uso de los recursos (Loreau y Hector 2001).

En esta tesis se estudió cómo la **facilitación** entre plantas puede ser modulada por los microorganismos simbioses. La facilitación es un proceso por el cual el crecimiento de una planta “beneficiada” se ve favorecido por cambios inducidos por la presencia de otra planta “benefactora” (Callaway 1995). En particular, se evaluó el efecto modulador del endófito en el beneficio que su hospedante le puede proveer a la leguminosa. Además, se evaluó el papel de la disponibilidad de rizobios como modulador de la posibilidad de recibir estos efectos benéficos. Esto se debió principalmente a que: (1) el impacto de los rizobios modulando los efectos de una leguminosa “benefactora” ha sido ampliamente estudiado, y (2) los efectos positivos del endófito hacia plantas vecinas no endofíticas han sido poco considerados (Omacini *et al.* 2005, 2006, 2013, Cheplick y Faeth 2009).

El endófito puede inducir mecanismos de facilitación desde el pasto hacia la leguminosa a través de distintos mecanismos que involucran diferentes intermediarios. Los mecanismos de facilitación “directos” se dan a través de cambios en el ambiente abiótico (incrementando la disponibilidad de un recurso) mientras que los “indirectos”, a través de cambios en el ambiente biótico (eliminando competidores potenciales, proveyendo protección contra herbívoros, promoviendo organismos benéficos como microorganismos del suelo u hongos micorrícicos; Callaway 1995). En primer lugar, en el capítulo 2 vimos como la presencia de endófitos y rizobios interactúan protegiendo a las plantas de trébol del ataque de áfidos. La protección contra herbívoros es uno de los mecanismos de facilitación más documentados en muchas especies. Sin embargo, aunque también había sido detectada de pastos a leguminosas (Harris y Brock 1972)

nunca se había evaluado el papel de los endófitos en esta protección. En segundo lugar, en el capítulo 3, se detectó que cambios inducidos por el endófito sobre componentes del suelo pueden afectar el crecimiento de la leguminosa. Aunque los hongos micorrícicos no mediaron el efecto del endófito, otros microorganismos del suelo podrían hacerlo. El endófito presenta numerosos cambios en el ambiente subterráneo (Omacini *et al.* 2012) que podrían explicar este y otros efectos observados sobre las leguminosas (Cripps *et al.* 2013). En resumen, en esta tesis detectamos facilitación desde el pasto hacia la leguminosa modulado por la presencia de endófitos y rizobios a través de intermediarios aéreos y subterráneos.

El nitrógeno (N) es uno de los elementos más limitantes en los ecosistemas terrestres (LeBauer y Treseder 2008). La posibilidad de diferentes especies de plantas de acceder a distintos reservorios de N es un claro ejemplo de **complementariedad** en el uso de los recursos y podría explicar su coexistencia y productividad (Loreau y Hector 2001, Fornara y Tilman 2009, Eisenhauer 2012). En este sentido, las leguminosas y su asociación con rizobios juegan un papel crucial para la coexistencia de plantas y la productividad primaria (Hooper y Dukes 2004). En una comunidad mixta las leguminosas obtienen el N de la atmósfera mientras que plantas no-fijadoras lo obtienen del suelo (Karpenstein-Machan y Stuelpnagel 2000). En el capítulo 4 se demuestra que las plantas con rizobios dependen de sus simbioses cuando crecen en competencia interespecífica con el pasto. Los resultados indican que las plantas de *T. repens* obtienen más del 90% de su N de fijación simbiótica cuando crecen con el pasto, incluso en los tratamientos de baja disponibilidad de rizobios (García Parisi *et al.* en prensa).

El papel de los simbioses proveedores, en este caso, de rizobios, en la relación entre plantas puede verse afectado por distintos elementos del sistema. El tipo de suelo, la disponibilidad de otros nutrientes y de otros organismos como los hongos micorrícicos, los patógenos o descomponedores afectan el resultado de la coexistencia de leguminosas y pastos (Wagg *et al.* 2011, Haynes 1980, Eisenhauer 2012, Hodge y Fitter 2013). Sin embargo nunca había sido evaluado el impacto de los simbioses aéreos de plantas vecinas sobre la complementariedad en el uso del N determinada por los rizobios de leguminosas. Los endófitos incrementan el crecimiento de su hospedante, su obtención de nutrientes, inducen cambios en el suelo y hasta puede afectar la nodulación en la leguminosa (Cheplick y Faeth 2009, García Parisi *et al.* en prensa, Capítulo 3). Sin embargo, los resultados indican que la capacidad de los rizobios de inducir complementariedad en la obtención de N no se ve afectada cuando crece junto a pastos asociados a endófitos (Fig. 4.2). Naturalmente, otros contextos, otras especies, otra duración del experimento podría modificar el resultado de la interacción (Chamberlain *et al.* 2014).

Los microorganismos condicionan de diversas maneras las interacciones entre plantas y su productividad (van der Heijden *et al.* 2008, van der Putten *et al.* 2001, Wardle 2000, Wardle *et al.* 2004). La obtención de nutrientes está íntimamente relacionada con los microorganismos del suelo, simbioses y no simbioses; los patógenos afectan negativamente a las plantas y los simbioses protectores evitan efectos negativos de los antagonistas. Además, la existencia de efectos positivos y negativos en las relaciones entre plantas se encuentra muy ligada a sus interacciones con las comunidades microbianas (Hodge y Fitter 2013). Los microorganismos pueden mediar los procesos de facilitación, como se discutió más arriba y en los capítulos

anteriores (Callaway 1995, Rodríguez-Echeverría *et al.* 2013). La complementariedad en el uso de nutrientes también puede en parte depender de los microorganismos (Eisenhauer 2012). Entonces, los efectos que las plantas tienen sobre ellos repercuten sobre la coexistencia y la productividad de las plantas (Bever 1997, Klironomos 2002, van der Putten *et al.* 2013).

En esta tesis estudiamos de que manera dos microorganismos, simbios, uno aéreo y otro subterráneo interactúan para condicionar o no la productividad y las relaciones entre plantas. Esto resulta particularmente novedoso teniendo en cuenta la incorporación del simbionte aéreo, con efectos sobre el subsistema subterráneo y su retroalimentación sobre la productividad aérea de las plantas. El papel de los microorganismos subterráneos ha sido ampliamente considerado en el funcionamiento de los ecosistemas. Por ejemplo, Hodge y Fitter (2013) revisan el papel de los microorganismos como mediadores de la competencia entre plantas y la estructura de las comunidades. Sin embargo, la revisión se centra en los microorganismos del suelo (los hongos micorrízicos, los patógenos del suelo, los fijadores de nitrógeno) y no incluyen los microorganismos aéreos. Del mismo modo, los estudios que relacionan a la diversidad microbiana con la productividad de plantas se refieren en general a los microorganismos del suelo (p.ej. van der Heijden *et al.* 1998, Wagg *et al.* 2011). Por ello, incorporar los endófitos aéreos en estos estudios resulta un avance para entender el verdadero significado de la microbiota en el funcionamiento de los ecosistemas (Clay 1990, Rudgers *et al.* 2004, Omacini *et al.* 2006, Rodríguez *et al.* 2009). Considerar a las interacciones dentro y entre subsistemas aéreos y subterráneos, con las plantas como integradoras de estos efectos permitirá avanzar en el entendimiento de los ecosistemas terrestres complejos (Wardle 2002, Wardle *et al.* 2004).

5.4– Perspectivas

Los resultados de esta tesis abren las puertas a futuras investigaciones. En primer lugar, una gran cantidad de preguntas surgen acerca de los mecanismos que subyacen detrás de los efectos observados en los capítulos. Un segundo aspecto sobre el que es posible conjeturar es acerca de la propagación de los efectos interactivos de los simbios a otros niveles de organización. En tercer lugar es posible preguntarse como varían nuestros resultados en otros contextos bióticos o abióticos y cuál es la magnitud de los mecanismos de facilitación y de complementariedad inducidos por simbios en las comunidades naturales o manejadas. Y un cuarto camino en el que se puede considerar los resultados de esta tesis es en la relación biodiversidad- funcionamiento.

A nivel de los **mecanismos subyacentes** surgen muchos interrogantes que pueden ser probados. La impronta de volátiles de poblaciones con alta incidencia de endófitos fue distinta a la de las plantas con baja incidencia de endófitos, lo que se propone como un mecanismo de protección hacia las plantas vecinas (Capítulo 2). Sin embargo el proceso subyacente por el cual se ejerce la protección no está claro: ¿los volátiles de *L. multiflorum* con endófitos repelen los insectos, o su papel es inducir defensas en las plantas de *T. repens* que actúen generando la protección? ¿Cuál es el alcance de esta protección en términos de distancia? ¿Cuál es el papel de estos volátiles en la propia protección de las plantas de *L. multiflorum*? Se sabe que los alcaloides producidos en las plantas endofíticas tienen efectos tóxicos para los herbívoros, pero ¿son estos los

únicos responsables de la no preferencia de plantas infectadas, o pueden también estar involucrados los compuestos volátiles?

En el capítulo 3 se observaron efectos mediados por el suelo sobre el crecimiento de la leguminosa. ¿Cuáles son los intermediarios involucrados en los efectos observados? ¿Están vinculados con otros microorganismos como las bacterias promotoras de crecimiento o microorganismos patógenos? ¿Qué papel tiene la mineralización del N inducida por el endófito al favorecer el crecimiento de las leguminosas? ¿En qué otras especies y contextos se pueden observar efectos similares? En el capítulo 4 se observó que los efectos de la coexistencia entre las plantas resultaron aditivos. Sin embargo, la nodulación se vio afectada por el endófito aunque esto no repercutió en cambios en la fijación de N o en el crecimiento. ¿Cuál es el mecanismo por el cual los endófitos disminuyen la nodulación? ¿Puede estar vinculado con los compuestos volátiles y las señales inducidas por ellos en las plantas de *T. repens*? El estudio de estos mecanismos supondrá un gran avance en comprender las relaciones particulares los simbioses y hospedantes y cuáles son los caminos por los que se dan los procesos observados.

Los efectos de los simbioses sobre sus hospedantes se **propagan** a niveles jerárquicos superiores afectando la estructura y funcionamiento de comunidades y ecosistemas (Omacini *et al.* 2005, Kothamasi *et al.* 2010). Estudiándose por separado se ha visto que los endófitos y los rizobios afectan componentes aéreos y subterráneos, afectan otras plantas, los herbívoros y sus consumidores. De esta forma, a escala de comunidad la composición y diversidad de las comunidades es afectada. A nivel de ecosistema, tanto el número de niveles tróficos como los procesos del ciclado de los nutrientes y la productividad primaria son afectados. Esta tesis puede funcionar como disparador para considerar los efectos interactivos de varios simbioses. En ese sentido ¿Cómo se extiende la influencia de uno sobre la propagación de los efectos del otro a escalas superiores (Fig. 5.3)?

La **contexto-dependencia** de las interacciones representó un gran avance en la ecología de poblaciones y comunidades (Bronstein 1994, Agrawal *et al.* 2007). El reconocer que un cambio en las condiciones bióticas o abióticas puede modificar el signo de la interacción entre dos poblaciones fue un paradigma central de esta tesis. Aunque es prácticamente imposible considerar todos los ejes en los que puede cambiar el contexto y afectar las interacciones, aquí se ha considerado el papel de varios intermediarios (herbívoros, simbioses generalistas, comunidades microbianas del suelo, recursos). Quedan por evaluar otros contextos, por ejemplo: ¿Cómo responden a cambios en el nivel de nutrientes y de agua en el suelo, a la presencia de herbívoros generalistas o específicos, domésticos o no, o al ataque patógenos y otros antagonistas, e incluso a cambios en las temperaturas medias o en la concentración de CO₂ como efecto del cambio global? Se ha demostrado que todos estos factores afectan individualmente el resultado de las interacciones planta-planta y plantas-simbioses. Entonces ¿pueden los simbioses modular las interacciones entre plantas mediante esos intermediarios o en respuesta a esos cambios en el ambiente?

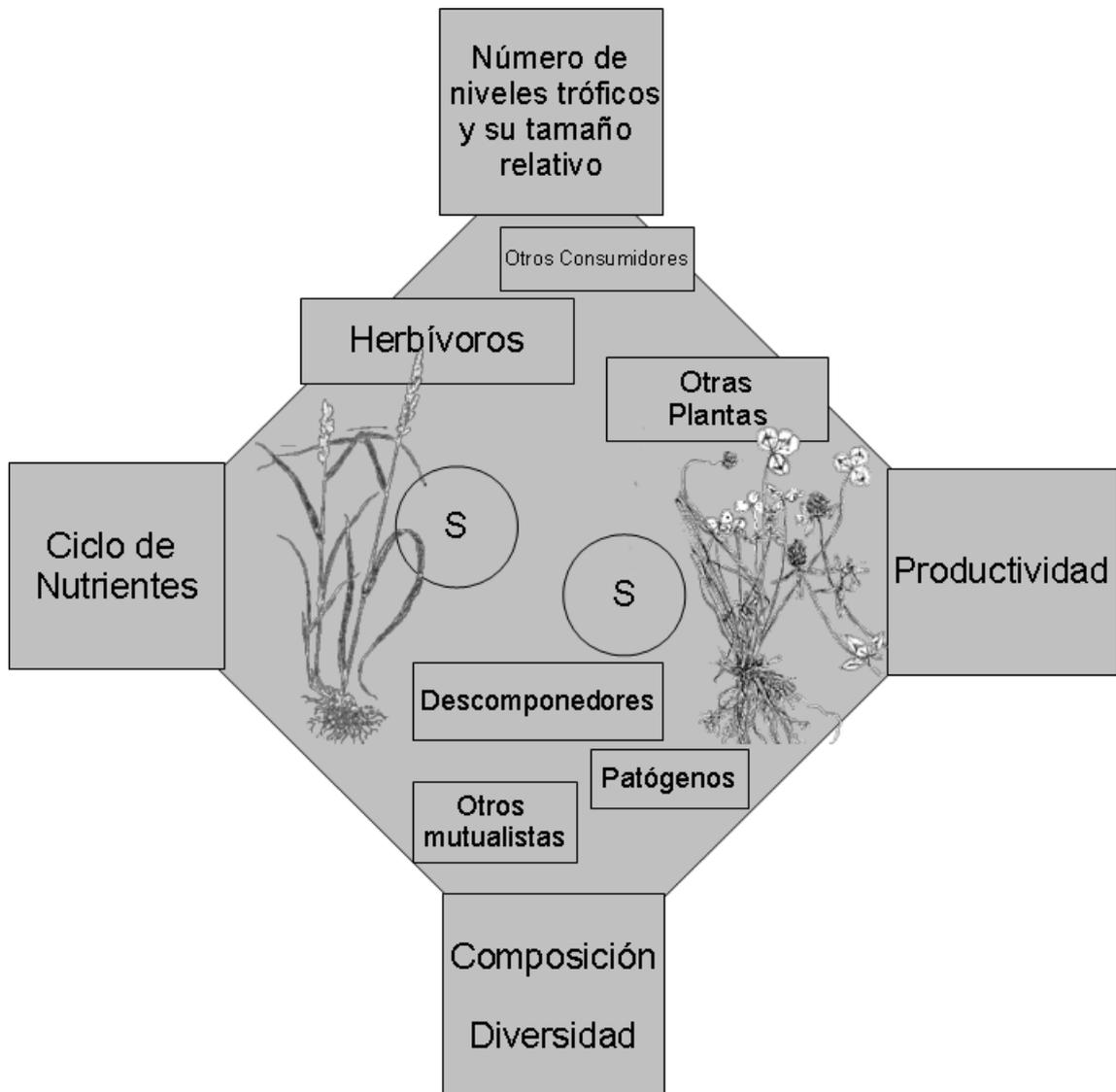


Figura 5.3: *Simbiosfera*: área de influencia de la presencia y la interacción de simbios a distintos niveles de organización. Dentro del rombo se encuentran las poblaciones susceptibles de ser afectadas. El efecto sobre estas poblaciones determinará cambios en los procesos relativos al funcionamiento del ecosistema (vértices horizontales) y en atributos descriptivos de la estructura de las comunidades y ecosistemas (vértices verticales).

En esta tesis detectamos mecanismos de complementariedad y de facilitación que podrían explicar la **coexistencia de especies**. ¿Cuál es el alcance de estos mecanismos en las comunidades, en condiciones menos controladas? En este sentido, estudios posteriores son necesarios para evaluar los efectos de complementariedad a mayores escalas y frente a contextos ambientales alternativos, dado que es importante capturar la complejidad y la dependencia de escala de estas interacciones entre componentes aéreos y subterráneos (van der Putten *et al.* 2009). Incluir otras interacciones u otros simbios puede inducir más efectos de la complementariedad o facilitación. Por ejemplo, la herbivoría sobre el hospedante o sobre la comunidad pueden ser afectados tanto por el endófito, como demostramos en el capítulo 2 (Omacini *et al.* 2001) o por rizobios (Dean *et al.* 2009, Kempel *et al.* 2009), influyendo en las interacciones entre

ambas especies. Además, los efectos observados sobre la nodulación podrían repercutir negativamente en la cantidad de rizobios que quedaría para la siguiente generación de plantas, lo que nuevamente determinaría otro contexto.

Entender los mecanismos detrás de la relación entre **biodiversidad y funcionamiento de los ecosistemas** es actualmente un tema de gran discusión en ecología. ¿Pueden los efectos aditivos y no aditivos observados aportar a la vinculación diversidad-funcionamiento? Esta relación parece ser generalmente positiva y existen tres hipótesis o mecanismos que la sustentan: los efectos de complementariedad y facilitación, y los efectos de muestreo (“sampling effect”). Con respecto a los dos primeros ¿pueden los mecanismos detectados en esta tesis contribuir en este campo? ¿Actúan los mecanismos que determinan la coexistencia de gramíneas y leguminosas también entre otras especies? En ese sentido, ¿hasta qué punto se sostiene el incremento aditivo de la productividad o la captura de N? Con respecto al tercer mecanismo que explica la relación biodiversidad-funcionamiento -el “sampling effect” o efecto de muestreo- también surgen preguntas. La hipótesis del efecto de muestreo dice que las comunidades más diversas son más productivas porque en ellas aumenta la posibilidad de encontrar a la especie más productiva. Sin embargo, en muchos trabajos anteriores (ver Callaway 1995, por ejemplo) se ha demostrado la presencia de beneficios inducidos por las plantas hacia el resto de la comunidad. En esta tesis en particular, demostramos que estos efectos podría inducirse por la presencia un microorganismo simbiote. Entonces, ¿puede atribuirse el “efecto de muestreo” no solo a la especie más productiva, sino también a la especie más altruista, o la que carga el simbiote que más beneficia a otras especies (i.e. comparte beneficios)? Si los simbiotes potencian los procesos del ecosistema (Fig. 5.3), entonces su presencia es clave para entender la relación entre biodiversidad y funcionamiento.

5.5 – Conclusiones

Los microorganismos simbiotes de plantas están ampliamente distribuidos en las comunidades naturales y presentan múltiples impactos en todos los niveles de organización. A lo largo de esta tesis he demostrado las consecuencias que puede tener la coexistencia de dos microorganismos simbiotes específicos en la interacción entre sus hospedantes. Se evidencia que los hongos endófitos de pastos y los rizobios de leguminosas pueden afectar interactivamente las relaciones de herbivoría de sus hospedantes (Capítulo 2). Por otro lado, los cambios en el suelo inducidos por el endófito afectan el crecimiento y la adquisición de nutrientes de la leguminosa dependiendo de la disponibilidad de rizobios (Capítulo 3). Finalmente, cuando los hospedantes crecen juntos el papel de cada simbiote sobre ellos es fundamental en términos de productividad primaria neta y adquisición de nutrientes (Capítulo 4). Como consecuencia de estos procesos surgen mecanismos de facilitación y complementariedad en el uso de los recursos que pueden afectar la coexistencia de las plantas. Esta tesis no solo aporta conocimientos sobre la importancia de la presencia de múltiples simbiosis en las comunidades sino que además sugiere que deben ser consideradas cuando se discuten temas de gran importancia para la ecología como la relación entre diversidad y funcionamiento, los mecanismos de coexistencia de especies y las interacciones entre componentes aéreos y subterráneos de los ecosistemas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, P. A. 1987. On clasifying interactions between populations. *Oecologia* 73:272–281.
- Agrawal, A. A., D. D. Ackerly, F. Adler, A. E. Arnold, C. Cáceres, D. F. Doak, E. Post, P. J. Hudson, J. L. Maron, K. A. Mooney, M. Power, D. Schemske, J. Stachowicz, S. Strauss, M. G. Turner, y E. Werner. 2007. Filling key gaps in population and community ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment* 5:142–152.
- Akçay, E., y E. L. Simms. 2011. Negotiation, sanctions and context dependency in the legume-rhizobium mutualism. *The American Naturalist* 178:1 – 14.
- 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.
- Aschehoug, E. T., R. M. Callaway, G. Newcombe, N. Tharayil, y S. Chen. 2014. Fungal endophyte increases the allelopathic effects of an invasive forb. *Oecologia* 175:285–91.
- Atsatt, P. R., y D. J. O’Dowd. 1976. Plant defense guilds. *Science* 193:24–29.
- Ayres, E., K. M. Dromph, R. Cook, N. Ostle, y R. D. Bardgett. 2007. The influence of below-ground herbivory and defoliation of a legume on nitrogen transfer to neighbouring plants. *Functional Ecology* 21:256–263.
- Barbosa, P., J. Hines, I. Kaplan, H. Martinson, A. Szczepaniec, y Z. Szendrei. 2009. Associational resistance and associational susceptibility: having right or wrong neighbors. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40.
- Bauer, J. T., N. M. Kleczewski, J. D. Bever, K. Clay, y H. L. Reynolds. 2012. Nitrogen-fixing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, and the productivity and structure of prairie grassland communities. *Oecologia* 170:1089–1098.
- Belesky, D. P., D. M. Burner, y J. M. Ruckle. 2008. Does endophyte influence resource acquisition and allocation in defoliated tall fescue as a function of microsite conditions? *Environmental and Experimental Botany* 63:368–377.
- Bever, J. D. 1997. Incorporating the Soil Community into Plant Population Dynamics: The Utility of the Feedback Approach. *Journal of Ecology* 85:561–673.
- Bonfante, P., y I. A. Anca. 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63:363–383.
- Bowatte, S., B. Barrett, C. Luscombe, D. E. Hume, D. Luo, P. Theobald, y P. C. Newton. 2011. Effect of grass species and fungal endophyte on soil nitrification potential. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 54:275–284.
- 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* 92:222–227.

- Bronstein, J. L. 1994. Our current understanding of mutualism. *The Quarterly Review of Biology* 69:31 – 51.
- Bush, L. P., H. H. Wilkinson, y C. L. Schardl. 1997. Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses. *Plant Physiology* 114:1–7.
- Buyer, J. S., D. A. Zuberer, K. A. Nichols, y A. J. Franzluebbers. 2011. Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil* 339:401–412.
- Callaway, R. M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61:306–348.
- 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.
- Casper, B. B., y J. P. Castelli. 2007. Evaluating plant-soil feedback together with competition in a serpentine grassland. *Ecology Letters* 10:394–400.
- Chamberlain, S. A., J. L. Bronstein, y J. A. Rudgers. 2014. How context dependent are species interactions? *Ecology Letters* 17:881–890.
- Chapin III, F. S., B. H. Walker, R. J. Hobbs, D. U. Hooper, J. H. Lawton, O. E. Sala, y D. Tilman. 1997. Biotic control over the functioning of ecosystems. *Science* 277:500–504.
- Cheplick, G. P., y S. H. Faeth. 2009. *Ecology and Evolution of the Grass-Endophyte Symbiosis*. Oxford Scholarship Online Monographs. 243 pp
- Chesson, P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:343–366.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69:10–16.
- Clay, K. 1990. The impact of parasitic and mutualistic fungi on competitive interactions among plants. Páginas 391–412 *En* J. B. Grace y D. Tilman, editores. *Perspectives on plant competition*. Academic Press, Inc., San Diego, USA.
- Clay, K., y J. Holah. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* 285:1742–1744.
- Clay, K., J. Holah, y J. A. Rudgers. 2005. Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:12465–12470.
- Clay, K., S. Marks, y G. P. Cheplick. 1993. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology* 74:1767–1777.
- Clay, K., y C. L. Schardl. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160:S99–S127.
- Colinas, C., E. Ingham, y R. Molina. 1994. Population responses of target and non-

- target forest soil organisms to selected biocides. *Soil Biology and Biochemistry* 26:41–47.
- Cripps, M. G., G. R. Edwards, y S. L. McKenzie. 2013. Grass species and their fungal symbionts affect subsequent forage growth. *Basic and Applied Ecology* 14:225–234.
- D'Alessandro, M., y T. C. J. Turlings. 2005. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. *Analyst* 131:24–32.
- De Battista, J. P. 2005. *Neotyphodium* research and application in South America. Páginas 63–69 en C. Roberts, C. West, y D. Spiers, editores. *Neotyphodium in Cool Season Grasses*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- De Faria, S. M., G. P. Lewis, J. I. Sprent, y J. M. Sutherland. 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytologist* 111:607–619.
- Dean, J. M., M. C. Mesher, y C. M. De Morales. 2009. Plant–rhizobia mutualism influences aphid abundance on soybean. *Plant and Soil* 323:187–196.
- Denison, R. F. 2000. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist* 156:567–576.
- Denison, R. F., y E. T. Kiers. 2004. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiology Letters* 237:187–193.
- Douglas. 2010. *The Significance of Symbiosis*. Princeton University Press. Princeton, NJ, USA. 214 pp.
- Eerens, J. P. J., R. J. Lucas, S. Easton, y J. G. H. White. 1998. Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) in a cool-moist environment III Interaction with white clover. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 41:201–207.
- Ehrenfeld, J. G., B. Ravit, y K. Elgersma. 2005. Feedback in the plant-soil system. *Annual Review of Environmental Resources* 30:75–115.
- Eisenhauer, N. 2012. Aboveground–belowground interactions as a source of complementarity effects in biodiversity experiments. *Plant and Soil* 351:1–22.
- Faeth, S. H. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos* 98:25–36.
- Faeth, S. H., L. P. Bush, y T. J. Sullivan. 2002. Peramine alkaloid variation in *Neotyphodium*-infected Arizona fescue: Effects of endophyte and host genotype and environment. *Journal of Chemical Ecology* 28:1511–1526.
- Faeth, S. H., M. Helander, y K. Saikkonen. 2004. Asexual *Neotyphodium* endophytes in a native grass reduce competitive abilities. *Ecology Letters* 7:304–313.
- Fornara, D. A., y D. Tilman. 2009. Ecological mechanisms associated with the positive diversity–productivity relationship in an N-limited grassland. *Ecology* 90:408–418.
- Franzluebbers, A. J. 2006. Short-term responses of soil C and N fractions to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil*:153–164.

- Franzluebbers, A. J., N. Nazih, J. A. Stuedemann, J. J. Fuhrmann, H. H. Schomberg, y P. G. Hartel. 1999. Soil carbon y nitrogen pools under low- and high-endophyte-infected tall Fescue. *Soil Science Society of America* 63:1687–1694.
- 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
- García Parisi, P. A., A. A. Grimoldi, y M. Omacini. 2014. Endophytic fungi of grasses protect other plants from aphid herbivory. *Fungal Ecology* 9:61–64.
- García Parisi, P. A., F. A. Lattanzi, A. A. Grimoldi, y M. Omacini. (n.d.). Multi-symbiotic systems: functional implications of the coexistence of grass-endophyte and legume-rhizobia symbioses. *Oikos*. En prensa
- Gerdemann, J. W., y T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235–244.
- Goldberg, D. E. 1990. Components of resource competition on plant communities. Páginas 27–49 *En* J. B. Grace and D. Tilman, editores. *Perspectives on plant competition*. Academic Press, Inc., San Diego, USA.
- Grace, J. B., y D. Tilman. 1990. *Perspectives on Plant Competition*. Academic Press, Inc., San Diego, USA. 484 pp
- Graham, P. H., y C. P. Vance. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology* 131:872–877.
- Gundel, P. E., W. B. Batista, M. Texeira, M. Omacini, y C. M. Ghersa. 2008. *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings of the Royal Society* 275:897–905.
- Gundel, P. E., L. A. Garibaldi, M. A. Martínez-Ghersa, y C. M. Ghersa. 2011. *Neotyphodium* endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. *Environmental and Experimental Botany* 71:359–366.
- Gundel, P. E., L. A. Garibaldi, P. M. Tognetti, R. Aragón, C. M. Ghersa, y M. Omacini. 2009. 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, M. Omacini, R. Cuyeu, E. Pagano, R. Ríos, y C. M. Ghersa. 2012. Mutualisms effectiveness and vertical transmission of symbiotic fungal endophytes in response to host genetic background. *Evolutionary Applications* 5:838–849.
- Harper, J. L. 1977. *Population biology of plants*. Academic Press, Inc., London, UK. 892 pp
- Harris, W., y J. L. Brock. 1972. Effect of porina caterpillar (*Wiseana spp.*) infestation on yield and competitive interactions of ryegrass and white clover varieties. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 15:723–740.

- 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
- Haynes, J. 1980. Competitive aspects of the grass-legume association *Advances in agronomy* 33:227-261.
- Heath, K. D., y J. A. Lau. 2011. Herbivores alter the fitness benefits of a plant-rhizobium mutualism. *Acta Oecologica* 37:87-92.
- Hector, A., B. Schmid, C. Belerkuhnlein, M. C. Caldeira, M. Diemer, P. G. Dimitrakopoulos, J. A. Finn, H. Freitas, P. S. Giller, J. Good, R. Harris, P. Högberg, K. Huss-Danell, J. Joshi, y J. H. Lawton. 1999. Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science* 286:1123-1127.
- Hodge, A., C. D. Campbell, y A. H. Fitter. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413:297-299.
- Hodge, A., y A. H. Fitter. 2013. Microbial mediation of plant competition and community structure. *Functional Ecology* 27:865-875.
- Högberg, P. 1997. Tansley Review No. 95. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist* 137:179-203.
- Høgh-Jensen, H., y J. K. Schjoerring. 1997. Interactions between white clover and ryegrass under contrasting nitrogen availability: N_2 fixation, N fertilizer recovery, N transfer and water use efficiency. *Plant and Soil* 197:187-199.
- Hokka, V., J. Mikola, M. Vestberg, y H. Setälä. 2004. Interactive effect of defoliation and an AM fungus on plant and soil organisms in experimental legume-grass communities. *Oikos* 106:73-84.
- Hooper, D. U., y J. S. Dukes. 2004. Overyielding among plant functional groups in a long-term experiment. *Ecology Letters* 7:95-115.
- Hoveland, C. S., J. H. Bouton, y R. G. Durham. 1999. Fungal endophyte effects on production of legumes in association with tall fescue. *Agronomy Journal* 91:897.
- Iannone, L. J., J. F. White, L. M. Giussani, D. Cabral, y M. V. Novas. 2011. Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycological Progress* 10:9-19.
- Iqbal, J., J. A. Nelson, y R. L. McCulley. 2013. Fungal endophyte presence and genotype affect plant diversity and soil-to-atmosphere trace gas fluxes. *Plant and Soil* 364:15-27.
- Johnson, N. C., J. H. Graham, y F. A. Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575-585.
- Karban, R., y J. Maron. 2002. The fitness consequences of interspecific eavesdropping between plants. *Ecology* 83:1209-1213.

- Karpenstein-Machan, M., y R. Stuelpnagel. 2000. Biomass yield and nitrogen fixation of legumes monocropped and intercropped with rye and rotation effects of subsequent maize crop. *Plant and Soil* 218:215–232.
- Kempel, A., R. Brandl, y M. Schädler. 2009. Symbiotic soil microorganisms as players in aboveground plant-herbivore interactions - the role of rhizobia. *Oikos* 118:634–640.
- Kiers, E. T., M. Duhamel, Y. Beesetty, J. A. Mensah, O. Franken, E. Verbruggen, C. R. Fellbaum, G. A. Kowalchuk, M. M. Hart, A. Bago, T. M. Palmer, S. A. West, P. Vandenkoornhuyse, J. Jansa, y H. Bucking. 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333:880–882.
- Kiers, E. T., y M. G. A. van der Heijden. 2006. Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypothesis of evolutionary cooperation. *Ecology* 87:1627–1636.
- Kiers, T., R. A. Rousseau, S. A. West, y R. F. Denison. 2003. Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. *Nature* 425:1095–1098.
- Klironomos, J. N. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* 417:67–70.
- Koricheva, J., A. C. Gange, y T. Jones. 2009. Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores: a meta-analysis. *Ecology* 90:2097.
- Kothamasi, D., E. T. Kiers, y M. G. A. van der Heijden. 2010. Mutualisms and community organization. Páginas 179–192 *En* H. A. Verhoef and P. J. Morin, editores. *Community ecology processes, models, and applications*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Krauss, J., S. Härrä, L. Bush, R. Husi, L. Bigler, S. Power, y C. B. Müller. 2007. Effects of fertilizer, fungal endophytes and plant cultivar on the performance of insect herbivores and their natural enemies. *Functional Ecology* 21:107–116.
- Larimer, A. L., J. D. Bever, y K. Clay. 2010. The interactive effects of plant microbial symbionts: a review and meta-analysis. *Symbiosis* 51:139–148.
- Larimer, A. L., J. D. Bever, y K. Clay. 2012. Consequences of simultaneous interactions of fungal endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi with a shared host grass. *Oikos* 121:2090–2096.
- Larimer, A. L., K. Clay, y J. D. Bever. 2014. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology* 95:1045–1054.
- LeBauer, D. S., y K. K. Treseder. 2008. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89:371–379.
- Lehtonen, P., M. L. Helander, M. Wink, F. Sporer, y K. T. Saikkonen. 2005. Transfer of endophyte-origin defensive alkaloids from a grass to a hemiparasitic plant. *Ecology Letters* 8:1256–1263.
- Leuchtman, A. 1992. Systematics, distribution, and host specificity of grass

- endophytes. *Natural Toxins* 1:150–162.
- Leuchtman, A., C. W. Bacon, C. L. Schardl, J. F. White, y M. Tadych. 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia* 106:202–215.
- Li, L., D. Tilman, H. Lambers, y F. Zhang. 2014a. Plant diversity and overyielding: insights from belowground facilitation of intercropping in agriculture. *New Phytologist*.
- Li, T., J. D. Blande, P. E. Gundel, M. L. Helander, y K. T. Saikkonen. 2014b. *Epichloë* endophytes alter inducible defences in host grasses. *Plos one* 9:e101331.
- Liu, Q., A. J. Parsons, H. Xue, K. Fraser, G. D. Ryan, J. A. Newman, y S. Rasmussen. 2011. Competition between foliar *Neotyphodium lolii* endophytes and mycorrhizal *Glomus spp.* fungi in *Lolium perenne* depends on resource supply and host carbohydrate content. *Functional Ecology* 25:910–920.
- Loreau, M., y A. Hector. 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412:72–76.
- Loreau, M., S. Naeem, P. Inchausti, J. Bengtsson, J. P. Grime, a Hector, D. U. Hooper, M. a Huston, D. Raffaelli, B. Schmid, D. Tilman, y D. Wardle. 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294:804–808.
- 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.
- Malinowski, D. P., G. A. Alloush, y D. P. Belesky. 1998. Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Plant and Soil* 205:1–12.
- Malinowski, D. P., y D. P. Belesky. 2000. Adaption of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40:923–940.
- Matthews, J. W., y K. Clay. 2001. Influence of fungal endophyte infection on plant-soil feedback and community interactions. *Ecology* 82:500–509.
- Morris, W., R. Hufbauer, A. Agrawal, J. Bever, V. Borowicz, G. Gilbert, J. L. Maron, C. E. Mitchell, I. M. Parker, A. Power, M. Torchin, y D. Vazquez. 2007. Direct and interactive effects of enemies and mutualists on plant performance: a meta-analysis. *Ecology* 88:1021–1029.
- Mortier, V., M. Holsters, y S. Goormachtig. 2011. Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell and Environment* 3:245–258.
- Mylona, P., K. Pawlowski, y T. Bisseling. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* 7:869–885.
- Newsham, K. K., A. H. Fitter, y A. R. Watkinson. 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution* 10:407–

411.

- Niranjan, R., V. Mohan, y V. M. Rao. 2007. Effect of indole acetic acid on the synergistic interactions of *Bradyrhizobium* and *Glomus fasciculatum* on growth, nodulation, and nitrogen fixation of *Dalbergia sissoo* Roxb. *Arid land research and management* 21:329–342.
- Novas, M. V, D. Cabral, y A. M. Godeas. 2005. Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in. *Canadian Journal of Botany*:23–30.
- 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. 2011. Evidence for leaf endophyte regulation of root symbionts: effect of *Neotyphodium* endophytes on the pre-infective state of mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 55:19–28.
- 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, y C. M. Ghersa. 2005. A hierarchical framework for understanding the ecosystem consequences of endofhyte-grass symbioses. Páginas 141–161 en C. Roberts, C. P. West, y D. E. Spiers, editores. *Neotyphodium* In Cool-Season Grasses Current Research Applications. Blackwell Publishing.
- 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.
- Pérez, L. I. 2014. La simbiosis con endófitos del género *Neotyphodium* y su impacto en la interacción del pasto hospedante con otros hongos. Tesis de Doctardo. EPG-Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires.
- Pinheiro, J. C., y D. M. Bates. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer, NewYork, USA. 528 pp
- Polis, G. A. 1999. Why are parts of the world green? Multiple factors control productivity and hte distribution of biomass. *Oikos* 86:3–15.
- Poorter, H., K. J. Niklas, P. B. Reich, J. Oleksyn, P. Poot, y L. Mommer. 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and

- environmental control. *New Phytologist* 193:30–50.
- Quigley, P. E. 2000. Effects of *Neotyphodium lolii* infection and sowing rate of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on the dynamics of ryegrass/subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) swards. *Australian Journal of Agricultural Research* 50:47–56.
- Rasmussen, S., A. J. Parsons, S. Bassett, M. J. Christensen, D. E. Hume, L. J. Johnson, R. D. Johnson, W. R. Simpson, C. Stacke, C. R. Voisey, H. Xue, y J. A. Newman. 2007. High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytologist* 173:787–797.
- Ravel, C., Y. Michalakis, y G. Chermet. 1997. The effect of imperfect transmission on the frequency of mutualistic seed-borne endophytes in natural populations of grasses. *Oikos* 80:18–24.
- Roberts, C., C. P. West, y D. E. Spiers. 2005. *Neotyphodium* in cool-season grasses. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. 380 pp
- Rodriguez, R. J., J. F. White. Jr, A. E. Arnold, y R. S. Redman. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182:314:330
- Rodríguez-Echeverría, S., C. Armas, N. Pistón, S. Hortal, y F. I. Pugnaire. 2013. A role for below-ground biota in plant-plant facilitation. *Journal of Ecology* 101:1420–1428.
- Rudgers, J., y K. Clay. 2008. An invasive plant-fungal mutualism reduces arthropod diversity. *Ecology letters* 11:831–40.
- 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., y S. Orr. 2009. Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. *Journal of Ecology* 97:247–255.
- Sachs, J. L., J. E. Russell, Y. E. Lii, K. C. Black, G. Lopez, y A. S. Patil. 2010. Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont. *Journal of Evolutionary Biology* 23:1919–1927.
- Sawada, L. D. Kuykendall, y J. M. Young. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology* 49:155–179.
- Schausberger, P., S. Peneder, S. Jürschik, y D. Hoffmann. 2012. Mycorrhiza changes plant volatiles to attract spider mite enemies. *Functional Ecology* 26:441–449.
- Schulze, J. 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167:125-137
- Schulze, J., G. Temple, S. J. Temple, H. Beschow, y C. P. Vance. 2006. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Annals of Botany* 98:731–40.

- Shiba, T., K. Sugawara, y A. Arakawa. 2011. Evaluating the fungal endophyte *Neotyphodium occultans* for resistance to the rice leaf bug, *Trigonotylus caelestialium*, in Italian ryegrass, *Lolium multiflorum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 141:45–51.
- Siegrist, J. A., R. L. Mcculley, L. P. Bush, y T. D. Phillips. 2010. Alkaloids may not be responsible for endophyte- associated reductions in tall fescue decomposition rates. *Functional Ecology* 24:460–468.
- Silvertown, J. 2004. Plant coexistence and the niche. *Trends in Ecology and Evolution* 19:605–611.
- Simms, E. L., y D. L. Taylor. 2002. Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. *Integrative and Comparative Biology* 42:369–380.
- Smith, y D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2da edición. Academic Press, Inc., London, UK. 800pp
- Snell, F. J. J., y P. E. E. Quigley. 1993. Allelopathic effects of endophyte in perennial ryegrass residues on young subterranean clover plants. Páginas 343–344 en A. M. Baker, J. R. Crush, y L. M. Humpries, editores. *Proceedings of the XVII International Grassland Congress*. New Zealand Grassland Association, Palmerston North, N.Z.
- Soriano, A., R. J. C. León, O. E. Sala, R. Lavado, V. A. Deregibus, M. A. Cahuepé, O. A. Scaglia, C. A. Velázquez, y J. H. Lemcoff. 1991. Rio de la Plata grasslands. Páginas 367–407 en R. Coupland, editor. *Ecosystems of the world 8A, Natural grasslands. Introduction and western hemisphere*. Elsevier, Netherlands.
- Sprent, J. I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New phytologist* 174:11–25.
- Stanton, M. 2003. Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *The American Naturalist* 162:S10–S23.
- Steinkellner, S., V. Lenzemo, I. Langer, P. Schweiger, T. Khaosaad, J.-P. Toussaint, y H. Vierheilig. 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* 12:1290–1306.
- Stevens, D. R., y M. J. Hickey. 1990. Effects of endophytic ryegrass on the production of ryegrass/white clover pastures. Páginas 58–61 *Proceedings of the International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*.
- Sutherland, B. L., y J. H. Hoglund. 1989. Effect of ryegrass containing the endophyte (*Acremonium lolii*) on the performance of associated white clover and subsequent crops. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 50:265–269.
- Sutherland, B. L., D. E. Hume, y B. A. Tapper. 1999. Allelopathic effects of endophyte-infected perennial ryegrass extracts on white clover seedlings. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 42:19–26.
- Tajini, F., M. Trabelsi, y J.-J. Drevon. 2011. Co-inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases P use efficiency for N₂ fixation in the

- common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency in hydroaerobic culture. *Symbiosis* 53:123–129.
- Thompson, J. N. 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press, Chicago, USA. 443 pp
- 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.
- Tilman, D., J. Knops, D. Wedin, P. B. Reich, M. Ritchie, y E. Siemann. 1997. The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277:1300–1302.
- Tilman, D., P. B. Reich, J. Knops, D. Wedin, T. Mielke, y C. Lehman. 2001. Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science* 294:843–845.
- Van der Heijden, M. G. A., R. D. Bardgett, y N. M. Van Straalen. 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11:296–310.
- Van der Heijden, M. G. A., T. Boller, A. Wiemken, y I. R. Sanders. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79:2082–2091.
- Van der Heijden, M. G. A., y C. Wagg. 2013. Soil microbial diversity and agroecosystem functioning. *Plant and Soil* 363:1–5.
- Van der Putten, W. H., R. D. Bardgett, J. D. Bever, T. M. Bezemer, B. B. Casper, T. Fukami, P. Kardol, J. N. Klironomos, A. Kulmatiski, J. A. Schweitzer, K. N. Suding, T. F. J. Van de Voorde, y D. A. Wardle. 2013. Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology* 101:265–276.
- Van der Putten, W. H., R. D. Bardgett, P. C. de Ruiter, W. H. G. Hol, K. M. Meyer, T. M. Bezemer, M. a Bradford, S. Christensen, M. B. Eppinga, T. Fukami, L. Hemerik, J. Molofsky, M. Schädler, C. Scherber, S. Y. Strauss, M. Vos, y D. A. Wardle. 2009. Empirical and theoretical challenges in aboveground-belowground ecology. *Oecologia* 161:1–14.
- Van der Putten, W. H., L. E. M. Vet, J. A. Harvey, y F. L. Wäckers. 2001. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plant, herbivores, pathogens and their antagonists. *Trends in Ecology and Evolution* 16:547–554.
- Van Hecke, M. M., A. M. Treonis, y J. R. Kaufman. 2005. How does the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum* affect tall fescue (*Festuca arundinacea*) rhizodeposition and soil microorganisms? *Plant and Soil* 275:101–109.
- Vázquez-de-Aldana, B. R., I. Zabalgogezcoa, 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.
- Vicari, M., P. E. Hatcher, y P. G. Ayres. 2002. Combined effect of foliar and mycorrhizal endophytes on an insect herbivore. *Ecology* 83:2452–2465.

- Walker, C., C. Mize, y H. McNabb Jr. 1982. Populations of endogonaceous fungi at two locations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany* 60:2518–2529.
- Wagg, C., J. Jansa, B. Schmid, y M. G. A. van der Heijden. 2011. Belowground biodiversity effects of plant symbionts support aboveground productivity. *Ecology Letters* 14:1001–1009.
- Wardle, D. A. 2002. *Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components*. Princeton University Press. Princeton, NJ, USA. 408 pp
- Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. van der Putten, y D. H. Wall. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304:1629–33.
- White, J. F., y M. S. Torres. 2010. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiologia Plantarum* 138:440–446.
- Wilkinson, H. H., M. R. Siegel, J. D. Blankenship, A. C. Mallory, L. P. Bush, y C. L. Schardl. 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13:1027–1033.
- Wootton, J. T. 1994. The nature and consequences of indirect effects in ecological communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25:443–466.
- 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* 58:935–41.