

# Mecanismos de resistencia a insectos en pastos que forman simbiosis con hongos endofitos

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

**Daniel A. Bastías Campos**

Lic. Biología - Pontificia Universidad Católica de Chile - 2009

Lugar de trabajo: IFEVA-FAUBA



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



## **COMITÉ CONSEJERO**

Director de tesis

**Pedro E. Gundel**

Ingeniero Agrónomo, 2004, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Doctor en Ciencias Agropecuarias, 2009, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Co-directora

**M. Alejandra Martínez-Ghersa**

Licenciada en Ciencias Biológicas. 1985. Centro de Altos Estudios en Ciencias Exactas (CAECE), Argentina.

Doctora en Ciencias Ambientales, 2004, Oregon State University, USA.

Consejero de Estudios

**Carlos L. Ballaré**

Ingeniero Agrónomo, 1984, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Doctor of Philosophy, 1992, Oregon State University, USA.

## **JURADO DE TESIS**

**María Victoria Novas**

Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires.

Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires.

JURADO

**Ana Pineda**

Licenciada en Biología, 2003, Universidad de Alicante, España.

Doctora en en Biología, 2008, Universidad de Alicante, España.

JURADO

**Jorge A. Zavala**

Ingeniero Agrónomo, 1994, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Dr Rerum Naturalis, Max Planck Institute for Chemical Ecology. Friedrich Schiller  
Universität, Jena, Alemania

Fecha de defensa de la tesis: 14 de marzo de 2018

**Dedicado a:**

*Mi familia y amigos todo terreno*

### **Agradecimientos:**

Gracias a los financiadores de mi doctorado: Agencia Nacional de Promoción Científica FONCYT, CONICET y programa ELAP (Canadian Emerging Leaders in the Americas; y a los financiadores de mi proyecto: UBACYT, FONCYT, Canadian Natural Science and Engineering Research Council y AgResearch Ltd.

Agradezco a los técnicos que fueron una ayuda esencial para llevar a cabo esta tesis: Dr. Armen Charchoglyan, Laura Ventura, Roberto Tornese; y a los estudiantes de grado y postgrado, Tara Di Leo, María Florencia Castagnani, Lucas Carboni, Andrea Ueno e Ignacio Hernández.

También agradezco a los investigadores Dra. Michelle Afkhami y Dra. Joanne Jensen quienes amablemente compartieron información para armar una de nuestras bases de datos.

**Declaración de originalidad:**

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 esta u otra institución.

**Publicaciones derivadas de esta tesis:**

1. **Bastías DA, Martínez-Ghersa MA, Ballaré CL, Gundel PE. 2017.** *Epichloë* fungal endophytes and plant defenses: not just alkaloids. *Trends in Plant Science* 22: 939-948.
2. **Bastías DA, Martínez-Ghersa MA, Newman JA, Card SD, Mace WJ, Gundel PE. 2018.** The plant hormone salicylic acid interacts with the mechanism of anti-herbivory conferred by fungal endophytes in grasses. *Plant, Cell & Environment* 41: 395-405.

## ÍNDICE GENERAL

Capítulo I: Introducción general y objetivos de la tesis .....	1
Introducción .....	1
Señalizaciones hormonales que activan los mecanismos de resistencia de las plantas frente a los insectos .....	2
Efecto de las interacciones simbióticas sobre las señalizaciones hormonales de resistencia de las plantas frente a los insectos .....	3
El caso de los hongos formadores de micorriza y las rizobacterias .....	3
El caso de los endofitos <i>Epichloë</i> .....	4
Hacia un modelo integrador de los mecanismos de resistencia mediados por hongos endofitos y los mecanismos de defensa propios de las plantas.....	5
Objetivos, hipótesis y predicciones .....	6
Objetivo general .....	6
Objetivos específicos.....	6
Organización de la tesis .....	7
Capítulo II: Hongos endofitos <i>Epichloë</i> y defensas de las plantas. No sólo alcaloides (*)....	9
Introducción .....	9
Mecanismos de defensa de las plantas contra los insectos.....	10
Efectos de microorganismos benéficos sobre la inmunidad de las plantas.....	11
Cambios en el sistema inmune de la planta promovidos por los hongos endofitos <i>Epichloë</i> .....	12
Hacia un modelo integrador de defensas en plantas en simbiosis con hongos endofitos <i>Epichloë</i> .....	13
Materiales y Métodos.....	15
Criterios de selección de los experimentos incluidos en el meta-análisis.....	15
Meta-análisis .....	18
Resultados.....	19
Discusión .....	20
Capítulo III: La hormona ácido salicílico de la planta interactúa con el mecanismo de anti-herbivoría conferido por los hongos endofitos (*) .....	22
Introducción .....	22
Metodología .....	24
Plantas y colonias de áfidos .....	24

Diseño y condiciones experimentales .....	24
Cuantificación del SA y JA.....	25
Cuantificación de las lolinas .....	26
Análisis estadísticos .....	27
Resultados .....	28
Efectos del SA y del endofito sobre los niveles fisiológicos de las hormonas .....	28
Efectos del SA sobre la concentración de los alcaloides lolinas.....	29
Efectos del SA sobre la relación entre los alcaloides NFL y NANL .....	30
Efectos del SA y del endofito en las poblaciones de los áfidos .....	31
Discusión .....	32
Capítulo IV: El ácido jasmónico regula el mecanismo de anti-herbivoría conferido por los hongos endofitos en pastos.....	36
Introducción .....	36
Metodología .....	38
Plantas y colonia de larvas .....	38
Diseño y condiciones experimentales .....	39
Cuantificación del SA, JA y lolinas .....	40
Análisis estadísticos .....	40
Resultados.....	41
Efectos del MeJA y del endofito sobre los niveles fisiológicos de las hormonas.....	41
Efectos del MeJA sobre la concentración de los alcaloides lolinas .....	44
Efectos del MeJA y del endofito sobre el crecimiento y desarrollo de <i>S. frugiperda</i> ....	44
Discusión .....	47
Capítulo V: Discusión general.....	51
Perspectivas .....	54
1. ¿El aumento de la resistencia a los insectos masticadores visto en las plantas con el endofito es realmente explicado por el priming de la vía del JA? y ¿la susceptibilidad contra los insectos succionadores por la represión de la vía del SA? .....	54
2. ¿Frente a qué grupo de atacantes la depresión de la vía del SA sería perjudicial, en términos de resistencia, para las plantas con los endofitos? .....	54
3. ¿Cuán sensibles son los hongos endofitos (y las defensas que brindan al pasto hospedero) a las perturbaciones externas que activan las vías del SA y del JA?.....	54

Bibliografía..... 56

*ÍNDICE DE CUADROS*

## Capítulo II

<b>Cuadro 2.1</b> Efectividad de los alcaloides para cada especie de insecto utilizada en el estudio.....	17
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo I

<b>Figura 1.1</b> Modelo hipotético que describe los mecanismos de resistencia de pastos simbióticos con hongos endofitos <i>Epichloë</i> frente a dos gremios ecológicos de insectos .....	5
<b>Figura 2.1</b> Representación esquemática que muestra los efectos combinados de las defensas producidas por los endofitos <i>Epichloë</i> (alcaloides) y las defensas propias de la planta sobre la resistencia a los insectos pertenecientes a dos gremios ecológicos .....	14
<b>Figura 2.2</b> Efecto de los hongos endofitos <i>Epichloë</i> sobre el desarrollo y crecimiento de los insectos herbívoros (efecto relativo de plantas con vs. sin el endofito) .....	20
<b>Figura 3.1</b> Concentración fisiológica de las hormonas ácido salicílico [SA, panel superior (a)] y ácido jasmónico [JA, panel inferior (b)] tres días después de que plantas de <i>Lolium multiflorum</i> con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras planas) el hongo endofito <i>Epichloë occultans</i> fueran tratadas (SA+, barras grises) y no tratadas (SA-, barras blancas) con la hormona ácido salicílico .....	29
<b>Figura 3.2</b> Concentraciones de los alcaloides lolinas [N-formilolina (NFL, barras blancas) y N-acetilnorlolina (NANL, barras punteadas)] producidos por el hongo endofito <i>Epichloë occultans</i> en plantas de <i>Lolium multiflorum</i> tratadas (SA+) y no tratadas (SA-) con la hormona ácido salicílico .....	30
<b>Figura 3.3</b> Relación entre los derivados de los alcaloides lolinas N-formilolina (NFL) y N-acetilnorlolina (NANL) producidas por el hongo endofito <i>Epichloë occultans</i> en plantas de <i>Lolium multiflorum</i> no tratadas [SA-, (a)] y tratadas [SA+, (b)] con la hormona ácido salicílico a lo largo del tiempo experimental .....	31
<b>Figura 3.4</b> Tamaño de la población de los áfidos <i>Rhopalosiphum padi</i> (número de áfidos) alimentados en plantas de <i>Lolium multiflorum</i> con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras planas) el endofito <i>Epichloë occultans</i> y tratadas (SA+) y no tratadas (SA-) con la hormona ácido salicílico .....	32
<b>Figura 4.1</b> Concentración fisiológica de las hormonas ácido salicílico [SA, panel superior (a)] y ácido jasmónico [JA, panel inferior (b)] a los 3 y 21 días desde que las plantas de <i>Lolium multiflorum</i> con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras planas) el hongo endofito <i>Epichloë occultans</i> fueran tratadas (MeJA+, barras grises) y no tratadas (MeJA-, barras blancas) con el metil jasmonato .....	43
<b>Figura 4.2</b> Concentraciones de los alcaloides lolinas [N-formilolina (NFL, barras blancas) and N-acetilnorlolina (NANL, barras punteadas)] producidos por el hongo endofito <i>Epichloë occultans</i> en plantas de <i>Lolium multiflorum</i> tratadas (MeJA+) y no tratadas (MeJA-) con el metil jasmonato .....	44
<b>Figura 4.3</b> Masa corporal de individuos de <i>Spodoptera frugiperda</i> en sus distintos estadios de vida [(a) larva, (b) pupa, y (c) adulto] alimentados en plantas de <i>Lolium multiflorum</i> con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras planas) el endofito <i>Epichloë occultans</i> y tratadas (MeJA+) y no tratadas (MeJA-) con el metil jasmonato .....	45

- Figura 4.4** Tiempos de desarrollo de individuos de *Spodoptera frugiperda* en sus distintos estadios de vida [(a) larva, (b) pupa y (c) adulto] alimentados en plantas de *Lolium multiflorum* con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras plantas) el endofito *Epichloë occultans* y tratadas (MeJA+) y no tratadas (MeJA-) con el metil jasmonato ..... 46
- Figura 4.5** Porcentaje de supervivencia de individuos de *Spodoptera frugiperda* alimentados en plantas de *Lolium multiflorum* con (E+, círculos negros y líneas continuas) y sin (E-, círculos blancos y líneas discontinuas) el endofito *Epichloë occultans* y tratadas [MeJA+, (a)] y no tratadas [MeJA-, (b)] con el metil jasmonato ..... 46
- Figura 5.1** Modificaciones del modelo general propuesto en esta tesis (Figura 1.1) en base a los resultados experimentales (capítulos III y IV) ..... 52

*ÍNDICE DE ANEXOS*

**Anexo 1.1** Lista de artículos utilizados en el meta-análisis (resultados en la Figura 2.2) ... 76

## ABREVIATURAS

A	Alcaloides
ANOVA	Análisis de varianza
<i>d</i>	Tamaño de efecto “d”
E-	Plantas libre de hongos endofitos del genero <i>Epichloë</i>
E+	Plantas simbióticas con hongos endofito del genero <i>Epichloë</i>
EA	Alcaloides efectivos
EE	Error estándar de la media
eJ	Epoxy-jantitrem
erg	Ergovalina
ET	Etileno
GC-MS	Espectrometría de masa en fase gaseosa
HR	Respuesta hipersensible
IA	Alcaloides inefectivos
ISR	Resistencia sistémica inducida
JA	Ácido jasmónico
IFEVA Agricultura	Instituto de Investigación Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la
lol	Lolinas
lotB	Lolitrem B
MeJA	Metil jasmonato
MIR	Resistencia inducida por micorrizas
NANL	N-acetilnorlolina
NFL	N-formilololina
per	Peramina
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
$\chi^2$	Chi cuadrado

## *Resumen*

### **Mecanismos de resistencia a insectos en pastos que forman simbiosis con hongos endofitos**

La herbivoría es una de las principales amenazas para las plantas teniendo impactos negativos no solo en los sistemas naturales sino también en los agro-ecosistemas. De la coevolución con los insectos han surgido en las plantas numerosas estrategias para sortear las amenazas como barreras físicas y bioquímicas. Además, muchas plantas establecen relaciones simbióticas con microorganismos, como los hongos micorrízicos, rizobacterias y hongos endofitos, los cuales inducen los mecanismos de defensa de las plantas, o aportan mecanismos adicionales de defensa como los alcaloides producidos por los hongos endofitos en pastos. Para el caso en particular de la simbiosis pasto-endofito, no existen trabajos que exploren la posibilidad de que ambos mecanismos (los alcaloides fúngicos y los cambios inducidos por el simbiote sobre los mecanismos de resistencia de la planta) funcionen de forma conjunta frente al ataque de insectos. En esta tesis buscamos comprender la interacción entre los mecanismos de resistencia conferidos por la simbiosis con los endofitos y el sistema inmune de la planta frente al ataque de insectos herbívoros. Para ello, avanzamos en un modelo teórico que incorpora conjuntamente el impacto potencial de los endofitos sobre los mecanismos de defensa de las plantas, específicamente el de las hormonas ácido salicílico y ácido jasmónico, y los compuestos tóxicos sintetizados por el hongo (i.e. alcaloides). La validación del modelo propuesto es abordada a través de dos aproximaciones. Primero, una síntesis y análisis cuantitativo de la información existente en la literatura. Segundo, las hipótesis del modelo serán puestas a prueba a través de experimentos manipulativos del estado de la simbiosis y de las hormonas, complementado con la evaluación del crecimiento y/o desarrollo de distintas especies de insectos herbívoros. Combinando experimentos fácticos con herramientas de la química ecológica, este proyecto constituye el primer esfuerzo en integrar el mecanismo de resistencia conferido por los hongos endofitos con los mecanismos de defensa de las plantas.

Palabras Clave: simbiosis, herbivoría, hormonas, *Epichloë*, endofitos, *Lolium multiflorum*, mecanismos de resistencia.

*Abstract***Resistance mechanisms to insect herbivores in grasses symbiotic with fungal endophytes**

Herbivory is one of the most important threats for plants, impacting negatively natural ecosystems and agro-ecosystems. As a result of coevolution with a diverse group of herbivores, plants have acquired a variety of mechanisms and strategies to defend themselves such as physical and biochemical barriers. In addition, many plants establish symbiotic relationships with microorganisms, including mycorrhizal fungi, rhizobacteria, and fungal endophytes, which induce the defense mechanisms of host plants, or provide of an additional defense such as alkaloids produced by endophyte fungi in grasses. In the particular case of the grass-endophyte symbiosis, there are no studies that explore the possibility that both mechanisms (induction of host plant defenses and production of fungal alkaloids) work together against the insect attacks. In this thesis, we seek to understand the interaction between the mechanisms of resistance given by the plant immune system and the fungal endophytes against the attack of herbivore insects. We advance in a theoretical model that incorporates the potential endophytic modulation of plant defense, specifically the phytohormones salicylic acid and jasmonic acid, and the presence of toxic compounds synthesized by the fungus (i.e. alkaloids). The model validation is given through two approaches. First, a synthesis and quantitative analysis of the published information in the literature. Second, the model hypotheses will be tested through the experimental manipulation of the plant symbiotic status and the phytohormones, complemented with the evaluation of the performance of different species of herbivorous insects. Combining factual experiments with tools of the chemical ecology, this project constitutes the first effort to integrate the mechanisms of resistance conferred by fungal endophytes and plant defenses.

Key words: symbiosis, herbivory, hormones, *Epichloë*, endophytes, *Lolium multiflorum*, resistance mechanisms.

# Capítulo I: Introducción general y objetivos de la tesis

---

## Introducción

La herbivoría es una de las principales amenazas para las plantas y sus consecuencias afectan no solo la productividad primaria de los ecosistemas naturales sino también a la producción agrícola (Oerke, 2006; Irisarri *et al.*, 2014). La estrecha relación coevolutiva de las plantas con los herbívoros ha moldeado en gran medida, la distribución y abundancia de las especies de ambos reinos en el planeta. Una de las consecuencias de la presión de selección ejercida por los herbívoros sobre las plantas es la existencia de una gran diversidad de mecanismos de defensa y estrategias que les han permitido -a las plantas- sortear al menos en parte, las amenazas (Strauss & Agrawal, 1999; Walters, 2011; Ballaré *et al.*, 2012). Por otro lado, además de las defensas de las plantas, la asociación simbiótica y mutuamente beneficiosa con microorganismos ha sido una estrategia coevolutiva de tercerización de las funciones de defensa (Thrall *et al.*, 2007; Kiers *et al.*, 2010; Pineda *et al.*, 2013). En ese sentido, existe bastante información sobre cómo las interacciones de provisión más estudiadas [e.g., simbiosis planta-hongos micorrízicos y fabáceas-bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobacterias)], pueden modificar el sistema inmune de la planta, y así la capacidad de las plantas de interactuar con los herbívoros (Walters, 2011; Cameron *et al.*, 2013). Sin embargo, resulta llamativo lo poco que se han estudiado los efectos de las simbiosis proveedoras de servicios de protección, conocidos también como mutualismos defensivos (White & Torres, 2009; Saikkonen *et al.*, 2013; Clay, 2014), sobre los mecanismos de defensa de las plantas. En este proyecto de tesis doctoral, nos propusimos explorar los efectos de una simbiosis de protección sobre los mecanismos de defensa de las plantas usando como modelo de estudio el sistema pastos (tribu Pooideae) - hongos endofitos sistémicos de transmisión vertical. Estos simbiontes se caracterizan por dotar a las plantas de un mecanismo de defensa adicional contra los herbívoros mediante la síntesis de alcaloides tóxicos.

Ante el ataque de los insectos, las plantas presentan una batería de mecanismos de defensa basados en barreras físicas, químicas, fenológicas, entre otras, que asegura un bajo impacto sobre los individuos atacados y la persistencia de las poblaciones (Walters, 2011). Por ejemplo, algunos de los compuestos químicos caracterizados son los terpenos, los flavonoides, los alcaloides, las proteasas, las deaminasas y los compuestos volátiles (Schoonhoven *et al.*, 2005; Walters, 2011). Además, la activación de la respuesta inmune de la planta pueden ser, en líneas generales, constitutiva o inducida. Mientras que las barreras constitutivas se entienden como rasgos que están presentes durante todo el transcurso de la vida del individuo, las inducibles se expresan sólo cuando la planta es atacada (Karban & Baldwin, 1997; Walters, 2011). Además de la interacción con los herbívoros, es muy común que las plantas establezcan relaciones simbióticas positivas con hongos y bacterias (Hartley & Gange, 2008; Rodriguez *et al.*, 2009; Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). Entre las más estudiadas se hallan el mutualismo entre plantas con hongos

micorrízicos y entre fabáceas y rizobacterias (Smith & Read, 2008; Sprent, 2008). La asociación con organismos simbioses tiene como resultado cambios importantes en la fisiología del hospedero con implicancias directas sobre su crecimiento y desarrollo, e indirectas sobre su interacción con el medio abiótico y biótico (Clay & Schardl, 2002; Rodriguez & Redman, 2008; Omacini *et al.*, 2012). En particular para el caso del estrés biótico, se ha propuesto que los simbioses podrían beneficiar a las plantas frente a herbívoros a través de algunos mecanismos: (i) la producción de metabolitos secundarios por parte del simbiote (e.g. alcaloides, antibióticos, sideróforos), o (ii) la inducción de los mecanismos de defensa de la plantas (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011; Pineda *et al.*, 2013). Estos mecanismos son considerados de “resistencia” porque disminuyen el *fitness* de los atacantes (Karban & Baldwin, 1997). Hasta la fecha, los estudios de resistencia a la herbivoría con pastos en simbiosis con hongos endofitos se han enfocado principalmente sobre el papel de los alcaloides (Clay, 1988; Schardl *et al.*, 2012, 2013b,a; Panaccione *et al.*, 2014), mientras que poco se ha explorado en relación a otros mecanismos.

La interacción simbiótica pasto-endofito es considerada un mutualismo defensivo ya que la planta provee de foto-asimilados y de un medio de dispersión del hongo a través de las semillas (i.e. transmisión vertical), mientras que éste protege a la planta de la herbivoría por medio de alcaloides (Clay & Schardl, 2002; Saikkonen *et al.*, 2004). Los hongos endofitos del género *Epichloë* comprenden especies sexuales y asexuales de transmisión vertical y horizontal (Clay & Schardl, 2002; Selosse & Schardl, 2007). La hipótesis coevolutiva propone que las especies *Epichloë* asexuales y de transmisión vertical, comúnmente híbridos de especies sexuales y de transmisión horizontal, habrían evolucionado hacia el mutualismo defensivo al producir mayores cantidades de alcaloides (Selosse & Schardl, 2007; Schardl *et al.*, 2012). La simbiosis con hongos de transmisión vertical tienen una alta especificidad (una especie de hongo es asociada a una especie de pasto), en la cual un hongo endofito crece sistémicamente en el aposplasto de los tejidos aéreos de la planta y durante todo el ciclo de vida del hospedero (Clay & Schardl, 2002; Schardl *et al.*, 2012). Sin embargo, se trata de una simbiosis secundaria ya que la asociación no es vital para las plantas, las cuales pueden vivir sin el hongo (Gundel *et al.*, 2011). Este tipo de simbiosis de transmisión vertical, tiende a generar relaciones simbióticas estables (que perduran en el tiempo ecológico) entre los socios (Gundel *et al.*, 2010)

A fin de poder avanzar en la comprensión de la interacción entre los mecanismos de defensa conferidos por la simbiosis con los hongos endofitos y los mecanismos de defensa propios de los pastos, el objetivo general de este proyecto de tesis doctoral, a continuación se profundiza en los diferentes aspectos necesarios para poder comprender las posibles vías y efectos de los organismos simbioses sobre las respuestas de resistencia de su hospedero.

## **Señalizaciones hormonales que activan los mecanismos de resistencia de las plantas frente a los insectos**

Las plantas poseen una batería de moléculas que les permiten el reconocimiento del tipo de atacante (Ballaré, 2014). En el caso de los insectos, es la composición química específica de su saliva lo que permite a la planta reconocerlos y diferenciarlos de otros tipos de

atacantes (Howe & Jander, 2008). Luego del reconocimiento se desencadena una cascada de señalizaciones intra y extracelular que activan hormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (De Vos *et al.*, 2005; Heil & Ton, 2008; Erb *et al.*, 2012; Pineda *et al.*, 2013). Se ha documentado que la expresión de genes es específica de acuerdo al gremio ecológico al cual pertenece el herbívoro atacante. Es decir, frente al ataque de insectos mandibulados, los cuales mastican e ingieren porciones de tejido de diferentes tamaños, las plantas modulan su respuesta de resistencia por medio del JA y del ET, mientras que frente al ataque de un insecto succionador, los cuales se alimentan de la savia de los líquidos xilemáticos o floemáticos, las plantas responden por medio del SA (Glazebrook, 2005; Walters, 2011; Pieterse *et al.*, 2012; Stam *et al.*, 2014). Las mismas hormonas están involucradas en la respuesta al ataque de patógenos. La resistencia mediada por SA se dispara frente al ataque de hongos biótrosos (Verhage *et al.*, 2010), los cuales se alimentan del tejido vivo de las plantas, mientras que respuestas mediadas por JA/ET se desencadenan frente a patógenos necrótrofos que se alimentan de tejido muerto. Además, se ha visto que las hormonas JA y SA se relacionan generalmente de forma negativa; cuando la vía del SA es activada por un atacante, la vía del JA es reprimida y viceversa. Se han encontrado algunas de las moléculas que regulan este antagonismo. Por ejemplo, la promoción de la vía del SA, por el ataque de un herbívoro o patógeno, activa el gen *NPRI* cuya proteína reprime la expresión del JA en *Arabidopsis* (Thaler *et al.*, 2012).

## **Efecto de las interacciones simbióticas sobre las señalizaciones hormonales de resistencia de las plantas frente a los insectos**

### **El caso de los hongos formadores de micorriza y las rizobacterias**

El establecimiento de las interacciones simbióticas con microorganismos benéficos genera una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en las plantas que garantizan la estabilidad y persistencia de la interacción. Sin embargo, la asociación de las plantas con organismos benéficos como los hongos micorrízicos puede generar un compromiso en la respuesta de resistencia a insectos, es decir, las plantas quedan susceptibles a insectos succionadores de savia, pero no a masticadores (Jung *et al.*, 2012; Gols, 2014). Se especula que esto se debe a que los organismos mutualistas serían reconocidos en una primera instancia como patógenos biótrosos, disparando la vía de resistencia mediada por el SA, lo cual en una segunda instancia sería contrarrestado por el simbionte permitiendo la colonización del hospedero y el establecimiento de la relación mutualista (Zamioudis & Pieterse, 2011). En este sentido, los estudios en hongos micorrízicos y rizobacterias han mostrado que efectivamente en etapas iniciales de la colonización se activan los mecanismos de resistencia mediados por el SA y la expresión de genes relacionados (Paszkowski, 2006; Zamioudis & Pieterse, 2011; Jung *et al.*, 2012). Por otro lado, también se ha visto en ambas interacciones que la vía hormonal del SA se encuentra deprimida una vez establecida la relación simbiótica, lo cual dejaría a las plantas susceptibles a los insectos succionadores.

La vía del JA también muestra cambios en los patrones de expresión en plantas simbióticas. En particular, se plantea que la vía del JA estaría activada una vez establecida la simbiosis, lo cual funcionaría como un mecanismo de control hacia los simbiontes (Zamioudis &

Pieterse, 2011). De hecho, se ha observado una acumulación de JA en plantas con hongos micorrízicos (Hause *et al.*, 2002, 2007) y con rizobacterias (Schäfer *et al.*, 2009). Desde el punto de vista de la defensa, una consecuencia es que las plantas serían especialmente resistentes a los insectos masticadores (Jung *et al.*, 2012), lo cual ha sido documentado tanto en las asociaciones planta-micorriza (Pozo *et al.*, 2008) como para las asociaciones planta-rizobacterias (Van Oosten *et al.*, 2008).

En resumen, el mantenimiento y la estabilidad de la relación mutualista se establece por medio de un balance delicado entre la supresión por parte de simbionte de la vía del SA, y del control del simbionte por parte de la planta a través del JA. Todo este “reordenamiento” hormonal tiene implicancias importantes sobre las respuestas inmune de las plantas a los insectos herbívoros.

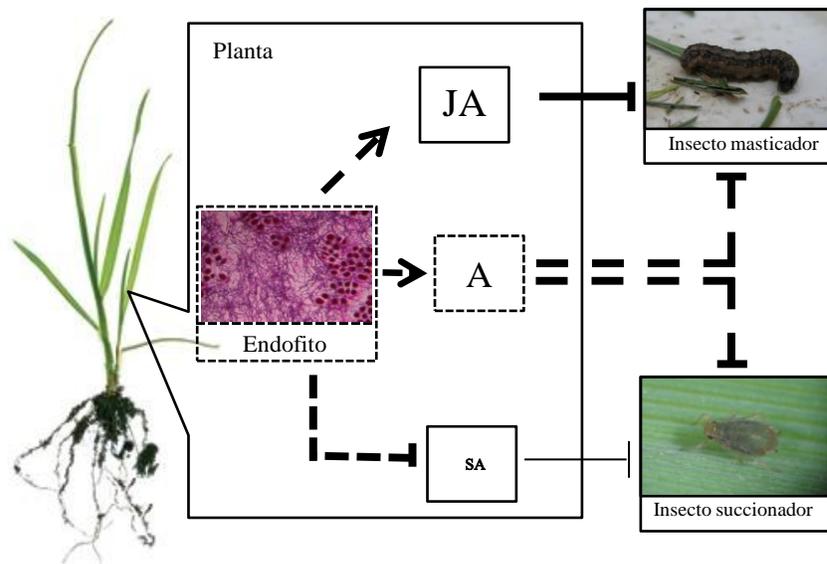
### **El caso de los endofitos *Epichloë***

Hasta la fecha prácticamente no existen trabajos que hayan evaluado el efecto de la presencia de hongos endofitos sobre las vías de señalización hormonal de defensa de las plantas frente a los insectos. No obstante, los antecedentes provenientes desde otras simbiosis nos ofrecen ideas sobre las modificaciones hormonales que podrían provocar los endofitos sobre sus hospederos. De hecho, es posible que los endofitos provoquen un reordenamiento hormonal similar al encontrado en las simbiosis con micorrizas y rizobacterias, dado que los endofitos también son microorganismos biótrofos (Partida-Martínez & Heil, 2011). Específicamente, es esperable que los hongos endofitos posean mecanismos de contención de la defensas de las plantas mediadas por el SA y así mantener la relación mutualista, promoviendo simultáneamente la activación de la vía del JA. Como en las otras interacciones mutualistas, la consecuencia de este reordenamiento hormonal sería que las plantas presentarían un mayor nivel de resistencia mediada por vía del JA.

El mecanismo de defensa más estudiado en la simbiosis con hongos endofitos es la producción de alcaloides con efectos negativos sobre herbívoros vertebrados e invertebrados (Schardl *et al.*, 2012, 2013b; Saikkonen *et al.*, 2013; Schardl *et al.*, 2013a; Panaccione *et al.*, 2014). Los alcaloides producidos por los endofitos han sido clasificados en cuatro clases, las pirrolizidinas (que incluye a las lolinas), ergotes, indol-diterpenos (que incluyen a los lolitrens) y las pirrolopirazina (que incluye a las peraminas). La especificidad de cada uno de estos alcaloides depende en mayor medida de la especie de atacante más que del gremio ecológico al que pertenece (Saikkonen *et al.*, 2010). Un hongo endofito puede sintetizar uno, dos o tres clases químicas de alcaloides (Saikkonen *et al.*, 2013). No obstante, la expresión *in planta* tanto de la cantidad como del tipo de alcaloide depende de la interacción genotípica planta-endofito como así también de las condiciones ambientales abióticas y bióticas (Eichenseer *et al.*, 1991; Roylance *et al.*, 1994; Bultman & Ganey, 1995; Boning & Bultman, 1996; Malinowski *et al.*, 1998b; Malinowski & Belesky, 2000; Bultman *et al.*, 2004; Spiering *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

## Hacia un modelo integrador de los mecanismos de resistencia mediados por hongos endofitos y los mecanismos de defensa propios de las plantas

Teniendo en cuenta los cambios potenciales en la respuesta inmune frente a los insectos en los pastos simbióticos con hongos endofitos, proponemos un modelo que considera específicamente tanto la promoción de las defensas de la planta dependientes de las hormonas como la producción de compuestos tóxicos de origen fúngico como los mecanismos de resistencia frente a los atacantes. Como fuera mencionado anteriormente, en este proyecto se propone que (i) el mantenimiento del sistema pasto-endofito supone un reordenamiento hormonal en los hospederos que tiene repercusiones en el nivel de resistencia frente al ataque de distintos gremios ecológicos de insectos, es decir, un sistema de defensa activado frente a los insectos masticadores y deprimido frente a los succionadores (Figura 1.1). De forma simultánea, (ii) los hongos endofitos confieren de material genético para la síntesis de los alcaloides, que son compuestos tóxicos para los insectos y que actúan de manera especie-específica (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Modelo hipotético que describe los mecanismos de resistencia de pastos simbióticos con hongos endofitos *Epichloë* frente a dos gremios ecológicos de insectos. Además de las defensas proporcionadas por el sistema inmune de las plantas [principalmente el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA)], los endofitos producen alcaloides (A) con propiedades de anti-herbivoría. Frente a un insecto masticador dado, la planta con el endofito posee potencialmente una dupla de mecanismos de resistencia, la respuesta mediada por el JA y la basada en los alcaloides fúngicos. En cambio frente a un insecto succionador dado, la planta posee sólo los alcaloides. Las flechas indican regulaciones positivas y las líneas trunca regulaciones negativas. Las líneas discontinuas

representan interacciones reguladas por el endofito. Notar que la diferencia en el tamaño de las letras en las hormonas indica la activación (mayor tamaño) o inactivación (menor tamaño) de las vías hormonales.

Además de los aspectos generales, el modelo propuesto (Figura 1.1) permite predecir la respuesta inmune de las plantas simbióticas en cuatro posibles escenarios. Si la planta tiene un hongo endofito que produce alcaloides con baja o nula efectividad frente a los insectos masticadores y succionadores, entonces presentaría (I) una respuesta de resistencia contra los primeros mediada por la vía del JA y (II) una de susceptibilidad frente a segundos debido a la supresión de la vía del SA. Por otro lado, si la planta tiene un hongo endofito que produce alcaloides efectivos contra ambos tipos de atacantes, entonces habría (III) una defensa frente a insectos masticadores mediada por la vía del JA y los alcaloides, y (IV) una de resistencia a los succionadores debida a los alcaloides.

Este proyecto de tesis doctoral tiene como objetivo entender la interacción entre los mecanismos de defensa conferidos por los hongos endofitos y sus plantas hospederas frente a insectos (Figura 1.1). El modelo propuesto considera que los mecanismos de defensa mediados por hongos endofitos involucran una mayor complejidad que la sola producción de alcaloides, tal como demuestra la literatura especializada en otras simbiosis.

Los resultados obtenidos de este proyecto servirán para: (i) entender como los microorganismos simbioses pueden modificar las respuestas de resistencia de las plantas frente a insectos, (ii) para comprender las respuestas de defensa resultantes de las interacciones entre los mecanismos de resistencia de la planta y los conferidos por los simbioses, y (iii) entender la señalización hormonal relacionada con defensas que se encuentra modulada por el diálogo cruzado entre el simbiote y la planta hospedera.

## **Objetivos, hipótesis y predicciones**

### **Objetivo general**

Avanzar en la comprensión de la interacción entre los mecanismos de defensa conferido por la simbiosis con los hongos endofitos en pastos y los mecanismos de defensa de las plantas hospederas frente al ataque de insectos herbívoros.

### **Objetivos específicos**

*Objetivo específico 1:* Puesta a prueba del modelo hipotético (Figura 1.1) y sus predicciones a través de una revisión bibliográfica y un meta-análisis cuantitativo.

*Hipótesis 1.1:* Los pastos con hongos endofitos presentan mecanismos de defensa mediado por los alcaloides y por la activación de defensas dada la presencia del simbiote, dependiendo del perfil de alcaloides, el gremio ecológico y la especie a la cual pertenece el insecto atacante.

*Predicción 1.1.1:* Las plantas con un hongo endofito que no produce alcaloides efectivos contra los atacantes, presentarán una respuesta de resistencia mediada por el JA contra los insectos masticadores y de susceptibilidad frente a los succionadores.

*Predicción 1.1.2:* Las plantas con un hongo endofito que produce alcaloides efectivos sólo contra los masticadores, presentarán una respuesta de defensa complementaria entre la de los alcaloides y la resistencia dada por el JA, y susceptibilidad frente a los succionadores.

*Predicción 1.1.3:* Las plantas con un hongo endofito que produce alcaloides efectivos sólo contra los succionadores, presentarán una respuesta de resistencia mediada por el JA contra los insectos masticadores y resistencia mediada por alcaloides frente a los succionadores.

*Predicción 1.1.4:* Las plantas con un hongo endofito que produce alcaloides efectivos contra ambos gremios, presentarán una respuesta de defensa complementaria ante los masticadores (mediada por los alcaloides y el JA) y una de defensa frente a los succionadores mediada sólo por los alcaloides.

*Objetivo específico 2:* Evaluar las consecuencias del reordenamiento de las hormonas relacionadas con la resistencia a los insectos, en particular la modulación del SA, en la planta hospedera debido a la simbiosis con el hongo endofito.

*Hipótesis 2.1:* El aumento en la concentración interna del SA tiene un impacto dual de sentido contrario sobre los participantes de la simbiosis ya que por un lado, afecta negativamente al hongo endofito y las defensas por éste conferidas, y por el otro, afecta positivamente a la planta induciendo las defensas contra los insectos succionadores.

*Predicción:* El aumento en la concentración interna del SA deprime la defensa conferida por los alcaloides y promueve la respuesta de defensa de la planta, lo que afecta de forma positiva y negativa, respectivamente, el crecimiento de las poblaciones de insectos succionadores.

*Objetivo específico 3:* Evaluar las consecuencias del reordenamiento de las hormonas relacionadas con la resistencia a los insectos, en particular la modulación del JA, en la planta hospedera debido a la simbiosis con el hongo endofito.

*Hipótesis 3.1:* El aumento en la concentración interna del JA tiene un efecto positivo sobre los participantes de la simbiosis ya que por un lado, no afecta al hongo endofito y a las defensas por éste conferidas, y por el otro, induce la defensa de la planta contra los insectos masticadores.

*Predicción:* El aumento en la concentración interna del JA afectará negativamente el crecimiento y desarrollo de los insectos masticadores debido al efecto combinado de los alcaloides y la defensa dependiente del JA.

## **Organización de la tesis**

La tesis se organizó a partir de los objetivos presentados más arriba. Este primer capítulo describió el estado del conocimiento y plantea las preguntas y objetivos que se pretenden responder. En el capítulo II, correspondiente al objetivo específico 1, se busca validar el modelo conceptual (Figura 1.1) tomando una doble aproximación; una revisión

bibliográfica sobre estado de las defensas de las plantas con el endofito y la puesta a prueba de las predicciones del modelo por medio de un meta-análisis cuantitativo. Los capítulos III y IV, correspondientes a los objetivos específicos 2 y 3, respectivamente, constituyen la parte experimental de la tesis donde se plantea la manipulación de las hormonas SA y JA en el modelo de estudio *Lolium multiflorum* – *Epichloë occultans*, y el ataque de las plantas por parte insectos pertenecientes a distintos gremios (el succionador *Rhopalosiphum padi* y el masticador *Spodoptera frugiperda*). El capítulo III estudia el efecto de la hormona SA sobre los mecanismos de defensa de plantas en simbiosis con hongos endofitos atacadas por insectos succionadores, el IV estudia el efecto del JA sobre las defensas de plantas con endofito atacadas por insectos masticadores. Finalmente, el capítulo V contiene las conclusiones y analiza la contribución general de esta tesis al conocimiento. Además, se presentan las perspectivas surgidas a partir de los resultados de estas tesis, en forma de preguntas que buscan incentivar y guiar la investigación futura.

Cada uno de los capítulos II, III, IV, presenta secciones propias de introducción, métodos, resultados y discusión. De esta manera cada capítulo introduce sus marcos conceptuales específicos, análisis y conclusiones, donde en ocasiones se hace referencia a los capítulos previos. A pesar de la independencia de cada uno de los capítulos, existe lógicamente cierto solapamiento ya que algunos conceptos y/o partes del marco conceptual general son comunes.

## Capítulo II: Hongos endofitos *Epichloë* y defensas de las plantas. No sólo alcaloides (\*)

---

### Introducción

La herbivoría es una de las grandes amenazas que enfrentan las plantas, afectando la productividad primaria neta de los ecosistemas naturales y causando importantes pérdidas económicas en la agricultura (Oerke, 2006). Como resultado de la coevolución con los herbívoros, las plantas han desarrollado diversos mecanismos y estrategias de defensa (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven *et al.*, 2005; Ballaré, 2014). Además, las plantas establecen interacciones simbióticas con microorganismos como hongos y bacterias mutualistas, parásitos y patógenos, los cuales pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales sobre el *fitness*. Mientras que los mecanismos de defensa de las plantas han sido muy bien estudiados (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven *et al.*, 2005; Thaler *et al.*, 2012; Ballaré, 2014), es menos claro cómo funcionan estas defensas cuando las plantas se asocian simbióticamente con microorganismos benéficos.

La asociación simbiótica con microorganismos modifica las relaciones entre las plantas y los herbívoros (Koricheva *et al.*, 2009; Pineda *et al.*, 2013; Saikkonen *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014). Se ha señalado que la simbiosis con hongos micorrízicos y ciertas rizobacterias promueven un aumento en el nivel de defensa de las plantas como consecuencia de la modulación del sistema inmune del hospedero (Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; Porrás-Alfaro & Bayman, 2011; Cameron *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014; Pozo *et al.*, 2015). Específicamente, estos simbiosiontes modulan las hormonas involucradas en las defensas de las plantas, lo que les permite colonizar con éxito al hospedero y establecer una simbiosis estable (Gutjahr, 2014; Pozo *et al.*, 2015).

Se conoce poco sobre los efectos de los hongos endofito *Epichloë* de transmisión vertical sobre los mecanismos de defensa de las plantas. Los endofitos son una fuente activa de alcaloides, compuestos químicos que protegen a las plantas contra los herbívoros (Schardl *et al.*, 2004, 2013b). Por lo tanto, la simbiosis pasto-endofito es considerada un caso de "mutualismo defensivo" (Clay, 1988). Sin embargo, es sorprendente lo poco que se sabe acerca de los efectos que tienen los hongos endofitos sobre el sistema inmune de sus plantas hospederas. De hecho, de 109 artículos publicados sobre los efectos de la simbiosis con los endofitos en la interacción planta-herbívoro, sólo 3 discuten temas relacionados con las vías hormonales implicadas en la defensa de las plantas (base de datos Scopus®, diciembre de 2016). En este sentido, proponemos que una mejor comprensión de los diferentes resultados ecológicos de la simbiosis pasto-endofito se podría lograr mediante la integración del mecanismo de defensa basado en los alcaloides y los efectos de la simbiosis sobre la respuesta inmune de los hospederos.

Los efectos positivos de los endofitos *Epichloë* en la defensa de las plantas se ha atribuido tradicionalmente a los alcaloides fúngicos. Los alcaloides son compuestos ricos en nitrógeno y para el caso de los endofitos cuatro clases han sido bien caracterizados: ergotes

(ergopeptina y ergovalina), indol-diterpenos (i.e. lolitrem B y epoxi-janthitrem), pirrolizidinas (lolinas) y peraminas (Schardl *et al.*, 2012, 2013b; Saikkonen *et al.*, 2013; Schardl *et al.*, 2013a; Panaccione *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2015). Todas las enzimas para la síntesis de los alcaloides están codificadas en el genoma del hongo y la mayoría de las rutas de biosíntesis han sido dilucidadas (Schardl *et al.*, 2007, 2013b; Young *et al.*, 2015). El perfil de alcaloides dependen de la especie del endofito y la cepa del hongo, y la concentración de los alcaloides depende del tejido, la etapa fenológica de la planta y las condiciones ambientales (Ball *et al.*, 1995; Justus *et al.*, 1997; Saikkonen *et al.*, 2013). Además, la efectividad de la defensa basada en los alcaloides contra un atacante dado depende de la concentración y del tipo químico de alcaloide producido por el endofito (Saikkonen *et al.*, 2006, 2010; Schardl *et al.*, 2013b; Saikkonen *et al.*, 2013).

Con el fin de entender efectos de la simbiosis con hongos endofitos *Epichloë* sobre la relación planta-herbívoro, avanzamos en un modelo que toma en cuenta no sólo los alcaloides fúngicos sino también los potenciales cambios en las vías hormonales de defensa de las plantas [principalmente el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA)]. Basado en el conocimiento derivado de otras simbiosis, para las cuales se dispone de mayor información (e.g., interacciones planta-micorrizas y planta-rizobacterias), el modelo incorpora la modulación potencial, por parte de los hongos endofitos, de las hormonas de defensa de las plantas. El modelo permite predecir si las plantas con endofitos serían defendidas contra insectos pertenecientes a diferentes gremios ecológicos y cuál mecanismo(s) explicaría el fenotipo de defensa (Figura 2.1).

Para validar el marco conceptual y las predicciones del modelo tomamos dos enfoques complementarios. Primero, revisamos la literatura buscando evidencias que muestren el efecto del endofito sobre el sistema inmune de las plantas. En segundo lugar, las predicciones del modelo se evaluaron a través de un meta-análisis estándar de resultados ya publicados. La fortaleza del modelo es que ofrece un marco conceptual robusto para entender el funcionamiento de la interacción planta-endofito bajo diferentes escenarios de herbivoría.

### **Mecanismos de defensa de las plantas contra los insectos**

Los mecanismos de defensa en plantas se clasifican como constitutivos, si están activos por defecto, o inducibles, si se activan ante un ataque (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven *et al.*, 2005). En comparación con los mecanismos constitutivos de resistencia, se cree que la expresión inducible ha evolucionado como una estrategia con un costo relativamente bajo (Karban & Baldwin, 1997; Thaler *et al.*, 2012). Ejemplos de defensas inducibles en plantas incluyen la respuesta hipersensible (HR), la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la producción inducida de toxinas, compuestos anti-nutricionales y volátiles. Estas respuestas son controladas por un grupo de hormonas que incluyen el SA, el JA y el etileno (ET) (Karban & Baldwin, 1997; Thaler *et al.*, 2012; Ballaré, 2014). El SA y el JA son hormonas importantes involucradas en las respuestas de las plantas frente a insectos herbívoros y patógenos (Bari & Jones, 2009; Thaler *et al.*, 2012; Vos *et al.*, 2013). El modelo predominante establece que las defensas dependientes del SA son efectivas contra los patógenos biotrófos y los insectos succionadores de savia, mientras que las defensas dependientes del JA son eficaces contra los patógenos necrótrofos y los insectos masticadores (Kunkel & Brooks, 2002; Glazebrook, 2005; Thaler *et al.*, 2012; Ballaré *et*

al., 2012; Schwartzberg & Tumlinson, 2014; Schweiger *et al.*, 2014). Además, en varias especies de plantas se ha observado que ambas hormonas (SA y JA) tienen relaciones antagónicas (Thaler *et al.*, 2012).

### **Efectos de microorganismos benéficos sobre la inmunidad de las plantas**

La asociación simbiótica entre las plantas con microorganismos benéficos puede tener importantes consecuencias sobre el sistema inmune del hospedero (Saikkonen *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014; Balmer *et al.*, 2015). Algunas especies de rizobacterias y hongos micorrízicos inducen tipos especiales de defensas sistémicas, denominadas resistencia sistémica inducida (ISR, del inglés *induced systemic resistance*) y resistencia inducida por micorrizas (MIR, del inglés *mycorrhiza induced resistance*), respectivamente (Verhagen *et al.*, 2004; Van der Ent *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014; Pozo *et al.*, 2015). Esencialmente, ISR y MIR se distinguen de otros mecanismos de resistencia inducida porque las plantas simbióticas presentan “cebada” (o en inglés “primed”) la vía de defensa dependiente del JA. Comparadas con plantas no simbióticas, las plantas cebadas (o primed) presentan respuestas de defensa más rápidas, más tempranas, más fuertes, y/o más sostenidas frente al ataque de patógenos o insectos (Pineda *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014; Martínez-Medina *et al.*, 2016). El mecanismo detrás del “cebado” (o en inglés, “priming”) no está completamente claro, pero pareciera que se debe a la acumulación de factores de transcripción y de proteínas de señalización de defensas en las células. Estos factores permanecen inactivos en los ambientes libres de enemigos, pero se activan cuando se detecta un atacante potencial, lo que finalmente termina promoviendo una respuesta más rápida de defensa (Frost *et al.*, 2008; Conrath, 2011; Pieterse *et al.*, 2014; Martínez-Medina *et al.*, 2016).

El priming de las defensas y otras modificaciones del sistema inmune de las plantas es consecuencia del diálogo molecular con los microorganismos durante la colonización y el establecimiento de la simbiosis (Gutjahr, 2014; Pozo *et al.*, 2015). En la colonización, las plantas reconocen al microorganismo, ya sea rizobacterias u hongos micorrízicos, como patógenos biótropos activando la vía del SA, y el microorganismo responde reprimiendo esa vía por medio de efectores específicos, estableciendo así una interacción permanente con el hospedero (Paszkowski, 2006; Zamioudis & Pieterse, 2011; Jung *et al.*, 2012; Pozo *et al.*, 2015). Como consecuencia de esta comunicación entre los socios, una simbiosis bien establecida muestra por un lado, la vía del SA reprimida y por el otro, un aumento en los niveles del JA, de los precursores del JA y de los genes reguladores de la respuesta del JA (Jung *et al.*, 2012; Wasternack & Hause, 2013; Pieterse *et al.*, 2014; Pozo *et al.*, 2015). En las plantas micorrízicas, la promoción de la vía del JA parece estar involucrada con la regulación del desarrollo y del funcionamiento de los simbiontes (Hause *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2012; Pozo *et al.*, 2015). Algunas de las moléculas efectoras que controlan la vía del SA ya han sido identificadas. Por ejemplo, el hongo micorrízico *Gigaspora margarita* produce la  $Ca^{2+}$ /calmodulina quinasa DMI3 que suprime algunos de los genes relacionados con la biosíntesis del SA en *Medicago truncatula* (Siciliano *et al.*, 2007). También algunos factores Nod producidos por la rizobacteria *Rhizobium meliloti* regulan negativamente la vía del SA de la planta hospedera (Martínez-Abarca *et al.*, 1998).

La regulación de las vías del SA y JA promovida por los microorganismos benéficos podría explicar el patrón de resistencia diferencial de las plantas simbióticas frente a los insectos

herbívoros de distintos gremios. Mientras que las plantas simbióticas se encuentran bien defendidas frente a los insectos masticadores, son generalmente susceptibles a los herbívoros succionadores (Hartley & Gange, 2008). Esto se debería al priming de la vía del JA y a la regulación negativa de la vía del SA (Van der Ent *et al.*, 2009; Pineda *et al.*, 2010; Zamioudis & Pieterse, 2011; Jung *et al.*, 2012; Gols, 2014).

### **Cambios en el sistema inmune de la planta promovidos por los hongos endofitos *Epichloë***

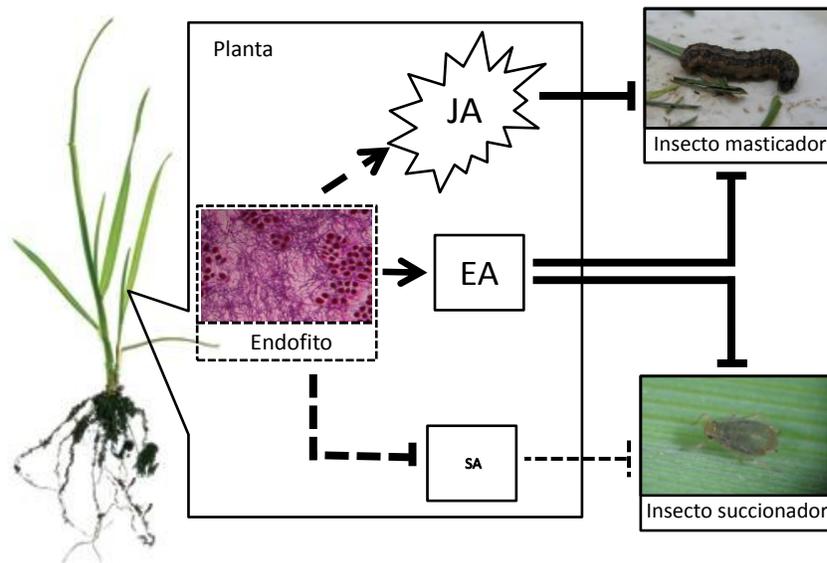
Mientras que nuestra comprensión del impacto de las rizobacterias y los hongos micorrízicos en las defensas de las plantas ha aumentado rápidamente, virtualmente no se sabe nada acerca de los efectos de los endofitos sobre la respuesta inmune de las plantas hospedadoras. Se ha observado, sin embargo, que la simbiosis con los hongos endofitos trae consigo un cambio significativo en el programa transcripcional de las plantas. Un estudio reciente con el sistema *Lolium perenne*-*E. festucae* var. *lolii* mostró que un 38% de los genes de la planta están diferencialmente expresados dependiendo del estado simbiótico (Dupont *et al.*, 2015). La lista incluye a genes de la categoría GO asociados con el metabolismo primario y secundario, genes de respuesta a factores de estrés biótico-abiótico y también genes de respuesta a hormonas (Dupont *et al.*, 2015). Además, algunos de los genes de la planta relacionados con la biosíntesis y señalización del SA se encontraron regulados negativamente en las plantas con el endofito (Dupont *et al.*, 2015). De una forma similar a lo observado en otras simbiosis, ésta regulación de la vía del SA podría ser resultado de una supresión activa por parte del hongo endofito (Stacey *et al.*, 2006; Pozo *et al.*, 2015; Yasuda *et al.*, 2016). La acción podría ser llevada a cabo por una enzima sintetizada por el endofito llamada salicilato hidroxilasa que ya ha sido identificada en el sistema simbiótico *Festuca rubra*-*E. festucae* (Ambrose & Belanger, 2012). La SA hidroxilasa cataliza el cambio del salicilato (un precursor del SA) a catecol, un producto inactivo (Ambrose & Belanger, 2012). Además, se ha observado que algunos genes marcadores de la vía del SA también se hallan diferencialmente regulados cuando el endofito está presente. Por ejemplo, varios genes *PR* están regulados negativamente en los sistemas *L. perenne*-*E. festucae* var. *lolii* y *Schedonorus arundinaceus*-*E. coenophiala* (Johnson *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2015). Además de los cambios observados en la vía del SA, otro estudio sugiere que la presencia del endofito podría afectar la vía del JA. En plantas de festuca alta (*S. arundinaceus*) simbióticas con el endofito *E. coenophiala* se ha encontrado una mayor expresión del gen *TFF41* de la planta. La proteína TFF41 tiene una alta similitud con la enzima FAD  $\omega$ -3, de la papa y del perejil, la cual aumenta la concentración de ácidos grasos trienoicos, precursores del JA (Johnson *et al.*, 2003). A pesar de ello no está claro si la regulación positiva del gen *TFF41* conduce realmente a un aumento en la concentración del JA.

Evidencias indirectas también apoyan la idea de que los endofitos *Epichloë* suprimirían la respuesta inmune mediada por el SA en las plantas. Por ejemplo, se ha encontrado que algunas plantas con endofito son susceptibles a un grupo de patógenos biótrofos, incluyendo a *Puccinia graminis*, *Blumeria graminis*, *Typhula ishikariensis* y *Claviceps purpurea* (Welty *et al.*, 1991, 1993; Wäli *et al.*, 2006; Krauss *et al.*, 2007b; Pańka Dariusz *et al.*, 2011; Sabzalian *et al.*, 2012). Además, otras evidencias sugieren que la regulación negativa de la vía del SA podría ir acompañada de una promoción de la respuesta mediada por el JA. Por ejemplo, el efecto negativo del endofito *E. festucae* var. *lolii* cepa AR1 sobre

el crecimiento del insecto masticador *Heteronychus arator*, pareciera haber sido causado por un mecanismo de defensa de la planta más que por los alcaloides producidos por el hongo (Popay & Baltus, 2001). En estudios recientes se han ido revelando las moléculas que podrían explicar ésta resistencia independiente de los alcaloides. Por ejemplo, estudios metabolómicos han mostrado que plantas con el endofito *L. perenne* tienen una concentración alta de fenilpropanoides (Rasmussen *et al.*, 2008, 2009) y una regulación positiva de sus genes de síntesis (Dupont *et al.*, 2015). Además, se han detectado niveles altos de compuestos fenólicos en plantas *S. arundinaceus* y *L. perenne* simbióticas con los endofitos *E. coenophiala* y *E. festucae* var. *lolii*, respectivamente (Malinowski *et al.*, 1998a; Pańka *et al.*, 2013). Queda pendiente, sin embargo, dilucidar si este efecto positivo de los endofitos en la acumulación de compuestos fenólicos depende de la activación de la vía del JA.

### **Hacia un modelo integrador de defensas en plantas en simbiosis con hongos endofitos *Epichloë***

Proponemos que los hongos endofitos aumentan la resistencia de las plantas a la herbivoría a través de dos mecanismos: la producción de alcaloides fúngicos y la promoción de la vía del JA de la planta hospedera. Si bien las defensas dependientes del JA serían eficaces contra un amplio espectro de insectos masticadores, las defensas basadas en los alcaloides serían más específicas, dependiendo del tipo de alcaloide y la identidad del atacante. Como se describe para otras interacciones simbióticas, la promoción de la vía del JA sería una consecuencia de la manipulación del sistema inmune de la planta por parte del endofito. El modelo conceptual está representado gráficamente en la Figura 2.1 y predice escenarios de resistencia o susceptibilidad de las plantas con el endofito, dependiendo de la especie del endofito y del gremio ecológico al que pertenece el insecto herbívoro.



**Figura 2.1** Representación esquemática que muestra los efectos combinados de las defensas producidas por los endofitos *Epichloë* (alcaloides) y las defensas propias de la planta sobre la resistencia a los insectos pertenecientes a dos gremios ecológicos. En el caso representado en la figura, el endofito posee un perfil de alcaloides efectivos (EA) contra las especies de insectos masticadores y succionadores de savia. Las defensas de las plantas, mediadas por el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA), son sólo efectivas contra los insectos masticadores porque, según el modelo, las defensas contra los insectos succionadores son dependientes del SA, el cual se encuentra reprimido por el endofito. El modelo predice que la resistencia de las plantas a insectos succionadores depende únicamente de la efectividad de los alcaloides producidos por el hongo, mientras que la resistencia a los insectos masticadores está mediada por las defensas dependientes de EA y del JA. Las flechas indican una regulación positiva y los conectores truncados una inhibición o regulación negativa. Las líneas sólidas indican conexiones funcionales que están bien documentadas en la literatura. Las líneas discontinuas denotan supuestos del modelo que requieren pruebas adicionales mediante experimentos.

*Respuesta predicha de plantas con el endofito frente a insectos succionadores de savia y masticadores:* Los hongos endofitos regulan negativamente la vía del SA, lo que daría como resultado un estado de susceptibilidad de las plantas a los insectos succionadores. Sin embargo, si un simbionte dado produce alcaloides efectivos (EA, del inglés *effective alkaloid*) contra una especie determinada de insecto succionador, el modelo predice un fenotipo resistente mediado por los alcaloides (Figura 2.1). Por el contrario, si el simbionte no produce alcaloides que sean efectivos contra los insectos succionadores [es decir, produce alcaloides inefectivos, IA (del inglés, *ineffective alkaloid*)], el modelo predice que las plantas simbióticas serán susceptibles a los insectos de ese gremio.

La vía del JA debería estar permanentemente “cebada” en las plantas hospederas bajo la acción del endofito, lo que daría lugar a una mayor resistencia a los insectos masticadores. Por lo tanto, si el endofito es una fuente de EA contra una especie particular de insecto masticador, el modelo predice una respuesta de resistencia, mediada por los alcaloides y la vía del JA (Figura 2.1). En cambio, si el simbiote produce IA para un insecto masticador dado, el modelo predice una respuesta de resistencia mediada sólo por las defensas dependientes del JA.

## **Materiales y Métodos**

Con el fin de probar las predicciones del modelo (Figura 2.1), revisamos la literatura publicada cuyos resultados fueron sintetizados y cuantitativamente analizados a través de un meta-análisis estándar.

### **Criterios de selección de los experimentos incluidos en el meta-análisis**

Buscamos experimentos que examinaran explícitamente hipótesis relacionadas con el efecto de los endofitos sobre la resistencia de las plantas a los insectos herbívoros. La compilación de experimentos fue hecha revisando una serie de trabajos tipo “review” del tema (Clay, 1988; Latch, 1993; Breen, 1994; Whipps, 2004; Popay & Bonos, 2005; Hartley & Gange, 2008; Saikkonen *et al.*, 2010) y complementada con una búsqueda basada en palabras clave en el buscador científico SCOPUS® (palabras claves: endophyte mutualism, endophyte fungi AND insect, endophyte symbiosis AND insect, endophytic alkaloids).

En todos los experimentos seleccionados se comparó el crecimiento y/o desarrollo de los insectos criados en plantas simbióticas (E+) y no simbióticas (E-) con el endofito (Anexo 1.1). Los criterios para incluir un experimento en nuestra base de datos fueron que: (i) las especies de pasto pertenecieran a la familia Poaceae (subfamilia Poöideae) y las especies de hongos al género *Epichloë* (Clavicipitaceae, Ascomycota; ver Leuchtman *et al.*, 2014) (ii) el experimento se realizara *in planta* (a campo, en invernáculo o laboratorio); (iii) el perfil de los alcaloides se informara explícitamente o estuviera disponible en la literatura especializada (por ejemplo en Schardl *et al.*, 2012, 2013b,a; Panaccione *et al.*, 2014); (iv) el insecto fuera un masticador o un succionador de savia; (v) la variable de respuesta medida en el insecto fuera una medida del crecimiento y/o desarrollo del individuo o de la población, como la masa corporal (peso), la tasa de crecimiento relativo, la fecundidad o el tamaño de la población; y (vi) la variable de respuesta presentara un valor de media, varianza y tamaño de la muestra en forma numérica o gráfica. Cuando la variable de respuesta se generó a partir de un diseño factorial (por ejemplo, endofito x fertilización) o de un experimento de medidas repetidas, los datos se obtuvieron a partir del grupo control o de la medición final, respectivamente. En estudios donde el mismo experimento se repitió de forma independiente, los datos se obtuvieron del experimento con mayor número de repeticiones.

La base de datos final incluyó 29 artículos publicados y un experimento no publicado (véase más adelante), sumando un total de 39 experimentos independientes (Anexo 1.1). La base de datos incluyó una amplia gama de especies de plantas (n = 8), de insectos (4

succionadores de savia y 5 especies de masticadores) y de hongos endofitos (n = 8). Entre los hongos incluidos hubieron especies de endofitos silvestres y mutantes (i.e. *E. festucae* Lol-), y cepas (i.e. *E. coenophiala* AR542, *E. festucae* var. *Lolii* AR37 y AR1).

El único estudio no publicado provino de un experimento llevado a cabo por nuestro equipo (Bastías *et al.*, no publicado), tratándose de un bioensayo con plantas E+ y E- (sistema *L. multiflorum*-*E. occultans*) y larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). Las larvas provinieron de una colonia de insectos criados con dieta artificial y durante varias generaciones en nuestro laboratorio. Durante la primavera, 5 plantas E+ y 5 E- se cultivaron individualmente en macetas de 0,5 L durante 2 meses en una cámara de crecimiento (temperatura: 25°C, fotoperiodo: 14/10 día/noche, radiación: 1888 Mj m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>). Bajo las mismas condiciones ambientales de la cámara, a cada planta se le puso una (1) larva de 15 días de edad por un periodo de 10 días. El peso final de las larvas después de 10 días de alimentación en las plantas se utilizó como variable respuesta para el meta-análisis (ver Anexo 1.1).

Para poner a prueba las predicciones del modelo, primero determinamos qué tipo de alcaloides son efectivos (EA) o inefectivos (IA) como defensa para cada una de las especies de insectos incluidas en la base de datos (Cuadro 2.1). Los alcaloides se consideraron EA si las evidencias disponibles muestran un efecto negativo sobre el crecimiento y/o desarrollo del herbívoro específico, en cambio, se los consideró IA si la evidencia apunta a un efecto neutro o incluso positivo. Esta información se obtuvo a partir de experimentos comparando los efectos entre endofitos silvestres y mutantes para las vías de síntesis de alcaloides o entre cepas de hongos con perfiles contrastantes de alcaloides y de bioensayos usando dietas artificiales con varios tipos de alcaloides fúngicos (ver referencias en Cuadro 2.1). Con esta información, evaluamos si cada uno de los simbioses incluidos en el Anexo 1.1 poseen EA o no para el insecto atacante utilizado en cada estudio.

**Cuadro 2.1** Efectividad de los alcaloides para cada especie de insecto utilizada en el estudio.

Especie de insecto	Gremio alimenticio	Ergot	Indole-diterpeno	Lolina	Peramina	Referencias
<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	IA	ND	EA	IA	Johnson <i>et al.</i> , 1985; Eichenseer <i>et al.</i> , 1991; Wilkinson <i>et al.</i> , 2000; Hunt & Newman, 2005; Panaccione <i>et al.</i> , 2014
<i>Schizaphis graminum</i>	Succionador	IA	ND	EA	EA	Siegel <i>et al.</i> , 1990; Breen, 1992; Wilkinson <i>et al.</i> , 2000
<i>Diuraphis noxia</i>	Succionador	EA	ND	EA	ND	Clement <i>et al.</i> , 1997
<i>Balanococcus poae</i>	Succionador	EA	ND	ND	EA	Pennell <i>et al.</i> , 2005
<i>Agrotis ipsilon</i>	Masticador	EA	ND	EA	EA	Potter <i>et al.</i> , 2008; Baldauf <i>et al.</i> , 2011
<i>Heteronychus arator</i>	Masticador	EA	IA	IA	IA	Ball <i>et al.</i> , 1997
<i>Listronotus bonariensis</i>	Masticador	ND	EA	EA	EA	Prestidge & Gallagher, 1988; Rowan <i>et al.</i> , 1990; Tanaka <i>et al.</i> , 2005; Popay <i>et al.</i> , 2009
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Masticador	EA	EA	EA	ND	Clay & Cheplick, 1989; Riedell <i>et al.</i> , 1991; Ball <i>et al.</i> , 2006
<i>Wiseana cervinata</i>	Masticador	ND	EA	ND	ND	Jensen & Popay, 2004

Abreviaciones: EA, alcaloide efectivo; IA, alcaloide ineficaz; ND, no determinado.

En la mayoría de los experimentos incluidos en el Anexo 1 fue posible determinar si las plantas con el endofito poseían alcaloides efectivos (EA) o inefectivos (IA) contra un atacante particular. Sin embargo, las simbiosis entre *Agrostis perennans* - *Epichloë amarillans* y *Elymus villosus* - *Epichloë elymi* fueron excepciones (Anexo 1.1). Aunque se sabe que ambos simbiotes no producen alcaloides del tipo lolinas, otros alcaloides no han sido analizados hasta la fecha. Dado que no fue posible determinar si las defensas de estas dos especies de plantas simbióticas estuvieron mediadas por otros alcaloides, se realizaron dos análisis separados. En el primero, los simbiotes fueron clasificados como productores de IA, y en el segundo, como EA. No hubo diferencias entre los resultados de ambos

análisis. En este capítulo se muestran ambas plantas simbióticas clasificadas en la categoría IA.

### Meta-análisis

Se realizaron tres meta-análisis diferentes utilizando la misma base de datos (Anexo 1.1). El primero fue hecho con el objetivo de probar el impacto global de la presencia del endofito en el crecimiento y desarrollo de los insectos. En el segundo análisis, estimamos el efecto del endofito sobre cada uno de los gremios ecológicos de los insectos (es decir, succionadores de savia y masticadores). En el tercer análisis, comparamos el efecto del endofito sobre el crecimiento y desarrollo de los insectos dentro de cada gremio ecológico teniendo en cuenta la efectividad de los alcaloides (IA y EA). Un tamaño de efecto negativo indica que la presencia del endofito disminuye el crecimiento y/o desarrollo de los insectos, mientras que lo opuesto significa un tamaño de efecto positivo.

Todos los meta-análisis fueron hechos utilizando el software estadístico MetaWin v.2.0 (Rosenberg *et al.*, 2000). Para cada experimento se calculó un tamaño de efecto,  $d$  (Gurevitch & Hedges, 2001):

$$d = \frac{\bar{X}_E - \bar{X}_C}{SD_{agrupada}} J$$

El valor  $d$  es la diferencia entre  $X_E$  [el promedio en el grupo experimental (plantas E+)] y  $X_C$  [el promedio en el grupo control (plantas E-)] dividida por una desviación estándar “agrupada” ( $SD$  agrupada) y corregida por  $J$ , que elimina el sesgo debido a tamaños de muestras pequeños. La  $SD$  agrupada y  $J$  se calculan como:

$$SD_{agrupada} = \sqrt{\frac{(n_E - 1)(SD_E)^2 + (n_C - 1)(SD_C)^2}{n_E + n_C - 2}}$$

$$J = 1 - \frac{3}{4(n_C + n_E - 2) - 1}$$

Donde  $SD_E$ ,  $SD_C$  y  $n_E$ ,  $n_C$  son las desviaciones estándar y tamaños de muestras para los grupos experimental (E+) y control (E-), respectivamente. En este estudio, el tamaño del efecto,  $d$ , es la diferencia -en términos de crecimiento y desarrollo- de los insectos criados en plantas E+ y E- medidos en unidades de desviación estándar.

El intervalo de confianza (IC) para cada tamaño de efecto promedio,  $d$ , se calculó utilizando un bootstrap corregido por sesgo con 4900 iteraciones (Gurevitch & Hedges, 2001). El efecto del endofito se consideró significativo si el IC al 95% del tamaño del efecto no se superpuso al cero (Adams *et al.*, 1997). Para probar las diferencias entre grupos categóricos (es decir, insectos succionadores vs masticadores y EA vs IA), se utilizó el estadístico Qb (el subíndice significa "entre") en un modelo de efectos mixtos (Rosenberg *et al.*, 2000). Adicionalmente, se calculó el número de Rosenthal asociado a cada comparación entre grupos. El número de Rosenthal es un indicador de la robustez del análisis estadístico que estima el número de experimentos con resultados no significativos

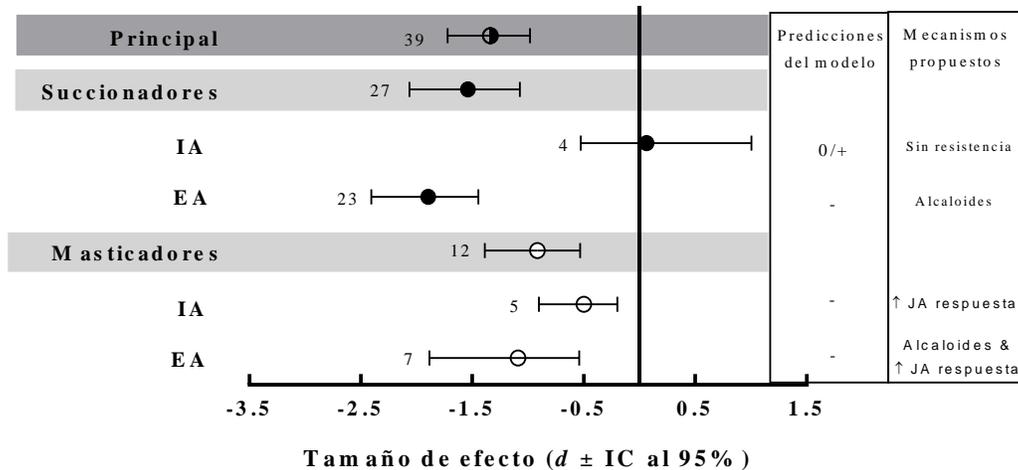
que se precisaría para convertir un resultado significativo en no significativo. Por lo tanto, si el número estimado de Rosenthal fue mayor que la referencia ( $5 * N + 10$ , donde N es el tamaño de la muestra), se supone que la inferencia estadística es robusta (Rosenberg, 2005).

## Resultados

Hubo un efecto negativo global de la presencia del hongo endofito sobre el crecimiento y desarrollo de los insectos herbívoros ( $d$  principal = -1,35; IC al 95% = -1,75 a -1,01) sin diferencias entre los gremios ecológicos ( $Q_b = 2,87$ ;  $P = 0,09$ ;  $df = 1$ ) (Figura 2.2.  $d$  para los succionadores = -1,54; IC al 95% = -2,08 a -1,07.  $d$  para los masticadores: tamaño del efecto = -0,95; IC al 95 % = -1,43 a -0,55). El número de Rosenthal fue mayor que el número de referencia [gremio ecológico:  $1109,5 > 5 * (39) + 10$ ], lo que indica que la inferencia estadística fue robusta.

Cuando el análisis se limitó a los insectos succionadores, el endofito tuvo un efecto negativo sobre los atacantes si los alcaloides producidos por el hongo eran efectivos ( $Q_b = 13,46$ ;  $P < 0,001$ ;  $df = 1$ ) (Figura 2.2.  $d$  para los succionadores/EA= -1,89; IC al 95% = -2,40 a -1,44;  $d$  para los succionadores/IA= 0,06; IC al 95% = -0,53 a 1,01). El número de Rosenthal fue mayor que el de referencia [efectividad de los alcaloides para los succionadores:  $648,1 > 5 * (26) + 10$ ].

Cuando el análisis se limitó a los insectos masticadores, el efecto del endofito siempre fue negativo contra el atacante, independientemente de la categoría de los alcaloides (es decir, IA o EA) ( $Q_b = 1,46$ ;  $P = 0,23$ ;  $df = 1$ ) (Figura 2.2.  $d$  para los masticadores/EA = -1,10, IC al 95% = -1,86 a -0,52.  $d$  para los masticadores/IA = -0,56; IC al 95% = -1,03 a -0,22). El número de Rosenthal fue mayor que el de referencia [efectividad de los alcaloides para los masticadores:  $72,7 > 5 * (12) + 10$ ].



**Figura 2.2** Efecto de los hongos endofitos *Epichloë* sobre el desarrollo y crecimiento de los insectos herbívoros (efecto relativo de plantas con vs. sin el endofito). El efecto global principal se descompone en dos, en los insectos succionadores de savia y en los masticadores, los que a su vez se dividen en dos grupos más dependiendo de la naturaleza de los alcaloides producidos por los endofitos [alcaloides efectivos (EA) o inefectivos (IA)]. La caja de la izquierda indica las predicciones dadas por el modelo para el efecto del endofito sobre el crecimiento y desarrollo de los insectos: 0 = neutro, + = positivo, - = negativo. La caja de la derecha indica el mecanismo de defensa propuesto. Los números junto a los tamaños de efecto indican la cantidad de experimentos. Los análisis se realizaron utilizando los experimentos resumidos en el Anexo 1.1.

## Discusión

Nuestro meta-análisis apoya la idea de que los hongos endofitos aumentan las defensas anti-herbivoría de las plantas por medio de mecanismos dependientes e independientes de los alcaloides. De acuerdo con nuestros resultados, si el hongo produce alcaloides ineficaces contra un atacante, la planta puede aún estar protegida aunque sólo de los insectos masticadores. Sugerimos que este patrón de resistencia, inferido desde estudios ecológicos publicados, podría ser explicado por el efecto propuesto de los endofitos sobre el sistema inmune de las plantas a través de una represión de la vía de señalización del SA y la promoción de las respuestas de defensa mediadas por el JA.

La interacción molecular entre el hongo endofito y el sistema inmune de la planta podría brindar al hospedero de un conjunto versátil de mecanismos de defensa para hacer frente a los herbívoros. El priming de la vía del JA aumentaría la defensa de la planta contra los insectos masticadores, independientemente del suministro de los alcaloides del hongo. La importancia relativa de la vía del JA, en términos de resistencia, sería inversamente proporcional a la defensa proporcionada por los alcaloides. Si el endofito produce alcaloides ineficaces contra el atacante, la respuesta de defensa mediada por el JA sería esencial para la planta hospedera. Sin embargo, incluso si el endofito produce alcaloides

efectivos, su efectividad puede estar restringida en tejidos donde estos metabolitos se encuentran en bajas concentraciones (como en las raíces) (Siegel *et al.*, 1990; Justus *et al.*, 1997). Por lo tanto, la vía de defensa del JA podría ser crítica para proteger éstos tejidos. Además, dado que la producción de alcaloides puede ser baja en suelos deficientes en nitrógeno (Faeth & Fagan, 2002), la promoción de las defensas de la planta podría llegar a ser muy importante en condiciones naturales, particularmente para plantas creciendo en suelos pobres de nutrientes.

La interacción con los hongos endofitos también podría tener consecuencias negativas para la inmunidad de las plantas y su *fitness*. Dado que una represión de la vía del SA podría ser esencial para mantener la relación simbiótica, las plantas serían más susceptibles a los patógenos biótrofos, como se ha observado en otros estudios (Welty *et al.*, 1991, 1993; Wäli *et al.*, 2006; Krauss *et al.*, 2007b; Pańka Dariusz *et al.*, 2011; Sabzalian *et al.*, 2012). Así mismo, cualquier factor biótico o abiótico que active la vía del SA es probable que tenga un efecto negativo sobre el endofito y su función anti-herbivoría (Figura 2.1). Por ejemplo, la activación de la vía del SA por los insectos succionadores o los patógenos biótrofos podría afectar negativamente al endofito y al nivel de resistencia de la planta. De forma similar, la exposición de agentes oxidantes como el ozono, un contaminante troposférico que activa la vía del SA (Kangasjarvi *et al.*, 2005), podría tener un impacto negativo en la estabilidad de la interacción planta-endofito. De acuerdo con esta hipótesis, se encontró que plantas de *L. multiflorum* expuestas a una dosis aguda de ozono tuvieron una reducción significativa de la efectividad del mutualismo defensivo proporcionado por el endofito *E. occultans* (Ueno *et al.*, 2015).

Mientras que el modelo presentado es indirectamente apoyado en términos tanto cualitativos como cuantitativos (Figura 2.2), nuestro estudio también pone en evidencia vacíos importantes en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos subyacentes en las interacciones entre las plantas y los hongos endofitos. Se necesitan más experimentos con el fin de abordar cuestiones específicas relacionadas con la interacción entre los endofitos y las hormonas de defensa de las plantas (Simons *et al.*, 2008; Ambrose *et al.*, 2015). Por ejemplo, el uso de marcadores de las vías del SA y del JA, de plantas mutantes para vías del SA y del JA, o de endofitos mutantes para la producción de los alcaloides serían enfoques interesantes para probar la modulación potencial del hongo sobre las respuestas inmune de las plantas hospedadas. Por otra parte, el uso de factores bióticos o abióticos que regulen las vías hormonales en el hospedero nos dará más ideas sobre la interacción entre el sistema inmune de la planta y las defensas proporcionadas por los hongos endofitos.

# Capítulo III: La hormona ácido salicílico de la planta interactúa con el mecanismo de anti-herbivoría conferido por los hongos endofitos (\*)

---

## Introducción

En los sistemas naturales las plantas están constantemente atacadas por herbívoros. Debido a las presiones de selección ejercidas por éstos atacantes, las plantas han desarrollado estrategias y mecanismos sofisticados para evadirlos y/o disminuir sus impactos negativos (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven *et al.*, 2005; Agrawal *et al.*, 2012). Entre los mecanismos se encuentran la inducción de defensas altamente específicas y efectivas contra el ataque de distintos grupos de herbívoros y patógenos (Bari & Jones, 2009; Thaler *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2012). Estas respuestas están orquestadas por un grupo de hormonas que interactúan: el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (Heil & Ton, 2008; Dicke & Baldwin, 2010; Thaler *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2012; Ballaré, 2014). El modelo actual postula que las defensas dependientes del JA son eficaces contra patógenos necrótrofos e insectos herbívoros masticadores, mientras que las defensas dependientes del SA son eficaces contra patógenos biótropos e insectos succionadores de savia (Kunkel & Brooks, 2002; Glazebrook, 2005; Thaler *et al.*, 2012; Pineda *et al.*, 2013; Schwartzberg & Tumlinson, 2014; Ballaré, 2014; Schweiger *et al.*, 2014). Aunque este modelo de inmunidad de las plantas ha recibido un apoyo empírico considerable, no está del todo claro cómo se aplica cuando las defensas de la plantas son asistidas por microorganismos simbióticos benéficos (Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; Jung *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2014).

La asociación de las plantas con microorganismos benéficos genera cambios en la respuesta inmune de las plantas (Zamioudis & Pieterse, 2011; Cameron *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014). Los efectos de los simbioses benéficos sobre el sistema inmune del hospedero han sido estudiados principalmente en las simbiosis entre plantas y rizobacterias y hongos micorrízicos. Una de las consecuencias de establecer una simbiosis con éstos microorganismos, es que las plantas hospederas quedan generalmente susceptibles a patógenos biótropos e insectos herbívoros succionadores (Hartley & Gange, 2008; Jung *et al.*, 2012; Pineda *et al.*, 2013). Esta susceptibilidad parece resultar de una supresión activa de la vía del SA de la planta por parte de los simbioses (Martínez-Abarca *et al.*, 1998; Siciliano *et al.*, 2007). Como microorganismos biótropos, los simbioses controlarían la hormona SA evitando así, el ser reconocidos como patógenos por el sistema inmune de la planta (Martínez-Abarca *et al.*, 1998; Paszkowski, 2006; Siciliano *et al.*, 2007; Zamioudis & Pieterse, 2011; Jung *et al.*, 2012; Pozo *et al.*, 2015). Además, se ha observado que las plantas simbióticas presentan una activación de la vía del JA lo que parece estar relacionado con un mecanismo de la planta para regular la funcionalidad de la simbiosis (Sun *et al.*, 2006; Nakagawa & Kawaguchi, 2006; Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; Jung *et al.*, 2012; Wasternack & Hause, 2013; Pieterse *et al.*, 2014).



Predecimos que la aplicación exógena del SA estimularía el sistema inmune (específicamente la vía del SA) en plantas libres de endofitos aumentando el nivel de resistencia general y consecuentemente, reduciendo el tamaño de población de los áfidos. Sin embargo, dado que los hongos endofitos *Epichloë* son microorganismos biótrofos, la exposición exógena del SA en las plantas simbióticas perjudicaría las defensas basadas en los alcaloides, disminuyendo el nivel de resistencia y consecuentemente aumentando el tamaño de la población de los áfidos.

## Metodología

### Plantas y colonias de áfidos

Plantas de *Lolium multiflorum* Lam., simbióticas y no simbióticas con el hongo endofito *Epichloë occultans* se obtuvieron de una población de pastos colectada en un pastizal sucesional pampeano (Argentina) (36°00' S, 61°5' O). Las plantas no simbióticas se generaron mediante el tratamiento de semillas simbióticas con un fungicida sistémico (Triadimenol 150 g kg<sup>-1</sup>, Baytan®). Para multiplicar las semillas, se sembraron aquellas tratadas y no tratadas con el fungicida en parcelas contiguas (1 m<sup>2</sup>) en el campo experimental del Instituto IFEVA - CONICET, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina (34° 35' S, 58° 28' O). A las plantas de ambas parcelas se les permitió compartir el polen para disminuir un eventual distanciamiento genético entre ambos lotes. Las semillas maduras de cada parcela se cosecharon y se almacenaron en seco hasta el comienzo de los experimentos. La frecuencia de semillas con endofito en cada lote se estimó mediante el muestreo de 100 semillas, las cuales fueron teñidas y examinadas individualmente bajo un microscopio con 40X de aumento (Bacon & White Jr, 1994; Card *et al.*, 2011). Un 99% de las semillas dio positivo y negativo en el lote no tratado (E+) y tratado con fungicida (E-), respectivamente. Además, el estado simbiótico de cada planta durante el experimento se confirmó mediante el examen microscópico de la base de la hoja más externa (Bacon & White Jr, 1994).

Durante la temporada de crecimiento normal de *L. multiflorum* (otoño-invierno-primavera), se cultivaron plantas individuales (E+: n = 50 y E-: n = 50) en el campo experimental del instituto IFEVA-CONICET, en macetas de 1,5 L (partes iguales de suelo, arena y turba). Las plantas fueron regadas periódicamente para evitar el estrés hídrico.

A principios de la primavera, se recolectaron individuos del áfido *Rhopalosiphum padi* (L.) del mismo campo experimental para generar una colonia para nuestros experimentos. La población inicial de áfidos se estableció a partir de 200 individuos adultos sin alas que se criaron durante 6 semanas en plantas de trigo (cultivar “Cronox”, Don Mario) y en condiciones controladas [21°C (±1), fotoperíodo L16: D8 h y radiación 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>].

### Diseño y condiciones experimentales

Se llevó a cabo un experimento para probar las respuestas de defensa de las plantas E+ y E- a los áfidos *R. padi*. A mediados de la primavera, se seleccionaron 14 plantas E+ y 14 E- de 18 semanas de edad del *stock* de plantas y se trasladaron a una cámara de crecimiento con las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo establecidas para la colonia de áfidos.

Cada una de las plantas tenían aproximadamente 45 macollos (rango: 35-67) y estaban empezando a florecer. Después de un examen minucioso para asegurar la ausencia de insectos, las plantas fueron individualmente envueltas con una bolsa de tela *voile* blanca soportada con una red tubular de plástico. Las plantas fueron aclimatadas a las condiciones de la cámara por una semana previo a la aplicación del tratamiento hormonal (véase más adelante).

El diseño del experimento consistió en un factorial completo 2 x 2, con el estado simbiótico de la planta (E+, E-) y el ácido salicílico (SA+, SA-) como factores principales. Antes del tratamiento con el SA, se registró el número y estado fenológico (vegetativo o reproductivo) de todos los macollos. Se pulverizaron la mitad de las plantas de cada estado endofito (7 E+ y 7 E-) con 10 mL de solución de SA 0,5 mM (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y la otra mitad con 10 mL de agua destilada. Tres días después de la aplicación del SA, cada planta recibió 5 áfidos adultos sin alas (de nuestra colonia) e inmediatamente las plantas fueron encapuchadas con las bolsas de tela *voile* para evitar la fuga de insectos. El retraso entre la aplicación del SA y el ataque con los áfidos fue establecido para permitir que las plantas desarrollaran una respuesta al SA antes del contacto con los áfidos.

Las poblaciones de áfidos fueron seguidas durante 12 días. El número de insectos en cada planta (tamaño de la población) se contó a los días 4, 7 y 12 desde el inicio de la puesta de los áfidos en las plantas, que corresponden a los días 7, 10 y 15 desde la aplicación del SA. En las plantas se realizaron tres muestreos de tejidos en serie para medir la concentración fisiológica de las hormonas y de los alcaloides. En la primera cosecha, se removieron dos hojas (de un macollo) por planta justo antes de la puesta de los áfidos (es decir, al día 3 desde la aplicación del SA) con el objetivo de medir las concentraciones de las hormonas de defensa (SA y JA). A los días 7 y 15 después de la aplicación del SA (o a los 4 y 12 días desde la puesta de los áfidos), se cosechó una base de macollo por planta E+ para medir la concentración de alcaloides fúngicos. El mismo procedimiento se realizó en las plantas E-, aunque los alcaloides no fueron cuantificados. La cosecha fue hecha en los macollos donde había áfidos. Teniendo en cuenta que los macollos tienen cierto grado de independencia (Yang & Hwa, 2008), las muestras fueron tomadas desde distintos macollos reduciendo así los efectos de los "cortes" seriales sobre el estado fisiológico de la planta. La biomasa removida en la toma de muestras (para hormonas y alcaloides) fue de alrededor del 1% de la biomasa aérea de la planta. Al día 15 desde la aplicación del SA, se cosecharon, secaron (en estufa a 60° por 24 h) y pesaron los tejidos aéreos de todas las plantas con una balanza analítica ( $\pm 0,1$  g Mettler Toledo).

### **Cuantificación del SA y JA**

*Extracción y derivatización.* La cuantificación del SA y JA se hizo mediante GC-MS/MS después de un paso de derivatización con N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA). En un primer paso, las muestras fueron liofilizadas y molidas usando un Geno/grinder® 2010 (SPEX®SamplePrep). La extracción fue hecha utilizando tubos de rosca de 2 mL conteniendo 50-100 mg de muestra molida, 1 mL de acetonitrilo al 100% (ACN), 10  $\mu$ L de estándares internos (d6-SA: 100 ng y d5-JA: 100 ng) (Isótopos CDN, Pointe-Claire, QC, Canadá) y 2 bolillas de acero (4 mm). Los tubos fueron agitados por 10 min con 1000 *stokes* min<sup>-1</sup> con el Geno/grinder®. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13.200 rpm durante 20 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se transfirieron a

tubos de vidrio de 2 mL. El protocolo de extracción se repitió añadiendo 1 mL de ACN al 100% sin los estándares internos. Después de la etapa de centrifugación, se combinaron los sobrenadantes. El volumen extraído de las muestras fue evaporado completamente en un concentrador de vacío (Savant SpeedVac, Thermo Fisher Scientific Inc.). Las muestras, ahora secas, se derivatizaron con 100  $\mu$ L de MSTFA a 60°C durante dos horas. Después de la sililación, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente antes de la inyección al GC.

*Método GC-MS/MS.* Se utilizó un equipo Scion TQ GC-MS/MS (Bruker Daltonics Inc) con una columna Agilent DB-5MS (30 m de largo con una columna de protección de 10 m, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu$ m de grosor). El GC fue operado en modo de flujo constante (1 ml  $\text{min}^{-1}$ ) con helio como gas transportador. El *inlet* tuvo una temperatura de 290°C, y la solución de inyección (1  $\mu$ L) fue establecida en el modo “*Split*” a razón de 1:20. La temperatura del GC fue mantenida en 80°C durante 2 min antes de elevarse a 230°C usando un gradiente lineal de 10°C  $\text{min}^{-1}$ . Luego de mantenerse la temperatura a 230°C por 1 min, fue aumentada a 310°C por 5 min con una rampa de 40°C  $\text{min}^{-1}$ . El tiempo total de cada corrida fue de 25 minutos. La temperatura de línea de transferencia del MS fue establecida en 290°C y la temperatura de fuente en 230°C. Los datos fueron adquiridos en modo de ionización positiva a 70eV de energía y en modo de monitoreo de múltiples reacciones (MRM) utilizando 2 mTorr de presión de colisión y 30eV de energía para la fragmentación de los iones precursores. Para cada compuesto, la transición del par de iones precursores y productos con sus correspondientes tiempos de retención fueron los siguientes: SA (267  $\rightarrow$  73 m/z; 11,2 min), d6-SA (271  $\rightarrow$  73 m/z; 11,1 min) JA (222  $\rightarrow$  73 m/z; 13,7 min), d5-JA (287  $\rightarrow$  73 m/z; 13,2 min).

*Análisis de dilución de isótopos.* El SA y el JA se cuantificaron mediante un análisis de dilución de isótopos. Se aprovecharon las diferencias en el comportamiento cromatográfico de las hormonas marcadas con deuterio y no marcadas (contenidas en la muestra cosechada). El efecto isotópico da lugar a diferencias en los tiempos de retención cromatográficos entre los compuestos marcados isotópicamente y no marcados. Se encontró que ambas hormonas y sus homólogos marcados isotópicamente tenían una diferencia de menos de 0,1 min en el tiempo de retención. Previamente, estándares de SA, SA-d6, JA y JA-d5 fueron corridos para determinar la separación óptima, los tiempos de retención y las transiciones a monitorear. La pequeña diferencia en el tiempo de retención entre SA, SA-d6, JA y JA-d5 fue suficiente para revelar la presencia y cantidad de estas hormonas. No se observó efecto matriz en las muestras. Dos métodos separados de monitoreo de reacción única (SRM) para explorar las transiciones de SA (267  $\rightarrow$  73 m/z) y d6-SA (271  $\rightarrow$  73 m/z), así como las de JA (222  $\rightarrow$  73 m/z) y d5-JA (287  $\rightarrow$  73 m/z) fueron hechos para asegurar que la detección de cada compuesto tuviera una sensibilidad máxima. En la etapa final del desarrollo del método, todas las diferencias de separación de los compuestos fue optimizada en modo MRM logrando un límite de detección de 5 nmol con excelentes picos cromatográficos y relaciones señal/ruido.

### **Cuantificación de las lolinas**

Las lolinas se cuantificaron usando una modificación del método de Moore *et al.* (2015). Las muestras fueron liofilizadas y trituradas hasta polvo en tubos de 2 mL con bolillas de acero de 3 mm (10 segundos a 5  $\text{m s}^{-1}$ ) en un molidor FastPrep FP120 (Savant Instruments

Inc., Farmingdale, NY, EE.UU). 50 mg por muestra fueron extraídos durante 1 hora con 50  $\mu\text{L}$  de metanol al 40% / amoniaco al 5% y 1 mL del 1,2-dicloroetano (que contenía 54,8 ng  $\text{mL}^{-1}$  de 4-fenilmorfolina como estándar interno). Después de la centrifugación (5 min a 8000 G) el sobrenadante fue transferido a tubos de GC de vidrio con un filtro de 10 mm. El análisis fue realizado con un detector de ionización de llama por cromatografía de gases (GC2010Plus, Shimadzu Corporation, Japón) equipado con una columna capilar ZB-5 (30 m de largo, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de grosor, Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). El límite de detección fue de 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco.

### **Análisis estadísticos**

La concentración de las hormonas SA y JA fue analizada por separado con modelos de efectos lineales utilizando la función `gls` del paquete `nlme` en el software R y la distribución normal (Pinheiro *et al.*, 2009). Los modelos incluyeron el estado simbiótico de la planta (E+, E-) y el tratamiento SA (SA+, SA-) como factores categóricos. Las desviaciones en la homogeneidad de la varianza de las concentraciones de SA y JA fueron modeladas usando estructuras de varianza “VarIdent” en el “tratamiento SA” y en la interacción entre los factores “tratamiento SA” y el “estado simbiótico de la planta”, respectivamente (Zuur *et al.*, 2009). Después de eso, se cumplieron todos los supuestos del ANOVA (normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia de los residuos).

La concentración de los alcaloides (lolinas totales, NFL y NANL) se analizaron por separado con modelos de efectos lineales mixtos utilizando el mismo paquete anteriormente mencionado y la distribución normal (Pinheiro *et al.*, 2009). Un outlier en el tratamiento del SA fue identificado y eliminado del conjunto de datos. Esta planta mostró concentraciones de alcaloides con un orden de magnitud más alto que el promedio de las otras plantas [lolinas totales, NFL, NANL: 1930, 1313, 617  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco), respectivamente]. Por lo tanto, el conjunto de datos para alcaloides conto con 6 réplicas para el SA- y 7 para el SA+. Los efectos fijos del modelo incluyeron el tratamiento SA (SA+, SA-), el tiempo experimental (días 7 y 15 desde la aplicación del SA) como factores categóricos y el tamaño de la población de áfidos a los días 7 y 15 como covariable continua; el efecto aleatorio incluyó al tiempo anidado en la maceta (i.e. planta). No se observó autocorrelación temporal entre las medidas repetidas. Dependiendo de la variable de respuesta, estructuras de la varianza “VarPower” o “varExp” se utilizaron en el tamaño de la población de áfidos para modelar las desviaciones en la normalidad (Zuur *et al.*, 2009). Después de eso, se cumplieron todos los supuestos ANOVA (normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia de los residuos).

La relación entre las concentraciones de NFL y NANL (derivados de las lolinas) fue analizada con modelos lineales mixtos utilizando el paquete `nlme` y la distribución normal. En el modelo se consideró la concentración de NFL como variable respuesta. Los efectos fijos incluyeron al tratamiento SA (SA+, SA-) y al tiempo experimental (días 7 y 15 desde la aplicación de SA) como factores categóricos, y la concentración de NANL como covariable continua; el efecto aleatorio incluyó al tiempo anidado en la maceta. El modelo estadístico fue basado en el rol químico que el NFL y el NANL tienen en la vía de biosíntesis de los alcaloides, donde el NANL es la molécula sustrato para producir el NFL (Charlton *et al.*, 2014). Para modelar las desviaciones de la normalidad y los problemas de autocorrelación entre las medidas repetidas, se utilizó la estructura de la varianza “VarExp”

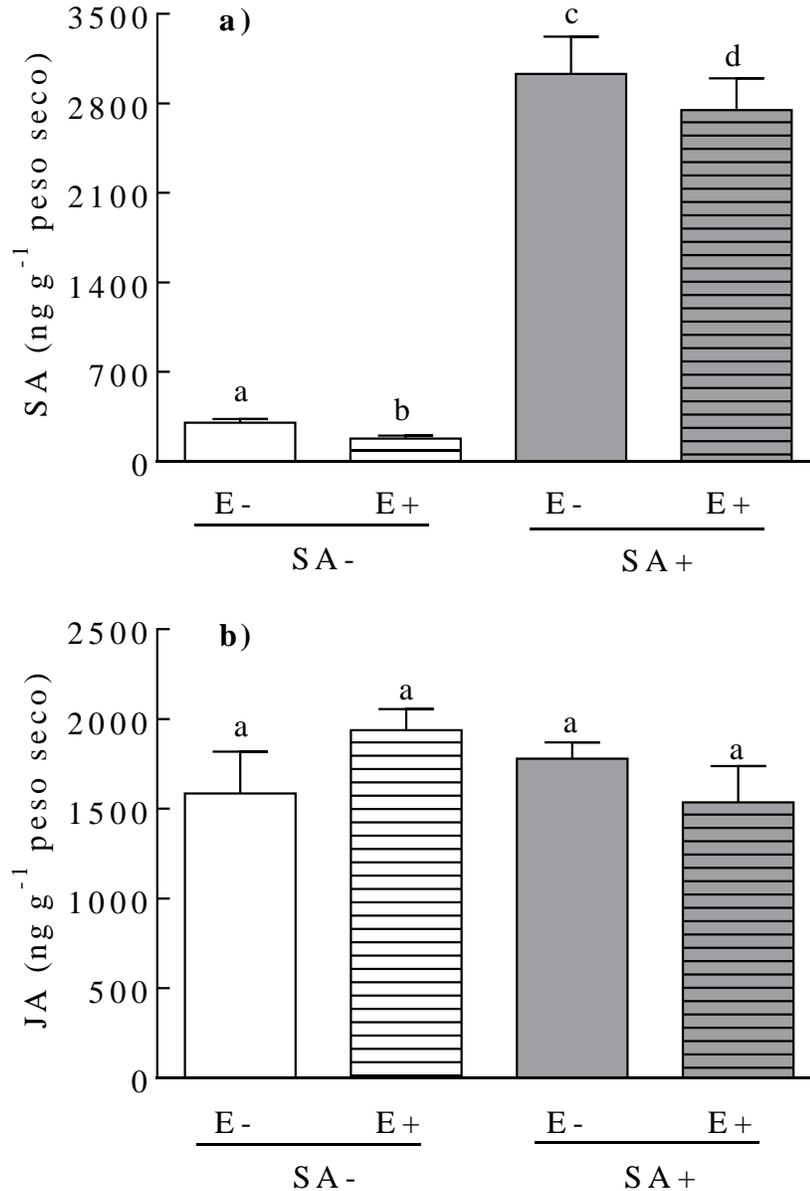
en la variable “concentración de NANL” y una estructura de correlación CorARMA ( $p = 1$ ,  $q = 0$ ), respectivamente (Pinheiro *et al.*, 2009; Zuur *et al.*, 2009). Después de eso, se cumplieron todos los supuestos ANOVA normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia de los residuos).

El tamaño de la población de áfidos (número de individuos) se analizó con modelos de efectos lineales mixtos utilizando el paquete glmmADMB y la distribución binomial negativa en R (Fournier *et al.*, 2012). Los efectos fijos en el modelo incluyeron el estado simbiótico de las plantas (E+, E-), el tratamiento SA (SA+, SA-) y el tiempo experimental (días 4, 7 y 12 desde la puesta de los áfidos) como factores categóricos; el efecto aleatorio incluyó al tiempo anidado en la maceta. No se observó autocorrelación temporal entre las mediciones repetidas. Los supuestos del ANOVA fueron cumplidos (independencia de los residuos). Cuando diferencias estadísticas fueron detectadas en los tratamientos, usamos la función lsmeans del paquete homónimo en R para poner a prueba las diferencias entre los grupos (Lenth, 2016). En este capítulo los valores están expresados en promedios  $\pm$  EE.

## Resultados

### Efectos del SA y del endofito sobre los niveles fisiológicos de las hormonas

La presencia del endofito redujo el nivel fisiológico del SA ( $F_{1,24} = 14,08$ ;  $P = 0,001$ ) independientemente del tratamiento hormonal (estado simbiótico x tratamiento SA:  $F_{1,24} = 0,15$ ;  $P = 0,693$ ). En promedio, las plantas con el endofito tuvieron una reducción aproximada de  $125 \text{ ng g}^{-1}$  (peso seco) en la concentración del SA en comparación con las plantas sin el endofito (Figura 3.1). Además, tres días después de la aplicación de la hormona, el nivel fisiológico del SA fue alrededor de 12 veces mayor en las plantas tratadas con el SA que en las no tratadas con la hormona (Figura 3.1;  $F_{1,24} = 188,63$ ;  $P < 0,001$ ). Ninguno de los tratamientos afectaron el nivel fisiológico del JA de la planta (Figura 3.1; estado simbiótico:  $F_{1,23} = 0,38$ ;  $P = 0,546$ ; tratamiento SA:  $F_{1,23} = 0,53$ ;  $P = 0,473$ ; estado simbiótico x tratamiento SA:  $F_{1,23} = 3,05$ ;  $P = 0,094$ ).

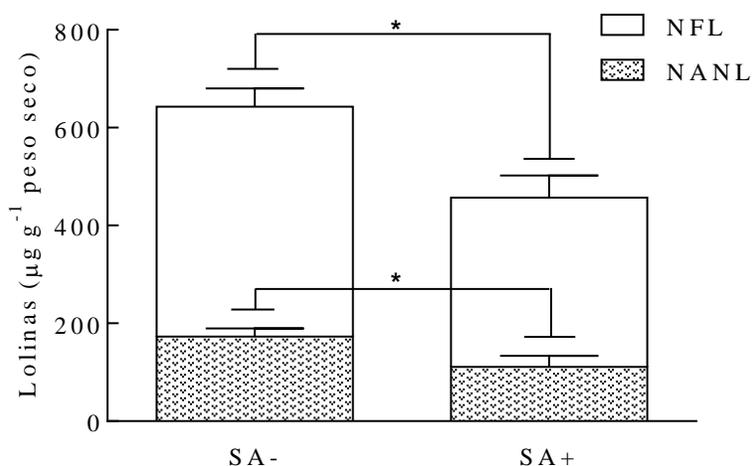


**Figura 3.1** Concentración fisiológica de las hormonas ácido salicílico [SA, panel superior (a)] y ácido jasmónico [JA, panel inferior (b)] tres días después de que plantas de *Lolium multiflorum* con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras planas) el hongo endofito *Epichloë occultans* fueran tratadas (SA+, barras grises) y no tratadas (SA-, barras blancas) con la hormona ácido salicílico. Las letras distintas indican diferencias significativas. Las barras representan valores promedio  $\pm$  EE (n = 7).

#### **Efectos del SA sobre la concentración de los alcaloides lolinas**

El tratamiento con el SA redujo significativamente la concentración de las lolinas totales ( $F_{1,11} = 7,22$ ;  $P = 0,021$ ). La concentración de las lolinas totales fue 28% menor en las

plantas tratadas con el SA que en las no tratadas [SA+ y SA-:  $457,08 \pm 65,46$  y  $643,27 \pm 52,66 \mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco), respectivamente]. Se observó el mismo patrón de resultados para cada derivado de las lolinas. En comparación con las plantas SA-, las concentraciones de NFL y NANL en las plantas SA+ fueron un 26% y un 36% menores, respectivamente (Figura 3.2; NFL:  $F_{1,11} = 9,97$ ;  $P = 0,009$ . NANL:  $F_{1,11} = 4,86$ ;  $P = 0,049$ ). Por otra parte, las concentraciones de las lolinas no cambiaron en el tiempo (lolinas totales:  $F_{1,7} = 1,26$ ;  $P = 0,297$ . NFL:  $F_{1,7} = 2,04$ ;  $P = 0,196$ . NANL:  $F_{1,7} = 0,05$ ;  $P = 0,822$ ). Las lolinas tampoco fueron afectadas por la interacción entre el tratamiento del SA y el tiempo (lolinas totales:  $F_{1,7} = 0,31$ ;  $P = 0,594$ . NFL:  $F_{1,7} = 0,39$ ;  $P = 0,548$ . NANL:  $F_{1,7} = 0,44$ ;  $P = 0,530$ ).

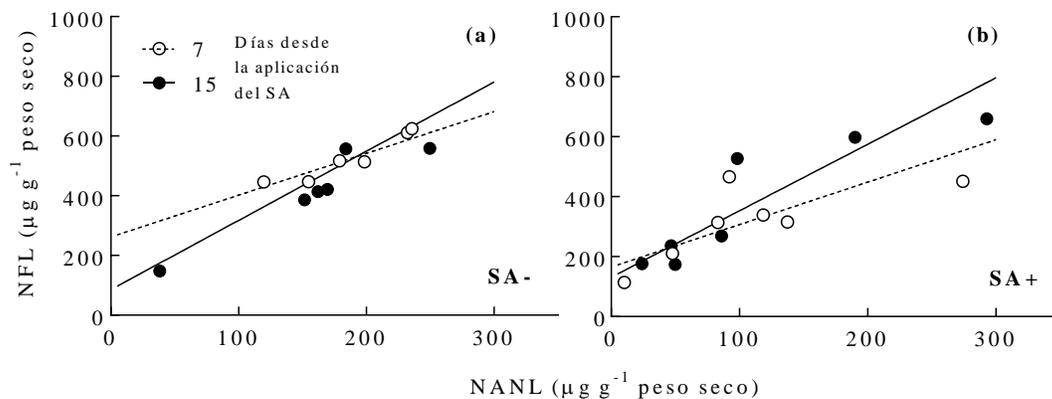


**Figura 3.2** Concentraciones de los alcaloides lolinas [N-formilolona (NFL, barras blancas) y N-acetilmorfolona (NANL, barras punteadas)] producidos por el hongo endofito *Epichloë occultans* en plantas de *Lolium multiflorum* tratadas (SA+) y no tratadas (SA-) con la hormona ácido salicílico. Cada barra incluye las dos mediciones de las lolinas cuantificadas para éste experimento (a los días 7 y 15 después de la aplicación de la hormona;  $n_{SA-} = 12$ ,  $n_{SA+} = 14$ ). Notar que la concentración de las lolinas totales corresponde a la suma de los derivados NFL y NANL. Los asteriscos indican diferencias significativas. Las barras representan valores promedio  $\pm$  EE.

### Efectos del SA sobre la relación entre los alcaloides NFL y NANL

Se observó una relación positiva significativa entre las concentraciones de los alcaloides NFL y NANL (Figura 3.3 a y b; pendiente media =  $1,42 \pm 0,24$ ;  $F_{1,7} = 215,75$ ;  $P < 0,001$ ). Sin embargo, esta relación varió con el tiempo transcurrido desde la aplicación del tratamiento hormonal (Figura 3.3 a y b;  $F_{1,7} = 21,53$ ;  $P = 0,002$ ). La concentración del NFL para un nivel dado de NANL aumentó un 40 y 36% desde el día 7 al 15 para las plantas bajo los tratamientos SA- y SA+, respectivamente (Figura 3.3a; pendiente SA- a los días 7 y 15:  $1,39 \pm 0,58$  y  $2,32 \pm 0,70 \mu\text{g NFL } \mu\text{g}^{-1} \text{NANL}$ , respectivamente. Figura 3.3b, pendientes SA+ a los días 7 y 15:  $1,41 \pm 0,25$  y  $2,22 \pm 0,29 \mu\text{g NFL } \mu\text{g}^{-1} \text{NANL}$ , respectivamente). Además, en el día 7 la concentración de NFL en las plantas tratadas con el SA fue un 58% menor que en las plantas no tratadas con la hormona, pero esta diferencia desapareció en el día 15 [Figura 3.3 a y b; ordenadas al origen de SA+ y SA- al día 7:  $165,04 \pm 33,22$  y  $262,01 \pm 102,05 \mu\text{g NFL g}^{-1}$  (peso seco), respectivamente. Ordenadas al

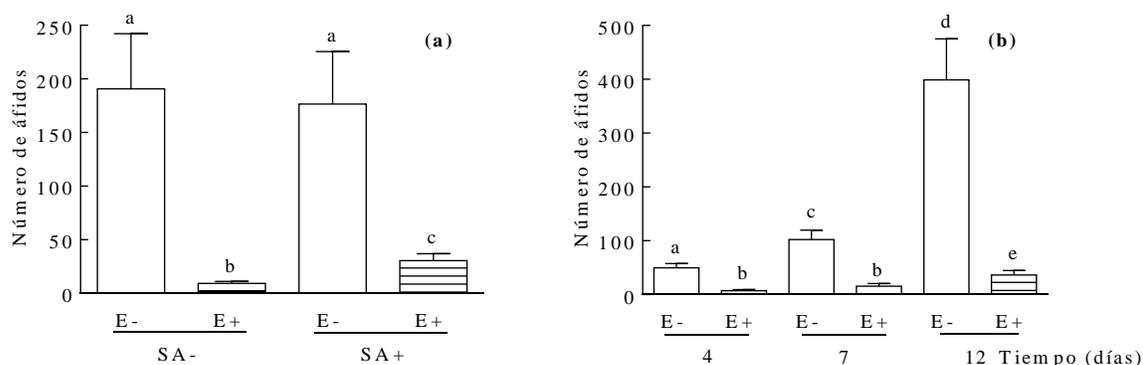
origen en SA+ y SA- al día 15:  $131,12 \pm 24,02$  y  $82,62 \pm 124,87 \mu\text{g NFL g}^{-1}$  (peso seco), respectivamente].



**Figura 3.3** Relación entre los derivados de los alcaloides lolinas N-formilololina (NFL) y N-acetilnorlololina (NANL) producidas por el hongo endofito *Epichloë occultans* en plantas de *Lolium multiflorum* no tratadas [SA-, (a)] y tratadas [SA+, (b)] con la hormona ácido salicílico a lo largo del tiempo experimental. Los círculos blancos y las líneas discontinuas indican la relación entre los alcaloides a los 7 días desde la aplicación del SA, mientras que los círculos negros y las líneas continuas corresponde a la misma relación a los 15 días (n = 6).

#### Efectos del SA y del endofito en las poblaciones de los áfidos

El efecto del endofito sobre el número de áfidos por planta dependió del tratamiento con la hormona SA (Figura 3.4a;  $F_{1,72} = 7,44$ ;  $P = 0,006$ ) y varió a lo largo del tiempo experimental (Figura 3.4b;  $F_{2,72} = 10,26$ ;  $P = 0,005$ ). El número de áfidos en las plantas con el endofito aumentó 3 veces debido a la aplicación del SA (SA+ vs SA-), pero el tratamiento hormonal sólo tendió a disminuir el tamaño de la población en las plantas sin el hongo (Figura 3.4a). Además, la tasa de incremento poblacional de los áfidos fue mayor en las plantas sin el endofito que en las plantas con el hongo (Figura 3.4b).



**Figura 3.4** Tamaño de la población de los áfidos *Rhopalosiphum padi* (número de áfidos) alimentados en plantas de *Lolium multiflorum* con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras planas) el endofito *Epichloë occulta* y tratadas (SA+) y no tratadas (SA-) con la hormona ácido salicílico. En (a) se resumen los efectos de la presencia del endofito y del tratamiento hormonal y en (b) del endofito y del tiempo experimental (en los días 4, 7 y 12 después de la aplicación de la hormona) sobre el tamaño poblacional de los áfidos. Cada barra en (a) incluye los tres conteos de áfidos hechos durante el experimento (en los días 4, 7 y 12 desde la aplicación de la hormona; n = 21), mientras que en (b) incluye los conteos hechos en las plantas SA+ y SA- (n = 14). Las letras distintas indican diferencias significativas. Las barras representan los valores promedio  $\pm$  EE.

## Discusión

Planteamos la hipótesis que la aplicación exógena de la hormona SA, debido a su papel en la defensa de las plantas contra los patógenos biótropos, suprimiría a los hongos endofitos *Epichloë* spp. La supresión del simbionte resultaría en una reducción de los alcaloides producidos por el endofito. Debido al papel que desempeñan los alcaloides en la defensa anti-herbivoría, una reducción en su concentración debería disminuir la resistencia de las plantas hospedadoras a los herbívoros. Nuestros resultados respaldan ésta hipótesis. Las plantas en simbiosis con los hongos endofitos *Epichloë* tuvieron concentraciones de la hormona SA menores que a las medidas en las plantas sin el endofito. En respuesta a la aplicación exógena de la hormona, todas las plantas alcanzaron concentraciones fisiológicas de SA muy altas. En línea con nuestra predicción, el tratamiento hormonal redujo las concentraciones de los alcaloides lolinas y, en consecuencia, disminuyó la resistencia conferida por los endofitos frente a los áfidos. No obstante, contrario a lo esperado, las plantas sin endofito no mostraron ningún cambio significativo en el nivel de resistencia a los áfidos.

Como consecuencia de la comunicación molecular entre las plantas y los microorganismos benéficos, una simbiosis bien establecida tiene como resultado una regulación negativa de la vía del SA (Stacey *et al.*, 2006; Navarro-Meléndez & Heil, 2014; Yasuda *et al.*, 2016).

Mediante este mecanismo, los simbioses colonizan y crecen dentro de los tejidos de las plantas (Stacey *et al.*, 2006; Pozo *et al.*, 2015; Yasuda *et al.*, 2016). En línea con esos reportes, encontramos que las plantas de *L. multiflorum* con el endofito *E. occultans* también tuvieron concentraciones menores de SA en comparación con las plantas no simbióticas. En el caso de los endofitos *Epichloë*, no se sabe si la regulación negativa de la producción del SA está estrictamente controlada por la planta, el hongo, o la interacción entre ellos. Las plantas de nuestro estudio estaban transitando el pasaje desde la etapa de crecimiento vegetativo al reproductivo. Esta transición es un momento en que el endofito se encuentra en un crecimiento activo, colonizando los meristemas reproductivos, y por lo tanto, es probable que el éxito en la transmisión a los ovarios en desarrollo dependa de la disminución de la concentración del SA de la planta (Justus *et al.*, 1997; Gundel *et al.*, 2011).

Nuestros resultados contrastan con los hallazgos de Ambrose *et al.*, (2015) en cuanto a que encontraron que la presencia del endofito *E. festucae* en plantas de *F. rubra* tuvo un efecto nulo o incluso positivo en la concentración del SA dependiendo del tejido (vaina/lámina) y la cepa del hongo. Aparte de las diferencias obvias en términos de especies de plantas y endofitos, y del tipo de tejidos recolectados, nuestro estudio presenta algunas diferencias metodológicas que también podrían explicar las discrepancias. Una de las principales disimilitudes es que las plantas con el endofito en el estudio de Ambrose *et al.* fueron obtenidas inoculando el hongo en plantas no simbióticas, mientras que en el nuestro las plantas fueron naturalmente simbióticas y las no simbióticas fueron obtenidas mediante la eliminación del hongo (ver “Plantas y colonias de áfidos” en Metodología). Es probable que el sistema inmune de la planta responda de manera diferencial si la simbiosis se crea artificialmente (inoculando el hongo) o si el endofito está presente naturalmente. De hecho, un estudio reciente sugiere que el método de obtención de las plantas con endofito puede influir en la expresión de las defensas de la planta (Dinkins *et al.*, 2017). Alternativamente, las mayores concentraciones del SA podrían ser un mecanismo de la planta hospedera que regula la excesiva proliferación del simbionte (López-Ráez *et al.*, 2010). Esta hipótesis surge de estudios con hongos micorrízicos donde las plantas aumentan la concentración del SA una vez que la biomasa de micelio del simbionte supera un cierto umbral (Khaosaad *et al.*, 2007; López-Ráez *et al.*, 2010). Por lo tanto, parecería que la regulación de la concentración del SA depende de la interacción entre el ciclo de vida del endofito y del crecimiento de la planta, de la asociación especie-específica planta-endofito y/o los tejidos de la planta donde el endofito se encuentra.

Se ha propuesto que la resistencia dependiente del SA es un mecanismo efectivo de control contra los patógenos biótropos y los insectos succionadores de savia (Glazebrook, 2005; Thaler *et al.*, 2012; Schwartzberg & Tumlinson, 2014; Ballaré, 2014; Schweiger *et al.*, 2014). En este trabajo, esperábamos que la aplicación exógena del SA aumentara el nivel de resistencia a los áfidos en las plantas sin el endofito. Sin embargo, a pesar de que las plantas sin el hongo tuvieron un aumento significativo en la concentración fisiológica del SA debido al tratamiento hormonal, los tamaños poblacionales de los áfidos no fueron afectados. Un número creciente de estudios están mostrando que las plantas responden al ataque de los áfidos por medio de vías de señalización complejas que no sólo incluyen al SA, sino también al JA y el etileno (Moran & Thompson, 2001; Zhu-Salzman *et al.*, 2004; Cooper & Goggin, 2005). Por ejemplo, estudios transcriptómicos en *Arabidopsis thaliana*,

*Glycine max* y *Sorghum bicolor* han mostrado que las respuestas de defensa de las plantas a los ataques de los áfidos implican la activación secuencial de las vías del SA, JA y etileno (Moran & Thompson, 2001; Moran *et al.*, 2002; Zhu-Salzman *et al.*, 2004; De Vos *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). Además, estudios con plantas mutantes para las vías del SA y del JA o de aplicación exógena de las hormonas han concluido que SA y JA son factores importantes para reducir el *fitness* de los áfidos (Ellis *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2004; Cooper & Goggin, 2005; Boughton *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006). Nuestros resultados sugieren la posibilidad de que otra vía hormonal puede estar involucrada en la respuesta de defensa de los pastos a los áfidos. Por ejemplo, un estudio previo exploró el papel defensivo del JA en plantas de *S. arundinaceus* en relación a la simbiosis con los hongos endofitos (Simons *et al.*, 2008). En particular, la aplicación de metil jasmonato (MeJA) a las plantas sin el endofito produjo un aumento significativo de la resistencia de las plantas al áfido *R. padi*, reduciendo el tamaño de las poblaciones en un 50% (Simons *et al.*, 2008). En nuestro estudio, el tratamiento de SA no afectó la concentración fisiológica del JA. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la hormona SA no cambia el nivel de resistencia a la herbivoría de plantas de pastos sin el endofito, ya sea directamente, o indirectamente a través de cambios posteriores en la producción del JA.

La aplicación exógena del SA altera generalmente los beneficios proporcionados por los microorganismos simbioses a sus plantas hospederas. Por ejemplo, la fijación biológica de nitrógeno realizada por la bacteria *Rhizobium* suele disminuir cuando las plantas de leguminosas se tratan con la hormona SA (Hayat *et al.*, 2010). En el presente estudio, se observó que el beneficio proporcionado por el endofito también es afectado negativamente por el tratamiento con el SA, a través de una reducción en la concentración de los alcaloides producidos por el hongo. En general, la cantidad de alcaloides puede variar como resultado de dos mecanismos no necesariamente excluyentes como son las variaciones (i) en la concentración de biomasa fúngica y (ii) en la tasa de producción de los alcaloides por unidad de biomasa del hongo. En relación al primer mecanismo (i), el trabajo de Rasmussen *et al.*, (2007) informa que las concentraciones de alcaloides se correlacionan linealmente con la concentración del endofito en el sistema *L. perenne-E. festucae*. En relación al segundo mecanismo (ii), Ryan *et al.*, (2014) demostraron que la simbiosis *S. arundinaceus-E. coenophiala* responde a elevados niveles de dióxido de carbono alterando la tasa de producción de alcaloides por unidad de biomasa del hongo. Debido a que el SA ha sido usualmente asociado como regulador de la proliferación de los simbioses (Hayat *et al.*, 2010; Zamioudis & Pieterse, 2011; Fernández *et al.*, 2014), es posible que en nuestro experimento la variación en la biomasa del endofito sea el mecanismo que explique la reducción de la concentración de los alcaloides. Sin embargo, la posibilidad de que la hormona SA afecte directa o indirectamente las rutas de biosíntesis de los alcaloides fúngicos es una alternativa que no se puede descartar. Por ejemplo, el gen fúngico *LolC* (que codifica para una enzima de la biosíntesis de lolinas) fue regulado negativamente cuando plantas con el endofito fueron expuestas a la hormona JA (en realidad al MeJA) (Simons *et al.*, 2008). Experimentos que incluyan la cuantificación de la biomasa del hongo y la expresión de genes relacionados con las rutas de biosíntesis de los alcaloides serán necesarios para determinar el mecanismo a través del cual la hormona SA regula las concentraciones de los alcaloides fúngicos.

Es plausible que la pérdida de la resistencia a los áfidos de las plantas con el endofito expuestas al SA haya sido consecuencia de la reducción en la concentración de los alcaloides. Sin embargo, es interesante observar que la pérdida de resistencia en plantas simbióticas no fue tan alta como se esperaría, considerando el dramático aumento en la concentración fisiológica del SA. En otras palabras, a pesar de que las plantas con el endofito tuvieron un aumento inicial de 12 veces en la concentración del SA (debido al tratamiento hormonal), éstas siguieron siendo altamente resistentes a los áfidos, con tamaños poblacionales 5 veces más pequeños que las poblaciones alimentadas con plantas sin el endofito. La alta resistencia de las plantas con el endofito tratadas con el SA es consistente con el hecho de que las concentraciones de lolinas disminuyeron sólo un 26-36% (dependiendo del tipo de lolina) como consecuencia de la exposición al SA. Adicionalmente, se detectó un aumento sutil en la producción del derivado de lolina NFL (a partir del NANL) quince días después de la exposición al SA. Este aumento de la relación NFL: NANL con el tiempo podría haber contribuido en parte a compensar la reducción general de las lolinas en su conjunto y por lo tanto, haber hecho que las plantas mantengan un alto nivel de resistencia a los áfidos después de la exposición al SA. Por otra parte, cabe destacar que las plantas con el endofito no expuestas al SA también mostraron un incremento en la producción de NFL después de 12 días desde la puesta inicial de los áfidos (o 15 días desde la exposición al SA). Este resultado sugiere la posibilidad de que los cambios en la producción del NFL (a partir del NANL) podrían haber sido inducidos por el consumo de savia de los áfidos.

En conclusión, el presente estudio destaca la importancia de la interacción entre el sistema inmune de las plantas y la presencia de los hongos endofitos foliares para la estabilidad y persistencia del mutualismo defensivo. Específicamente, nuestros resultados indican que la hormona SA regula la resistencia conferida por los endofitos contra los insectos succionadores de savia. Una consecuencia importante de esta interacción es que cualquier factor ecológico que estimule significativamente la vía del SA podría tener un impacto negativo sobre el endofito y los beneficios que éste proporciona. En línea con esta hipótesis, la exposición de plantas de *L. multiflorum* a dosis agudas del gas ozono troposférico, un contaminante del cambio global y activador de la vía del SA (Kangasjarvi *et al.*, 2005), resultó en una reducción significativa de la eficacia de las defensas proporcionadas por el endofito *E. occultans* (Ueno *et al.*, 2015). Por lo tanto, para tener una mejor comprensión de cómo diferentes factores ecológicos afectan a la funcionalidad de la simbiosis pasto-endofito serán necesarios más experimentos que estudien la comunicación molecular existente entre las plantas y sus hongos simbiotes.

# Capítulo IV: El ácido jasmónico regula el mecanismo de anti-herbivoría conferido por los hongos endofitos en pastos

---

## Introducción

Las plantas están constantemente amenazadas por los herbívoros. Ante el ataque de los herbívoros, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa que son expresados de forma constitutiva o inducida (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven *et al.*, 2005). Entre las respuestas inducidas se encuentran, por ejemplo, la producción de toxinas, compuestos anti-nutricionales y volátiles (Karban & Baldwin, 1997; Schoonhoven *et al.*, 2005). Las respuestas inducidas son gobernadas por un grupo de hormonas, entre las cuales el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA) desempeñan un papel central (Karban & Baldwin, 1997; Heil, 2008; Dicke & Baldwin, 2010; Thaler *et al.*, 2012; Ballaré, 2014). Las plantas responden activando las defensas dependientes del JA cuando son atacadas por los insectos masticadores y los patógenos necrótrofos, mientras que las respuestas dependientes del SA son inducidas por los ataques de los herbívoros succionadores de savia y los patógenos biótrosos (Kunkel & Brooks, 2002; Halitschke & Baldwin, 2004; Glazebrook, 2005; Thaler *et al.*, 2012; Ballaré *et al.*, 2012; Schwartzberg & Tumlinson, 2014; Schweiger *et al.*, 2014). Además, a menudo las plantas establecen relaciones simbióticas con distintos microorganismos benéficos (Pineda *et al.*, 2013). La simbiosis entre las plantas y los microorganismos implica un complejo diálogo a nivel molecular que afecta varias funciones de la planta, incluyendo la expresión de las defensas (Gutjahr, 2014; Pozo *et al.*, 2015). Algunos simbiosiontes aumentan la resistencia de las plantas a través de la promoción de las vías hormonales involucradas en las defensas (Pineda *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014; Pozo *et al.*, 2015), y otros microorganismos producen compuestos bioactivos que protegen a sus hospederos de los atacantes (Schardl *et al.*, 2013b; Panaccione *et al.*, 2014). Mientras que el papel de los compuestos de defensa producidos por los simbiosiontes en la protección de las plantas ha sido bien descrito (Wilkinson *et al.*, 2000; Potter *et al.*, 2008), raramente ha sido explorada la posibilidad de que este mecanismo de resistencia pueda ser complementado por las defensas propias de las plantas.

El establecimiento de relaciones simbióticas entre las plantas y los microorganismos benéficos implica cambios en la respuesta inmune del hospedero (Zamioudis & Pieterse, 2011; Jung *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2014; Pozo *et al.*, 2015). Entre los cambios, se ha observado que las plantas hospederas presentan un aumento en la resistencia frente a los patógenos necrótrofos y los herbívoros masticadores (Pineda *et al.*, 2010; Zamioudis & Pieterse, 2011; Jung *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2014). Este aumento en la resistencia parece estar relacionada con un cebado o “priming” de la vía de señalización del JA activado por los microorganismos benéficos (Van Wees *et al.*, 2008; Pineda *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014; Martínez-Medina *et al.*, 2016). Las plantas en un “estado de priming” de defensas muestran una respuesta defensiva más temprana, más rápida, más fuerte y/o

más sostenida contra los atacantes comparado con otros tipos de respuesta inducidas (Van Wees *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2012; Pineda *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2014).

Los hongos endofitos del género *Epichloë* (Clavicipitaceae, Ascomycota) forman simbiosis con especies de pastos (Poöideae) y producen alcaloides que protegen a las plantas hospederas de los herbívoros, (Clay, 1988; Popay & Bonos, 2005; White & Torres, 2009; Saikkonen *et al.*, 2013). Entre los alcaloides de origen endofítico se encuentran los ergotes, indol-diterpenos, lolinas y peraminas (Schardl *et al.*, 2012, 2013b; Saikkonen *et al.*, 2013; Schardl *et al.*, 2013a; Panaccione *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2015). El perfil de alcaloides es determinado por la especie y cepa del hongo (Ball *et al.*, 1995; Justus *et al.*, 1997; Saikkonen *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2014), mientras que la efectividad de un alcaloide particular depende de la especie de herbívoro atacante (Saikkonen *et al.*, 2006, 2010; Schardl *et al.*, 2013b; Saikkonen *et al.*, 2013) y de las condiciones ambientales (Ueno *et al.*, 2015).

Mientras que la función anti-herbivoría que presentan los alcaloides producidos por los hongos endofitos ha sido ampliamente documentada (Wilkinson *et al.*, 2000; Potter *et al.*, 2008), mucho menos atención ha recibido el impacto que el hongo podría tener sobre el sistema inmune de la planta hospedera. Sin embargo, estudios recientes están contribuyendo en éste sentido (Dupont *et al.*, 2015; Dinkins *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha encontrado que varios factores de transcripción *WRKY* se expresan diferencialmente en plantas de *Schedonorus arudinaceum* simbióticas con el endofito *E. coenophiala* (Dinkins *et al.*, 2017). Dado que los *WRKYs* se expresan durante la activación de las vías de defensa dependientes del SA o del JA (Ülker & Somssich, 2004; Rushton *et al.*, 2010), su regulación positiva sugiere que el endofito podría promover la resistencia de las plantas frente a los atacantes (Dinkins *et al.*, 2017). En el caso de la vía del SA, se ha observado que varios de los genes de biosíntesis, señalización y marcadores de la vía se encuentran regulados negativamente cuando el endofito está presente en las plantas (Johnson *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2015). Otros estudios sugieren que la presencia del endofito también podría afectar algunos genes precursores de la síntesis del JA (Johnson *et al.*, 2003) y también aumentar la concentración y genes de síntesis de metabolitos de defensa de la planta (Malinowski *et al.*, 1998a; Rasmussen *et al.*, 2008, 2009; Pańka *et al.*, 2013; Dupont *et al.*, 2015).

En este capítulo estudiamos la interacción entre la vía hormonal del ácido jasmónico y los hongos endofitos foliares en las defensas de las plantas contra los insectos herbívoros. Plantas con y sin el endofito fueron expuestas a una aplicación exógena de metil jasmonato (MeJA) seguido de una puesta de un insecto masticador. El jasmonato, MeJA, se usó como un inductor de la respuesta de defensa dependiente del JA (Wu *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2013). Utilizamos larvas del insecto masticador generalista *Spodoptera frugiperda* y plantas de *Lolium multiflorum* en simbiosis con el endofito *Epichloë occultans*, conocido por producir alcaloides lolinas (Moon *et al.*, 2000; Sugawara *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2015). A pesar de la amplia cantidad de especies que pueden ser consumidas por *S. frugiperda*, los pastos están entre las plantas más preferidas por el insecto (Luginbill, 1928). Estudios previos han mostrado que los hongos endofitos tiene en general, efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo de *S. frugiperda* (Ahmad *et al.*, 1987; Bultman & Bell, 2003; Ball *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2010), y también que las lolinas producidas

por *E. occultans* tienen propiedades anti-herbivoría sobre varias especies de insectos (Scharndl *et al.*, 2007; Charlton *et al.*, 2014; Bastías *et al.*, 2017). Un grupo de variables respuesta relacionadas con el crecimiento y desarrollo de los insectos se usaron como indicadores del nivel de resistencia de las plantas, y las concentraciones fisiológicas de los alcaloides lolinas y hormonas (SA y JA) se utilizaron para caracterizar el estado de las defensas de las plantas. Dado que los insectos masticadores son afectados negativamente por la vía del JA (Halitschke & Baldwin, 2004), predecimos que la aplicación exógena del MeJA aumentará el nivel de resistencia de las plantas con y sin el endofito y reducirá así el crecimiento y desarrollo del insecto *S. frugiperda*. Sin embargo, mientras que la resistencia en plantas sin el endofito estará relacionada sólo con la defensa dependiente del JA, en plantas con el endofito el mecanismo hormonal será complementado por la defensa provista por los alcaloides.

## Metodología

### Plantas y colonia de larvas

Plantas de *Lolium multiflorum* (Lam.) simbióticas y no simbióticas con el endofito *Epichloë occultans* fueron generadas a partir de una población cosechada de un pastizal sucesional de la Pampa Argentina (36° 00' S, 61° 5' W). Las plantas no simbióticas fueron generadas sometiendo semillas con el endofito a un fungicida sistémico (Triadimenol 150 g kg<sup>-1</sup>, Baytan®). Con el fin de aumentar de multiplicar la población, se sembraron semillas tratadas y no tratadas con el fungicida en parcelas contiguas de 1 m<sup>2</sup> en el campo experimental del Instituto IFEVA - CONICET, Universidad de Buenos Aires, Argentina (34° 35' S, 58° 28' W). La polinización cruzada entre las plantas fue permitida con el objetivo de evitar cualquier diferenciación genética entre las plantas poblaciones (Gundel *et al.*, 2012). En cada parcela, las semillas fueron cosechadas y se determinó la proporción de semillas con el endofito. Para cada lote fueron seleccionadas al azar 100 semillas, las cuales fueron individualmente teñidas y examinadas con un microscopio a una potencia de 40X (Seed Squash Technique; Bacon & White Jr, 1994; Card *et al.*, 2011). La eficacia del tratamiento para eliminar el hongo fue muy alta; en el lote tratado con el fungicida sólo un 3% de las semillas tuvieron endofito mientras que en el lote no tratado con el fungicida, el 99% de las semillas presentaron el hongo.

Las plantas experimentales (con endofito: n = 50 y sin endofito: n = 50) fueron cultivadas individualmente en macetas de 1,5 L (partes iguales de suelo, arena y turba) durante la temporada de crecimiento normal para la especie (otoño-invierno-primavera). Las plantas fueron puestas al aire libre en el campo experimental del instituto y fueron regadas periódicamente para evitar situaciones de estrés. El estado simbiótico [con (E+) y sin el endofito (E-)] de cada planta experimental fue confirmado por segunda vez buscando el endofito en la base de la vaina de la hoja más externa (Bacon & White Jr, 1994). Las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) de nuestro experimento fueron obtenidas a partir de una colonia mantenida permanentemente en nuestro laboratorio (> 80 generaciones). La colonia fue criada con una dieta sintética estándar (compuesta por frijoles pinto, trigo, proteína de soja, levadura de cerveza, ácido ascórbico, tetraciclina, parabeno, ácido sórbico y agar) y bajo condiciones controladas [21°C (± 1), fotoperíodo L16: D8 h, y radiación 150 µmol m<sup>-2</sup>

s<sup>-1</sup>]. Todas las larvas utilizadas en el experimento correspondieron a una única puesta de una sola madre.

### **Diseño y condiciones experimentales**

Realizamos un experimento para probar las respuestas anti-herbivoría de plantas con y sin el endofito frente al insecto *S. frugiperda*. A principios de la primavera, 18 plantas E+ y 18 E- de 16 semanas de edad fueron seleccionadas desde el stock y trasladadas a una cámara de crecimiento con las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo que las establecidas para la colonia de *S. frugiperda*. La totalidad del experimento se realizó en ésta cámara experimental. Previo al traslado, las plantas fueron examinadas (para asegurar que no tuvieran insectos) y fueron caracterizadas en cuanto al número y estado (vegetativo o reproductivo) de los macollos. Cada planta individual fue encapuchada con una bolsa *voile* de color blanco soportada con una red de plástico tubular. Las plantas estaban comenzando la etapa reproductiva (encañazón-comienzo de la emergencia de espigas) con un número de  $32,19 \pm 0,97$  macollos por planta (rango: 24-46). Las plantas fueron aclimatadas a las condiciones de la cámara por una semana previo a la aplicación del tratamiento con el jasmonato.

El experimento consistió en un diseño factorial con el estado simbiótico de la planta (E+, E-) y la aplicación de metil jasmonato (MeJA+, MeJA-) como factores principales. El tratamiento del MeJA se realizó pulverizando exógenamente el jasmonato sobre la planta. La mitad de las plantas en cada estado simbiótico (9 E+ y 9 E-) fueron pulverizadas con 10 mL de 1 mmol L<sup>-1</sup> de MeJA (Sigma-Aldrich®) y la otra mitad con 10 mL de agua destilada. Tres días después de la aplicación del MeJA, una (1) larva en estadio IV de *S. frugiperda* fue puesta en todas y cada una de las plantas del experimento (e independientemente de los tratamientos experimentales). Las larvas estuvieron 4 h sin comida previo al contacto con las plantas. Luego de la puesta, las plantas fueron encapuchadas con la bolsa de *voile* para evitar el escape del insecto. El periodo de tiempo entre la aplicación del MeJA y la puesta de las larvas (3 días) fue para asegurar que las plantas desarrollaran una respuesta de defensa a los insectos. No observamos cambios en la superficie de los tejidos aéreos de las plantas luego de la aplicación del MeJA. El peso de las larvas, previo a la puesta en las plantas, fue de  $12,40 \pm 0,57$  mg (promedio  $\pm$  EE).

El crecimiento y el desarrollo individual de *S. frugiperda* se midió a través de los cambios en la masa corporal del insecto, el tiempo de desarrollo y la supervivencia en cada insecto de cada planta. Las mediciones fueron hechas cada 48 horas por un periodo total de 70 días. Cuando las larvas alcanzaron el estadio de pupa, los insectos fueron removidos de las plantas y puestos individualmente en placas Petri hasta la emergencia del adulto (manteniendo la identidad de cada unidad experimental, una planta = una placa Petri). Como variables de respuesta relacionadas con la masa corporal de los insectos, se utilizaron el peso de la larva al día 15 desde el comienzo de la puesta de los insectos en las plantas (o correspondiente al día 18 desde la exposición al MeJA), el peso de la pupa y el peso del adulto. Al día 15 las larvas se encontraban en el estadio VI y cercanas a alcanzar el máximo peso individual. Respecto al desarrollo de los insectos, se usaron como variables de respuesta el “tiempo hasta pupa”, “tiempo en pupa” y “tiempo hasta la eclosión de los adultos” (ésta última corresponde a la suma de las otras dos variables). Cuando las larvas alcanzaron el estadio de pupa (día 23-28 desde la aplicación del jasmonato), la biomasa

aérea de las plantas fue cosechada, secada en estufa a 60-70 °C por 48h y pesada. La biomasa aérea fue un 16% mayor en plantas con el endofito comparado a las plantas sin el hongo (E+: 6,92 ± 0,34 g peso seco y E-: 5,88 ± 0,33 g peso seco;  $F_{1,32} = 4,76$ ,  $P = 0,036$ ) y no fue afectada por la exposición con el jasmonato ( $F_{1,32} = 0,29$ ,  $P = 0,590$ ) ni por la interacción entre los tratamientos (estado simbiótico x tratamiento MeJA:  $F_{1,32} = 0,08$ ,  $P = 0,776$ )

Las concentraciones fisiológicas de las hormonas (SA y JA) y de los alcaloides del hongo se cuantificaron a partir de muestras de tejidos obtenidos en tres cosechas en serie. En el primer muestreo, se retiraron dos hojas (de un macollo) justo antes de la puesta de los insectos (en el día 3 después de la exposición al MeJA) para medir las concentraciones de las hormonas de defensa por medio de espectrometría de masa gaseosa (GC-MS, ver más adelante). En el día 5 luego del tratamiento con el MeJA, se cosechó la base de un macollo (pseudotallo formado por vainas foliares) en las plantas con el endofito para medir la concentración de los alcaloides por medio de cromatografía de gases (ver más adelante). El mismo procedimiento se realizó en las plantas sin endofito, aunque los alcaloides no se cuantificaron. El tercer muestreo se realizó al día 21 después del tratamiento con el MeJA para cuantificar tanto las hormonas como los alcaloides siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente. Teniendo en cuenta que los macollos tienen cierto grado de independencia (Yang & Hwa, 2008), todas las muestras fueron cosechadas de macollos lejanos, reduciendo así los efectos del "corte en serie de los tejidos" sobre el estado fisiológico general de la planta. Además, se evitó el muestreo de tejidos senescentes y en el caso particular de las mediciones de los alcaloides, se intentó cosechar tejidos en macollos que habían sido comidos por los insectos. La cosecha total de muestras (para hormonas y alcaloides) fue de alrededor de un 1% de la biomasa aérea total.

### **Cuantificación del SA, JA y lolinas**

Los protocolos de cuantificación del SA, del JA y las lolinas fueron exactamente los mismos que los expuestos en la sección metodología del capítulo III de esta tesis.

### **Análisis estadísticos**

Las variables de respuesta “concentraciones de las hormonas SA y JA” se analizaron por separado con modelos lineales mixtos utilizando el paquete nlme en el software R y la distribución normal (Pinheiro *et al.*, 2009). Las partes fijas de los modelos incluyeron el estado simbiótico de la planta (E+, E-), el tratamiento del MeJA (MeJA+, MeJA-) y el tiempo experimental (días 3 y 21 desde la aplicación del MeJA) como factores categóricos. Las partes aleatorias incluyeron el tiempo anidado en la maceta. Para modelar las desviaciones en la homogeneidad de la varianza en ambas variables de respuesta (SA y JA), se utilizaron estructuras de varianza “VarIdent” en la interacción entre los factores “estado simbiótico de la planta” y el “tratamiento MeJA” (Zuur *et al.*, 2009). Luego de esos procedimientos, se cumplieron todos los supuestos ANOVA (normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia de los residuos).

Las concentraciones de los alcaloides (lolinas totales, NFL y NANL) fueron analizadas por separado con modelos lineales de efectos mixtos utilizando el mismo paquete anteriormente mencionado y la distribución normal. Las partes fijas de los modelos incluyeron el tratamiento del MeJA (MeJA+, MeJA-) y el tiempo experimental (días 5 y 21 desde la aplicación del MeJA) como factores categóricos. Las partes aleatorias incluyeron el tiempo

anidado en la maceta. Para modelar las desviaciones en la homogeneidad de la varianza y los problemas de autocorrelación entre las medidas repetidas, se utilizó la estructura de la varianza “VarIdent” en el “tratamiento MeJA” y una estructura de correlación CorARMA ( $p = 1, q = 0$ ), respectivamente (Pinheiro *et al.*, 2009; Zuur *et al.*, 2009). Después de eso, se cumplieron todos los supuestos ANOVA (normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia de los residuos).

Las variables respuesta relacionadas con la masa corporal de los insectos (peso de la larva en el día 15, peso pupa y peso adulto) fueron analizadas por separado con modelos lineales utilizando la función `gls` del paquete `nlme` en el software R y la distribución normal (Pinheiro *et al.*, 2009). La masa corporal inicial de los insectos (al día 1) se utilizó como covariable para el peso de la larva y el peso de la pupa, y la masa de la pupa como covariable para el peso del adulto. La parte fija de cada modelo incluyó el estado simbiótico de la planta (E+, E-) y el tratamiento del MeJA (MeJA+, MeJA-) como factores categóricos y la respectiva covariable como factores continuos. Los supuestos del ANOVA se cumplieron en todos los modelos (normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia de los residuos). Cada una de las variables relacionadas con el desarrollo de los insectos (tiempo hasta pupa, tiempo en pupa y tiempo hasta la eclosión de los adultos) se analizó por separado con modelos lineales generalizados utilizando la función `glm` del paquete `lme4` en el software R y la distribución de Poisson (Bates *et al.*, 2015). No se observó sobre-dispersión en los datos. Todos los análisis cumplieron con los supuestos del ANOVA (independencia de los residuos). Las curvas de supervivencia de insectos se estimaron usando el modelo de Kaplan-Meier y los efectos de los tratamientos fueron testados con la prueba no paramétrica de Mantel-Cox usando el paquete `Survival` en R (Therneau & Grambsch, 2000). Dado que en la prueba de Mantel-Cox no es posible evaluar el efecto de las interacciones, evaluamos por separado el efecto del “estado simbiótico de la planta” en la supervivencia de los insectos alimentados en las plantas tratadas (MeJA+) y no tratadas (MeJA-) con el metil jasmonato. Fueron consideradas muertas las pupas en las que el adulto no emergió al día 70. Cuando diferencias estadísticas fueron detectadas en los tratamientos, usamos la función `lsmeans` del paquete homónimo en R para poner a prueba las diferencias entre los grupos (Lenth, 2016). En este capítulo los valores están expresados en promedios  $\pm$  EE.

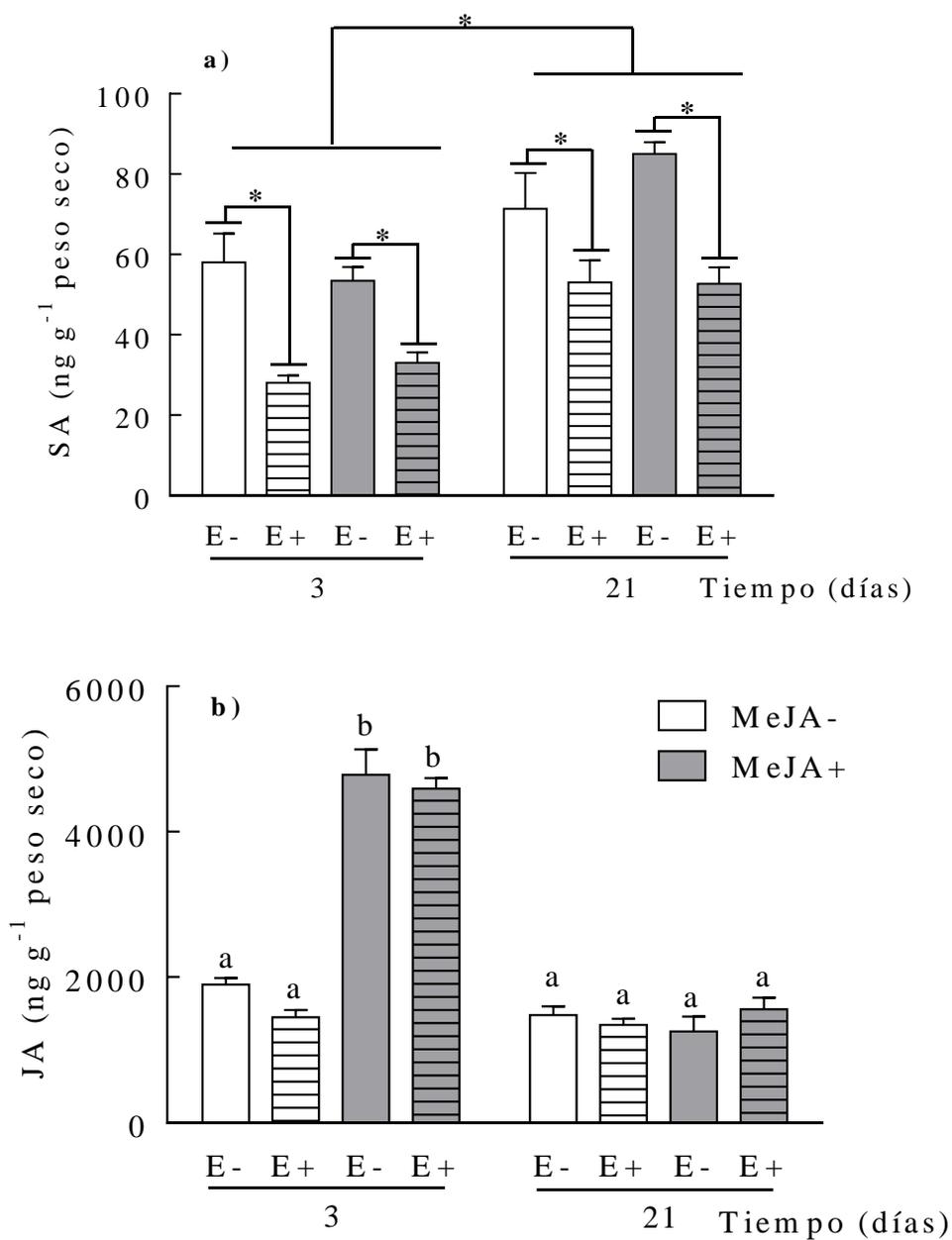
## Resultados

### Efectos del MeJA y del endofito sobre los niveles fisiológicos de las hormonas

El endofito redujo la concentración fisiológica del SA ( $F_{1,32} = 90,20; P < 0,001$ ) independientemente del tratamiento con el MeJA (estado simbiótico x tratamiento MeJA:  $F_{1,32} = 0,09; P = 0,761$ ) y del tiempo experimental (estado simbiótico x tiempo:  $F_{1,32} = 1,67; P = 0,205$ ). En promedio, la concentración del SA en plantas con el endofito fue un ~38% menor que en las plantas sin el hongo [Figura 4.1a; E+:  $41,67 \pm 2,64$  ng SA  $g^{-1}$  (peso seco) y E-:  $66,94 \pm 3,62$  ng SA  $g^{-1}$  (peso seco)]. Además, la concentración del SA aumentó durante el tiempo experimental ( $F_{1,32} = 84,34; P < 0,001$ ). La concentración del SA en el día 21 fue un 35% mayor a la que fue registrada al tercer día de haber aplicado el MeJA

[Figura 4.1a; concentración del SA en los días 3 y 21:  $43,11 \pm 2,99$  y  $65,50 \pm 3,62$  ng SA g<sup>-1</sup> (peso seco), respectivamente].

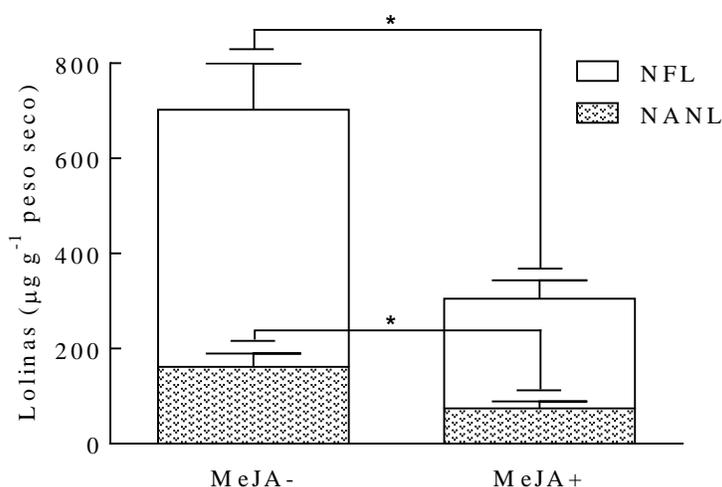
La concentración fisiológica del JA fue afectada por la interacción entre el tratamiento con el MeJA y el tiempo (Figura 4.1b;  $F_{1,32} = 201,86$ ;  $P < 0,001$ ). Mientras que la concentración del JA al día 3 de la exposición al jasmonato fue 2,8 veces mayor en plantas tratadas con el MeJA que en las no tratadas [MeJA+ y MeJA-:  $4685,00 \pm 186,50$  y  $1672,00 \pm 85,81$  ng JA g<sup>-1</sup> (peso seco), respectivamente], en el día 21 no hubieron diferencias entre plantas tratadas y no tratadas con el MeJA [MeJA+ y MeJA-:  $1407,00 \pm 131,80$  y  $1410,00 \pm 73,50$  ng JA g<sup>-1</sup> (peso seco), respectivamente]. Además, la concentración del JA fue independiente de la presencia del endofito ( $F_{1,32} = 0,18$ ;  $P = 0,673$ ) y sus interacciones (estado simbiótico x tratamiento MeJA:  $F_{1,32} = 1,76$ ;  $P = 0,193$ . estado simbiótico x tiempo:  $F_{1,32} = 0,55$ ;  $P = 0,463$ ).



**Figura 4.1** Concentración fisiológica de las hormonas ácido salicílico [SA, panel superior (a)] y ácido jasmónico [JA, panel inferior (b)] a los 3 y 21 días desde que las plantas de *Lolium multiflorum* con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras planas) el hongo endofito *Epichloë occultans* fueran tratadas (MeJA+, barras grises) y no tratadas (MeJA-, barras blancas) con el metil jasmonato. Los asteriscos y las letras distintas indican diferencias significativas. Las barras representan valores promedio  $\pm$  EE (n = 9).

### Efectos del MeJA sobre la concentración de los alcaloides lolinas

El tratamiento con el jasmonato redujo significativamente la concentración de las lolinas totales ( $F_{1,16} = 5,54$ ;  $P = 0,031$ ). La concentración de las lolinas totales fue 57% menor en las plantas tratadas con el MeJA que en las no tratadas [MeJA+ y MeJA-:  $304,80 \pm 52,96$  y  $702,10 \pm 127,90 \mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco)]. Se observó el mismo patrón de resultados para cada derivado de las lolinas. El tratamiento con el MeJA redujo un 58% y un 54% las concentraciones de NFL ( $F_{1,16} = 5,64$ ;  $P = 0,030$ ) y NANL ( $F_{1,16} = 4,95$ ;  $P = 0,040$ ), respectivamente (Figura 4.2). Ni la concentración de lolinas totales ni la de los derivados cambiaron en el tiempo (lolinas totales:  $F_{1,16} = 4,42$ ;  $P = 0,052$ . NFL:  $F_{1,16} = 4,29$ ;  $P = 0,055$ . NANL:  $F_{1,16} = 3,42$ ;  $P = 0,083$ ). Las lolinas tampoco fueron afectadas por la interacción entre el tratamiento con el MeJA y el tiempo (lolinas totales:  $F_{1,16} = 1,59$ ;  $P = 0,224$ . NFL:  $F_{1,16} = 2,86$ ;  $P = 0,109$ . NANL:  $F_{1,16} = 0,01$ ;  $P = 0,914$ )

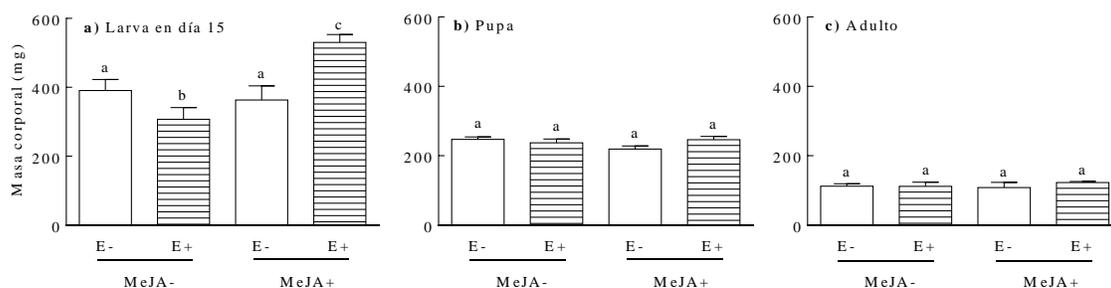


**Figura 4.2** Concentraciones de los alcaloides lolinas [N-formilolona (NFL, barras blancas) and N-acetilnorlolina (NANL, barras punteadas)] producidos por el hongo endofito *Epichloë occultans* en plantas de *Lolium multiflorum* tratadas (MeJA+) y no tratadas (MeJA-) con el metil jasmonato. Cada barra incluye las dos mediciones de lolinas cuantificadas para éste experimento (a los días 5 y 21 después de la aplicación del jasmonato). Notar que la concentración de las lolinas totales corresponde a la suma de los derivados NFL y NANL. Los asteriscos indican diferencias significativas. Las barras representan valores promedio  $\pm$  EE ( $n = 18$ ).

### Efectos del MeJA y del endofito sobre el crecimiento y desarrollo de *S. frugiperda*

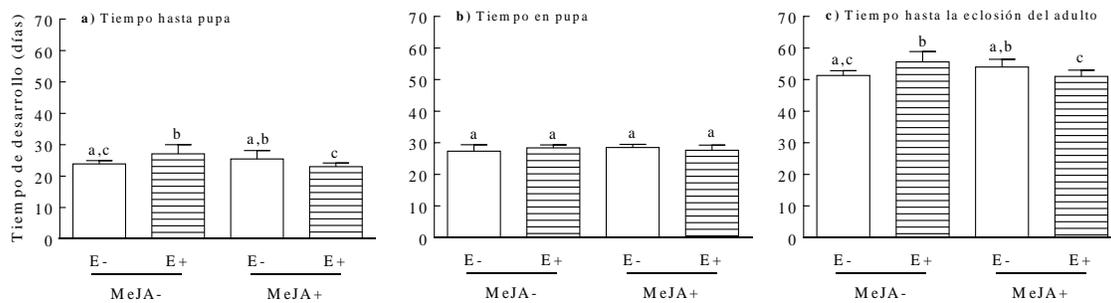
La masa corporal de las larvas de *S. frugiperda* varió con la interacción entre el estado simbiótico de la planta y el tratamiento con el MeJA ( $F_{1,31} = 14,55$ ;  $P < 0,001$ ). Mientras que el endofito redujo un 21% la masa corporal de las larvas alimentadas en plantas no tratadas con el MeJA, las larvas pesaron un 31% más en plantas con el endofito que en aquellas sin el hongo cuando fueron tratadas con el jasmonato (Figura 4.3a). Sin embargo, ninguno de los tratamientos afectó el peso de las pupas (Figura 4.3b; estado simbiótico:  $F_{1,29} = 0,71$ ;  $P = 0,406$ . Tratamiento MeJA:  $F_{1,29} = 1,37$ ;  $P = 0,251$ . Estado simbiótico x tratamiento MeJA:  $F_{1,29} = 3,72$ ;  $P = 0,064$ ) ni el de los adultos (Figura 4.3.c; estado simbiótico:  $F_{1,15} = 0,01$ ,  $P = 0,908$ . Tratamiento MeJA:  $F_{1,15} = 0,76$ ;  $P = 0,397$ . Estado

simbiótico x tratamiento MeJA:  $F_{1,15} = 0,05$ ;  $P = 0,832$ ). Aparte de los efectos indicados, el peso final de los insectos en los estadios de larva y adulto fue influenciado por la masa corporal inicial (covariable: peso de la larva en el día 1 para la variable “peso de larva”:  $F_{1,31} = 11,08$ ;  $P = 0,002$ . Peso de la larva en el día 1 para la variable “peso de pupa”:  $F_{1,29} = 0,11$ ;  $P = 0,742$ . Peso de la pupa para la variable “peso del adulto”:  $F_{1,15} = 4,75$   $P = 0,045$ ).



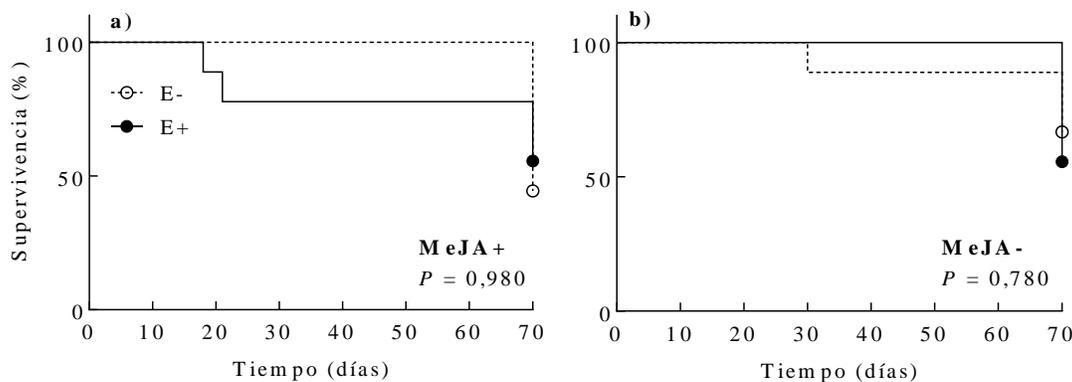
**Figura 4.3** Masa corporal de individuos de *Spodoptera frugiperda* en sus distintos estadios de vida [(a) larva, (b) pupa, y (c) adulto] alimentados en plantas de *Lolium multiflorum* con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras planas) el endofito *Epichloë occultans* y tratadas (MeJA+) y no tratadas (MeJA-) con el metil jasmonato. Las letras distintas indican diferencias significativas. Las barras representan los valores medios  $\pm$  EE (larva, n = 9; pupa, n = 9-7; adulto, n = 6-4).

El tiempo que demoraron los insectos en empupar y en que emergieran los adultos dependió de la interacción entre el estado simbiótico de la planta y el tratamiento con el MeJA [días hasta pupa:  $F_{1,30} = 14,74$ ;  $P < 0,001$  (Figura 4.4a). Días hasta la eclosión del adulto:  $F_{1,16} = 11,84$ ;  $P = 0,003$  (Figura 4.4b)]. En las plantas no expuestas al MeJA, el endofito retrasó el tiempo de empupado y la eclosión de los adultos en aproximadamente 4 días (Figura 4.4a y c, respectivamente). Por el contrario, en plantas expuestas al MeJA, los insectos empuparon y los adultos emergieron 3 días antes en las plantas con el endofito que en las sin el hongo (Figura 4.4a y c, respectivamente). El tiempo en que los insectos estuvieron en el estadio de pupa no fue afectado por ninguno de los tratamientos (Figura 4.4b; estado simbiótico:  $F_{1,16} = 0,07$ ;  $P = 0,797$ ; tratamiento MeJA:  $F_{1,16} = 0,05$ ;  $P = 0,820$ ; estado simbiótico x tratamiento MeJA:  $F_{1,16} = 1,93$ ;  $P = 0,183$ ).



**Figura 4.4** Tiempos de desarrollo de individuos de *Spodoptera frugiperda* en sus distintos estadios de vida [(a) larva, (b) pupa y (c) adulto] alimentados en plantas de *Lolium multiflorum* con (E+, barras con líneas horizontales) y sin (E-, barras blancas) el endofito *Epichloë occultans* y tratadas (MeJA+) y no tratadas (MeJA-) con el metil jasmonato. La variable “tiempo hasta la eclosión del adulto” representa la suma de las variables “tiempo hasta pupa” y “tiempo en pupa”. Las letras distintas indican diferencias significativas. Las barras representan los valores medios  $\pm$  EE (larva, n = 9; pupa, n = 9-7; adulto, n = 6-4).

La supervivencia total de los individuos de *S. frugiperda* durante los 70 días del experimento fue de 58,5%. No obstante, no fue afectada por la presencia del endofito tanto en las plantas expuestas al MeJA (Figura 4.5a; Mantel-Cox  $X^2_{(1)} < 0,01$ ;  $P = 0,980$ ) como en las no expuestas (Figura 4.5b; Mantel-Cox  $X^2_{(1)} = 0,07$ ;  $P = 0,780$ ). La supervivencia de los insectos fue un 56 y un 44% en las plantas con y sin el endofito tratadas con MeJA, respectivamente (Figura 4.5a). Por otro lado, en las plantas no tratadas con el jasmonato, la supervivencia de los insectos fue de un 56 y un 67% en presencia y ausencia del hongo endofito, respectivamente (Figura 4.5b).



**Figura 4.5** Porcentaje de supervivencia de individuos de *Spodoptera frugiperda* alimentados en plantas de *Lolium multiflorum* con (E+, círculos negros y líneas continuas) y sin (E-, círculos blancos y líneas discontinuas) el endofito *Epichloë occultans* y tratadas [MeJA+, (a)] y no tratadas [MeJA-, (b)] con el metil jasmonato. Se muestran los valores de significancia para cada una de las pruebas estadísticas (Mantel-Cox).

## Discusión

La hormona JA desempeña un papel central en la inmunidad de las plantas modulando las respuestas de defensa contra los patógenos necrótrofos y los insectos herbívoros masticadores (Halitschke & Baldwin, 2004). Planteamos la hipótesis que la aplicación exógena del MeJA, un activador de la vía del JA, aumentaría el nivel de resistencia de las plantas con y sin el endofito frente al insecto masticador *S. frugiperda*. Además, como los endofitos *Epichloë* producen alcaloides, compuestos químicos con propiedades anti-herbivoría, la activación de la defensa dependiente del JA actuaría como un complemento de la resistencia conferida por los alcaloides. Se encontró que plantas de *L. multiflorum* simbióticas con el endofito *E. occultans* fueron más resistentes a *S. frugiperda* que las plantas no simbióticas. Sin embargo, a pesar de que la concentración del JA fue significativamente alta en plantas expuestas al MeJA, las plantas con y sin el endofito no mostraron un aumento en la resistencia frente a los insectos. Inesperadamente, la exposición de las plantas con endofito al MeJA produjo una reducción en la concentración de los alcaloides lolinas, y un aumento del crecimiento y una extensión del desarrollo del herbívoro. Independiente del tratamiento con el MeJA, las plantas con el endofito tuvieron una menor concentración del SA.

La presencia de microorganismos benéficos en las plantas está generalmente asociada con una represión de la vía del SA (Stacey *et al.*, 2006; Navarro-Meléndez & Heil, 2014; Yasuda *et al.*, 2016). Al igual que en otras simbiosis, las plantas con el endofito mostraron una menor concentración de la hormona SA en comparación con las plantas sin el hongo (Stacey *et al.*, 2006; Pozo *et al.*, 2015; Yasuda *et al.*, 2016). En línea con este resultado, se ha observado que en las simbiosis pasto-endofito hay una regulación negativa de varios genes relacionados con la vía del SA (Johnson *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2015), así como también una susceptibilidad a ciertas especies de patógenos biotrofos (Welty *et al.*, 1991, 1993; Wäli *et al.*, 2006; Krauss *et al.*, 2007; Pańka Dariusz *et al.*, 2011; Sabzalian *et al.*, 2012). Además del efecto del endofito sobre el SA, la hormona aumentó la concentración una vez que las plantas fueron atacadas con *S. frugiperda*. Un incremento en el nivel del SA en respuesta a la herbivoría de lepidópteros generalistas ha reportado en plantas de *Nicotiana attenuata* (Heidel & Baldwin, 2004; Diezel *et al.*, 2009). Sin embargo, procesos endógenos de la planta (e.g. asociados al desarrollo fenológico) podrían también explicar el aumento del SA. Mientras la presencia del endofito parece modular la concentración del SA de la planta, otros experimentos (i.e. con y sin herbivoría) serán necesarios para determinar si la vía del SA responde o no al ataque de *S. frugiperda* en plantas de *L. multiflorum*.

La presencia de los endofitos en los pastos generalmente perjudica el crecimiento y/o desarrollo de los individuos de *S. frugiperda* (Hardy *et al.*, 1986; Davidson & Potter, 1995; Bultman & Ganey, 1995; Mark & Lincoln, 1996; Boning & Bultman, 1996; Bultman & Conard, 1998; Brem & Leuchtman, 2001; Bultman & Bell, 2003; Salminen *et al.*, 2005; Ball *et al.*, 2006; Afkhami & Rudgers, 2009; Crawford *et al.*, 2010). En nuestro estudio el endofito *E. occultans* también afectó negativamente el crecimiento y desarrollo de *S. frugiperda*. Específicamente, se encontró que la presencia del hongo redujo el peso de las larvas y extendió el tiempo de desarrollo de los insectos. Sin embargo, no observamos efectos del endofito y del tratamiento con el jasmonato sobre la supervivencia individual de

los insectos. Considerando que las larvas tuvieron un desarrollo más rápido en las plantas sin el endofito que en las plantas con el hongo, es esperable que luego de un intervalo de tiempo fijo, la masa corporal de las larvas sea mayor cuando los insectos se alimentaron de las plantas no simbióticas que de las simbióticas (Boning & Bultman, 1996). A pesar de que el endofito afectó negativamente el crecimiento y el desarrollo de las larvas de *S. frugiperda*, el hongo no afectó la masa corporal ni el tiempo de desarrollo de las pupas. La falta de efecto del endofito en las pupas podría explicarse por el hecho de que las larvas de *S. frugiperda* generalmente pierden la sensibilidad a los alcaloides a medida que avanzan en el desarrollo (Hardy *et al.*, 1986; Bultman & Conard, 1998). Así, durante los últimos estadios larvales, los insectos podrían haber compensado los efectos negativos del endofito aumentando, por ejemplo, el consumo de tejidos o la eficiencia para digerir los alimentos. Por otro lado, es interesante observar que a pesar de que la supervivencia de los insectos y el peso de las pupas no fueron afectadas por el endofito, alrededor del 50% de los adultos emergidos de larvas criadas en plantas con el endofito presentaron deformaciones en las alas (Bastias D.A., observación personal). Esto sugeriría que el endofito podría tener efectos adicionales en procesos relacionados con el desarrollo de los insectos (Thakur *et al.*, 2013).

La promoción de la resistencia de la planta frente al ataque de insectos masticadores con la aplicación del MeJA ha sido observada en varias especies (Thaler *et al.*, 1996; Stout *et al.*, 1998; van Dam *et al.*, 2000; Thaler *et al.*, 2001; Heijari *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2011, 2012). En el caso de los pastos de la subfamilia Poöideae, existe un único trabajo, según nuestro conocimiento, mostrando que la aplicación del MeJA aumenta el nivel de resistencia de las plantas hospederas (Simons *et al.*, 2008). En este trabajo, plantas de festuca alta (*S. arundinaceus*) expuestas al MeJA fueron más resistentes al ataque de los áfidos *Rhopalosiphum padi* que las plantas no expuestas (Simons *et al.*, 2008). En nuestro estudio, a pesar de que la aplicación del MeJA aumentó casi 3 veces la concentración de la hormona JA, el tratamiento no aumentó el nivel de resistencia de las plantas sin el endofito frente al herbívoro masticador *S. frugiperda*. Dos mecanismos no exclusivos podrían explicar este resultado contrario a nuestras predicciones: (i) la tolerancia de las plantas a la herbivoría de los insectos y/o (ii) la tolerancia de los insectos a las defensas de las plantas. El nivel de tolerancia de las plantas a los insectos puede aumentar en respuesta a la herbivoría real o a la simulada con el MeJA. Esta promoción en el grado de tolerancia de la planta ha sido denominada “secuestro de recursos inducido por la herbivoría” (HIRS, de inglés *herbivory-induced resource sequestration*) (Meuriot *et al.*, 2004; Babst *et al.*, 2005; Frost & Hunter, 2008; Gómez *et al.*, 2010; Ferrieri *et al.*, 2013), y es explicada por la re-localización de recursos químicos (e.g. compuestos carbonados y nitrogenados) hacia las raíces, protegiéndolos así de los herbívoros foliares (Schwachtje & Baldwin, 2008; Orians *et al.*, 2011). Respuestas del tipo HIRS han sido reportadas en varias especies de plantas (Meuriot *et al.*, 2004; Babst *et al.*, 2005; Frost & Hunter, 2008; Gómez *et al.*, 2010; Ferrieri *et al.*, 2013), incluyendo pastos (Wilsey *et al.*, 1997; Fahnestock & Detling, 1999; Green & Detling, 2000; Hokka *et al.*, 2004; Bazot *et al.*, 2005). Por lo tanto, si la exposición del MeJA hubiera contribuido a la re-localización de recursos a las raíces de *L. multiflorum*, más que a la activación de las defensas, se explicaría al menos en parte la susceptibilidad de las plantas al ataque de *S. frugiperda*. De forma alternativa, las larvas de *S. frugiperda* podrían haber sido naturalmente tolerantes a los metabolitos de defensa producidos por *L. multiflorum*. Entre los metabolitos de defensa más importantes de ésta

especie se encuentran las polifenol oxidasas y los inhibidores de proteinasas (Humphries, 1980; Faville *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). Las larvas de *S. frugiperda* son conocidas por poseer mecanismos efectivos para metabolizar una amplia gama de metabolitos de defensa. Los mecanismos incluyen la actividad de enzimas especializadas en detoxificación, la capacidad de regular las tasas de excreción de los metabolitos y tejidos con distinto grado de sensibilidad a las toxinas (Paulillo *et al.*, 2000; Brioschi *et al.*, 2007; Giraudo *et al.*, 2015).

Nuestra predicción planteaba que el tratamiento con MeJA en las plantas con endofito activaría las defensas dependientes del JA complementando así el fenotipo de resistencia dado por los alcaloides fúngicos. Sin embargo, a pesar de que el MeJA aumentó significativamente la concentración del JA de la planta, el tratamiento redujo la concentración de los alcaloides lolinas y, en consecuencia, disminuyó el nivel de resistencia de las plantas frente a *S. frugiperda*. Un resultado similar se encontró en plantas de festuca alta (*S. arundinaceus*), en las cuales tanto la producción de alcaloides como el nivel de resistencia conferido por el hongo endofito fueron perjudicados por el tratamiento con MeJA (Simons *et al.*, 2008). En estudios con hongos micorrízicos, la hormona JA puede regular positiva o negativamente el crecimiento del simbionte dependiendo del grado de colonización que tenga en las raíces de la planta (Hause *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2014). El efecto dual del JA en el hongo es explicado por el rol doble que tiene la hormona en el metabolismo de la planta, la re-localización de recursos y la activación de defensas (Hause *et al.*, 2007). Dado que los hongos micorrízicos viven en las raíces, la re-localización de recursos hacia los tejidos subterráneos sería beneficiosa para el hongo, pero un efecto opuesto ocurriría si la hormona promocionara las defensas del hospedero (Isayenkov *et al.*, 2005; Landgraf *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2014; Gutjahr *et al.*, 2015). En el caso de los endofitos foliares, la estimulación de cualquiera de los dos procesos por parte del JA (es decir, la re-localización de recursos o la activación de las defensas) afectaría negativamente al hongo. Dado que los endofitos de hojas (como *E. occultans*), viven en los tejidos apoplásticos, la re-localización de los nutrientes hacia las raíces reduciría la disponibilidad de recursos para el hongo. De hecho, tanto el crecimiento de los endofitos como la producción de los alcaloides son procesos altamente dependientes de la disponibilidad de carbohidratos y nitrógeno en los tejidos aéreos (Krauss *et al.*, 2007b; Rasmussen *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2014). Por otro lado, aunque parece contra-intuitivo que las defensas dependientes del JA puedan perjudicar a los hongos endofitos biotrófos, existen reportes mostrando este tipo efectos en hongos micorrízicos (Herrera-Medina *et al.*, 2008; Gutjahr *et al.*, 2015). De forma alternativa, existe la posibilidad de que el tratamiento con MeJA haya afectado directamente las rutas de biosíntesis de los alcaloides. Por ejemplo, se ha encontrado que el gen *LolC*, que codifica para una enzima de biosíntesis de lolinas, es regulado negativamente cuando plantas de *S. arundinaceus* con el endofito son expuestas al MeJA (Simons *et al.*, 2008). Por lo tanto, el efecto perjudicial del MeJA en el nivel de resistencia a la herbivoría de plantas con el endofito podría ser explicado tanto por mecanismos indirectos, como la re-localización de recursos o la activación de defensas de plantas, como por mecanismos directos que influyan en la biosíntesis de los alcaloides.

En conclusión, el presente estudio destaca la importancia de la interacción entre la vía del ácido jasmónico y la presencia de hongos endofitos foliares para la efectividad de las defensas anti-herbivoría de plantas simbióticas. Nuestros resultados sugieren que, en lugar

de complementar la defensa basada en los alcaloides, la hormona JA desempeña un papel regulador del mecanismo anti-herbivoría conferido por los endofitos. Una consecuencia ecológica importante de nuestros resultados es que cualquier factor biótico o abiótico que active la vía del JA podría reducir la eficacia de la defensa proporcionada por los hongos endofito *Epichloë*. Un ejemplo de activador de la vía del JA es la radiación UV-B (Ballaré, 2014). En línea con esta hipótesis, el nivel de resistencia contra la langosta *Shistocerca gregaria* se redujo significativamente cuando plantas de *Festuca pratensis* simbióticas con el endofito *E. festucae* fueron expuestas a la radiación UV-B (McLeod *et al.*, 2001). Es importante destacar que dado que la tolerancia de las larvas de *Spodoptera frugiperda* a las defensas químicas de la planta aumenta con el desarrollo del insecto (Hardy *et al.*, 1986; Bultman & Conard, 1998), nuestros resultados podrían haber sido distintos si hubiéramos utilizado larvas en estadios anteriores a las usadas en este estudio (i.e. estadio IV). De acuerdo con esta hipótesis, el nivel de resistencia dado por las defensas de las plantas (dependientes del JA) y las del endofito (alcaloides) debería ser mayor frente a larvas en los primeros estadios (e.g. larvas neonatas) comparado a los últimos estadios. Así, la respuesta de resistencia de plantas de *L. multiflorum* expuestas al MeJA si se podría observar frente al ataque de, por ejemplo, larvas neonatas.

## Capítulo V: Discusión general

---

La simbiosis de los pastos con los hongos endofitos foliares está llamando la atención tanto en el conocimiento básico de las defensas de las plantas contra herbívoros como en las aplicaciones potenciales que ésta interacción podría tener en la agricultura sustentable (Gundel *et al.*, 2013; Kauppinen *et al.*, 2016). Los endofitos del género *Epichloë* son conocidos por producir alcaloides, compuestos químicos con actividades anti-herbivoría, que protegen a sus plantas hospederas (Schardl *et al.*, 2013b; Panaccione *et al.*, 2014). Mientras que el rol de los alcaloides fúngicos en la protección de los pastos ha sido vastamente documentado, muy poco se sabe sobre cómo las plantas hospederas pueden regular las defensas conferidas por el endofito y si los hongos afectan o no las respuestas de defensa del hospedero. Esta tesis entrega nuevas ideas en lo que se conoce actualmente de la interacción entre las plantas y los hongos endofitos foliares, específicamente en el área de la expresión de las defensas.

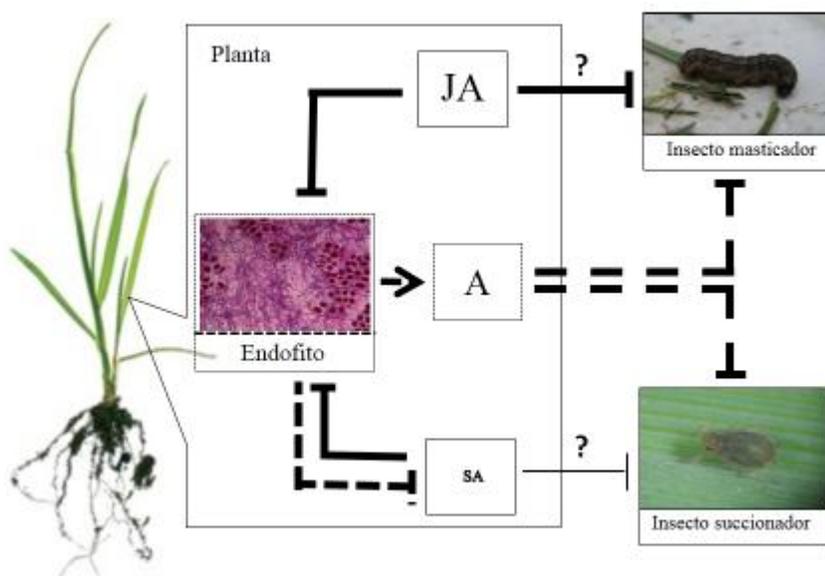
En esta tesis se estudiaron los mecanismos de resistencia contra insectos de pastos en simbiosis con hongos endofito del género *Epichloë*. Específicamente se estudió la interacción entre los mecanismos de defensa de la planta, dependientes de las vías de señalización del ácido salicílico y del ácido jasmónico (SA y JA, respectivamente), y los del endofito, basado en los alcaloides, frente a insectos herbívoros succionadores de savia y masticadores de tejidos foliares de la planta. En una primera parte (capítulo II) se generó un modelo de resistencia a los insectos en plantas con el endofito. El modelo tiene como novedad que integra, por primera vez, las defensas propias de la planta y las conferidas por el endofito. En la segunda y tercera parte (capítulos III y IV, respectivamente) se buscó entender en profundidad la interacción entre las defensas de la planta hospedero y el hongo endofito a través de la manipulación de las hormonas de defensa de las plantas (específicamente las vías del SA y del JA). Para ello se usó el sistema de estudio compuesto por plantas de *Lolium multiflorum* en simbiosis con su hongo endofito natural *Epichloë occultans* y los insectos herbívoros *Rhopalosiphum padi* y *Spodoptera frugiperda*.

En concordancia con las predicciones derivadas de la hipótesis 1.1 (ver capítulo I), los resultados del meta-análisis (capítulo II) sugieren que aún en los casos donde el endofito produce alcaloides inefectivos contra un insecto herbívoro atacante, la planta puede protegerse, aunque sólo de los masticadores. Proponemos que ésta resistencia se podría corresponder con el priming de la vía del JA, lo cual ya ha sido reportado en otras simbiosis similares (planta-micorrizas, planta-rizobacterias). Así, nuestros resultados muestran que las plantas con el endofito podrían presentar una vía de defensa alternativa (i.e., el priming del JA) al muy bien conocido mecanismo de resistencia dado por los alcaloides fúngicos.

En línea con la hipótesis 2.1 y su predicción, la exposición de las plantas a la hormona SA redujo la concentración de los alcaloides fúngicos y consecuentemente disminuyó la resistencia conferida por los hongos endofitos frente a los áfidos. Estas evidencias muestran por primera vez que la vía del SA puede regular el mutualismo defensivo dado por los hongos endofitos. Además, las plantas con los hongos endofitos *Epichloë* tuvieron concentraciones más bajas de la hormona SA que las plantas sin el hongo. Sin embargo,

contrario a lo esperado, la promoción de la hormona SA no aumentó el nivel de resistencia a los insectos en las plantas sin el endofito (ver capítulo III, Figura 5.1).

Contrario a la hipótesis 3.1 y su predicción, el tratamiento con el MeJA (un activador de la vía del JA) no complementó la resistencia dada por los alcaloides fúngicos y tampoco aumentó la resistencia de plantas sin el endofito frente al insecto masticador. Inesperadamente, la exposición de las plantas con endofito al MeJA redujo la concentración de los alcaloides y consecuentemente, el nivel de resistencia al insecto (ver capítulo IV, Figura 5.1). Esto muestra que, al igual que el SA, la vía del JA también puede modular la defensa conferida por el hongo endofito, un hallazgo novedoso para el conocimiento de la simbiosis pasto-endofito.



**Figura 5.1** Modificaciones del modelo general propuesto en esta tesis (Figura 1.1) en base a los resultados experimentales (capítulos III y IV). En el caso representado en la figura, tanto el ácido jasmónico (JA) como el ácido salicílico (SA) regulan la producción de alcaloides y el nivel de resistencia dado por el endofito. El endofito por su parte, es un regulador importante de la hormona SA de la planta y de la herbivoría dada por insectos masticadores y succionadores. Las flechas indican una regulación positiva y los conectores truncados una inhibición o regulación negativa. Las líneas discontinuas muestran regulaciones llevadas a cabo por el endofito, mientras que las continuas regulaciones hechas por la planta. El signo de interrogación indica interacciones no resueltas con los experimentos.

Los resultados experimentales de ésta tesis muestran un novedoso mecanismo de regulación de la planta sobre la defensa conferida por el hongo endofito (Figura 5.1). Este mecanismo está mediado por las hormonas de defensa de la planta (SA y JA), cuya promoción regula negativamente la producción de los alcaloides del endofito afectando así,

la resistencia de la planta hospedera frente a los insectos herbívoros. Estos hallazgos brindan un marco mecanístico para entender por ejemplo, por qué algunos factores ecológicos (e.g. ozono troposférico, radiación UVB), en principio inconexos con las defensas de las plantas simbióticas, afectan el mecanismo anti-herbivoría que provee el hongo endofito (McLeod *et al.*, 2001; Ueno *et al.*, 2015). Sería interesante en futuros experimentos evaluar si ésta regulación del mutualismo defensivo ocurre en contextos ecológicos más reales a los utilizados en esta tesis (i.e. aplicación exógena de las hormonas), como por ejemplo incluyendo en los experimentos factores que naturalmente activen las vías de defensa hormonales de la planta. Además, de interés será determinar cuál es el mecanismo específico por el cual las hormonas regulan la producción de los alcaloides producidos por el endofito. En este sentido, la cuantificación de la biomasa del hongo endofito y/o la evaluación de la expresión de los genes de síntesis de los alcaloides prometen esclarecer, al menos en una primera instancia, el mecanismo.

Nuestros resultados sugieren que el endofito puede modular la concentración del SA de la planta (Figura 5.1), una respuesta que ya ha sido reportada para otros microorganismos benéficos. Al ser simbioses bióticas, se cree que los microorganismos deben atenuar la respuesta dependiente del SA de la planta para crecer por los tejidos del hospedero. Según esta hipótesis, sería esperable que haya una mayor regulación del SA- por parte del endofito- en las etapas del ciclo del hongo en que las hifas estén creciendo a una alta tasa (e.g. crecimiento reproductivo de la planta) y en tejidos donde exista una alta biomasa de hifas del hongo (e.g. base de los macollos). Para abordar estas preguntas, una aproximación útil sería el uso de plantas transgénicas o mutantes, específicamente para la producción del SA de la planta. En los experimentos que conciernen a la simbiosis pasto-endofito pocas veces se han utilizado plantas transgénicas o mutantes, sin embargo los protocolos de generación de este tipo de plantas en *Lolium* spp. han ido mejorando en el tiempo (ver Lee *et al.*, 2010) y casos exitosos ya han sido reportados (Wilkinson *et al.*, 2000; Bettany *et al.*, 2003).

Al contrario de lo hipotetizado en ésta tesis (Figura 1.1), nuestros resultados muestran que la vía del SA de la planta no regula las defensas contra las poblaciones de los áfidos. Posiblemente sea la vía del JA la que efectivamente controle a los insectos succionadores en plantas de *L. multiflorum* al igual como ya ha sido demostrado en varias especies de plantas (incluidas otras gramíneas) (Moran & Thompson, 2001; Moran *et al.*, 2002; Zhu-Salzman *et al.*, 2004; De Vos *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Simons *et al.*, 2008). Por otro lado, la falta de efectos del tratamiento con el MeJA sobre el crecimiento y desarrollo de los individuos de *S. frugiperda* podría ser explicada por la alta tolerancia que tuvieron las larvas a las defensas de las plantas. Como fue mencionado en el capítulo respectivo, usamos larvas en estadio IV, las cuales probablemente ya poseían mecanismos efectivos de detoxificación a los metabolitos de defensa de las plantas [generalmente las larvas Lepidópteras van adquiriendo éstos mecanismos a medida que avanzan en el desarrollo (Ahmad, 1986)]. Por lo tanto, la elección de larvas de *S. frugiperda* en los primeros estadios (e.g. neonatas) serían más apropiadas para entender los efectos de las defensas de las plantas sobre el crecimiento y desarrollo de los insectos masticadores.

## Perspectivas

Los resultados de esta tesis abren interesantes interrogantes respecto a la resistencia de las plantas en simbiosis con hongos endofito *Epichloë* frente a insectos herbívoros. Algunas de las preguntas son resumidas a continuación:

### **1. ¿El aumento de la resistencia a los insectos masticadores visto en las plantas con el endofito es realmente explicado por el priming de la vía del JA? y ¿la susceptibilidad contra los insectos succionadores por la represión de la vía del SA?**

Mientras que en nuestros resultados experimentales no hubieron indicios de una activación de la vía de defensa del JA con la presencia del endofito, pruebas de resistencia usando tejidos con bajas concentraciones de los alcaloides (e.g. raíces, extremos de láminas foliares) o en contextos ecológicos donde la producción de los alcaloides esté limitada (e.g., suelos deficientes en nitrógeno), serían escenarios interesantes para poner a prueba la existencia del priming. Por otro lado, los experimentos mostraron que efectivamente la presencia del endofito disminuye la concentración del SA de la planta, pero que la activación de ésta vía no controla las poblaciones de los áfidos. Es posible que sean más bien los atributos asociados al herbívoro los que expliquen la susceptibilidad de las plantas con el endofito a las poblaciones de los insectos succionadores. Por ejemplo, los insectos especializados en alimentarse de los pastos deberían presentar una mayor cantidad de mecanismos y estrategias de detoxificación de los metabolitos de defensa producidos por ese grupo de plantas que los insectos generalistas (Ali & Agrawal, 2012). Este podría ser el caso de los áfidos *Sipha maydis* que son herbívoros especializados en los pastos y que comúnmente se alimentan de plantas de *L. multiflorum* con el endofito, pero que parecen no ser afectados ni por los alcaloides ni por las defensas de las plantas (Omacini *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2011).

### **2. ¿Frente a qué grupo de atacantes la depresión de la vía del SA sería perjudicial, en términos de resistencia, para las plantas con los endofitos?**

Considerando la gran cantidad de evidencias apuntando a que es la vía del SA la que regula la respuesta de defensa de las plantas frente a los patógenos biótrofos (Glazebrook, 2005), es probable que la baja concentración del SA que observamos en los pastos con el endofito disminuya el nivel de resistencia de las plantas contra éste tipo de patógenos. Como fue mostrado en la tesis, varios experimentos han mostrado la susceptibilidad de las plantas con el endofito frente a distintas especies de patógenos biótrofos (Welty *et al.*, 1991, 1993; Wäli *et al.*, 2006; Krauss *et al.*, 2007b; Pańka Dariusz *et al.*, 2011; Sabzalian *et al.*, 2012), sin embargo aún no se han hecho experimentos específicos en el sistema pasto-endofito que integren el marco teórico de las defensas hormonales de las plantas y el ataque de los patógenos.

### **3. ¿Cuán sensibles son los hongos endofitos (y las defensas que brindan al pasto hospedero) a las perturbaciones externas que activan las vías del SA y del JA?**

Nuestros resultados muestran que la activación de las vías de señalización del SA y del JA afectan negativamente la producción de los alcaloides y la resistencia anti-herbivoría dada por los endofitos. Esto tendría como consecuencia que cualquier factor biótico o abiótico que active alguna de las vías podría tener un efecto perjudicial sobre el endofito. Sería interesante en estudios futuros evaluar los cambios en las concentraciones de las hormonas

de defensa de las plantas usando algunos activadores naturales de las vías, y si los cambios en las hormonas se correlacionan o no con la producción de los alcaloides fúngicos y el nivel de resistencia conferido por los hongos endofitos. En ésta tesis proponemos, por ejemplo, que serían las promociones de las vías del SA y del JA, dada la exposición de las plantas al ozono troposférico y a la radiación UV-B, respectivamente, los mecanismos que expliquen la disminución en los niveles de resistencia de las plantas con el endofito frente a los insectos herbívoros (McLeod *et al.*, 2001; Ueno *et al.*, 2015).

## Bibliografía

**Adams DC, Gurevitch J, Rosenberg MS. 1997.** Resampling tests for meta-analysis of ecological data. *Ecology* **78**: 1277–1283.

**Afkhami ME, Rudgers JA. 2009.** Endophyte-mediated resistance to herbivores depends on herbivore identity in the wild grass *Festuca subverticillata*. *Environmental Entomology* **38**: 1086–1095.

**Agrawal AA, Hastings AP, Johnson MTJ, Maron JL, Salminen JP. 2012.** Insect herbivores drive real-time ecological and evolutionary change in plant populations. *Science* **338**: 113–116.

**Ahmad S. 1986.** Enzymatic adaptations of herbivorous insects and mites to phytochemicals. *Journal of Chemical Ecology* **12**: 533–560.

**Ahmad S, Govindarajan S, Johnson-Cicalese JM, Funk CR. 1987.** Association of a fungal endophyte in perennial ryegrass with antibiosis to larvae of the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **43**: 287–294.

**Ali JG, Agrawal AA. 2012.** Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in Plant Science* **17**: 293–302.

**Ambrose KV, Belanger FC. 2012.** SOLiD-SAGE of endophyte-infected red fescue reveals numerous effects on host transcriptome and an abundance of highly expressed fungal secreted proteins. *PLoS ONE* **7**: e53214.

**Ambrose KV, Tian Z, Wang Y, Smith J, Zylstra G, Huang B, Belanger FC. 2015.** Functional characterization of salicylate hydroxylase from the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Scientific Reports* **5**: 10939.

**Babst BA, Ferrieri RA, Gray DW, Lerdau M, Schlyer DJ, Schueller M, Thorpe MR, Orians CM. 2005.** Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in *Populus*. *New Phytologist* **167**: 63–72.

**Bacon CW, White Jr JF. 1994.** Stains, media, and procedures for analyzing endophytes. In: Bacon CW, White Jr JF, eds. *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. CRC Press, Boca Raton, 47–56.

**Baldauf MW, Mace WJ, Richmond DS. 2011.** Endophyte-mediated resistance to black cutworm as a function of plant cultivar and endophyte strain in tall fescue. *Environmental Entomology* **40**: 639–647.

**Ball OJ-P, Coudron TA, Tapper BA, Davies E, Trently D, Bush LP, Gwinn KD, Popay AJ. 2006.** Importance of host plant species, *Neotyphodium* endophyte isolate, and alkaloids on feeding by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Economic Entomology* **99**: 1462–1473.

- Ball OJP, Miles CO, Prestidge RA. 1997.** Ergopeptine alkaloids and *Neotyphodium lolii*-mediated resistance in perennial ryegrass against adult *Heteronychus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology* **90**: 1382–1391.
- Ball OJ, Prestidge RA, Sprosen JM. 1995.** Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in perennial ryegrass. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1527–1533.
- Ballaré CL. 2014.** Light regulation of plant defense. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 335–363.
- Ballaré CL, Mazza CA, Austin AT, Pierik R. 2012.** Canopy light and plant health. *Plant Physiology* **160**: 145–155.
- Balmer A, Pastor V, Gamir J, Flors V, Mauch-Mani B. 2015.** The ‘prime-ome’: towards a holistic approach to priming. *Trends in Plant Science* **20**: 443–452.
- Bari R, Jones JG. 2009.** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473–488.
- Barker GM, Pottinger RP, Addison PJ. 1984a.** Effect of *Lolium* endophyte fungus infections on survival of larval Argentine stem weevil. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **27**: 279–281.
- Barker GM, Pottinger RP, Addison PJ, Prestidge RA. 1984b.** Effect of *Lolium* endophyte fungus infections on behaviour of adult Argentine stem weevil. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **27**: 271–277.
- Bastías DA, Ueno AC, Machado Assefh CR, Alvarez AE, Young CA, Gundel PE. 2017.** Metabolism or behavior: explaining the performance of aphids on alkaloid-producing fungal endophytes in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Oecologia* **185**: 245–256.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. 2015.** Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* **67**: 1–48.
- Bazot S, Mikola J, Nguyen C, Robin C. 2005.** Defoliation-induced changes in carbon allocation and root soluble carbon concentration in field-grown *Lolium perenne* plants: do they affect carbon availability, microbes and animal trophic groups in soil? *Functional Ecology* **19**: 886–896.
- Bettany A, Dalton S, Timms E, Manderyck B, Dhanoa M, Morris P. 2003.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.). *Plant Cell Reports* **21**: 437–444.
- Bixby AJ, Potter DA. 2010.** Influence of endophyte (*Neotyphodium lolii*) infection of perennial ryegrass on susceptibility of the black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) to a baculovirus. *Biological Control* **54**: 141–146.

- Boning RA, Bultman TL. 1996.** A test for constitutive and induced resistance by tall Fescue (*Festuca arundinacea*) to an insect herbivore: impact of the fungal endophyte, *Acremonium coenophialum*. *American Midland Naturalist* **136**: 328–335.
- Boughton AJ, Hoover K, Felton GW. 2006.** Impact of chemical elicitor applications on greenhouse tomato plants and population growth of the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **120**: 175–188.
- Breen JP. 1992.** Temperature and seasonal effects on expression of *Acremonium* endophyte-enhanced resistance to *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* **21**: 68–74.
- Breen JP. 1994.** *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology* **39**: 401–423.
- Brem D, Leuchtman A. 2001.** *Epichloë* grass endophytes increase herbivore resistance in the woodland grass *Brachypodium sylvaticum*. *Oecologia* **126**: 522–530.
- Brioschi D, Nadalini LD, Bengtson MH, Sogayar MC, Moura DS, Silva-Filho MC. 2007.** General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**: 1283–1290.
- Bultman TL, Bell GD. 2003.** Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. *Oikos* **103**: 182–190.
- Bultman TL, Bell G, Martin WD. 2004.** A fungal endophyte mediates reversal of wound-induced resistance and constrains tolerance in a grass. *Ecology* **85**: 679–685.
- Bultman TL, Conard NJ. 1998.** Effects of endophytic fungus, nutrient level, and plant damage on performance of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* **27**: 631–635.
- Bultman TL, Ganey DT. 1995.** Induced resistance to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) mediated by a fungal endophyte. *Environmental Entomology* **24**: 1196–1200.
- Bultman TL, Pulas C, Grant L, Bell G, Sullivan TJ. 2006.** Effects of fungal endophyte isolate on performance and preference of bird cherry-oat aphid. *Environmental Entomology* **35**: 1690–1695.
- Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM, Ton J. 2013.** Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in Plant Science* **18**: 539–545.
- Card SD, Rolston MP, Park Z, Cox N, Hume DE. 2011.** Fungal endophyte detection in pasture grass seed utilising the infection layer and comparison to other detection techniques. *Seed Science and Technology* **39**: 581–592.

**Charlton ND, Craven KD, Afkhami ME, Hall BA, Ghimire SR, Young CA. 2014.** Interspecific hybridization and bioactive alkaloid variation increases diversity in endophytic *Epichloë* species of *Bromus laevipes*. *FEMS Microbiology Ecology* **90**: 276–289.

**Christensen MJ, Bennett RJ, Ansari HA, Koga H, Johnson RD, Bryan GT, Simpson WR, Koolaard JP, Nickless EM, Voisey CR. 2008.** *Epichloë* endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 84–93.

**Clay K. 1988.** Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**: 10–16.

**Clay K. 2014.** Defensive symbiosis: a microbial perspective. *Functional Ecology* **28**: 293–298.

**Clay K, Cheplick G. 1989.** Effect of ergot alkaloids from fungal endophyte-infected grasses on fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Journal of Chemical Ecology* **15**: 169–182.

**Clay K, Schardl C. 2002.** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* **160**: S99–S127.

**Clement S. 2001.** Incidence and diversity of *Neotyphodium* fungal endophytes in tall fescue from Morocco, Tunisia, and Sardinia. *Crop Science* **41**: 570–576.

**Clement SL, Lester DG, Wilson AD, Johnson RC, Bouton JH. 1996.** Expression of russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) resistance in genotypes of tall fescue harboring different isolates of *Acremonium* endophyte. *Journal of Economic Entomology* **89**: 766–770.

**Clement SL, Pike KS, Kaiser WJ, Wilson AD. 1990.** Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **63**: 646–648.

**Clement SL, Wilson AD, Lester DG, Davitt CM. 1997.** Fungal endophytes of wild barley and their effects on *Diuraphis noxia* population development. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **82**: 275–281.

**Conrath U. 2011.** Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* **16**: 524–531.

**Cooper WR, Goggin FL. 2005.** Effects of jasmonate-induced defenses in tomato on the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **115**: 107–115.

**Cooper WC, Jia L, Goggin FL. 2004.** Acquired and R-gene-mediated resistance against the potato aphid in tomato. *Journal of Chemical Ecology* **30**: 2527–2542.

**Crawford KM, Land JM, Rudgers JA. 2010.** Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. *Oecologia* **164**: 431–444.

**van Dam NM, Hadwich K, Baldwin IT. 2000.** Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Oecologia* **122**: 371–379.

**Davidson AW, Potter DA. 1995.** Response of plant-feeding, predatory, and soil-inhabiting invertebrates to *Acremonium* endophyte and nitrogen fertilization in tall fescue turf. *Journal of Economic Entomology* **88**: 367–379.

**De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J-P, Van Loon LC, Dicke M, et al. 2005.** Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 923–937.

**Dicke M, Baldwin IT. 2010.** The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’. *Trends in Plant Science* **15**: 167–175.

**Diezel C, von Dahl CC, Gaquerel E, Baldwin IT. 2009.** Different Lepidopteran elicitors account for cross-talk in herbivory-induced phytohormone signaling. *Plant Physiology* **150**: 1576.

**Dinkins RD, Nagabhyru P, Graham MA, Boykin D, Schardl CL. 2017.** Transcriptome response of *Lolium arundinaceum* to its fungal endophyte *Epichloë coenophiala*. *New Phytologist* **213**: 324–337.

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

**Eichenseer H, Dahlman DL. 1992.** Antibiotic and deterrent qualities of endophyte-infected tall fescue to two aphid species (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* **21**: 1046–1051.

**Eichenseer H, Dahlman DL, Bush LP. 1991.** Influence of endophyte infection, plant age and harvest interval on *Rhopalosiphum padi* survival and its relation to quantity of N-formyl and N-acetyl loline in tall fescue. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **60**: 29–38.

**Ellis C, Karafyllidis I, Turner JG. 2002.** Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 1025–1030.

**Erb M, Meldau S, Howe GA. 2012.** Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Special Issue: Specificity of plant–enemy interactions* **17**: 250–259.

- Faeth SH, Fagan WF. 2002.** Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology* **42**: 360–368.
- Fahnestock JT, Detling JK. 1999.** Plant responses to defoliation and resource supplementation in the pryor mountains. *Journal of Range Management* **52**: 263–270.
- Faville MJ, Vecchies AC, Schreiber M, Drayton MC, Hughes LJ, Jones ES, Guthridge KM, Smith KF, Sawbridge T, Spangenberg GC, et al. 2004.** Functionally associated molecular genetic marker map construction in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 12–32.
- Fernández I, Merlos M, López-Ráez JA, Martínez-Medina A, Ferrol N, Azcón C, Bonfante P, Flors V, Pozo MJ. 2014.** Defense related phytohormones regulation in arbuscular mycorrhizal symbioses depends on the partner genotypes. *Journal of Chemical Ecology* **40**: 791–803.
- Ferrieri AP, Agtuca B, Appel HM, Ferrieri RA, Schultz JC. 2013.** Temporal changes in allocation and partitioning of new carbon as <sup>11</sup>C elicited by simulated herbivory suggest that roots shape aboveground responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **161**: 692–704.
- Fournier DA, Skaug HJ, Ancheta J, Ianelli J, Magnusson A, Maunder MN, Nielsen A, Sibert J. 2012.** AD model builder: using automatic differentiation for statistical inference of highly parameterized complex nonlinear models. *Optimization Methods and Software* **27**: 233–249.
- Frost CJ, Hunter MD. 2008.** Herbivore-induced shifts in carbon and nitrogen allocation in red oak seedlings. *New Phytologist* **178**: 835–845.
- Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM. 2008.** Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology* **146**: 818–824.
- Giraud M, Hilliou F, Fricaux T, Audant P, Feyereisen R, Le Goff G. 2015.** Cytochrome P450s from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): responses to plant allelochemicals and pesticides. *Insect Molecular Biology* **24**: 115–128.
- Glazebrook J. 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205–227.
- Gols R. 2014.** Direct and indirect chemical defences against insects in a multitrophic framework. *Plant, Cell & Environment* **37**: 1741–1752.
- Gómez S, Ferrieri RA, Schueller M, Orians CM. 2010.** Methyl jasmonate elicits rapid changes in carbon and nitrogen dynamics in tomato. *New Phytologist* **188**: 835–844.
- Green RA, Detling JK. 2000.** Defoliation-induced enhancement of total aboveground nitrogen yield of grasses. *Oikos* **91**: 280–284.

- Gundel PE, Martínez-Ghersa MA, Omacini M, Cuyeu R, Pagano E, Ríos R, Ghersa CM. 2012.** Mutualism effectiveness and vertical transmission of symbiotic fungal endophytes in response to host genetic background. *Evolutionary Applications* **5**: 838–849.
- Gundel PE, Omacini M, Sadras VO, Ghersa CM. 2010.** The interplay between the effectiveness of the grass-endophyte mutualism and the genetic variability of the host plant. *Evolutionary Applications* **3**: 538–546.
- Gundel PE, Pérez LI, Helander M, Saikkonen K. 2013.** Symbiotically modified organisms: nontoxic fungal endophytes in grasses. *Trends in Plant Science* **18**: 420–427.
- Gundel PE, Rudgers JA, Ghersa CM. 2011.** Incorporating the process of vertical transmission into understanding of host–symbiont dynamics. *Oikos* **120**: 1121–1128.
- Gurevitch J, Hedges LM. 2001.** Meta-analysis: combining the results of independent experiments. In: Scheiner S, Gurevitch J, eds. Design and analysis of ecological experiments. New York: Oxford University Press Inc., 378–398.
- Gutjahr C. 2014.** Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhiza development. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 26–34.
- Gutjahr C, Siegler H, Haga K, Iino M, Paszkowski U. 2015.** Full establishment of arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice occurs independently of enzymatic jasmonate biosynthesis. *PLOS ONE* **10**: e0123422.
- Halitschke R, Baldwin IT. 2004.** Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**: 238–245.
- Hardy TN, Clay K, Hammond AM. 1986.** Leaf age and related factors affecting endophyte-mediated resistance to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in tall fescue. *Environmental Entomology* **15**: 1083–1089.
- Hartley SE, Gange AC. 2008.** Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology* **54**: 323–342.
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D. 2002.** Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* **130**: 1213–1220.
- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D. 2007.** Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Molecular Basics of Mycorrhizal Symbiosis* **68**: 101–110.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010.** Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany* **68**: 14–25.
- Heidel AJ, Baldwin IT. 2004.** Microarray analysis of salicylic acid- and jasmonic acid-signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1362–1373.

- Hejari J, Nerg A-M, Kainulainen P, Vuorinen M, Holopainen JK. 2008.** Long-term effects of exogenous methyl jasmonate application on Scots pine (*Pinus sylvestris*) needle chemical defence and diprionid sawfly performance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **128**: 162–171.
- Heil M. 2008.** Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* **178**: 41–61.
- Heil M, Ton J. 2008.** Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science* **13**: 264–272.
- Herrera-Medina MJ, Tamayo MI, Vierheilig H, Ocampo JA, García-Garrido JM. 2008.** The jasmonic acid signalling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* **27**: 221.
- Hokka V, Mikola J, Vestberg M, Setälä H. 2004.** Interactive effects of defoliation and an AM fungus on plants and soil organisms in experimental legume–grass communities. *Oikos* **106**: 73–84.
- Howe GA, Jander G. 2008.** Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 41–66.
- Humphries C. 1980.** Trypsin inhibitors in leaf protein concentrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **31**: 1225–1230.
- Hunt MG, Newman JA. 2005.** Reduced herbivore resistance from a novel grass-endophyte association. *Journal of Applied Ecology* **42**: 762–769.
- Irisarri JG, Oesterheld M, Golluscio R, Paruelo J. 2014.** Effects of animal husbandry on secondary production and trophic efficiency at a regional scale. *Ecosystems*: 1–12.
- Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B. 2005.** Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiology* **139**: 1401.
- Jensen JG, Popay AJ. 2004.** Perennial ryegrass infected with AR37 endophyte reduces survival of porina larvae. *New Zealand Plant Protection* **57**: 323–328.
- Johnson MC, Dahlman DL, Siegel MR, Bush LP, Latch GCM, Potter DA, Varney DR. 1985.** Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 568–571.
- Johnson LJ, Johnson RD, Schardl CL, Panaccione DG. 2003.** Identification of differentially expressed genes in the mutualistic association of tall fescue with *Neotyphodium coenophialum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**: 305–317.
- Jung S, Martinez-Medina A, Lopez-Raez J, Pozo M. 2012.** Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* **38**: 651–664.

**Justus M, Witte L, Hartmann T. 1997.** Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*. *Phytochemistry* **44**: 51–57.

**Kangasjarvi J, Jaspers P, Kollist H. 2005.** Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1021–1036.

**Kangasjarvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R. 1994.** Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* **17**: 783–794.

**Karban R, Baldwin I. 1997.** *Induced responses to herbivory*. Chicago: The University of Chicago Press.

**Kauppinen M, Saikkonen K, Helander M, Pirttilä AM, Wäli PR. 2016.** *Epichloë* grass endophytes in sustainable agriculture. *Nature Plants* **2**: 15224.

**Khaosaad T, García-Garrido JM, Steinkellner S, Vierheilig H. 2007.** Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 727–734.

**Kiers ET, Palmer TM, Ives AR, Bruno JF, Bronstein JL. 2010.** Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecology Letters* **13**: 1459–1474.

**Kindler SD, Breen JP, Springer TL. 1991.** Reproduction and damage by russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) as influenced by fungal endophytes and cool-season turfgrasses. *Journal of Economic Entomology* **84**: 685–692.

**Koo YJ, Yoon ES, Seo JS, Kim J-K, Choi YD. 2013.** Characterization of a methyl jasmonate specific esterase in *Arabidopsis*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **56**: 27–33.

**Koricheva J, Gange AC, Jones T. 2009.** Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores: a meta-analysis. *Ecology* **90**: 2088–2097.

**Krauss J, Härri SA, Bush L, Husi R, Bigler L, Power SA, Müller CB. 2007a.** Effects of fertilizer, fungal endophytes and plant cultivar on the performance of insect herbivores and their natural enemies. *Functional Ecology* **21**: 107–116.

**Krauss J, Härri SA, Bush L, Power SA, Muller CB. 2007b.** Fungal grass endophytes, grass cultivars, nitrogen deposition and the associations with colonizing insects. In: Popay AJ, Thom ER, eds. Proceedings of the 6th international symposium on fungal endophytes of grasses. Christchurch, NZ: New Zealand Grassland Association, 53–57.

**Kunkel BN, Brooks DM. 2002.** Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325–331.

**Landgraf R, Schaarschmidt S, Hause B. 2012.** Repeated leaf wounding alters the colonization of *Medicago truncatula* roots by beneficial and pathogenic microorganisms. *Plant, Cell & Environment* **35**: 1344–1357.

- Latch GCM. 1993.** Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **44**: 143–156.
- Latch GCM, Christensen MJ, Gaynor DL. 1985.** Aphid detection of endophyte infection in tall fescue. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **28**: 129–132.
- Lee K-W, Choi GJ, Kim K-Y, Yoon SH, Ji HC, Park HS, Lim YC, Lee S-H. 2010.** Genotypic variation of *Agrobacterium*-mediated transformation of Italian ryegrass. *Electronic Journal of Biotechnology* **13**: 8–9.
- Lee MR, Olmos Colmenero J de J, Winters AL, Scollan ND, Minchin FR. 2006.** Polyphenol oxidase activity in grass and its effect on plant-mediated lipolysis and proteolysis of *Dactylis glomerata* (cocksfoot) in a simulated rumen environment. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 1503–1511.
- Lehtonen P, Helander M, Saikkonen K. 2005.** Are endophyte-mediated effects on herbivores conditional on soil nutrients? *Oecologia* **142**: 38–45.
- Lenth RV. 2016.** Least-squares means: the R package lsmeans. *Journal of Statistical Software* **69**: 1–33.
- Leuchtman A, Bacon CW, Schardl CL, White JF, Tadych M. 2014.** Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia* **106**: 202–215.
- Li Q, Xie Q-G, Smith-Becker J, Navarre DA, Kaloshian I. 2006.** Mi-1-mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 655–664.
- Li Y, Zou J, Li M, Bilgin DD, Vodkin LO, Hartman GL, Clough SJ. 2008.** Soybean defense responses to the soybean aphid. *New Phytologist* **179**: 185–195.
- López-Ráez JA, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Flors V, Pozo MJ. 2010.** Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2589–2601.
- Luginbill P. 1928.** *The fall armyworm*. US Dept. of Agriculture.
- Malinowski D, Alloush G, Belesky D. 1998a.** 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 DP, Belesky DP. 2000.** Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Sci.* **40**: 923–940.

**Malinowski DP, Belesky DP, Hill NS, Baligar VC, Fedders JM. 1998b.** Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant and Soil* **198**: 53–61.

**Mark S, Lincoln DE. 1996.** Antiherbivore defense mutualism under elevated carbon dioxide levels: a fungal endophyte and grass. *Environmental Entomology* **25**: 618–623.

**Martínez-Abarca F, Herrera-Cervera JA, Bueno P, Sanjuan J, Bisseling T, Olivares J. 1998.** Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 153–155.

**Martinez-Medina A, Flors V, Heil M, Mauch-Mani B, Pieterse CM., Pozo MJ, Ton J, van Dam NM, Conrath U. 2016.** Recognizing plant defense priming. *Trends in Plant Science* **21**: 818–822.

**McLeod A., Rey A, Newsham K., Lewis G., Wolferstan P. 2001.** Effects of elevated ultraviolet radiation and endophytic fungi on plant growth and insect feeding in *Lolium perenne*, *Festuca rubra*, *F. arundinacea* and *F. pratensis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **62**: 97–107.

**Meuriot F, Noquet C, Avice J-C, Volenec JJ, Cunningham SM, Sors TG, Caillot S, Ourry A. 2004.** Methyl jasmonate alters N partitioning, N reserves accumulation and induces gene expression of a 32-kDa vegetative storage protein that possesses chitinase activity in *Medicago sativa* taproots. *Physiologia Plantarum* **120**: 113–123.

**Miranda MI, Omacini Marina, Chaneton EJ. 2011.** Environmental context of endophyte symbioses: interacting effects of water stress and insect herbivory. *International Journal of Plant Sciences* **172**: 499–508.

**Moon CD, Scott B, Schardl CL, Christensen MJ. 2000.** The evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia* **92**: 1103–1118.

**Moore JR, Pratley JE, Mace WJ, Weston LA. 2015.** Variation in alkaloid production from genetically diverse *Lolium* accessions infected with *Epichloë* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**: 10355–10365.

**Moran PJ, Cheng Y, Cassell JL, Thompson GA. 2002.** Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **51**: 182–203.

**Moran PJ, Thompson GA. 2001.** Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology* **125**: 1074–1085.

**Nakagawa T, Kawaguchi M. 2006.** Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 176–180.

**Navarro-Meléndez AL, Heil M. 2014.** Symptomless endophytic fungi suppress endogenous levels of salicylic acid and interact with the jasmonate-dependent indirect

defense traits of their host, lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Chemical Ecology* **40**: 816–825.

**Oerke EC. 2006.** Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144**: 31–43.

**Omacini M, Chaneton EJ, Ghera CM, Muller CB. 2001.** Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* **409**: 78–81.

**Omacini M, Semmartin M, Pérez LI, Gundel PE. 2012.** Grass–endophyte symbiosis: a neglected aboveground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology* **61**: 273–279.

**Orians CM, Thorn A, Gómez S. 2011.** Herbivore-induced resource sequestration in plants: why bother? *Oecologia* **167**: 1.

**Panaccione DG, Beaulieu WT, Cook D. 2014.** Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Functional Ecology* **28**: 299–314.

**Pańka Dariusz, Jeske Małgorzata, Troczyński Mikołaj. 2011.** Effect of *Neotyphodium uncinatum* endophyte on meadow fescue yielding, health status and ergovaline production in host-plants. *Journal of Plant Protection Research* **51**: 362–370.

**Pańka D, Piesik D, Jeske M, Baturo-Cieśniewska A. 2013.** Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/*Neotyphodium lolii* association as a response to infection by *Fusarium poae*. *Journal of Plant Physiology* **170**: 1010–1019.

**Park SJ, Huang Y, Ayoubi P. 2006.** Identification of expression profiles of *Sorghum* genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis. *Planta* **223**: 932–947.

**Partida-Martínez L, Heil M. 2011.** The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in plant science* **2**: 100.

**Paszkowski U. 2006.** Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 364–370.

**Paulillo LCMS, Lopes AR, Cristofolletti PT, Parra JRP, Terra WR, Silva-Filho MC. 2000.** Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *Journal of Economic Entomology* **93**: 892–896.

**Pennell CGL, Popay AJ, Ball OJ, Hume DE, Baird DB. 2005.** Occurrence and impact of pasture mealybug (*Balanococcus poae*) and root aphid (*Aploneura lentisci*) on ryegrass (*Lolium* spp.) with and without infection by *Neotyphodium* fungal endophytes. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **48**: 329–337.

**Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012.** Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489–521.

**Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. 2014.** Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 347–375.

**Pineda A, Dicke M, Pieterse CMJ, Pozo MJ. 2013.** Beneficial microbes in a changing environment: are they always helping plants to deal with insects? *Functional Ecology* **27**: 574–586.

**Pineda A, Zheng S-J, van Loon JJA, Pieterse CMJ, Dicke M. 2010.** Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science* **15**: 507–514.

**Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team. 2009.** *nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package.* Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

**Popay AJ, Baltus JG. 2001.** Black beetle damage to perennial ryegrass infected with AR1 endophyte. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* **63**: 267–271.

**Popay AJ, Bonos SA. 2005.** Biotic responses in endophytic grasses. In: Roberts CA, West CP, West DES, eds. *Neotyphodium in cool-season grasses.* Blackwell Publishing, 163–185.

**Popay AJ, Tapper BA, Podmore C. 2009.** Endophyte-infected meadow fescue and loline alkaloids affect Argentine stem weevil larvae. *New Zealand Plant Protection* **62**: 19–27.

**Porrás-Alfaro A, Bayman P. 2011.** Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 291–315.

**Potter DA, Tyler Stokes J, Redmond CT, Schardl CL, Panaccione DG. 2008.** Contribution of ergot alkaloids to suppression of a grass-feeding caterpillar assessed with gene knockout endophytes in perennial ryegrass. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **126**: 138–147.

**Pozo MJ, Azcón-Aguilar C. 2007.** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 393–398.

**Pozo MJ, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C, García-Garrido JM. 2015.** Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **205**: 1431–1436.

**Pozo MJ, Van Der Ent S, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2008.** Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **180**: 511–523.

**Prestidge RA, Gallagher RT. 1988.** Endophyte fungus confers resistance to ryegrass: Argentine stem weevil larval studies. *Ecological Entomology* **13**: 429–435.

**Rasmussen S, Parsons AJ, Bassett S, Christensen MJ, Hume DE, Johnson LJ, Johnson RD, Simpson WR, Stacke C, Voisey CR, et al. 2007.** High nitrogen supply and carbohydrate content reduce fungal endophyte and alkaloid concentration in *Lolium perenne*. *New Phytologist* **173**: 787–797.

**Rasmussen S, Parsons AJ, Newman JA. 2009.** Metabolomics analysis of the *Lolium perenne*–*Neotyphodium lolii* symbiosis: more than just alkaloids? *Phytochemistry Reviews* **8**: 535–550.

**Rasmussen S, Parsons AJ, Popay A, Xue H, Newman JA. 2008.** Plant-endophyte-herbivore interactions: more than just alkaloids? *Plant Signaling & Behavior* **3**: 974–977.

**Riedell WE, Kieckhefer RE, Petroski RJ, Powell RG. 1991.** Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity. *Journal of Entomological Science* **26**: 122–129.

**Rodriguez R, Redman R. 2008.** More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1109–1114.

**Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**: 314–330.

**Rosenberg MS. 2005.** The file-drawer problem revisited: a general weighted method for calculating fail-safe numbers in meta-analysis. *Evolution* **59**: 464–468.

**Rosenberg MS, Adams DC, Gurevitch J. 2000.** *MetaWin: Statistical Software for Meta-Analysis, Version 2.0*. Sinauer Associates, Inc.

**Rowan D, Dymock J, Brimble M. 1990.** Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *Journal of Chemical Ecology* **16**: 1683–1695.

**Roylance JT, Hill NS, Agee CS. 1994.** Ergovaline and peramine production in endophyte-infected tall fescue: independent regulation and effects of plant and endophyte genotype. *Journal of Chemical Ecology* **20**: 2171–2183.

**Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. 2010.** WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* **15**: 247–258.

**Ryan GD, Rasmussen S, Xue H, Parsons AJ, Newman JA. 2014.** Metabolite analysis of the effects of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization on the association between tall fescue (*Schedonorus arundinaceus*) and its fungal symbiont *Neotyphodium coenophialum*. *Plant, Cell & Environment* **37**: 204–212.

**Sabzalian M, Mirlohi A, Sharifnabi B. 2012.** Reaction to powdery mildew fungus, *Blumeria graminis* in endophyte-infected and endophyte-free tall and meadow fescues. *Australasian Plant Pathology* **41**: 565–572.

**Saikkonen K, Gundel P, Helander M. 2013.** Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. *Journal of Chemical Ecology* **39**: 962–968.

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

**Saikkonen K, Saari S, Helander M. 2010.** Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Diversity* **41**: 101–113.

**Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH. 2004.** Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in Plant Science* **9**: 275–280.

**Salminen SO, Richmond DS, Grewal SK, Grewal PS. 2005.** Influence of temperature on alkaloid levels and fall armyworm performance in endophytic tall fescue and perennial ryegrass. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **115**: 417–426.

**Schäfer P, Pfiffi S, Voll LM, Zajic D, Chandler PM, Waller F, Scholz U, Pons-Kühnemann J, Sonnewald S, Sonnewald U, et al. 2009.** Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *The Plant Journal* **59**: 461–474.

**Schardl CL. 2010.** The Epichloae, symbionts of the grass subfamily Poöideae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **97**: 646–665.

**Schardl CL, Florea S, Pan J, Nagabhyru P, Bec S, Calie PJ. 2013a.** The Epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 480–488.

**Schardl CL, Grossman RB, Nagabhyru P, Faulkner JR, Mallik UP. 2007.** Loline alkaloids: currencies of mutualism. *Phytochemistry* **68**: 980–996.

**Schardl CL, Leuchtman A, Spiering MJ. 2004.** Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 315–340.

**Schardl CL, Young CA, Faulkner JR, Florea S, Pan J. 2012.** Chemotypic diversity of Epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology* **5**: 331–344.

**Schardl CL e., Young C, Pan J, Florea S, Takach J, Panaccione D, Farman M, Webb J, Jaromczyk J, Charlton N, et al. 2013b.** Currencies of mutualisms: sources of alkaloid genes in vertically transmitted Epichloae. *Toxins* **5**: 1064–1088.

**Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M. 2005.** *Insect-plant biology*. New York: Oxford University Press Inc.

**Schwachtje J, Baldwin IT. 2008.** Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiology* **146**: 845.

**Schwartzberg EG, Tumlinson JH. 2014.** Aphid honeydew alters plant defence responses. *Functional Ecology* **28**: 386–394.

**Schweiger R, Heise A, Persicke M, Muller C. 2014.** Interactions between the jasmonic and salicylic acid pathway modulate the plant metabolome and affect herbivores of different feeding types. *Plant, Cell & Environment* **37**: 1574–1585.

**Selosse M-A, Schardl CL. 2007.** Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* **173**: 452–458.

**Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, deWit PJGM, Bonfante P. 2007.** Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology* **144**: 1455–1466.

**Siegel MR, Latch GCM, Bush LP, Fannin FF, Rowan DD, Tapper BA, Bacon CW, Johnson MC. 1990.** Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology* **16**: 3301–3315.

**Simons L, Bultman T, Sullivan TJ. 2008.** Effects of methyl jasmonate and an endophytic fungus on plant resistance to insect herbivores. *Journal of Chemical Ecology* **34**: 1511–1517.

**Singh A, Singh IK, Verma PK. 2008.** Differential transcript accumulation in *Cicer arietinum* L. in response to a chewing insect *Helicoverpa armigera* and defence regulators correlate with reduced insect performance. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2379–2392.

**Smith SE, Read D. 2008.** The symbionts forming arbuscular mycorrhizas. In: Smith SE, Read D, eds. *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press, 13–23.

**Spiering MJ, Moon CD, Wilkinson HH, Schardl CL. 2005.** Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics* **169**: 1403–1414.

**Sprent JI. 2008.** 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *Journal of Experimental Botany* **59**: 1081–1084.

**Stacey G, McAlvin CB, Kim S-Y, Olivares J, Soto MJ. 2006.** Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **141**: 1473–1481.

**Stam JM, Kroes A, Li Y, Gols R, van Loon JJA, Poelman EH, Dicke M. 2014.** Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 689–713.

- Stout MJ, Workman KV, Bostock RM, Duffey SS. 1998.** Stimulation and attenuation of induced resistance by elicitors and inhibitors of chemical induction in tomato (*Lycopersicon esculentum*) foliage. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**: 267–279.
- Strauss SY, Agrawal AA. 1999.** The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 179–185.
- Sugawara K, Inoue T, Yamashita M, Ohkubo H. 2006.** Distribution of the endophytic fungus, *Neotyphodium occultans* in naturalized Italian ryegrass in western Japan and its production of bioactive alkaloids known to repel insect pests. *Grassland Science* **52**: 147–154.
- Sullivan TJ, Rodstrom J, Vandop J, Librizzi J, Graham C, Schardl CL, Bultman TL. 2007.** Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition. *New Phytologist* **176**: 673–679.
- Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM. 2006.** Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *The Plant Journal* **46**: 961–970.
- Tan C-W, Chiang S-Y, Ravuiwasa KT, Yadav J, Hwang S-Y. 2012.** Jasmonate-induced defenses in tomato against *Helicoverpa armigera* depend in part on nutrient availability, but artificial induction via methyl jasmonate does not. *Arthropod-Plant Interactions* **6**: 531–541.
- Tan C-W, Lo J-C, Yadav J, Ravuiwasa KT, Hwang S-Y. 2011.** Methyl jasmonate induced responses in four plant species and its effect on *Spodoptera litura* Fab. performance. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **14**: 263–269.
- Tanaka A, Tapper BA, Popay A, Parker EJ, Scott B. 2005.** A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology* **57**: 1036–1050.
- Thakur A, Kaur S, Kaur A, Singh V. 2013.** Enhanced resistance to *Spodoptera litura* in endophyte infected cauliflower plants. *Environmental Entomology* **42**: 240–246.
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK. 2012.** Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**: 260–270.
- Thaler JS, Stout MJ, Karban R, Duffey SS. 1996.** Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. *Journal of Chemical Ecology* **22**: 1767–1781.
- Thaler JS, Stout MJ, Karban R, Duffey SS. 2001.** Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecological Entomology* **26**: 312–324.

- Thrall PH, Hochberg ME, Burdon JJ, Bever JD. 2007.** Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 120–126.
- Ueno AC, Gundel PE, Omacini M, Ghera CM, Bush LP, Martínez-Ghera MA. 2015.** Mutualism effectiveness of a fungal endophyte in an annual grass is impaired by ozone. *Functional Ecology* **30**: 226–232.
- Ülker B, Somssich IE. 2004.** WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 491–498.
- Van der Ent S, Van Hulten M, Pozo MJ, Czechowski T, Udvardi MK, Pieterse CMJ, Ton J. 2009.** Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and  $\beta$ -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist* **183**: 419–431.
- Van Oosten VR, Bodenhausen N, Reymond P, Van Pelt JA, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CMJ. 2008.** Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 919–930.
- Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM. 2008.** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 443–448.
- Verhage A, van Wees SCM, Pieterse CMJ. 2010.** Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiology* **154**: 536–540.
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang H-S, van Loon LC, Pieterse CMJ. 2004.** The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 895–908.
- Vos IA, Pieterse CMJ, van Wees SCM. 2013.** Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. *Plant Pathology* **62**: 43–55.
- Wäli PR, Helander M, Nissinen O, Saikkonen K. 2006.** Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds). *Canadian Journal of Botany* **84**: 1043–1051.
- Walters DR. 2011.** *Plant defense: warding off attack by pathogens, herbivores, and parasitic plants*. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd.
- Wasternack C, Hause B. 2013.** Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* **111**: 1021–1058.
- Welty RE, Barker RE, Azevedo MD. 1991.** Reaction of tall fescue infected and noninfected by *Acremonium coenophialum* to *Puccinia graminis* subsp. *graminicola*. *Plant Disease* **75**: 883–886.

- Welty RE, Barker RE, Azevedo MD. 1993.** Response of field-grown tall fescue infected by *Acremonium coenophialum* to *Puccinia graminis* subsp. *graminicola*. *Plant Disease* **77**: 574–575.
- Whipps JM. 2004.** Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1198–1227.
- White JF, Torres MS. 2009.** *Defensive mutualism in microbial symbiosis*. NW: CRC Press.
- Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL. 2000.** Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1027–1033.
- Wilsey BJ, Coleman JS, McNaughton SJ. 1997.** Effects of elevated CO<sub>2</sub> and defoliation on grasses: a comparative ecosystem approach. *Ecological Applications* **7**: 844–853.
- Wu J, Wang L, Baldwin IT. 2008.** Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? *Planta* **227**: 1161–1168.
- Yang X, Hwa C. 2008.** Genetic modification of plant architecture and variety improvement in rice. *Heredity* **101**: 396–404.
- Yasuda M, Miwa H, Masuda S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Okazaki S. 2016.** Effector-triggered immunity determines host genotype-specific incompatibility in legume–*Rhizobium* symbiosis. *Plant and Cell Physiology* **57**: 1791–1800.
- Young CA, Schardl CL, Panaccione DG, Florea S, Takach JE, Charlton ND, Moore N, Webb JS, Jaromczyk J. 2015.** Genetics, genomics and evolution of ergot alkaloid diversity. *Toxins* **7**: 1273–1302.
- Zamioudis C, Pieterse CMJ. 2011.** Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 139–150.
- Zhang D-X, Nagabhyru P, Schardl CL. 2009.** Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants. *Plant Physiology* **150**: 1072–1082.
- Zhu F, Poelman EH, Dicke M. 2014.** Insect herbivore-associated organisms affect plant responses to herbivory. *New Phytologist* **204**: 315–321.
- Zhu-Salzman K, Salzman RA, Ahn J-E, Koiwa H. 2004.** Transcriptional regulation of *Sorghum* defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiology* **134**: 420–431.
- Züst T, Härri SA, Müller CB. 2008.** Endophytic fungi decrease available resources for the aphid *Rhopalosiphum padi* and impair their ability to induce defences against predators. *Ecological Entomology* **33**: 80–85.

**Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smit GM. 2009.** *Mixed effects models and extensions in ecology with R.* USA: Springer Sciences.

**Anexo 1.1** Lista de artículos utilizados en el meta-análisis (resultados en la Figura 2.2). Cada experimento es caracterizado tomando en cuenta la lista de criterios considerados en el estudio del capítulo II. La columna “perfil de alcaloides” indica el espectro de alcaloides producidos por una especie dada de endofito y “alcaloides efectivos (EA)” indica el tipo de alcaloide que afecta negativamente el crecimiento y/o desarrollo de una especie dada de insecto (tomado desde el cuadro 2.1). Comparando estas columnas, determinamos si cada uno de los simbioses poseían un EA para el insecto atacante testeado en cada experimento. Además, el efecto de cada planta simbiótica sobre el crecimiento y/o desarrollo del insecto (0 = neutral, + = positivo, - = negativo) fue determinado considerando el marco conceptual del modelo. La columna “mecanismo subyacente” indica el mecanismo de defensa propuesto [susceptibilidad, alcaloides o ácido jasmónico (↑ JA)]. Ver las referencias de este anexo en la sección “Bibliografía”.

Especie de planta	Especie/cepa de endofito	Insecto atacante		Tipo de experimento	Variable respuesta	Alcaloides		Model		Referencias
		Especie	Gremio ecológico			Perfil	Alcaloides efectivos (EA)	Predicción	Mecanismo subyacente	
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Campo	Tamaño poblacional	per, erg, lotB	lol	0/+	Susceptibilidad	Krauss <i>et al.</i> , 2007
<i>Festuca rubra x Lolium giganteum</i>	<i>Epichloë festucae</i> Lol-	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Laboratorio	Tamaño poblacional	erg	lol	0/+	Susceptibilidad	Wilkinson <i>et al.</i> , 2000
<i>Festuca rubra x Lolium giganteum</i>	<i>Epichloë festucae</i> Lol-	<i>Schizaphis graminum</i>	Succionador	Laboratorio	Tamaño poblacional	erg	lol, per	0/+	Susceptibilidad	Wilkinson <i>et al.</i> , 2000
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño poblacional	per, erg, lotB	lol	0/+	Susceptibilidad	Latch <i>et al.</i> , 1985
<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Epichloë occultans</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Campo	Tamaño poblacional	lol	lol	-	Alcaloides	Ueno <i>et al.</i> , 2015
<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Epichloë occultans</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Campo	Tamaño poblacional	lol	lol	-	Alcaloides	Gundel <i>et al.</i> , 2012
<i>Festuca pratensis</i>	<i>Epichloë uncinata</i>	<i>Rhopalosiphum</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño	lol	lol	-	Alcaloides	Lehtonen <i>et al.</i> ,

		<i>padi</i>			poblacional					2005
<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Epichloë occultans</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Campo	Tamaño poblacional	lol	lol	-	Alcaloides	Omacini <i>et al.</i> , 2001
<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Epichloë occultans</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Tasa intrínseca de crecimiento	lol	lol	-	Alcaloides	Miranda <i>et al.</i> , 2011
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Bultman & Bell, 2003
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Tasa intrínseca de crecimiento	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Bultman <i>et al.</i> , 2004
<i>Schedonorus arundinaceus</i> 'Sardinia'	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Laboratorio	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Clement, 2001
<i>Schedonorus arundinaceus</i> 'Tunisia'	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Laboratorio	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Clement, 2001
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Hunt & Newman, 2005
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Laboratorio	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Züst <i>et al.</i> , 2008
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Latch <i>et al.</i> , 1985
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Laboratorio	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Eichenseer & Dahlman, 1992
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Davidson & Potter, 1995

<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i> AR542	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Population size	lol, per	lol	-	Alcaloides	Bultman <i>et al.</i> , 2006
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño poblacional	lol, per	lol	-	Alcaloides	Bultman <i>et al.</i> , 2006
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Laboratorio	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Eichenseer <i>et al.</i> , 1991
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Succionador	Laboratorio	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol	-	Alcaloides	Simons <i>et al.</i> , 2008
<i>Lolium perenne</i>	<i>Neotyphodium lolii</i>	<i>Diuraphis noxia</i>	Succionador	Invernáculo	Sobrevivencia	per, erg, lotB	lol, erg	-	Alcaloides	Kindler <i>et al.</i> , 1991
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Diuraphis noxia</i>	Succionador	Campo	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol, erg	-	Alcaloides	Clement <i>et al.</i> , 1996
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Diuraphis noxia</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño poblacional	lol, per, erg, lotB	lol, erg	-	Alcaloides	Clement <i>et al.</i> , 1990
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	<i>Diuraphis noxia</i>	Succionador	Invernáculo	Tamaño poblacional	per, erg, lotB	lol, erg	-	Alcaloides	Clement <i>et al.</i> , 1990
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i> AR37	<i>Balanococcus poae</i>	Succionador	Campo	Tamaño poblacional	eJ	per, eJ	-	Alcaloides	Pennell <i>et al.</i> , 2005
<i>Agrostis perennans</i>	<i>Epichloë amarillans</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Masticador	Invernáculo	Peso larva	? <sup>a</sup>	lol, erg, eJ	-	↑ JA o Alcaloides & ↑ JA	Crawford <i>et al.</i> , 2010
<i>Elymus villosus</i>	<i>Epichloë elymi</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Masticador	Invernáculo	Peso larva	? <sup>a</sup>	lol, erg, eJ	-	↑ JA o Alcaloides & ↑ JA	Crawford <i>et al.</i> , 2010
<i>Festuca subverticillata</i>	<i>Epichloë</i> sp.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Masticador	Invernáculo	Días hasta pupar	-- <sup>a,b</sup>	lol, erg, eJ	-	↑ JA	Crawford <i>et al.</i> , 2010
<i>Festuca</i>	<i>Epichloë</i> sp.	<i>Spodoptera</i>	Masticador	Invernáculo	Peso larva	-- <sup>a,b</sup>	lol, erg, eJ	-	↑ JA	Afkhami &

<i>subverticillata</i>		<i>frugiperda</i>								Rudgers, 2009
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i> AR1	<i>Heteronychus arator</i>	Masticador	Campo	Tamaño poblacional	per, ter	erg	-	↑ JA	Popay & Baltus, 2001
<i>Schedonorus arundinaceus</i>	<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Masticador	Invernáculo	Peso larva	lol, per, erg, lotB	lol, erg, eJ	-	Alcaloides & ↑ JA	Crawford <i>et al.</i> , 2010
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	<i>Heteronychus arator</i>	Masticador	Campo	Tamaño poblacional	per, erg, lotB	erg	-	Alcaloides & ↑ JA	Popay & Baltus, 2001
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	<i>Agrotis ipsilon</i>	Masticador	Invernáculo	Peso larva	per, erg, lotB	lol, per, erg	-	Alcaloides d & ↑ JA	Bixby & Potter, 2010
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i> AR37	<i>Wiseana cervinata</i>	Masticador	Laboratorio	Peso larva	eJ	eJ	-	Alcaloides & ↑ JA	Jensen & Popay, 2004
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	<i>Listronotus bonariensis</i>	Masticador	Invernáculo	Tamaño poblacional	per, erg, lotB	lol, per, lolB	-	Alcaloides & ↑ JA	Barker <i>et al.</i> , 1984a
<i>Lolium perenne</i>	<i>Epichloë festucae</i> var. <i>lolii</i>	<i>Listronotus bonariensis</i>	Masticador	Laboratorio	Número de huevos	per, erg, lotB	lol, per, lolB	-	Alcaloides & ↑ JA	Barker <i>et al.</i> , 1984b
<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Epichloë occultans</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Masticador	Laboratorio	Peso larva	lol	lol	-	Alcaloides & ↑ JA	Bastías <i>et al.</i> (no publicado)

Abreviaciones: lol, lolinas; per, peramina; erg, ergovalina; eJ, epoxy-jantitrem; lotB, lolitrem B.

<sup>a</sup>Los endofitos *E. amarillans*, *E. elymi* y *Epichloë* sp. no producen lolinas (Crawford *et al.*, 2010). Sin embargo, otros alcaloides fúngicos podrían estar presentes en las plantas.

<sup>b</sup>Las simbiosis entre *Festuca subverticillata* and *Epichloë* sp. no produce alcaloides tóxicos para insectos (Panaccione *et al.*, 2014).

