

Los compuestos orgánicos volátiles de la simbiosis pasto-endófito como un mecanismo alternativo de defensa en el vecindario

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

Juan Esteban Fiorenza

Lic. en Ciencias Ambientales - Universidad de Buenos Aires - 2016

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura (IFEVA) - FAUBA - CONICET



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

COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Marina Omacini

Licenciada en Ciencias Biológicas (CAECE)

Magister Scientiae en Recursos Naturales (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Co-directora

Patricia Carina Fernández

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Magíster en Control de Plagas y su Impacto Ambiental (UNSAM)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

JURADO

Javier López de Casenave

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Carmen Rossini Caridad

Química Farmacéutica (Universidad de la República, Uruguay)

PhD in Neurobiology and Behavior (Cornell University, United States)

JURADO

Luis Marone

Licenciado en Biología (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de San Luis)

Fecha de defensa de la tesis: 07 de Febrero de 2022

DEDICATORIA

A Nadia, el amor de mi vida.

A mi familia, mi hermano Tomás y mis padres Liliana y Claudio.

AGRADECIMIENTOS

A mi compañera, Nadia.

A toda mi familia. Pero en especial a Tom, Mami y Papo. Siempre, siempre presentes.

A Mar y Pato, por acompañarme en este viaje. Aprendí y sigo aprendiendo muchísimo de ellas. Excelentísimas investigadoras y docentes, pero muchísimo mejores personas. Muchas gracias.

Mención especial a Pablo Roset y Lucio que me dieron una mano enorme sobre el final con su laburo de edición.

A Pedro Togne y a Willie, por inculcarme el interés por la ciencia y el “bichito” de hacer el doctorado.

A Willie, de nuevo, y a Susana, por brindarme siempre su invaluable apoyo en los momentos más difíciles.

A los “Salieris”, mis amigos del doctorado, Lucio, Seba, Luiggi, Bruno y Pipa. Por ellos con gusto quería pasar 10 horas por día en el IFEVA rumiando algún carbohidrato que el Pipeta tuviera en su cajón.

A Celes, mi amiga antes y durante el doctorado.

A mi amigo Sergio, mi primer compañero de oficina en el IFEVA.

A los Simbiosfera: Ale, PGP, Male, las Catas, Mechi, Mirta, Pau G., Romu.

A todos los compañeros y compañeras del piso de becarios: Lucho, Ido, Lu, Vivi, Ceci, Sole, Dani Ponce, Dani Bastias, Ludmi, Pau B., Marian GL, Andy Ood, Pri, Gastón, Rolo, Maranda, Lu Mochi, Luquitas, Lauti, Xime y perdón si me olvido de alguno.

A la gente de Biomoléculas: Cami, Dai, Vane, Luli, Juampi, Franco, Martín, Vir, Mile, Hugo y Marina.

A todos los muchachos del fulbo IFEVA. Maravillosa forma de terminar los miércoles.

A los viejos amigos de la facu: Facu, con quien volvemos a coincidir en la vida académica; Anita, Ari, Juancito, Luiggi, Felix, Pau, Ro, Wendy.

A mis amigos de la vida: Fede, Grego, Seba, Esteban, Lauti.

A mi otra familia: Danita, Beti y muy especialmente a Miguel.

A todos los maravillosos docentes que tuve la suerte de acompañar en diferentes cursos en la Cátedra de Ecología y en el Departamento de Métodos.

A la Universidad de Buenos Aires y a la educación pública, gratuita y de calidad en nuestro país.

DECLARACIÓN

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

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

-Capítulo 2.

Fiorenza, J.E., Fernández, P.C., Omacini, M. 2021. Z-3-Hexenylacetate emissions induced by the endophyte *Epichloë occultans* at different levels of defoliation during the host plant's life cycle. *Fungal Ecology* 49: 101015.

Impact factor. 3.404.

INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. LA SIMBIOSIS PASTO-ENDÓFITO	2
1.2. COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES COMO MECANISMO DE DEFENSA	5
1.3. VOC INDUCIDOS POR MICROORGANISMOS BENÉFICOS	6
1.4. OBJETIVO E HIPÓTESIS GENERAL.....	6
1.5. SISTEMA DE ESTUDIO	7
1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	11
1.7. CARACTERÍSTICAS COMUNES DE LAS APROXIMACIONES EXPERIMENTALES	12
CAPÍTULO 2: LA PRESENCIA DE EPICHLÖË OCCULTANS MODIFICA LOS VOC EMITIDOS POR LOLIUM MULTIFLORUM EN DIFERENTES MOMENTOS DE SU CICLO DE VIDA	14
2.1. INTRODUCCIÓN	15
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.2.1. <i>Diseño experimental</i>	17
2.2.2. <i>Colección de VOC y análisis químico</i>	19
2.2.3. <i>Análisis estadístico</i>	20
2.3. RESULTADOS	21
2.4. DISCUSIÓN.....	26
CAPÍTULO 3: CAMBIOS EN LA EMISIÓN DE VOLÁTILES CUANDO UN SIMBIONTE FÚNGICO AÉREO Y OTRO SUBTERRÁNEO COMPARTEN AL MISMO HOSPEDANTE.....	30
3.1. INTRODUCCIÓN	31
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.2.1. <i>Material biológico</i>	33
3.2.4. <i>Análisis estadístico</i>	36
3.3. RESULTADOS	37
3.4. DISCUSIÓN.....	41
CAPÍTULO 4: LA COLISIÓN DE DOS SIMBIOSIS FÚNGICAS: LA QUE ESTABLECEN LAS PLANTAS Y LA QUE ESTABLECEN LAS HORMIGAS CORTADORAS	43
4.1. INTRODUCCIÓN	44
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
4.2.1. <i>Material biológico</i>	46
4.2.2. <i>Diseños experimentales</i>	46
4.2.2.1. <i>Experimento 1</i>	46
4.2.2.2. <i>Experimento 2</i>	47
4.2.3. <i>Análisis estadístico</i>	48
4.3. RESULTADOS	50
4.3.1. <i>Experimento 1</i>	50

4.3.2. <i>Experimento 2</i>	51
4.4. DISCUSIÓN	52
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL	57
5.1. CONTRIBUCIONES AL ESTADO DEL CONOCIMIENTO.....	58
5.2. PERSPECTIVAS	61
5.3. CONCLUSIÓN	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

INDICE DE CUADROS

- Cuadro 2.1.** Porcentaje de VOC (media±EE) colectados de muestras (50 macollos) de parcelas dominadas por plantas dañadas y no dañadas de *L. multiflorum* con baja (E-) y alta (E+) frecuencia de infección con el endófito. Los resultados muestran la emisión de plantas en distintas fases fenológicas (P: plántula, V: vegetativo, R: reproductivo y M: muerto en pie). El número de muestras en las cuales cada compuesto apareció se indica entre paréntesis.25
- Cuadro 3.1.** Porcentaje del total de VOC (media±EE) en las muestras obtenidas en las macetas sembradas con semillas con baja (E-) y alta (E+) frecuencia de infección con el endófito y con adición en el suelo de inóculo de HMA esterilizado y no esterilizado (M- y M+, respectivamente) en 2019. De las 6 macetas en cada tratamiento, indicamos entre paréntesis el número en las cuales apareció cada compuesto.40

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Fotografía de macetas con plantas de *Lolium multiflorum* con alta (cinta roja) y baja (cinta verde) frecuencia de infección con el endófito *Epichloë occultans*. Se puede apreciar que las plantas simbióticas, vistas por fuera, son completamente indistinguibles a las no simbióticas. Arriba a la derecha se visualizan hifas de este hongo en semillas de *L. multiflorum*. Fotos: Pablo García Parisi y Mirta Rabadán.4
- Figura 1.2.** Fotografías de a) las hormigas cortadoras de hoja *Acromyrmex ambiguus* y b) de su hongo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. 10
- Figura 1.3.** Esquema resumido con la relación entre los objetivos específicos y los capítulos de la tesis. 12
- Figura 2.1.** Fases del ciclo de vida de las plantas durante las cuales medimos los VOC en un experimento a campo a escala de parche: A) plántula, B) vegetativa, C) reproductiva y D) muerto en pie. En cada subparcela, una muestra de cincuenta macollos fue envuelta en una bolsa para horno de PET para la recolección de VOC en cada fase fenológica. La densidad de plantas era de ~300 plantas/m². E- y E+ indican dos frecuencias contrastantes de infección con el endófito en las semillas sembradas en las parcelas de 1 m² (0% y 93%, respectivamente) y las tijeras representan la subparcela sobre la que se aplicó el daño por defoliación..... 19
- Figura 2.2.** Media (\pm error estándar) de las emisiones de VOC totales ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{PS}\cdot\text{hora}^{-1}$) de parcelas con: A) baja (E-) y alta (E+) frecuencia de infección con el endófito, B) plantas dañadas y no dañadas, donde “dañadas” se refiere a las plantas defoliadas, y C) plantas en diferentes fases fenológicas (ver Figura 2.1). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*= $P<0,05$; **= $P<0,01$). 22
- Figura 2.3.** Media (\pm error estándar) de las emisiones del volátil de hoja verde (Z)-3-hexenyl acetato ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{PS}\cdot\text{hora}^{-1}$) de parcelas con baja (E-) y alta (E+) frecuencia de infección con el endófito y plantas en diferentes fases fenológicas (ver Figura 2.1). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$; Tukey HSD). 24
- Figura 3.1.** Fotografía del sistema de la colección de VOCs en el invernáculo. 36
- Figura 3.2.** Emisión de a) VOC totales, b) el volátil de hoja verde Z3-HAC, c) el monoterpeno β -ocimeno en macetas con plantas de *L. multiflorum* con niveles contrastantes de frecuencia de infección con el endófito *E. occultans* (baja: E- y alta: E+) y con la adición de inóculo de HMA esterilizado y no esterilizado en el suelo (M- y M+, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$; Tukey HSD). 39
- Figura 4.1.** Esquema del diseño del experimento 1 en el que se puede visualizar a una colonia de hormigas cortadoras *Acromyrmex ambiguus* en uno de los cinco días del experimento en los que se les ofrecieron macetas con plantas de *Lolium multiflorum* con frecuencias de infección contrastantes con el endófito *Epichloë occultans*. En las ampliaciones superiores se ve a las hormigas cortando el pasto,

- transportándolo por el puente a su arena de recolección e incorporándolo en un recipiente con su hongo *L. gongylophorus*.47
- Figura 4.2.** Fotografías de dos placas de Petri del experimento 2 con el cultivo de *L. gongylophorus* en agar extracto de malta después de 1 semana de sembradas: a) control con MO (verde) y b) tratamiento de Z3-HAC diluido en MO (rojo). Se resaltan las áreas distal y proximal al punto en el que se colocó el papel de filtro embebido.....48
- Figura 4.3.** Proporción de macollos dañados a lo largo del tiempo, en días, en macetas con plantas de *Lolium multiflorum* con alta y baja frecuencia de infección con el endófito *E. occultans*. 50
- Figura 4.4.** Área total del halo de crecimiento del hongo *L. gongylophorus* a lo largo de las seis semanas en las que se midió en placas de Petri en las que se había colocado un papel de filtro de celulosa embebido con 2 μ L de aceite mineral (MO) o 2 μ L de 1,4 μ g/ μ L de Z3-HAC en MO (N=8) en un extremo. 51
- Figura 4.5.** Fotografías de dos placas de Petri del experimento 2 con el cultivo de *L. gongylophorus* en agar extracto de malta después de 6 semanas desde que se sembraron: a) control con MO (verde) y b) tratamiento de Z3-HAC diluido en MO (rojo). Se resaltan las áreas distal y proximal al punto en el que se colocó el papel de filtro embebido.....52
- Figura 4.6.** Área del halo de crecimiento del hongo *L. gongylophorus* a lo largo de las seis semanas en las que se midió en placas de Petri en las que se había colocado un papel de filtro de celulosa embebido con 2 μ L de aceite mineral (MO) o 2 μ L de 1,4 μ g/ μ L de Z3-HAC en MO (N=8) en un extremo, del lado a) **proximal** y b) **distal** a la fuente de emisión 53
- Figura 5.1.** Adaptación de la figura de Dicke y Baldwin (2010), en la que se esquematiza a los simbiontes que, entre otros, pueden inducir la producción de VIS en las plantas. Y cómo éstos pueden afectar a diferentes componentes de la comunidad como herbívoros, sus enemigos naturales o patógenos..... 60
- Figura 5.2.** Esquema de Barton y Koricheva (2010) modificado en base a los resultados hallados para plantas herbáceas. En el cual se puede observar cómo la importancia relativa de los alcaloides fúngicos y de los volátiles inducidos por el simbionte va cambiando a lo largo del ciclo de vida del holobionte.62

ABREVIATURAS

VOCs: Compuestos orgánicos volátiles.

E+: Parches o macetas sembradas con semillas de *Lolium multiflorum* con alta frecuencia de infección con el endófito *Epichloë occultans*.

E-: Parches o macetas sembradas con semillas de *Lolium multiflorum* con baja frecuencia de infección con el endófito *Epichloë occultans*.

M+: Macetas en las que después de esterilizar el suelo se colocó un inóculo de tres especies de hongos micorrícicos arbusculares.

M-: Macetas en las que después de esterilizar el suelo se colocó un inóculo de tres especies de hongos micorrícicos arbusculares pero también esterilizado.

HMA: Hongos micorrícicos arbusculares.

MO: Aceite mineral.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Ea.: Estancia.

Pdo.: Partido.

Pcia.: Provincia.

GLMM: Modelo lineal generalizado y mixto.

LMM: Modelo lineal mixto.

RT: Tiempo de retención.

MHN: *6-metil-5-Hepten-2-ona*.

TMB: *1,3,5-trimetil-Benceno*.

DMUE: *(E)-6,10-dimetil-5,9-Undecadien-2-ona*.

TMPD: *6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona*.

ng: nanogramo

mL: mililitro

μL: microlitro

d.i.: diámetro interno

m: metro

m²: metro cuadrado

mm: milímetro

PS: Peso seco

Los compuestos orgánicos volátiles de la simbiosis pasto-endófito como un mecanismo alternativo de defensa en el vecindario

Numerosas especies de pastos forrajeros establecen una simbiosis con endófitos foliares asexuales del género *Epichloë* (Ascomycota, Clavicipitaceae). Esta simbiosis es conocida como un mutualismo protector debido a la producción de alcaloides por parte del hongo, sin contemplar que éste también puede inducir otro tipo de defensas en el hospedante. El objetivo general de mi tesis fue evaluar el impacto de la presencia de endófitos asexuales sobre la composición y cantidad de compuestos orgánicos volátiles (VOC) en parches de vegetación dominados por una gramínea hospedante a lo largo de su ciclo de vida y dilucidar cuál es el papel de estos cambios químicos en la interacción entre las plantas y sus enemigos naturales. Trabajé con la simbiosis entre *Lolium multiflorum* y *Epichloë occulta*. A través de una serie de experimentos a campo y en invernáculo demostré que la presencia del hongo endófito induce un aumento en la emisión de VOC en la planta hospedante, especialmente en las etapas tempranas de su ciclo de vida. El principal componente de los VOC fue el (Z)-3-hexenyl acetato, un volátil de hoja verde relacionado con la comunicación planta-planta y las defensas. Comprobé que estos cambios en el perfil de VOC de las plantas hospedantes dependían además de si las plantas estaban asociadas con hongos formadores de micorrizas. Evalué a los VOC inducidos como un mecanismo que podría proteger a las plantas de las hormigas cortadoras de hojas. Encontré que las hormigas aprenden a rechazar a las plantas con endófitos y que el (Z)-3-hexenyl acetato afecta al hongo que cultivan en sus jardines subterráneos. En conclusión, los endófitos foliares interactúan con otros simbioses, dentro y fuera del hospedante, e inducen cambios en la producción de VOC en la gramínea que pueden proteger tanto a las plantas simbióticas como a las vecinas no simbióticas de sus enemigos.

Palabras clave: Simbiosis, endófitos, *Epichloë*, mutualismos, hormigas cortadoras de hojas, *Leucoagaricus gongylophorus*, defensas inducidas, interacciones.

ABSTRACT

Volatile organic compounds of grass-endophyte symbiosis as an alternative defense mechanism in the neighborhood

Numerous species of forage grasses establish symbiosis with asexual foliar endophytes of the genus *Epichloë* (Ascomycota, Clavicipitaceae). This symbiosis is known to be a protective mutualism due to the production of alkaloids by the fungus, but its potential to induce other types of defenses in the host grass is underrated. The general objective of my thesis was to evaluate the impact of the presence of asexual endophytes on the composition and quantity of volatile organic compounds (VOCs) in vegetation patches dominated by a host grass throughout its life cycle and elucidate what the role of these chemical changes may be in the interaction between plants and their natural enemies. I worked with the symbiosis between *Lolium multiflorum* and *Epichloë occultans*. Through a series of field and greenhouse experiments I demonstrated that the presence of the endophytic fungus induces the emission of VOCs in the host plant, especially in the early phases of its life cycle. The main component of the VOCs was (Z) -3-hexenyl acetate, a green leaf volatile related with the plant-plant communication and defenses. I also verified that these changes in the VOCs profile of the host plants depend on whether the plants were symbiotically associated with arbuscular mycorrhizal fungi. I evaluated this symbiosis-induced VOCs as a mechanism that could protect plants from leaf-cutter ants. I found that these ants can learn to reject symbiotic plants after a few days and that their cultivated fungus responds to (Z) -3-hexenyl acetate. In conclusion, foliar endophytes of the genus *Epichloë* interact with other symbionts, inside and outside the host, and induce changes in the production of VOCs in the grass, which can protect symbiotic plants and non-symbiotic neighbors from their enemies.

Keywords: Symbiosis, endophyte, *Epichloë*, mutualism, leaf-cutter ants, *Leucoagaricus gongylophorus*, induced defenses, interactions.

Capítulo 1

Introducción general

1.1. La simbiosis pasto-endófito

Es un gran desafío para la ecología identificar los mecanismos involucrados en la estructuración y en la dinámica de las comunidades. Sin embargo, sólo recientemente los mutualismos —y, en particular, las simbiosis— fueron reconocidos como interacciones clave que modifican las relaciones de los organismos con su entorno biótico y abiótico (Kothamasi et al., 2010). Numerosas especies o grupos de especies de gran interés humano obtienen nuevas capacidades y múltiples beneficios de hongos y bacterias con los que se asocian simbióticamente de forma natural (Hansen, 2017; Thirkell et al., 2017; Garcia Parisi y Omacini, 2019). Según cómo impactan en ciertas características de la planta hospedante, los simbioses se pueden clasificar en protectores (los que protegen de herbívoros o patógenos) o en proveedores (los que facilitan el acceso a diferentes nutrientes) (Thrall et al., 2007). Entre los primeros se encuentran los hongos foliares del género *Epichloë* (Ascomycota, Clavicipitaceae) denominados endófitos defensivos o protectores (Rodriguez et al., 2009; Leuchtman et al., 2014). La infección con estos hongos no es contagiosa para las plantas vecinas, dado que el micelio crece en la inflorescencia y en los espacios intersticiales de los tejidos aéreos, y se transmite a la siguiente generación sólo a través de las semillas (Moon et al., 2000). Entre los simbioses proveedores se encuentran los rizobios —bacterias específicas de las leguminosas, capaces de fijar nitrógeno atmosférico— (Sprent, 2007) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), que se asocian con la mayoría de las especies vegetales y aumentan su capacidad de absorber fósforo (Johnson et al., 1997). Los HMA forman redes complejas que transportan nutrientes y señales químicas entre plantas de distintas especies, incluidas las que forman simbiosis con los otros microorganismos (Van Der Heijden y Horton, 2009). Aunque las plantas pueden establecer simbiosis con múltiples microorganismos, de aquí en adelante

usaremos los términos plantas “simbióticas” o “no simbióticas” para referirnos a aquellas que están o no asociadas con endófitos del género *Epichloë* (Clay y Schardl, 2002; Schardl et al., 2007).

A la simbiosis pasto-endófito se la considera un mutualismo protector porque el simbionte obtiene alimento del hospedante y constituye su único modo de dispersión, mientras que, a cambio, le aumenta la resistencia al daño por herbívoros (Clay y Schardl, 2002) y por hongos patógenos (Pérez et al., 2016) (Figura 1.1). Se considera que el perfil de alcaloides que producen las plantas simbióticas es el principal determinante de que los herbívoros las eviten y prefieran a las plantas no simbióticas (Schardl et al., 2007), aunque es complejo establecer la relevancia de un único atributo sobre la interacción planta-herbívoro (Rasmann y Agrawal, 2009). Varios estudios muestran que la cantidad y el tipo de alcaloides producidos depende de los genotipos de los integrantes y de las condiciones ambientales (Clay y Schardl, 2002). Mientras que algunas asociaciones pasto-endófito producen alcaloides tóxicos para el ganado como los ergots e indol-diterpenos (Gallagher et al., 1981; Porter et al., 1981), otras producen alcaloides que tienen efectos negativos sólo sobre algunos herbívoros invertebrados, como las peraminas y las lolinas (Rowan y Gaynor, 1986; Bush et al., 1997; Clay y Schardl, 2002). Una gran cantidad de gramíneas nativas se asocian con endófitos amigables para el ganado y podrían ser promovidas en sistemas pastoriles (Iannone et al., 2017; Mc Cargo et al., 2020; Vignale et al., 2020).

Es probable que el efecto protector de los distintos tipos de alcaloides sea menor en las plántulas y mayor en las semillas de ciertas combinaciones de especies de gramínea y hongo endófito debido a que las semillas presentan mayor concentración de alcaloides (Tepaske et al., 1993; Repussard et al., 2014) y de micelio (Rasmussen et al., 2007). A su vez, se observó que la herbivoría puede inducir la producción de lolinas que

aumentan la protección en las plantas frente a otros herbívoros invertebrados (Bultman et al., 2004; Sullivan et al., 2007).



Figura 1.1. Fotografía de macetas con plantas de *Lolium multiflorum* con alta (cinta roja) y baja (cinta verde) frecuencia de infección con el endófito *Epichloë occultans*. Se puede apreciar que las plantas simbióticas, vistas por fuera, son completamente indistinguibles a las no simbióticas. Arriba a la derecha se visualizan hifas de este hongo en semillas de *L. multiflorum*. Fotos: Pablo García Parisi y Mirta Rabadán.

La mayoría de los estudios no logran definir que los alcaloides son efectivamente el mecanismo de protección, sino que encuentran correlaciones entre la disminución en la herbivoría y la concentración de alcaloides (Clay, 2014). Hasta donde sabemos, a la fecha, el único trabajo que manipula de forma experimental la producción de alcaloides y evalúa la respuesta de la herbivoría es el de Wilkinson y colaboradores (2000). Por un lado, dado que son múltiples los cambios morfológicos, químicos y fisiológicos que la

presencia del endófito produce en el hospedante (White y Torres, 2010; Rasmussen et al., 2012), podrían existir sinergismos o antagonismos entre diferentes tipos de defensas, poco considerados (Rasmann y Agrawal, 2009). Por otra parte, se observó que el material muerto de las plantas con endófitos (i.e., la broza) rápidamente pierde los alcaloides (Siegrist et al., 2010); sin embargo, este material puede reducir la herbivoría de plántulas con y sin endófitos por hormigas cortadoras de hojas (Omacini et al., 2009). Por esta razón, hasta el momento no se determinó cuáles son los cambios que introduce el endófito en el hospedante que podrían explicar los efectos de la broza. También se desconoce si hay otros mecanismos que podrían contribuir tanto a los efectos directos como a los indirectos sobre los herbívoros (en este caso, a través de reducir las visitas de vectores de patógenos o de atraer a sus enemigos naturales) (Omacini et al., 2001; Perez et al., 2017).

1.2. Compuestos orgánicos volátiles como mecanismo de defensa

Los principales mecanismos de defensa de las plantas contra los herbívoros y patógenos son la resistencia (i.e., la capacidad de evitar o reducir la probabilidad de ser comido o infectado) y la tolerancia (i.e., la habilidad de reducir el efecto negativo del daño) (Strauss y Agrawal, 1999; Tiffin, 2000; Strauss et al., 2002). Las plantas pueden asignar recursos en simultáneo a diferentes tipos de defensas, aunque su importancia relativa, en general, varía según el estado ontogénico o el ambiente en el que se desarrollan (Boege y Marquis, 2005; Barton y Koricheva, 2010). Los mecanismos de resistencia pueden ser constitutivos —y, por lo tanto, manifestarse independientemente de un estímulo externo— o inducidos, cuando se activan en respuesta a la presencia o el ataque de los herbívoros (Karban et al., 1997; Agrawal, 1999; Dicke y Baldwin, 2010).

La producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC, del inglés *volatile organic compounds*) es un mecanismo de defensa bien documentado como una defensa tanto constitutiva como inducida por la herbivoría (Dicke y Baldwin, 2010). Sin embargo, más recientemente cobró relevancia y se acumuló evidencia de que este mecanismo también puede ser inducido por microorganismos (Ameye et al., 2017; Sharifi et al., 2018). A su vez, los compuestos orgánicos volátiles pueden actuar en forma directa como repelentes o tóxicos para los herbívoros, o indirecta al actuar sobre los simbioses de las plantas o los enemigos naturales de los herbívoros (e.g., parasitoides y depredadores) (Heil, 2008).

1.3. VOC inducidos por microorganismos benéficos

Si bien la función de los VOC en las defensas de las plantas está muy estudiada (Dicke y Baldwin, 2010; Aartsma et al., 2017; Kessler, 2018), no está tan claro cómo este mecanismo interactúa con la presencia de simbioses mutualistas protectores. Se han encontrado algunas diferencias en la cantidad y la composición de VOC que emiten diferentes especies de gramíneas con endófitos del género *Epichloë* respecto de sus pares no infectadas (Yue et al., 2001; Steinebrunner et al., 2008; Pańka et al., 2013; Li et al., 2014). Además, se encontraron diferencias en los VOC emitidos por raíces de un híbrido entre *Festuca pratensis* y *Lolium perenne* cuando estos pastos presentaban la simbiosis con el endófito, haciendo a las plantas infectadas “menos visibles” para las larvas de un depredador de raíces (Rostás et al., 2015). Algunos estudios recientes muestran que la presencia de otras interacciones simbióticas puede modificar el perfil de producción de VOC de las plantas (Fontana et al., 2009).

1.4. Objetivo e hipótesis general

El **objetivo general** de mi tesis fue evaluar el impacto de la presencia de endófitos asexuales sobre la composición y la cantidad de compuestos orgánicos volátiles en parches de vegetación dominados por una gramínea hospedante a lo largo de su ciclo de vida y dilucidar cuál es el papel de estos cambios químicos en la interacción entre las plantas y los herbívoros. La **hipótesis general** con la que trabajé postula que la simbiosis induce la producción de compuestos alternativos a los alcaloides y relacionados con las defensas, en el estado de plántula y en el material muerto del hospedante; y que estos confieren protección, tanto al hospedante como a plantas vecinas no simbióticas.

1.5. Sistema de estudio

En mi trabajo utilicé como modelo de estudio a *Lolium multiflorum*, que es una gramínea exótica anual naturalizada en pastizales pampeanos y promovida como forrajera invernal con su hongo endófito, dado que esta asociación no resulta tóxica para el ganado (De Battista, 2005). *Lolium multiflorum* Lam. (raigrás anual, también llamado raigrás italiano) es un pasto anual invernal nativo del sur de Europa, que se distribuye ampliamente en todo el mundo (CABI, <https://www.cabi.org/isc/datasheet/31165>, consultado en noviembre de 2021). *Epichloë occultans* es un endófito fúngico que crece naturalmente en el apoplasto de los tejidos aéreos de las plantas de *Lolium multiflorum* (Moon et al., 2000; Leuchtmann et al., 2014). Se sabe que este hongo se transmite sólo de forma vertical, que no suprime la producción de semillas de su hospedante (Moon et al., 2000) y que produce únicamente alcaloides no tóxicos para el ganado (Sugawara et al., 2006). Como *L. multiflorum* es una anual de invierno en pastizales templados (Soriano, 1991), el hongo comparte un ciclo de vida común con su planta hospedante.

En estudios de largo plazo se detectó que esta especie de gramínea persistió hasta 25 años de sucesión post-agrícola en campos de cultivo abandonados de la Pampa Interior (Omacini et al., 2005; Tognetti et al., 2010). Estos estudios despertaron el interés por los factores ecológicos que podrían determinar el éxito de *L. multiflorum* en diferentes ecosistemas, así como por su influencia en el atraso de la recuperación de especies nativas y en la invasión de otras especies exóticas en pastizales sucesionales (Tognetti et al., 2010; Tognetti y Chaneton, 2012). Experimentos a campo mostraron que el endófito favorece el establecimiento del pasto en diferentes comunidades con distintos estadios sucesionales en la Pampa Interior (Uchitel et al., 2011), al igual que su capacidad invasora en pastizales pastoreados de la Pampa Deprimida (Casas et al., 2016). En experimentos realizados en mesocosmos se demostró que su asociación natural con el endófito *Epichloë occultans* le confiere una mayor habilidad competitiva, aunque disminuye su capacidad de obtener beneficios de otros simbiontes como de los hongos formadores de micorrizas (Omacini et al., 2006).

La simbiosis entre *L. multiflorum* y *E. occultans* constituye el modelo ideal para estudiar los efectos de la presencia de endófitos sobre el perfil, la composición y la cantidad de los compuestos orgánicos volátiles que emite el hospedante y su broza, y para incorporar este tipo de defensas antiherbívoro como posible mecanismo de defensa para la planta hospedante y las plantas vecinas (Dicke y Baldwin, 2010; Holopainen y Blande, 2013). Omacini y colaboradores (2001) detectaron que el áfido *Rhopalosiphum padi* es muy sensible a la presencia del endófito en *L. multiflorum* y que los efectos negativos sobre el crecimiento de la población del primero se transmiten a sus enemigos, modificando la tasa de ataque de parasitoides. García Parisi y colaboradores (2014) encontraron que la abundancia de áfidos en plantas de *Trifolium repens* disminuye a medida que aumenta el nivel de infección con endófitos en las poblaciones

de *Lolium multiflorum* que las rodean. Por su parte, Pérez y colaboradores (2016) encontraron que la simbiosis no sólo protege a las plantas hospedantes contra patógenos del suelo, sino que, además, disminuye el ataque de patógenos sobre pastos vecinos sin endófito. Estos estudios incluyen mediciones de los perfiles de VOC de plantas con diferente infección; si bien las herramientas usadas para la medición no permiten identificar los compuestos involucrados (i.e., nariz electrónica), sugieren que estos volátiles podrían ser responsables de la respuesta de los herbívoros y patógenos (García Parisi et al., 2014; Perez et al., 2017).

Como modelo de herbívoro trabajamos con hormigas cortadoras de hojas. Se llama así a dos géneros, *Atta* y *Acromyrmex* (Figura 1.2a), que pertenecen a la tribu Attini (Formicidae) y se distribuyen únicamente en el continente americano (Cherrett et al., 1989; Hölldobler y Wilson, 1990). Estos herbívoros polípagos presentan preferencia por los materiales vegetales que seleccionan para alimentar al hongo que cultivan en sus jardines subterráneos (*Leucoagaricus gongylophorus*) (Figura 1.2b) (Saverschek et al., 2010). La asociación simbiótica de estas hormigas con el hongo consiste en que éstas cortan material vegetal fresco que brindan como sustrato para alimentar al hongo (Cherret et al., 1989) mientras que éste produce una estructura denominada goniglidias (Martin y Martin, 1970) de la que se alimentan la reina y las larvas (Hölldobler y Wilson, 1990). Se comprobó que estas hormigas rechazan plantas, antes aceptadas, si son dañinas para el hongo. A este fenómeno se lo conoce como “rechazo demorado” e involucra aprendizaje por parte de los insectos (Herz et al., 2008; Saverschek y Rocas, 2011). Se hallaron respuestas de estos insectos a los VOC inducidos por herbivoría en plantas de *Vitis vinifera* spp. *vinifera* y de *Phaseolus lunatus*, lo que sugiere que podrían estar vinculados con el aprendizaje antes mencionado (Kost et al., 2011; Thiele et al., 2014).

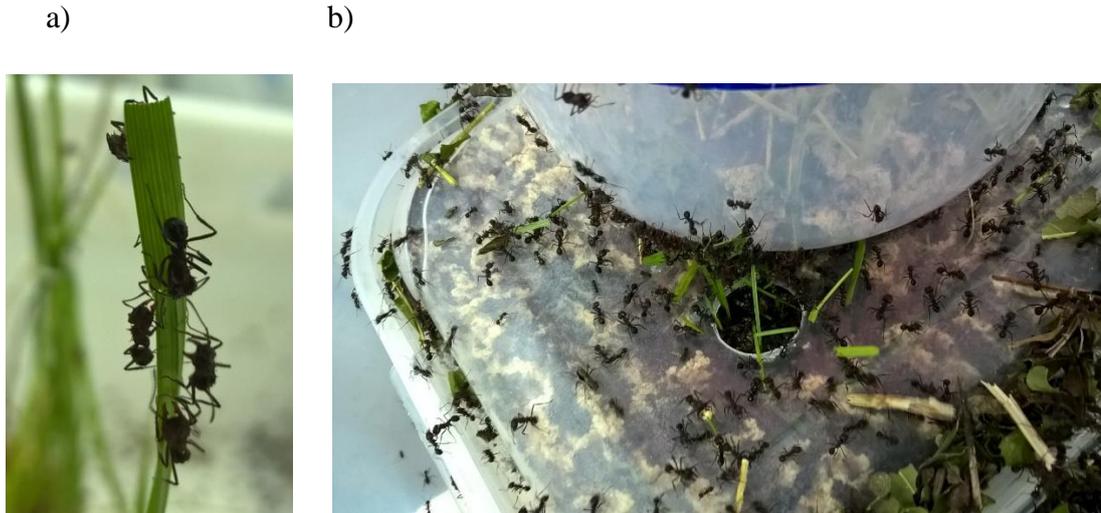


Figura 1.2. Fotografías de a) las hormigas cortadoras de hoja *Acromyrmex ambiguus* y b) de su hongo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

Se sabe que la presencia de hongos endófitos en las plantas modifica ciertas interacciones entre las hormigas cortadoras y su hongo simbiote, y los cambios en su preferencia (Van Bael et al., 2009, 2012; Estrada et al., 2015). En particular se sabe poco sobre la relación de las hormigas cortadoras con los hongos endófitos asexuales de los pastos, que son menos “promiscuos” que los presentes en las dicotiledóneas y que no presentan transmisión horizontal (razón por la cual su éxito ecológico está más ligado con su capacidad de transmitirse a las semillas y con el éxito de su hospedante (Gundel et al., 2008)). Tibbets y Faeth (1999) estudiaron la relación entre dos especies de *Festuca*, con sus respectivos hongos endófitos, y una especie de hormigas cortadoras (*Acromyrmex versicolor*), y encontraron que, si bien las hormigas no prefirieron entre las plantas con y sin endófito para ambas especies, hubo un claro efecto negativo de la presencia del endófito en una de las especies sobre las colonias de hormigas. Cabe destacar que en estos experimentos no se tuvo en cuenta el posible aprendizaje de estos insectos en el mediano-largo plazo (“rechazo demorado”).

1.6. Objetivos específicos y estructura de la tesis

Los **objetivos específicos** de mi tesis fueron:

1. Identificar y cuantificar los VOC emitidos por parches de plantas de *Lolium multiflorum* con niveles contrastantes de infección con *Epichloë occultans* **(1.1)** en diferentes momentos de su ciclo de vida (i.e., plántulas, pre-reproductivo, reproductivo y después de la muerte) y **(1.2)** determinar el impacto de otras interacciones, como la simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares y la herbivoría (defoliación), sobre los cambios que induce el endófito en el perfil de VOC. Estos objetivos serán desarrollados en los capítulos 2 y 3 (Figura 1.2).

2. Determinar **(2.1)** si existe un antagonismo entre los hongos *Epichloë occultans* y *Leucoagaricus gonglyophorus* que determina un rechazo demorado de las plantas simbióticas y **(2.2)** si los VOC producidos por la simbiosis entre *Epichloë occultans* y *Lolium multiflorum* constituyen el mecanismo por el cual se inhibiría el crecimiento del simbionte de las hormigas cortadoras de hojas. Estos objetivos serán desarrollados en el capítulo 4 (Figura 1.2).

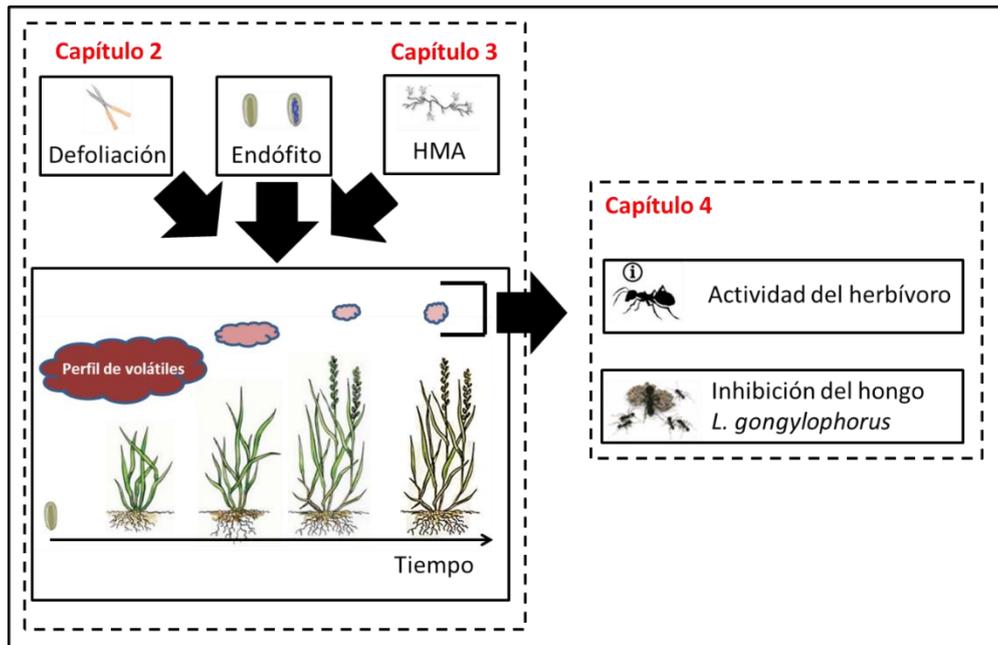


Figura 1.3. Esquema resumido con la relación entre los objetivos específicos y los capítulos de la tesis.

1.7. Características comunes de las aproximaciones experimentales

Todos los años se generaron semillas con alta y baja frecuencia de infección con el endófito (de aquí en más, E+ y E-, respectivamente) a partir de semillas de *L. multiflorum* provenientes de una población que presenta naturalmente una frecuencia de infección de entre 85 y 95% (i.e., de 100 semillas, entre 85 y 95 tienen endófito). Estas semillas se cosecharon en un pastizal pampeano sucesional en un campo experimental de la Universidad de Buenos Aires (Estancia San Claudio, Pdo. de Carlos Casares, provincia de Buenos Aires, 34°06' S - 60°25' O). Las semillas de *L. multiflorum* E- se obtuvieron eliminando al endófito de una parte de las cosechadas con un fungicida sistémico antes de la siembra, tal como se realizó en estudios previos (ver detalles en Omacini et al., 2004). Las semillas cosechadas y las tratadas se sembraron todos los años en parcelas de 1 m², separadas por un borde de 30 cm, en el jardín experimental de la Facultad de Agronomía de la UBA (FAUBA). Luego de que las plantas completaran

su ciclo de vida, se cosecharon las semillas producidas; el objetivo fue usar en los experimentos semillas producidas por plantas de una misma población con y sin endófitos, cultivadas en las mismas condiciones ambientales. Para conocer la frecuencia de infección de las semillas E+ y E- antes de usarlas en los experimentos, se observaron al microscopio 30 semillas teñidas con rosa de bengala (Bacon y White Jr., 1994). Se comprobó la presencia/ausencia de hifas del endófito en cada semilla. Si bien en cada capítulo se indica la frecuencia de infección, en términos generales fue mayor a 90% y menor al 8% para las semillas E+ y E-, respectivamente.

Capítulo 2

La presencia de *Epichloë occultans* modifica los VOC emitidos por *Lolium multiflorum* en diferentes momentos de su ciclo de vida

* **Fiorenza, J.E.**, Fernández, P.C., Omacini, M. 2021. Z-3-Hexenylacetate emissions induced by the endophyte *Epichloë occultans* at different levels of defoliation during the host plant's life cycle. *Fungal Ecology* 49: 101015.

2.1. Introducción

Los microorganismos simbioses son reguladores clave del metabolismo del organismo que los hospeda (Dupont et al., 2015; Grunseich et al., 2020). Un modelo ideal para estudiar las interacciones benéficas entre plantas y hongos es la asociación entre los pastos C3 de zonas templadas y los hongos asexuales del género *Epichloë* (Ascomycota, Clavicipitaceae) (Rodríguez et al., 2009; Leuchtman et al., 2014). Esta simbiosis es considerada un mutualismo protector o defensivo porque el simbionte obtiene carbohidratos de la planta y, a cambio, le confiere al hospedante resistencia frente a herbívoros (Clay y Schardl, 2002; Tian et al., 2008; White y Torres, 2010; Paňka et al., 2013; Clay, 2014; Bastias et al., 2017). En general, los herbívoros tienen un mejor éxito ecológico en plantas no simbióticas (Siegel et al., 1990; Bush et al., 1997). Como se mencionó en el capítulo anterior, se considera que los alcaloides fúngicos presentes en las plantas simbióticas son el principal determinante de que los herbívoros las eviten y del éxito de las plantas (Clay y Schardl, 2002; Schardl et al., 2007). Sin embargo, dado que los endófitos producen muchos cambios morfológicos, químicos y fisiológicos en el hospedante (Rasmussen et al., 2009, 2012; White y Torres, 2010; Dupont et al., 2015; Bastias et al., 2017), otros mecanismos podrían estar involucrados en la protección de las plantas frente a herbívoros y patógenos (Rasmann y Agrawal, 2009).

Existen al menos tres efectos de la simbiosis pasto-endófito sobre la interacción entre plantas simbióticas y otros miembros de la comunidad que no pueden explicarse sólo por la producción de alcaloides fúngicos (Siegrist et al., 2010; Bastias et al., 2017). En primer lugar, el endófito contribuye a una mayor defensa indirecta de las plantas al atraer a los enemigos naturales de los herbívoros (Omacini et al., 2001). Considerando que no entraron en contacto con alcaloides en la planta hospedante, Fuchs y Krauss

(2018) sugieren que los endófitos del género *Epichloë* pueden modificar la emisión de VOC de la planta hospedante, contribuyendo a la respuesta de enemigos naturales en las plantas simbióticas (e.g., el aumento en las tasas de parasitismo en áfidos). Se comprobó que existe protección por asociación frente a herbívoros mediada por la presencia de plantas endofíticas en el vecindario (García Parisi et al., 2014). Paralelamente, algunos experimentos sugieren que estos endófitos no sólo protegen a las plantas hospedantes contra los patógenos del suelo al disminuir su incidencia, sino también protegen a las plántulas de gramíneas no simbióticas que crecen cerca de plantas simbióticas de *L. multiflorum* (Pérez et al., 2016). Por último, también se documentó la protección por asociación frente a herbívoros en plántulas, mediada por los tejidos muertos de plantas simbióticas (Omacini et al., 2009), mientras que se asume que la hojarasca del hospedante pierde rápidamente sus alcaloides (Siegrist et al., 2010).

Si bien el rol de los VOC en las defensas de las plantas en respuesta a la herbivoría está muy estudiado (Dicke et al., 2009; Unsicker et al., 2009; Dicke y Baldwin, 2010), no está claro cómo la presencia de simbiontes microbianos dentro de los tejidos del hospedante afecta esta respuesta. Los VOC que sintetizan las plantas pueden actuar sobre los herbívoros de forma directa (i.e., repelentes o tóxicos) o sobre sus enemigos naturales de manera indirecta (e.g., parasitoides y depredadores) (Kessler, 2001; Heil, 2004, 2008). Existen diferentes ejemplos de simbiontes de plantas que modifican el perfil de VOC que emite su hospedante. Schausberger y colaboradores (2012) encontraron una mayor emisión de los compuestos β -ocimeno y β -cariofileno en hojas dañadas de *Phaseolus vulgaris* cuando sus raíces eran colonizadas por hongos micorrícicos arbusculares. Ballhorn y colaboradores (2013) encontraron un patrón similar con la misma especie de planta, pero con otro tipo de simbionte: la inoculación con rizobios aumentó la producción de VOC en plantas rociadas con ácido jasmónico

(simulando herbivoría). También se encontraron algunas diferencias en la cantidad y la composición de los VOC emitidos por diferentes asociaciones pasto-*Epichloë*, en comparación con sus conespecíficas no simbióticas. En estos casos, el cambio en el perfil de VOC dependió en gran medida de las especies que conformaban la asociación (Yue et al., 2001; Steinebrunner et al., 2008; Pańka et al., 2013; Li et al., 2014; Qawasmeh et al., 2015).

El objetivo de este capítulo fue caracterizar el perfil de VOC que inducen la defoliación y la simbiosis pasto-endófito, abarcando todo el ciclo de vida de la planta hospedante y de su simbionte asexual. Se realizó un experimento a campo con parches de vegetación dominados por plantas de *L. multiflorum* con niveles contrastantes de infección con el endófito *Epichloë occultans* y de daño mecánico. La hipótesis planteada postula que la presencia del simbionte cambia la emisión de VOC de las plantas hospedantes, aunque sus efectos pueden depender de la fase fenológica en la que éstas se encuentren y de la respuesta inducida por el daño. Teniendo en cuenta que la importancia relativa de las defensas inducidas en las plantas herbáceas disminuye a lo largo de su ciclo de vida (Barton y Koricheva, 2010), se esperaba que la infección con el endófito aumentase la emisión de VOC en etapas fenológicas más tempranas, y que este incremento fuera mayor en plantas dañadas.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Diseño experimental

Entre abril y diciembre de 2017 realizamos un experimento al aire libre en un campo experimental de la FAUBA, Argentina. Creamos doce parcelas pareadas de 1 m², separadas por un borde de 30 cm (los bordes siempre se cortaron al menos quince días antes de las recolecciones de VOC). El 25 de abril sembramos en cada parcela aproximadamente 1.500 semillas E+ o E- y luego las subdividimos en dos partes iguales

(i.e., dos subparcelas de 0,5 x 1 m²; total=24 subparcelas). Simulamos la defoliación aplicando un daño mecánico, al azar, en una subparcela por parcela. El daño se realizó cortando con unas tijeras las hojas de las plantas a 20 cm de altura. Realizamos este procedimiento en cuatro fases fenológicas diferentes del ciclo de vida de la planta: plántula, vegetativa, reproductiva y muerto en pie (Figura 2.1). Consideramos que las parcelas se encontraban en aquellas fases cuando más del 60% de las plantas de cada parcela lo habían alcanzado. En la fase de muerto en pie hubo semillas en las espigas, y representaron 8,4%±3,2% (media±SE) de la biomasa envuelta en las bolsas para recolección de volátiles. Al final de la fase reproductiva recolectamos semillas de todas las subparcelas y evaluamos la frecuencia de infección. Sólo consideramos como E- a aquellas parcelas con una frecuencia de infección <25% y como E+ a aquellas >90%. Si bien el umbral de 25% para las parcelas E- puede parecer alto, hay que tener en cuenta que este ensayo se realizó a campo y sin eliminar las semillas en el banco del suelo, que incluyen a *L. multiflorum* y que, como mencionamos antes, tiene más éxito ecológico asociado al endófito. Las subparcelas que estaban fuera de estos rangos no se incluyeron en el análisis (7 en total). La presencia de herbívoros y de patógenos se evaluó de forma periódica, pero no se registró ningún daño significativo en las plantas durante todo el experimento.

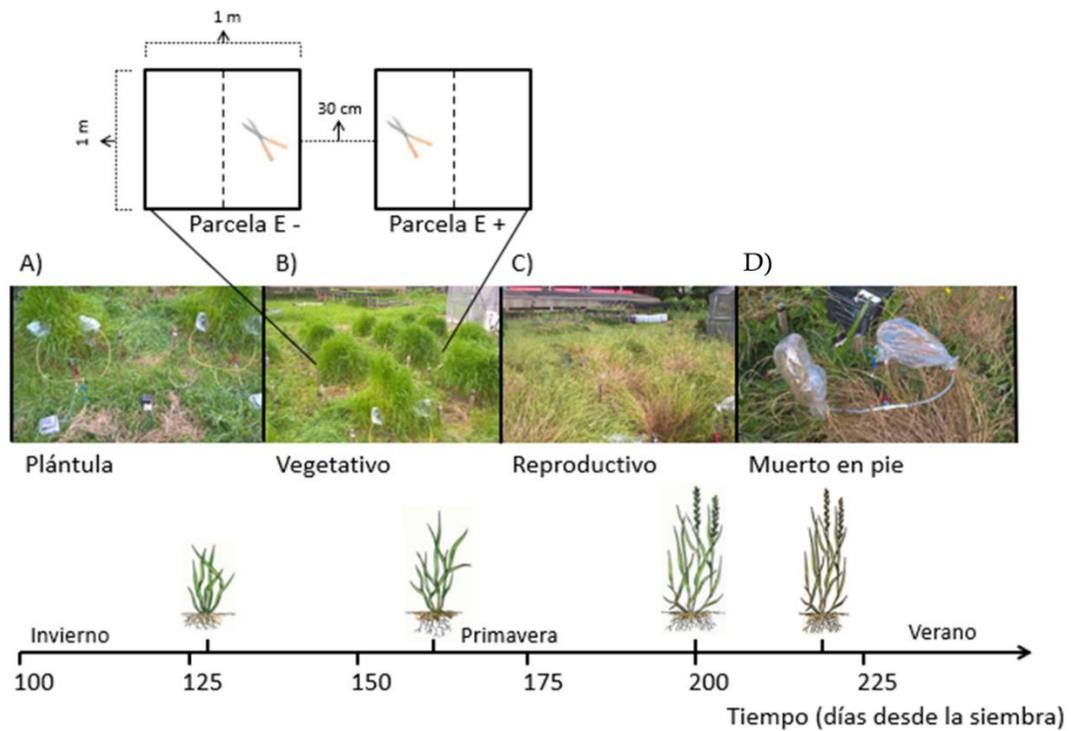


Figura 2.1. Fases del ciclo de vida de las plantas durante las cuales medimos los VOC en un experimento a campo a escala de parche: A) plántula, B) vegetativa, C) reproductiva y D) muerto en pie. En cada subparcela, una muestra de cincuenta macollos fue envuelta en una bolsa para horno de PET para la recolección de VOC en cada fase fenológica. La densidad de plantas era de ~ 300 plantas/m². E- y E+ indican dos frecuencias contrastantes de infección con el endófito en las semillas sembradas en las parcelas de 1 m² (0% y 93%, respectivamente) y las tijeras representan la subparcela sobre la que se aplicó el daño por defoliación.

2.2.2. Colección de VOC y análisis químico

Las colecciones de VOC comenzaron 5 minutos después del daño mecánico en cada subparcela. En cada subparcela envolvimos cincuenta macollos en una bolsa de polietileno (PET) para horno (6 litros de capacidad) y por medio de una bomba las ventilamos con aire filtrado con carbón activado a una velocidad constante de 0,5 L/minuto durante 1 hora a fin de evitar la condensación en las bolsas (ver Figura 2.1D). El aire, succionado por la bomba, pasó a través de un tubo de vidrio de borosilicato de 3" de largo y 1/4" de diámetro exterior, y que contenía 20 mg de absorbente HayeSep Q, que funcionó como trampa de recolección de volátiles. Utilizamos bolsas vacías

(bolsas para horno sin plantas dentro) como blanco para controlar la presencia de contaminantes. Las fechas de recolección de VOC fueron el 30 de agosto, el 6 de octubre, el 11 de noviembre y el 28 de noviembre para plántulas, vegetativa, reproductiva y muerto en pie, respectivamente. Eluimos los VOC de las trampas con 150 μ L de diclorometano que contenía 4,9 ng/ μ l de heptil butirato (Sigma Aldrich) que utilizamos como estándar interno. Para el análisis empleamos un cromatógrafo gaseoso Agilent 7890A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5977 (GC-MS). Se utilizó una columna capilar Agilent J&W HP-5 MS (fenilmetilsiloxano al 5%, 30 m x 0,25 mm de d.i. x 0,25 μ m de espesor). Inyectamos las muestras (1 μ L) a 240 °C en modo *splitless*. Utilizamos helio como gas *carrier* a 0,7 mL por minuto (presión de entrada: 20,48 kPa). La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C durante 1 minuto y luego se incrementó a una velocidad de 10 °C por minuto hasta que alcanzó 230 °C. Finalmente, la temperatura se mantuvo a 230 °C durante 15 minutos.

Identificamos los compuestos comparando los espectros de masas con los de una biblioteca de espectros de masas NIST. Comparamos el tiempo de retención del (Z)-3-hexenil acetato con un estándar comercial (Sigma Aldrich). Realizamos la cuantificación relacionando las áreas de los picos con las del patrón interno. Expresamos la cantidad como la masa equivalente al estándar interno después de restar los valores de los blancos. Sólo consideramos compuestos que pudieran ser de origen vegetal o fúngico y que tuvieran una constancia superior al 5% de las muestras.

2.2.3. Análisis estadístico

Realizamos análisis estadísticos sobre la emisión total de VOC y sobre el compuesto (Z)-3-hexenil acetato (en adelante, Z3-HAC). Llevamos a cabo los análisis a través de modelos lineales generalizados con efectos mixtos (GLMM, por sus siglas en inglés) realizados en el software estadístico R (Versión 3.4.1). Pusimos a prueba las

diferencias en las emisiones entre los tratamientos utilizando GLMM con distribución lognormal y logaritmo como función de enlace para la emisión total de VOC, y con distribución “Tweedie” y logaritmo como función de enlace para el Z3-HAC. Colocamos la infección con endófito (I), el daño (D), la fase fenológica (P) y sus interacciones como efectos fijos; y como efectos aleatorios especificamos el anidamiento correspondiente al diseño en parcelas divididas y a las medidas repetidas. La infección con el endófito fue el factor principal, a nivel de parcela y el daño fue el factor subordinado, a nivel de subparcela. Evaluamos los efectos de cada factor y sus interacciones (I*D; I*P; D*P; I*D*P) sobre la emisión de VOC utilizando cocientes de verosimilitud con el estadístico *Chi* cuadrado (Zuur et al. 2009). Construimos los modelos utilizando la función *glmmTMB*, en el paquete *glmmTMB* (Brooks et al. 2017) y la función *lme*, en el paquete *nlme* (Pinheiro et al. 2019). Realizamos comparaciones múltiples entre los tratamientos con la prueba *post hoc* Tukey HSD utilizando el paquete *lsmeans* (Lenth 2016). Excluimos la fase de muerto en pie de los análisis porque no encontramos VOC en esta fase.

2.3. Resultados

El nivel de infección con el endófito (I, $P=0,0449$) y el daño (D, $P=0,0078$) alteraron la emisión total de compuestos orgánicos volátiles (VOC) de las plantas de *L. multiflorum* (Figura 2.2 a y b). En cambio, la fase fenológica no alteró la emisión total de VOC (P, $P=0,1515$) (Figura 2.2c). Ni la interacción triple (I*P*D, $P=0,4909$) ni las interacciones dobles con el daño fueron estadísticamente significativas (D*I, $P=0,7148$; P*D, $P=0,4137$), aunque sí encontramos una interacción marginalmente significativa entre la infección con el endófito y la fase fenológica (I*P, $P=0,0563$). No detectamos VOC en la fase de muerto en pie.

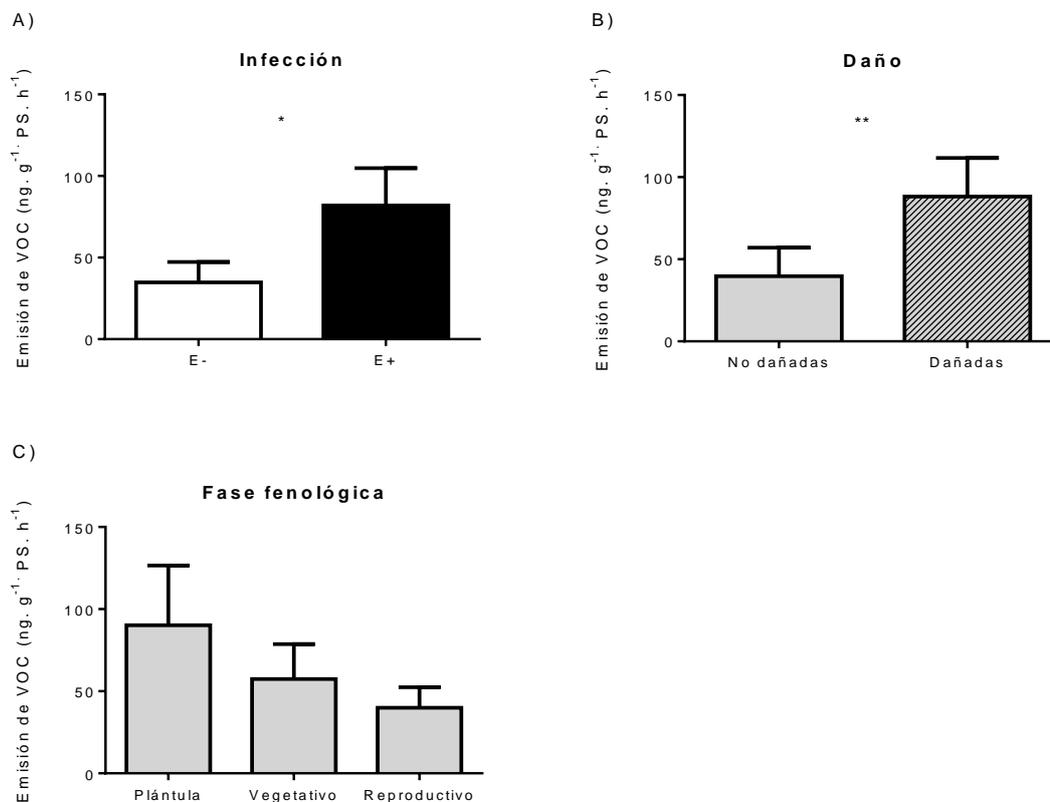


Figura 2.2. Media (\pm error estándar) de las emisiones de VOC totales ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{PS}\cdot\text{hora}^{-1}$) de parcelas con: A) baja (E-) y alta (E+) frecuencia de infección con el endófito, B) plantas dañadas y no dañadas, donde “dañadas” se refiere a las plantas defoliadas, y C) plantas en diferentes fases fenológicas (ver Figura 2.1). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*= $P<0,05$; **= $P<0,01$).

Identificamos un total de seis VOC emitidos por las plantas de *L. multiflorum* a lo largo de su ciclo de vida (Cuadro 2.1). El volátil de hoja verde Z3-HAC apareció en el 80,4% de las muestras recolectadas en las parcelas, abarcando las fases de plántula, vegetativo y reproductivo. Los otros cinco compuestos sólo se detectaron en menos del 35% de las muestras de cada tratamiento, en su mayoría asociados a la fase reproductiva. Sin embargo, dado que no pudimos identificar estos compuestos menores con certeza, el resto del análisis se centró en el Z3-HAC. Este compuesto fue el VOC más constante y dominante de aquellos recolectados en parcelas con plantas vivas,

independientemente de su nivel de infección con el endófito o el daño que tuviesen, representando el $87,4 \pm 3,6\%$ (media \pm EE) de la emisión total de volátiles en las muestras en las que apareció (Cuadro 2.1, Figura 1 Apéndice).

Con respecto a la emisión de Z3-HAC, la triple interacción entre la infección con el endófito, el daño y la fase fenológica no fue estadísticamente significativa ($I*D*P$, $P=0,8416$). Las interacciones entre el daño y la fase fenológica y el daño y la infección endófito no fueron estadísticamente significativas ($D*P$, $P=0,919$ y $D*I$, $P=0,122$, respectivamente). Tampoco encontramos un efecto significativo del daño mecánico sobre la emisión de Z3-HAC para todas las fases fenológicas (D , $P=0,1730$).

Encontramos una interacción significativa entre la infección con el endófito y la fase fenológica; mientras que las parcelas E- no cambiaron su emisión de Z3-HAC a lo largo del ciclo de vida de las plantas, las parcelas E+ mostraron niveles de emisión más altos en las fases de plántula y vegetativa que en la fase reproductiva ($I*P$, $P=0,002$, Figura 2.3). La emisión media de Z3-HAC de las parcelas E+ disminuyó en un 63% desde la fase vegetativa a la reproductiva, alcanzando niveles de emisión similares a los de las parcelas E-.

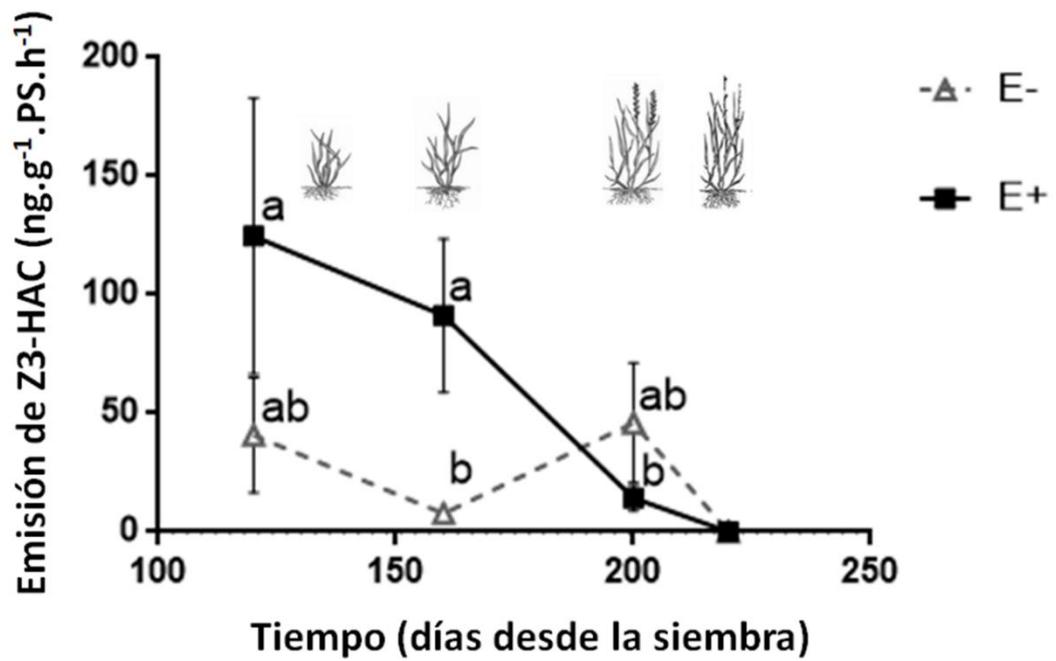


Figura 2.3. Media (\pm error estándar) de las emisiones del volátil de hoja verde (Z)-3-hexenyl acetato ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{PS}\cdot\text{hora}^{-1}$) de parcelas con baja (E-) y alta (E+) frecuencia de infección con el endófito y plantas en diferentes fases fenológicas (ver Figura 2.1). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; Tukey HSD).

Cuadro 2.1. Porcentaje de VOC (media±EE) colectados de muestras (50 macollos) de parcelas dominadas por plantas dañadas y no dañadas de *L. multiflorum* con baja (E-) y alta (E+) frecuencia de infección con el endófito. Los resultados muestran la emisión de plantas en distintas fases fenológicas (P: plántula, V: vegetativo, R: reproductivo y M: muerto en pie). El número de muestras en las cuales cada compuesto apareció se indica entre paréntesis. (TR: Tiempo de retención).

Endófito	Parcelas E-								Parcelas E+								
	Daño	Dañadas (n=3)				No dañadas (n=4)				Dañadas (n=5)				No dañadas (n=5)			
Fase fenológica		TR	P	V	R	M	P	V	R	M	P	V	R	M	P	V	R
<i>(Z)</i> -3-Hexenil, acetato	10.2	100±0 (2)	100±0 (3)	88±0 (2)	-	100±0 (3)	88±8 (2)	70±7 (3)	-	100±0 (5)	97±1 (5)	53±7 (4)	-	100±0 (5)	100±0 (3)	56±9 (4)	-
<i>Aromático desconocido</i>	19.4	-	-	16±7 (3)	-	-	-	14±4 (3)	-	-	-	63±26 (2)	-	-	-	17 (1)	-
<i>Poli aromático desconocido</i>	22.1	-	-	14±5 (3)	-	-	-	-	-	-	-	14±- (1)	-	-	-	39 (1)	-
<i>Acetamida desconocida</i>	22.4	-	-	10±5 (3)	-	-	-	-	-	-	-	37±4 (2)	-	-	-	23 (1)	-
<i>Poli aromático desconocido</i>	23.4	-	-	-	-	-	-	100 (1)	-	-	1 (1)	14±6 (2)	-	-	-	18 (1)	-
<i>Derivado del Indol</i>	23.9	-	-	2 (1)	-	-	25 (1)	49 (1)	-	-	11 (1)	16±1 (3)	-	-	-	39±17 (2)	-

2.4. Discusión

Hasta donde sabemos, este estudio proporciona la primera evidencia experimental en condiciones de campo del impacto de la infección con endófitos del género *Epichloë* en la producción de VOC durante el ciclo de vida completo de la planta hospedante y del simbionte asexual. Encontramos que la simbiosis con el endófito *Epichloë occulta* y el daño mecánico aumentaron las emisiones totales de VOC de *Lolium multiflorum*. En nuestras condiciones experimentales, el principal componente de la mezcla de VOC de las plantas *L. multiflorum* fue el volátil de hoja verde Z3-HAC. Esto coincide con los resultados reportados por Yue y colaboradores (2001), quienes encontraron que este compuesto era el más abundante en plantas no dañadas de festuca alta (*Schedonorus arundinaceus*), significando el 77% y 89% del total de las emisiones de volátiles de las plantas E- y E+, respectivamente. Para el Z3-HAC no encontramos un efecto significativo del daño mecánico que aplicamos, aunque la infección con el endófito indujo un aumento en la emisión de este compuesto en las fases fenológicas tempranas del ciclo de vida de las plantas. Entonces, si el Z3-HAC funciona como un mecanismo de defensa inducida directa o indirecta (Scala et al., 2013; Fuchs y Krauss, 2018), sería más importante durante las fases en las que la concentración de alcaloides y de micelio fúngico son las más bajas (di Menna y Waller, 1986; Tepaske et al., 1993; Spiering et al., 2005; Repussard et al., 2014; Fuchs et al., 2017). Sin embargo, para referirnos estrictamente a una resistencia o defensa inducida (Karban y Myers, 1989), deberíamos investigar si los cambios en la emisión de este volátil afectan la preferencia de los herbívoros y aumentan el éxito reproductivo de las plantas simbióticas sobre las no simbióticas.

El Z3-HAC es un volátil de hoja verde que deriva de la vía de la hidroperóxido liasa de la ruta metabólica de las oxilipinas que es específica de las plantas (Matsui,

2006). Encontramos niveles de emisión de Z3-HAC similares a los reportados para otras especies C3 como trigo, festucas, cebada y avena (Yue et al., 2001; Piesik et al., 2010; Pańka et al., 2013; Li et al., 2014; Qawasmeh et al., 2015). Si bien no se reportó previamente en *Lolium multiflorum*, es uno de los pocos volátiles que emite *Lolium perenne* en asociación con *Epichloë festucae* var. *lolii* (Pańka et al., 2013). Típicamente, la emisión de volátiles de hoja verde se relaciona con la respuesta de las plantas al daño, más allá de si ese daño se realiza de forma mecánica, por insectos masticadores o fitosuccívoros, o por microorganismos patógenos (Scala et al., 2013; Ameye et al., 2017). El Z3-HAC fue encontrado, entre otros compuestos, en tres especies de cereales (trigo, avena, y cebada) infectadas con hongos patógenos del género *Fusarium* (Piesik et al., 2010; Wenda-Piesik et al., 2010). Este compuesto también indujo el *priming* de defensas en plantas de trigo (Ameye et al., 2015). Se reportaron aumentos en la emisión de Z3-HAC en otras simbiosis planta-hongo benéficas (e.g., entre *Plantago lanceolata* y el hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*) en niveles similares a los que encontramos en nuestro trabajo (Fontana et al., 2009).

Nuestros resultados pueden ayudar a explicar los dos tipos de protección por asociación que brindan las plantas simbióticas de *L. multiflorum* con *Epichloë occultaans* a plantas vecinas no simbióticas, que no pueden ser explicados *per se* por la presencia de alcaloides fúngicos (García Parisi et al., 2014; Pérez et al., 2016). En primer lugar, el Z3-HAC podría estar involucrado en la protección inducida por el endófito frente a patógenos fúngicos. Perez y colaboradores (2017) propusieron que la presencia del endófito disminuía las visitas de vectores del patógeno *Claviceps purpurea*, alterando el perfil de emisión de VOC de las plantas simbióticas. Otro mecanismo podría ser un efecto negativo directo de los VOC producidos por estas plantas sobre el crecimiento del patógeno; por ejemplo se observó que el Z3-HAC disminuye el crecimiento del

micelio del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* (Quintana-Rodríguez et al., 2018). Nuestros resultados apoyan ambas hipótesis, dado que no son mutuamente excluyentes. En segundo lugar, las emisiones de Z3-HAC de plantas simbióticas podrían explicar la protección por asociación contra herbívoros conferida a plantas no simbióticas de *Trifolium repens* (García Parisi et al., 2014). Se reportó que los endófitos del género *Epichloë* pueden fortalecer la inmunidad de las plantas al promover respuestas de defensas endógenas mediadas por el ácido jasmónico (Bastias et al., 2017). Además, esta fitohormona estimula la emisión de volátiles de hoja verde, incluido el Z3-HAC (Hopke et al., 1994; Boland et al., 1995). También resulta interesante que el Z3-HAC haya sido señalado como inductor de la expresión de genes de defensa contra herbívoros en plantas vecinas al inducir la síntesis de ácido jasmónico (Engelberth et al., 2004; Hu et al., 2019).

Encontramos un efecto del daño mecánico en la emisión total de VOC de las plantas de *L. multiflorum* independientemente de la infección con el endófito o de la fase fenológica en la que se encontraran las plantas. Pero, sorprendentemente, para el Z3-HAC no encontramos un efecto significativo del daño mecánico. Este compuesto es un volátil de hoja verde, un grupo de compuestos que las plantas suelen liberar después de la destrucción de sus tejidos (Matsui, 2006). Sin embargo, se sabe que el daño mecánico no produce en las plantas exactamente el mismo efecto que aquel causado por el ataque de herbívoros o patógenos, en especial porque estos diferentes tipos de daño activan diferentes rutas metabólicas de defensa en las plantas (Pieterse et al., 2009; Bastias et al., 2017). Por ejemplo, en un metaanálisis reciente se demostró que la cantidad de volátiles de hoja verde que emiten las plantas depende del tipo de daño producido. Las emisiones de las plantas infectadas por hongos son mayores que las de aquellas dañadas mecánicamente (Ameye et al., 2017).

En conclusión, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la importancia relativa de las defensas inducidas y constitutivas varía en función de la fase fenológica en la que se encuentren las plantas y de las condiciones ambientales (Boege y Marquis, 2005; Barton y Koricheva, 2010). El volátil de hoja verde Z3-HAC es, por lejos, el compuesto con la mayor concentración de los que emite esta simbiosis pasto-endófito en condiciones de campo. Su emisión varió a lo largo del ciclo de vida común del hongo y la planta hospedante. Inducido por el endófito, pero producido por la planta durante las fases vegetativas, el Z3-HAC podría jugar un rol clave en la protección por asociación frente a herbívoros y frente a patógenos fúngicos en plantas vecinas no simbióticas (Pérez et al., 2016, García Parisi et al., 2014, Hu et al., 2019).

Capítulo 3

Cambios en la emisión de volátiles cuando un simbionte fúngico aéreo y otro subterráneo comparten al mismo hospedante

3.1. Introducción

Las plantas establecen relaciones simbióticas simultáneamente con microorganismos tan diferentes como bacterias, endófitos aéreos y endófitos radicales, entre otros (Hardoim et al., 2015; Compant et al., 2016). Más allá de que las simbiosis generan múltiples cambios en el metabolismo del hospedante (Schliemann et al., 2008; Dupont et al., 2015; Rivero et al., 2015; Shtark et al., 2021), cada una es conocida por un tipo de beneficio particular que le brinda el simbionte a la planta hospedante (e.g., protección contra herbívoros [endófitos aéreos del género *Epichloë*], fijación de nitrógeno atmosférico [rizobacterias] o mayor absorción de fósforo del suelo [hongos micorrízicos arbusculares (HMA)] (Johnson et al., 1997; Clay y Schardl, 2002; Sprent, 2007). La presencia simultánea de dos o más simbiontes en la misma planta puede inducir efectos aditivos o interactivos (sinergias o antagonismos) en los beneficios que la planta obtiene de estos microorganismos (García Parisi y Omacini, 2019). Existen pocos estudios en los que se evalúa la presencia de hongos micorrízicos y endofíticos, y se enfocan principalmente en aspectos relacionados con el crecimiento y la producción de semillas de la planta hospedante (Larimer et al., 2012).

Un rasgo de las plantas que podría ser alterado por la presencia de diferentes microorganismos simbióticos es la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOC) debido a cambios tanto en la composición como en la cantidad emitida (Sharifi et al., 2018). Las plantas producen VOC en respuesta a una amplia variedad de estímulos; por ejemplo, como respuesta al daño causado por herbívoros (Dicke y Baldwin, 2010), a ataques de patógenos (Piesik et al., 2010; Wenda-Piesik et al., 2010; Ameye et al., 2017), o la presencia de microorganismos benéficos (Fontana et al., 2009; Ballhorn et al., 2013; Fiorenza et al., 2021). Es muy complejo reconocer el rol de los VOC, al igual que la vía por la cual generan protección. Los VOC pueden funcionar como

repelentes de herbívoros (i.e., defensas directas [De Moraes et al., 2001; Kessler, 2001]), como atrayentes de enemigos naturales de los herbívoros o defensas indirectas (Kost y Heil, 2006); o bien pueden participar de la comunicación planta-planta (Sharifi y Ryu, 2021), induciendo la producción de defensas (*priming*) en plantas vecinas (Engelberth et al., 2004; Hu et al., 2019).

Existe evidencia de que diferentes grupos de simbioses benéficos podrían afectar la emisión de VOC en dicotiledóneas y gramíneas. Por ejemplo, se encontró que *Phaseolus vulgaris* emitía una mayor cantidad de VOC cuando las plantas eran colonizadas por HMA (Schausberger et al., 2012) o por rizobios (Ballhorn et al., 2013). En cuanto a la simbiosis entre pastos y los endófitos aéreos del género *Epichloë*, algunos estudios le atribuyen un papel en la producción de VOC de la planta hospedante (Yue et al., 2001; Steinebrunner et al., 2008a; Li et al., 2014; Qawasmeh et al., 2015; Fiorenza et al., 2021). Sin embargo, hasta donde sabemos, en ninguno de estos trabajos se esterilizó el suelo en el que se sembraron las plantas ni se consideró si en esa inducción estuvieron involucradas otras simbiosis (e.g., micorrizas). Aunque hay varios estudios que evalúan el impacto de una simbiosis benéfica sobre la emisión de VOC, no hemos encontrado ninguno que considere cómo interactúan dos o más simbioses presentes en la misma planta. No obstante, esto sí se estudió con microorganismos patógenos (Pulido et al., 2019).

En el presente capítulo nos propusimos evaluar si existe un efecto aditivo o interactivo en la emisión de VOC inducidos por hongos simbióticos aéreos y subterráneos. En el capítulo anterior encontramos que la presencia del endófito *Epichloë occultans* indujo un incremento en la emisión del volátil de hoja verde Z3-HAC en las fases fenológicas tempranas del ciclo de vida de las plantas de *Lolium multiflorum*, más allá del nivel de daño que tuvieran las mismas (Ver Capítulo 2, Fiorenza et al., 2021).

Sin embargo, ese experimento se realizó a campo y, por lo tanto, sin controlar el nivel de colonización por HMA en las plantas. En este experimento utilizamos como modelo de estudio la simbiosis que *L. multiflorum* establece con *Epichloë occultans* y con tres especies diferentes de HMA. Trabajamos con la hipótesis de que los cambios inducidos por los hongos endofíticos asexuales en la emisión de VOC de las gramíneas hospedantes están modulados por el nivel de colonización de las raíces por HMA. Por lo tanto, esperábamos que el cambio en el perfil de VOC inducidos por la presencia del endófito fuera diferente en las plantas que estaban asociadas con HMA, al de aquellas que no lo estaban.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material biológico

Las semillas de *L. multiflorum* con nivel contrastantes de infección con *E. occultans* se obtuvieron como en el experimento del capítulo anterior. En este caso, las frecuencias de infección de las semillas E+ y E- sembradas fueron 93% y 0%, respectivamente (ver Capítulo 1).

El inóculo de HMA que utilizamos consistió en la mezcla de hifas y esporas ($32 \pm 3,4$ esporas/g) de tres especies de hongos conocidos por colonizar pastos: *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker y A. Schüßler (LPS SB1), *Simiglomus hoi* (S.M. Berch & Trappe) G.A. Silva, Oehl & Sieverd (BEG 104) y *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler (BAFC 3108). Los inóculos se obtuvieron multiplicando cultivos puros de cada uno de los hongos en plantas de *Lotus tenuis* y *Bromus unioloides*. Estas plantas crecieron en macetas con perlita y vermiculita estéril, regadas con agua destilada durante la primera semana, y posteriormente con solución Hoagland modificada (ver García Parisi y Omacini, 2017). Cuando las plantas tuvieron más del 60% del largo de la raíz

colonizada por HMA, dejamos de regar. Entonces, el inóculo consistió en el sustrato, las raíces de las plantas, y las esporas contenidas en las macetas. Para obtener el inóculo control para las macetas experimentales de los tratamientos sin HMA, autoclavamos durante una hora la mezcla a 1 atmósfera y 100 °C.

3.2.2. Diseño experimental

En dos años consecutivos realizamos el mismo experimento en la FAUBA (34 °35'S - 58°35' O). El primero, entre agosto y diciembre de 2018, y el segundo, entre junio y octubre de 2019. Cada uno fue un factorial completo con seis repeticiones y dos factores: la frecuencia de infección con el endófito en las semillas sembradas (E=E+ y E-) y la adición del inóculo de HMA (M=M+: con adición del inóculo, M-: con adición del inóculo esterilizado). De la combinación de estos factores obtuvimos cuatro tratamientos, resultando un total de 24 macetas cada año.

Todas las macetas se llenaron con suelo estéril clasificado como un Argiudol típico que obtuvimos en Rojas, provincia de Buenos Aires (34°11' 00'' S - 60°44'00'' O). Para esterilizarlo, el suelo fue autoclavado a 1 atmosfera y 100° C durante una hora, tres veces consecutivas, en intervalos de 24 horas. Cada año, en 12 macetas sembramos 20 semillas de *L. multiflorum* E- y en otras 12 macetas, 20 semillas E+. La mitad de las macetas E- y la mitad de la E+ fueron inoculadas con 10 gramos del inóculo de HMA. El resto, con el inóculo esterilizado.

Cuatro meses después de la siembra removimos las raíces presentes en cada maceta. Las raíces fueron teñidas con azul de tripán (McGonigle et al., 1990). Luego, fueron examinadas al microscopio óptico con una magnificación de x200 a fin de observar las diferentes estructuras de los HMA (i.e., hifas, arbusculos y vesículas) (Phillips y Hayman, 1970). No encontramos diferencias en la colonización por HMA

entre las macetas E- y E+ (los valores P para la interacción, el nivel de frecuencia de infección con el endófito y la adición de inóculo de HMA fueron 0,3722, 0,1874 y $<0,0001$, respectivamente). Los porcentajes de colonización por hifas en las macetas M- y M+ fueron $3,1\pm 0,2\%$ y $51,2\pm 2,1\%$, respectivamente. Encontramos menos de 0,05% de colonización de arbusculos o vesículas en macetas M-. No encontramos diferencias en la biomasa total ni en la aérea entre los tratamientos. La presencia de herbívoros y patógenos fue monitoreada de forma periódica, pero no registramos daños importantes en las plantas de ningún tratamiento a lo largo del experimento.

3.2.3. Colección de VOC y análisis químico

Realizamos las colecciones de VOC en la primavera (entre el 19 y el 21 de septiembre en 2018 y el 12 de septiembre en 2019), cuando las plantas habían alcanzado la fase fenológica vegetativa. Envolvimos cada maceta con una bolsa de polietileno (PET) para horno (6 litros de capacidad) y por medio de una bomba de aire ventilamos con aire filtrado con carbón activado a una velocidad constante de 0,5 L por minuto durante 1 hora para evitar la condensación en las bolsas (Figura 3.1). El aire, succionado por la bomba, pasó a través de un tubo de vidrio de borosilicato de 3" de largo y 1/4" de diámetro exterior conteniendo 20 mg de absorbente HayeSep Q, que funcionó como trampa de recolección de volátiles. Utilizamos bolsas vacías (bolsas para horno sin plantas dentro) como blanco para controlar la presencia de contaminantes. Eluimos los VOC de las trampas con 150 μL de diclorometano que contenía 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de heptilbutirato (Sigma Aldrich) que utilizamos como estándar interno. Para el análisis empleamos un cromatógrafo gaseoso Agilent 7890A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5977 (GC-MS). Se utilizó una columna capilar Agilent J&W HP-5 MS (fenilmetilsiloxano al 5%, 30 m x 0,25 mm de d.i. x 0,25 μm de espesor). Inyectamos las muestras (1 μL) a 240 $^{\circ}\text{C}$ en modo *splitless*. Utilizamos helio como gas *carrier* a 0,7

mL por minuto (presión de entrada: 20,48 kPa). La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C durante 1 minuto y luego se incrementó a una velocidad de 10 °C por minuto hasta que alcanzó 230 °C. Por último, la temperatura se mantuvo a 230 °C durante 15 minutos.

Identificamos los compuestos comparando los espectros de masas con los de una biblioteca de espectros de masas NIST. Comparamos el tiempo de retención del (Z)-3-hexenil acetato con un estándar comercial (Sigma Aldrich). Realizamos la cuantificación relacionando las áreas de los picos con las del patrón interno. Expresamos la cantidad como la masa equivalente al estándar interno después de restar los valores de los blancos. Sólo consideramos los compuestos que pudieran ser de origen vegetal o fúngico y que tuvieran una constancia superior al 5% de las muestras.



Figura 3.1. Fotografía del sistema de la colección de VOCs en el invernáculo.

3.2.4. Análisis estadístico

Para los análisis univariados agrupamos los datos de los dos años y realizamos análisis sobre la emisión total de VOC y la emisión de aquellos compuestos que hayan

sido reportados como compuestos involucrados en las defensas de las plantas. Utilizamos modelos lineales mixtos (LMM, por su sigla en inglés) en el software estadístico R (versión 3.4.1). La infección con el endófito (E), la adición de inóculo de HMA (M) y su interacción (E*M) fueron colocados como efectos fijos, mientras que el año y la bomba utilizada para la recolección como efectos aleatorios. Las diferencias en la emisión de los VOC totales y del Z3-HAC entre tratamientos fueron puestas a prueba utilizando LMM con distribución normal. Como los datos presentaban heterocedasticidad para estos factores, modelamos las varianzas. Los efectos de cada factor y de la interacción fueron puestos a prueba con el cociente de probabilidades del estadístico *Chi-cuadrado* (Zuur et al. 2009). Construimos los modelos utilizando la función *lme* en el paquete *nlme* (Pinheiro et al. 2020). Para las comparaciones múltiples usamos la prueba *post hoc* HSD de Tukey en el paquete *emmeans* (Lenth 2020). Para el caso del β -ocimeno construimos dos modelos separados debido a la gran cantidad de ceros (i.e., muestras en las que no detectamos este compuesto). Primero, para evaluar si la probabilidad de emitir β -ocimeno era distinta entre los tratamientos, dicotomizamos la respuesta entre ceros y no ceros, y usamos un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) binomial, con logit como función de enlace. Luego, para los no ceros, utilizamos un GLMM log normal, ambos con la misma estructura de efectos fijos y aleatorios que para los VOC totales y el Z3-HAC. Para estos modelos utilizamos las funciones *glmer* y *lme*, en los paquetes *lme4* (Bates et al. 2015) y *nlme* (Pinheiro et al. 2020), respectivamente.

3.3. Resultados

La infección con el endófito *Epichloë occultans* produjo un aumento en la emisión de VOC sólo cuando las plantas estaban inoculadas con HMA (E*M, $P=0,0046$) (Figura 3.2a). El volátil de hoja verde Z3-HAC fue el compuesto más

abundante en las muestras de todos los tratamientos (Cuadro 3.1). La infección con el endófito produjo un incremento en la emisión de Z3-HAC sólo cuando las plantas estaban inoculadas con HMA (E*M, $P=0,0057$) (Figura 3.2b). No encontramos efectos significativos ni de la interacción (E*M: $P=0,5233$), ni de la infección con el endófito (E: $P=0,5424$) o la inoculación con HMA (M: $P=0,7813$) sobre la probabilidad de que las plantas emitan el monoterpeno β -ocimeno. Sin embargo, cuando lo emitían sí hubo un efecto marginal de la interacción entre la infección con el endófito y la inoculación con HMA (E*M: $P=0,0693$). El patrón que observamos es que las plantas E+ emitieron el doble de este compuesto que las E-, pero solamente en las macetas inoculadas con HMA (Figura 3.2c).

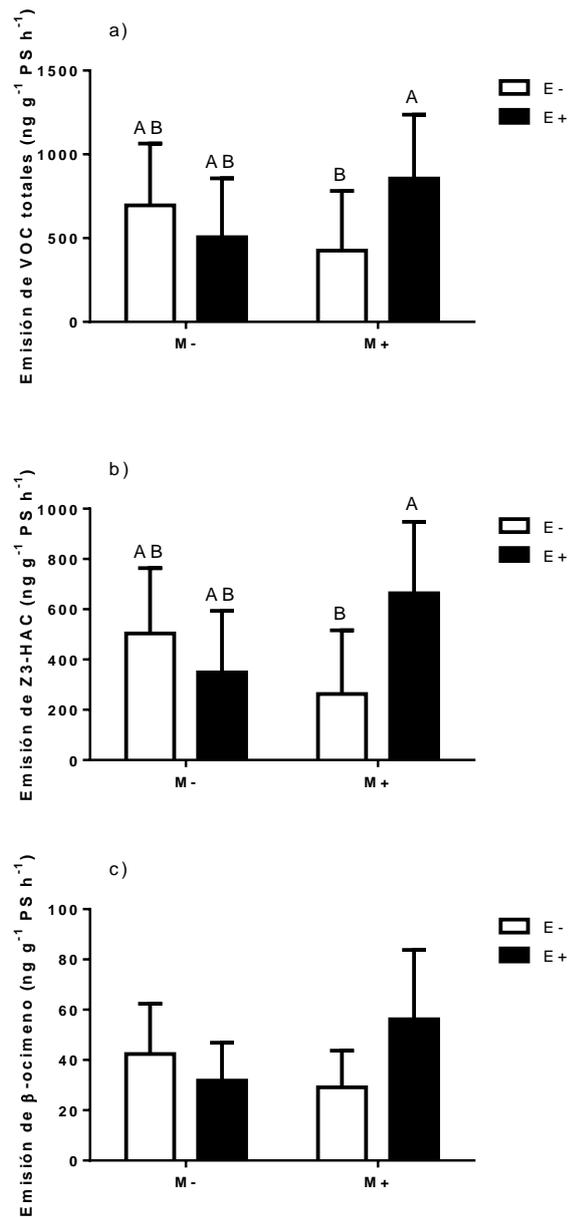


Figura 3.2. Emisión de a) VOC totales, b) el volátil de hoja verde Z3-HAC, c) el monoterpeno β -ocimeno en macetas con plantas de *L. multiflorum* con niveles contrastantes de frecuencia de infección con el endófito *E. occultans* (baja: E- y alta: E+) y con la adición de inóculo de HMA esterilizado y no esterilizado en el suelo (M- y M+, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; Tukey HSD).

Cuadro 3.1. Porcentaje del total de VOC (media±EE) en las muestras obtenidas en las macetas sembradas con semillas con baja (E-) y alta (E+) frecuencia de infección con el endófito y con adición en el suelo de inóculo de HMA esterilizado y no esterilizado (M- y M+, respectivamente) en 2019. De las 6 macetas en cada tratamiento, indicamos entre paréntesis el número en las cuales apareció cada compuesto.

Inóculo de HMA	RT	M-		M+	
		E-	E+	E-	E+
MHN (<50%)	10.1	4,5±0,9 (5)	4,6±0,7 (5)	6,4±1,3 (5)	3,6±1,1 (5)
TMB (54%)	10.2	3,0±0,6 (3)	3,7±1,0 (3)	6,1±1,3 (4)	4,1±0,7 (3)
Z3-HAC (90%)	10.7	73,5±1,8 (6)	69,7±2,6 (6)	53,7±8,8 (6)	70,2±7,0 (6)
β-Ocimeno (95%)	11.9	5,1±2,7 (3)	5,7±1,7 (4)	9,7±1,5 (3)	8,2±2,0 (4)
Nonanal (<50%)	13.6	5,5±1,9 (6)	4,6±0,9 (6)	7,6±2,5 (6)	5,7±1,9 (6)
Decanal (53%)	16.0	5,4±1,5 (6)	5,5±1,6 (6)	7,8±2,1 (6)	5,6±1,5 (6)
DMUE (<50%)	19.7	3,0±0,4 (3)	3,7±1,1 (4)	4,6±1,1 (6)	2,1±0,5 (5)
TMPD (60%)	23.6	7,4±2,0 (5)	9,8±2,2 (5)	12,1±3,5 (6)	7,5±1,5 (5)

Referencias: RT: tiempo de retención; MHN: *6-metil-5-Hepten-2-ona*; TMB: *1,3,5-trimetil-Benceno*; Z3-HAC: *(Z)-3-hexenyl acetato*; DMUE: *(E)-6,10-dimetil-5,9-Undecadien-2-ona*; TMPD: *6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona*. Entre paréntesis, al lado del nombre de cada compuesto, se muestra el porcentaje del mejor match con la biblioteca del GC-MS.

3.4. Discusión

La infección con el endófito *E. occultans* produjo un aumento en la emisión total de VOC sólo cuando las plantas fueron colonizadas por HMA. Este resultado estuvo fuertemente explicado por los cambios en la emisión del volátil de hoja verde Z3-HAC, que fue el compuesto más abundante en el perfil de VOC emitido por las plantas de *L. multiflorum* en condiciones de campo (Ver Capítulo 2, Fiorenza et al., 2021). Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en el que se estudió de qué manera la presencia simultánea de dos simbiosis con microorganismos benéficos afecta la emisión de VOC de la planta hospedante.

Los dos compuestos más relevantes que observamos en el perfil de volátiles de las plantas de *L. multiflorum* fueron el Z3-HAC y el β -ocimeno, compuestos involucrados en la comunicación planta-planta y en las defensas indirectas de las plantas (Yongjun et al., 1998; Engelberth et al., 2004; Zhang et al., 2009; Hu et al., 2019). El primero, como ya describimos en el capítulo anterior, es un volátil de hoja verde que deriva de la vía de la hidropéroxido-liasa de la ruta metabólica de las oxilipinas que es específica de las plantas (Matsui, 2006) y se ha reportado que induce la expresión de genes de defensa contra herbívoros en plantas vecinas, a través de la inducción del ácido jasmónico (Engelberth et al., 2004; Hu et al., 2019). El segundo, aunque mucho menos abundante, es un monoterpeno reportado como un compuesto que participa en las defensas indirectas de las plantas que lo emiten, atrayendo a enemigos naturales de los herbívoros (Yongjun et al., 1998; Zhang et al., 2009).

Se sugirió que existe una competencia entre HMA y endófitos foliares (Liu et al., 2011) y que la presencia de endófitos aéreos puede afectar el nivel de colonización con HMA en la planta hospedante (Vignale et al., 2020; Perez et al., 2021). No obstante, en

nuestro trabajo no encontramos diferencias en los niveles de colonización ni de estructuras como arbusculos o vesículas entre las plantas con alto y bajo nivel de infección con endófitos. Zhou y colaboradores (2016) reportaron que plantas de *Achnatherum sibiricum* infectadas con endófitos del género *Epichloë* produjeron una mayor concentración de compuestos fenólicos sólo cuando estaban asociadas con HMA, algo similar a lo que aquí observamos con los VOC.

Existe un interés creciente en usar microorganismos benéficos como tecnología para el manejo integrado de cultivos (White et al., 2019; Beltran-Garcia y White, 2021), en particular, la inducción de VOC en la planta hospedante por parte de microorganismos (Sharifi et al., 2018) que pueden brindar protección a plantas vecinas no simbióticas (García Parisi et al., 2014). Pero, a la luz de nuestros resultados y en un contexto en el que el uso extendido de agroquímicos como el glifosato reduciría la abundancia de HMA en los suelos (Druille et al., 2016), podríamos perder este potencial beneficio que brindan los endófitos a las plantas vecinas no simbióticas.

En conclusión, este trabajo muestra que la emisión de VOC inducida por un tipo de interacción benéfica de la planta con un microorganismo depende de si se contempla o no la presencia de otras simbiosis. Si bien se conoce que la presencia de microorganismos simbióticos —desde HMA hasta endófitos foliares— modifica la emisión de VOC en sus plantas hospedantes (Sharifi et al., 2018); según el par microorganismo-planta que observemos podemos encontrar casos en los que el microorganismo induce la emisión de VOC (Yue et al., 2001; Schausberger et al., 2012; Ballhorn et al., 2013; Li et al., 2014; Fiorenza et al., 2021) como así también otros en los que la disminuye (Babikova et al., 2014; Rostás et al., 2015). A la luz de nuestros resultados, podemos decir que parte de esta variabilidad podría explicarse porque en esos estudios no se contempló la presencia simultánea de otras simbiosis benéficas.

Capítulo 4

La colisión de dos simbiosis fúngicas: la que establecen las plantas y la que establecen las hormigas cortadoras

4.1. Introducción

Las hormigas cortadoras de hoja pertenecen a la tribu Attini y, en particular, a los géneros *Atta* y *Acromyrmex* (Hölldobler y Wilson, 1990). Son herbívoros polívoros que presentan preferencia en los materiales vegetales que seleccionan para alimentar al hongo que cultivan en sus jardines subterráneos (*Leucoagaricus gonglyophorus*) (Saverschek et al., 2010). La asociación simbiótica entre las hormigas y este hongo consiste en que éstas cortan material vegetal fresco que brindan como sustrato para alimentar al hongo (Cherrett et al. 1989), mientras que éste produce unas estructuras llamadas goniglidias (Martin y Martin, 1970), de las que se alimentan la reina y las larvas (Hölldobler y Wilson, 1990). Se comprobó que estas hormigas rechazan plantas —previamente aceptadas— si son dañinas para el hongo. Este fenómeno se conoce como “rechazo demorado” e involucra un aprendizaje por parte de los insectos (Herz et al., 2008, Saverschek y Roces, 2011).

Ninguna simbiosis persiste aislada de otras simbiosis, pero cómo el encuentro de dos simbiosis afecta a su persistencia todavía es tema de estudio (Kiers et al., 2010). Los pocos trabajos con dos simbiosis fúngicas contemplan los efectos entre distintos tipos de simbiosis de plantas que pueden estar en el mismo hospedante (ver Capítulo 3) o en plantas vecinas (García Parisi et al., 2014). Se sabe que existen ciertas interacciones entre las hormigas cortadoras, el hongo que cultivan en sus jardines subterráneos y los cambios en su preferencia mediados por la presencia de hongos endófitos en las plantas (Van Bael et al., 2009, 2012; Estrada et al., 2013). Sin embargo, se sabe poco sobre la relación particular de estas hormigas con los hongos endófitos de pastos (Tibbets y Faeth, 1999; Omacini et al., 2009), menos “promiscuos” que los presentes en las dicotiledóneas. Numerosas especies de *Epichloë* no presentan transmisión horizontal, por lo cual su éxito ecológico está más ligado a su capacidad de

transmitirse a las semillas y al éxito de su hospedante (Gundel et al., 2008). Está claro que varias especies de hormigas cortadoras forrajean pastos, y que incluso algunas son preferentemente cortadoras de pastos (Farji Brener y Ruggiero, 1994). Tibbets y Faeth (1999) estudiaron la relación entre dos especies de *Festuca*, con sus respectivos hongos endófitos, y una especie de hormigas cortadoras (*Acromyrmex versicolor*), y encontraron que, si bien no hubo una preferencia de las hormigas entre las plantas con y sin endófito para ambas especies, hubo un claro efecto negativo de la presencia del endófito en una de las especies sobre las colonias de hormigas. Sin embargo, en estos experimentos no se tuvo en cuenta el posible aprendizaje de estos insectos en el mediano-largo plazo (“rechazo demorado”).

Las hormigas responden a las características químicas de las plantas; entre ellas se encuentran los VOC (Nelson et al., 2019). Perri y colaboradores (2017) demostraron que las hormigas cortadoras de hojas pueden rechazar el olor del sesquiterpeno farnesol, y se hallaron respuestas de estos insectos a los VOC inducidos por herbivoría en plantas de *Vitis vinifera* spp. *vinifera* y de *Phaseolus lunatus*; esto sugiere que podrían estar vinculados con el aprendizaje antes mencionado (Kost et al., 2011; Thiele et al., 2014). Además, recientemente, Arenas y Roces (2018) hallaron evidencia de que las hormigas cortadoras de hojas usan claves volátiles en los jardines subterráneos y en los basureros para tomar decisiones sobre su actividad de forrajeo, lo que sugiere que los VOC podrían estar involucrados en la comunicación entre el hongo y las hormigas.

En este capítulo trabajamos con la hipótesis que sostiene que las hormigas cortadoras aprenden a rechazar a las plantas con endófito, dado que el hongo que cultivan es sensible a la presencia del endófito en el material que ellas le ofrecen. Por lo tanto, esperábamos, por un lado, que la preferencia de forrajeo de las hormigas cortadoras por plantas con endófitos se redujera en el tiempo. Y, por otro lado, que si el

Z3-HAC producido por la simbiosis entre *L. multiflorum* y *E. occultans* es parte del mecanismo defensivo, afectaría de forma negativa el crecimiento de *Leucoagaricus gongylophorus*.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Material biológico

En los experimentos en laboratorio se utilizaron hormigueros de *Acromyrmex ambiguus*, Formicidae, Attini, colectados en la estación experimental INTA Delta, en la localidad de Campana, provincia de Buenos Aires. Las colonias se mantuvieron en la cátedra de Biomoléculas (FAUBA) en una cámara con temperatura y humedad controladas, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, y se alimentaron con hojas verdes de *Fraxinus* sp. o de *Jasminum mezyi* (Oleaceae), manzana, avena, maíz y arroz (Perri et al., 2017).

Leucoagaricus gongylophorus, el hongo simbiótico que cultivan las colonias de hormigas cortadoras de hoja con las que trabajamos en el laboratorio, fue cultivado *in vitro*. Para ello se tomaron muestras del hongo de las colonias y se las sembró en placas de Petri con medio de cultivo agar extracto de malta. Las placas permanecieron en oscuridad a 24 ± 2 °C durante por lo menos 3 semanas antes utilizarlas en los ensayos (Lugo et al., 2013; Bich et al., 2017).

4.2.2. Diseños experimentales

4.2.2.1. Experimento 1

Consistió en un ensayo de preferencia realizado en laboratorio, en el que le ofrecimos a 5 colonias de hormigas *Acromyrmex ambiguus*, a lo largo de 5 días y durante 9 horas por día, dos macetas sembradas con 16 semillas de *L. multiflorum*

provenientes de la misma población con niveles contrastantes de infección con el endófito *Epichloë occultans* (E+: 93%, E-: 5%) (Figura 4.1). Al final de cada día contamos la cantidad de macollos dañados en cada maceta. Cada día agregamos nuevas macetas.

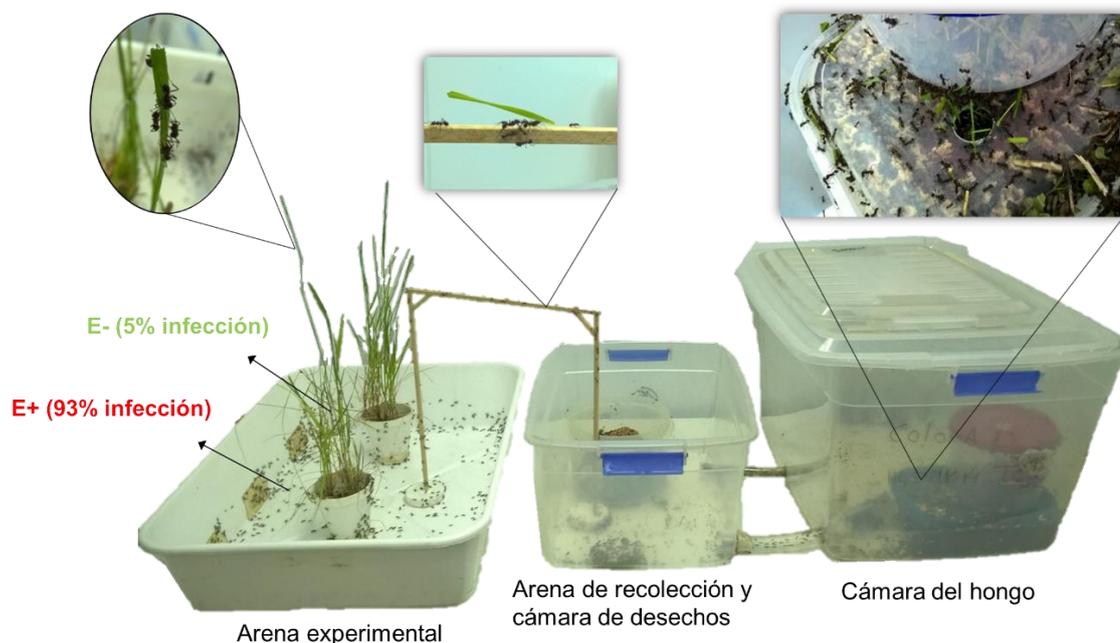


Figura 4.1. Esquema del diseño del experimento 1 en el que se puede visualizar a una colonia de hormigas cortadoras *Acromyrmex ambiguus* en uno de los cinco días del experimento en los que se les ofrecieron macetas con plantas de *Lolium multiflorum* con frecuencias de infección contrastantes con el endófito *Epichloë occultans*. En las ampliaciones superiores se ve a las hormigas cortando el pasto, transportándolo por el puente a su arena de recolección e incorporándolo en un recipiente con su hongo *L. gongylophorus*.

4.2.2.2. Experimento 2

Consistió en exponer al hongo *L. gongylophorus* al volátil de hoja verde Z3-HAC, principal componente del perfil de VOC que emiten las plantas de *L. multiflorum* infectadas con el endófito *E. occultans* (Fiorenza et al., 2021) (ver capítulos 2 y 3). En cada placa de Petri colocamos un taco de $\sim 1 \text{ cm}^2$ del hongo *L. gongylophorus* en el centro de la placa y un papel de filtro de celulosa embebido con $2 \mu\text{L}$ de aceite mineral (MO) o $2 \mu\text{L}$ de $1,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Z3-HAC en MO ($n=8$) en un extremo. Además, antes de

poner en su lugar el papel de filtro, colocamos entre éste y la superficie del agar un papel de aluminio para evitar que el MO y el MO con Z3-HAC entraran en contacto directo con el agar. Una vez por semana durante seis semanas consecutivas evaluamos el crecimiento del hongo midiendo la superficie del halo tanto en el área total como en las áreas de las mitades proximal y distal respecto del punto en el que colocamos el papel embebido (Figura 4.2). Para medir el área utilizamos el programa de procesamiento de imágenes digitales ImageJ.

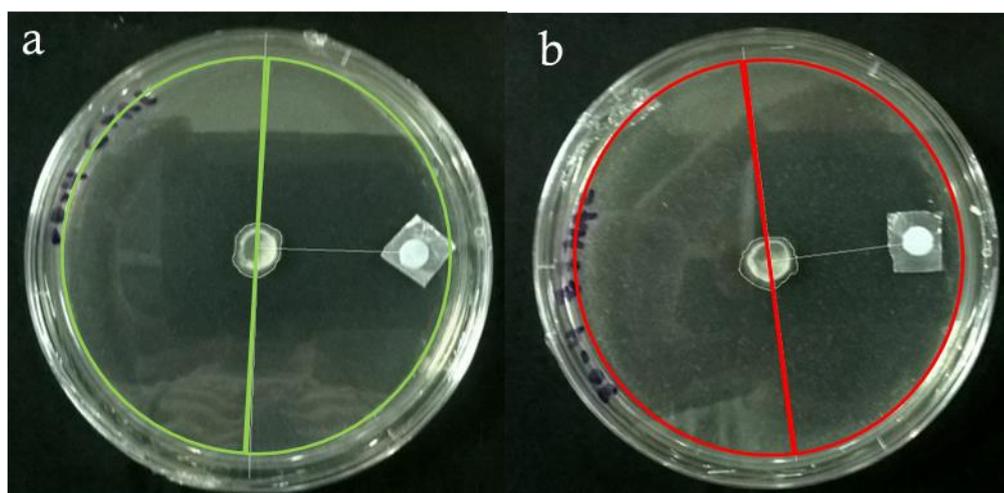


Figura 4.2. Fotografías de dos placas de Petri del experimento 2 con el cultivo de *L. gongylophorus* en agar extracto de malta después de 1 semana de sembradas: a) control con MO (verde) y b) tratamiento de Z3-HAC diluido en MO (rojo). Se resaltan las áreas distal y proximal al punto en el que se colocó el papel de filtro embebido.

4.2.3. Análisis estadístico

Para el Experimento 1 pusimos a prueba las diferencias en la proporción de macollos dañados a lo largo del tiempo y en cada tratamiento utilizando un GLMM con distribución binomial y “logit” como función de enlace en el *software* estadístico R (versión 3.4.1). Colocamos el nivel de infección con endófito (E), el tiempo (T) y su interacción (E*T) como efectos fijos, y como efecto aleatorio, el correspondiente a la identidad de las colonias de hormigas para reflejar el diseño de medidas repetidas en el tiempo. Evaluamos los efectos de cada factor y sus interacciones sobre la proporción de

macollos dañados utilizando la prueba de Wald con el estadístico chi cuadrado (Zuur et al., 2009). Construimos el modelo utilizando la función `glmer`, en el paquete “`lme4`” (Bates et al., 2015). Chequeamos los residuales y el cumplimiento de los supuestos del análisis con la función `simulateResiduals` de la biblioteca “`DHARMA`” (Hartig, 2021).

Para el Experimento 2 pusimos a prueba las diferencias en el área del halo del hongo *L. gonylophorus* a lo largo del tiempo y en cada tratamiento utilizando un LMM en el *software* estadístico R (versión 3.4.1). En este caso, realizamos dos modelos; en uno colocamos el tratamiento (adición o no del volátil Z3-HAC en el MO con el que embebimos el papel de filtro colocado en la placa de Petri) (T), la semana de medición (S) y su interacción (T*S) como efectos fijos, y como efecto aleatorio, el correspondiente a la identidad de cada placa para reflejar el diseño de medidas repetidas en el tiempo. Además, el segundo modelo incluyó como efecto fijo la ubicación relativa al punto de emisión del volátil (U) (ubicaciones distal y proximal) y sus interacciones con el resto de los términos del modelo (i.e., se agregaron al modelo anterior, además del término de efecto simple U, las interacciones U*T, U*S y U*T*S). Dado que el crecimiento del hongo mostraba una respuesta ligeramente exponencial, más que lineal, se adicionó a ambos modelos un término cuadrático para la semana, pero no sus interacciones con el resto de los términos del modelo. Por lo tanto, este término estimado es el mismo para todas las combinaciones de los tratamientos. Evaluamos los efectos de cada factor y sus interacciones sobre el área del halo del hongo *L. gonylophorus* a lo largo de las semanas utilizando pruebas de cocientes de verosimilitud con el estadístico *Chi* cuadrado (Zuur et al., 2009). Construimos los modelos utilizando la función `lme`, en el paquete “`nlme`” (Pinheiro et al., 2019). Dado que no se cumplía el supuesto de homogeneidad de varianzas, ésta se modeló, en ambos modelos, utilizando el argumento `weights = varExp()` en la función `lme` antes

mencionada. Con esto se comprobó que se cumplieran todos los supuestos en los modelos finales.

4.3. Resultados

4.3.1. Experimento 1

Encontramos un efecto significativo de la interacción entre la infección y el tiempo (I*T: $P < 0,001$; los valores de P para los efectos simples fueron: I: 0,196 y T: $P = 0,617$). En los primeros días, la cantidad de macollos dañados fue igual para las plantas E- y E+. Sin embargo, para las E- se mantuvo la proporción de macollos dañados a lo largo de los 5 días. Mientras tanto, para las E+, el daño fue decreciendo a una tasa de 0,124 en la proporción de macollos dañados por día (Figura 4.3).

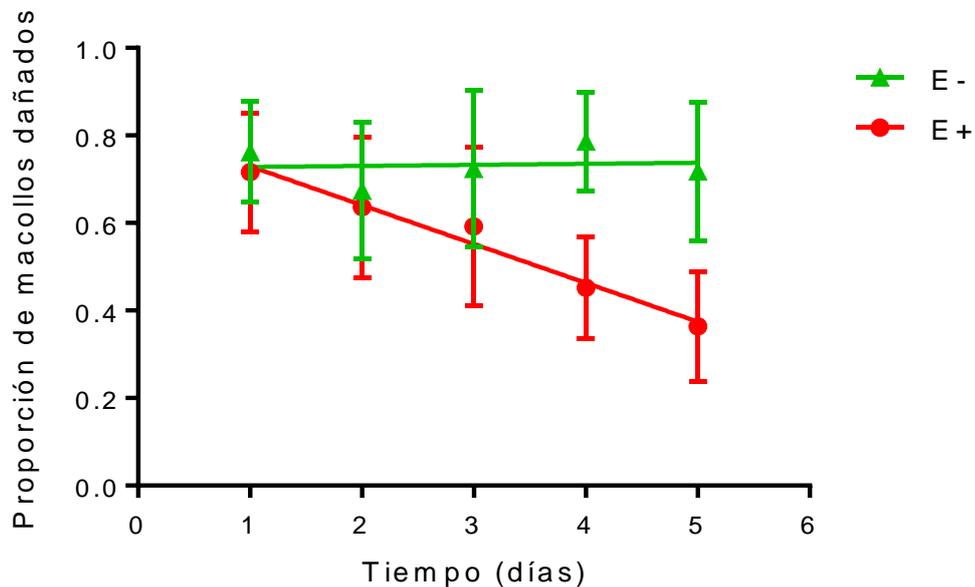


Figura 4.3. Proporción de macollos dañados a lo largo del tiempo, en días, en macetas con plantas de *Lolium multiflorum* con alta y baja frecuencia de infección con el endófito *E. occultans*.

4.3.2. Experimento 2

El crecimiento del área total del hongo no difirió significativamente entre los tratamientos a lo largo del tiempo (T*S: $P=0,1122$). Tampoco hubo un efecto simple del tratamiento (T: $P=0,4113$), aunque sí hubo, como era de esperar, un efecto simple del tiempo en semanas (S: $P<0,0001$) (Figura 4.4).

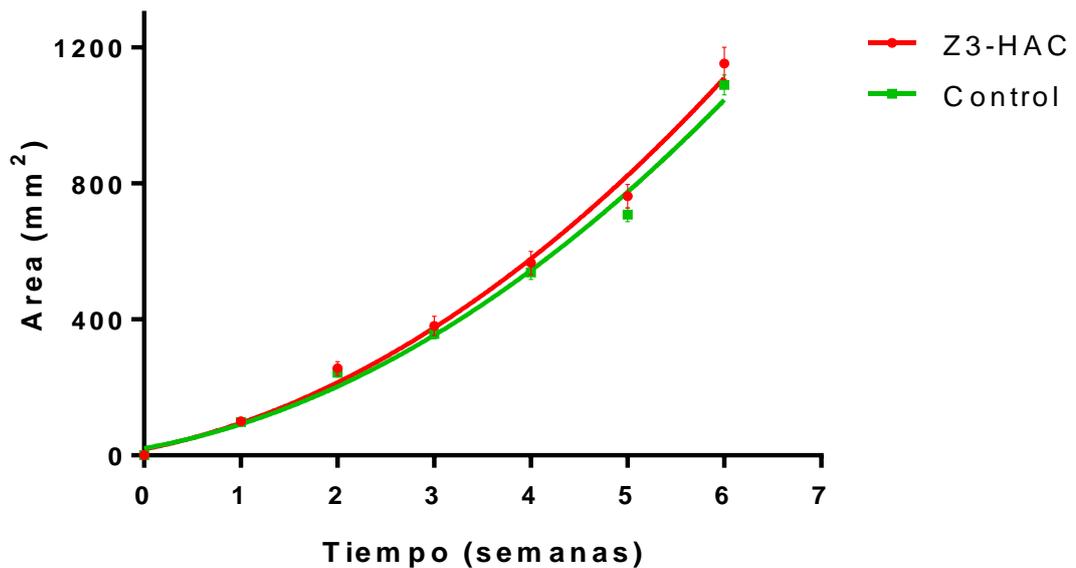


Figura 4.4. Área total del halo de crecimiento del hongo *L. gongylophorus* a lo largo de las seis semanas en las que se midió en placas de Petri en las que se había colocado un papel de filtro de celulosa embebido con 2 μL de aceite mineral (MO) o 2 μL de 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Z3-HAC en MO (N=8) en un extremo.

Cuando observamos lo que pasaba con las mitades proximal y distal a la fuente de emisión del volátil en la placa de Petri, encontramos un efecto de la interacción triple entre el tratamiento, el tiempo en semanas y la ubicación (T*S*U: $P=0,0170$); esto implica que ocurrió un crecimiento asimétrico sólo cuando aplicamos el Z3-HAC (Figura 4.5). Si comparamos la ubicación proximal a la fuente de emisión en las placas con Z3-HAC vs. control con MO, no se detectan diferencias en el crecimiento del hongo a lo largo del tiempo (Figura 4.6a). Mientras tanto, cuando realizamos esta misma comparación en la mitad distal a la fuente de emisión, se ve que el área del halo del

hongo aumenta más a lo largo del tiempo en aquellas placas en las que se colocó el Z3-HAC (Figura 4.6b).

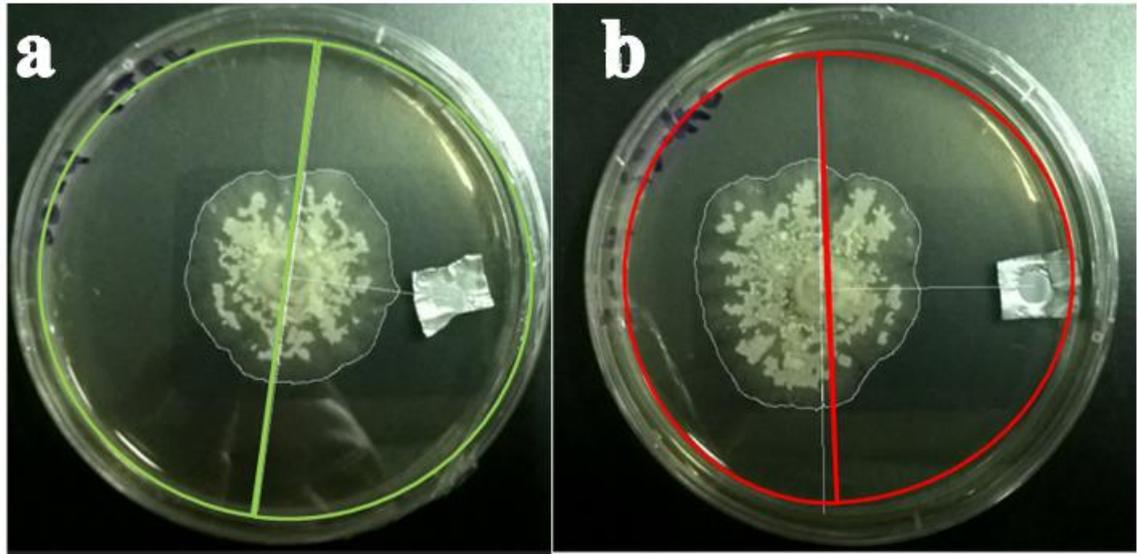
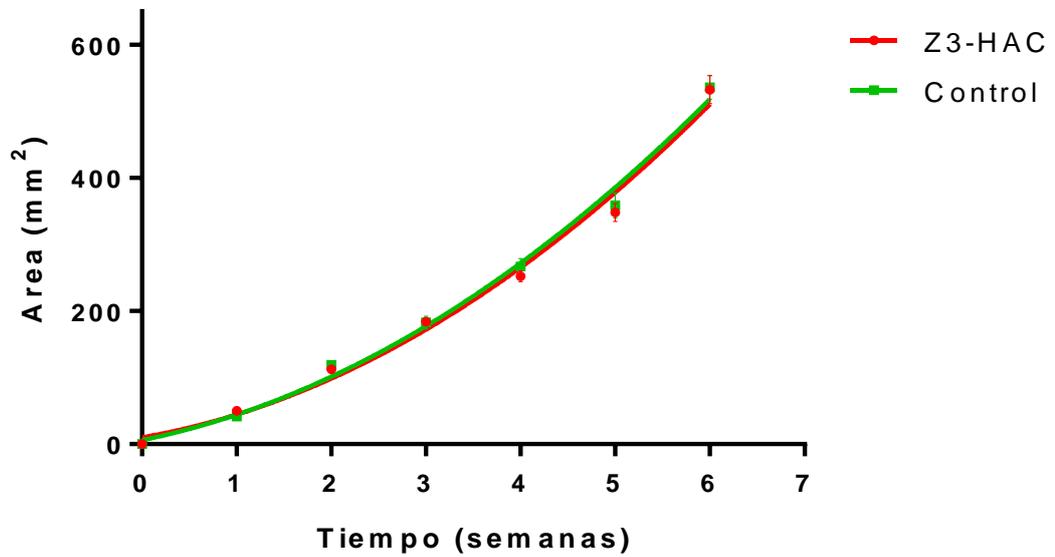


Figura 4.5. Fotografías de dos placas de Petri del experimento 2 con el cultivo de *L. gongylophorus* en agar extracto de malta después de 6 semanas desde que se sembraron: a) control con MO (verde) y b) tratamiento de Z3-HAC diluido en MO (rojo). Se resaltan las áreas distal y proximal al punto en el que se colocó el papel de filtro embebido.

4.4. Discusión

Nuestros resultados arrojan nueva luz sobre las consecuencias de la colisión entre diferentes simbiosis fúngicas. La respuesta de las hormigas a los efectos antiherbívoro del hongo endófito es demorada en el tiempo al estar mediada por una respuesta negativa de su propio hongo simbionte. Por otra parte, encontramos que el hongo *L. gongylophorus* responde al Z3-HAC, un volátil de hoja verde que es el principal componente del perfil de volátiles que emiten las plantas de *L. multiflorum* cuando están infectadas con el endófito *E. occultans* y HMA (Fiorenza et al., 2021) (ver capítulos 2 y 3).

a)



b)

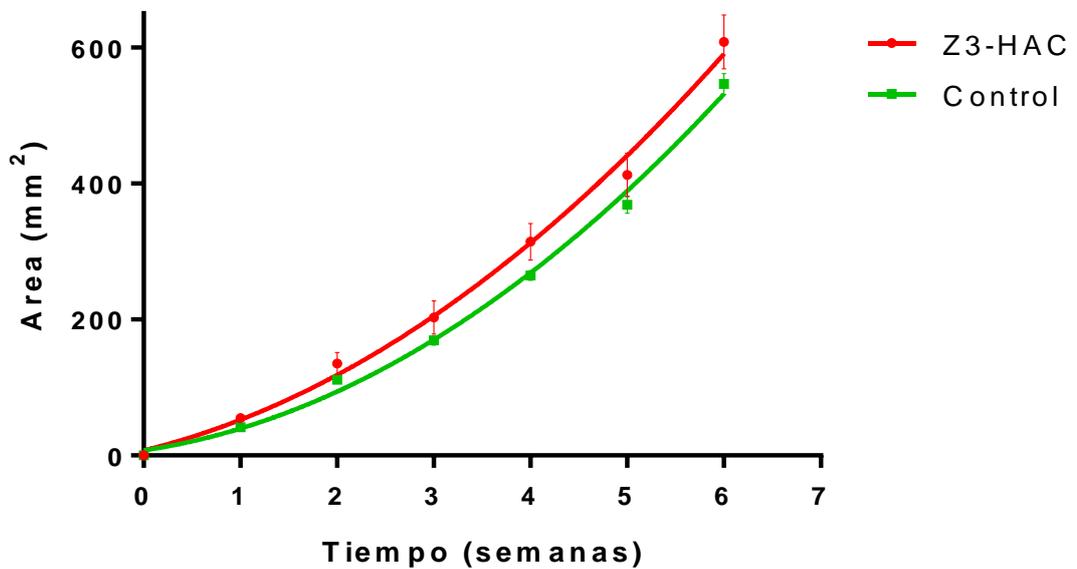


Figura 4.6. Área del halo de crecimiento del hongo *L. gongylophorus* a lo largo de las seis semanas en las que se midió en placas de Petri en las que se había colocado un papel de filtro de celulosa embebido con 2 μL de aceite mineral (MO) o 2 μL de 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Z3-HAC en MO (N=8) en un extremo, del lado a) **proximal** y b) **distal** a la fuente de emisión

Hay antecedentes de distintos VOC que afectan negativamente el crecimiento de distintas especies de hongos en general (Quintana-Rodriguez et al., 2018) y del hongo *L. gongylophorus* en particular (Francoeur et al., 2019). Estas respuestas van desde la inhibición completa a la no inhibición, incluyendo efectos negativos en el crecimiento del lado proximal a la fuente de emisión (ver Francoeur et al., 2019). No encontramos en la bibliografía una respuesta como la que observamos nosotros (un crecimiento del hongo en el lado distal sin cambios en el área proximal). Consideramos que nuestros resultados sugieren cierta sensibilidad a la presencia del Z3-HAC y una suerte de escape del foco de emisión. Pensamos que una limitación de nuestro trabajo es que sólo medimos el crecimiento del hongo por medio del área y desconocemos si la biomasa total del hongo es la misma y si ésta implica un crecimiento neto del hongo. Para poder responder si efectivamente estamos observando un beneficio de agregar Z3-HAC al hongo deberíamos tener otro tipo de medida de desempeño del hongo, como, por ejemplo, la biomasa fúngica o alguna medida del metabolismo, como la respiración.

En cuanto a la respuesta de las hormigas a los VOC, trabajos como los de Kost y colaboradores (2011) y Thiele y colaboradores (2014) muestran que las hormigas pueden utilizarlos como una señal y modificar su actividad de forrajeo. En nuestro trabajo encontramos que las hormigas aprenden a rechazar a las plantas de *L. multiflorum* que están infectadas con el endófito. Sin embargo, nuestro diseño no nos permite descartar si este aprendizaje se debe específicamente a los cambios en los volátiles inducidos por el endófito (Fiorenza et al., 2021, ver Capítulos 2 y 3). Por ejemplo, en plantas de pepino con alta y baja infección con el endófito *Colletotrichum tropicale* no se encontraron cambios en los perfiles de volátiles, pero sí otros cambios químicos en las hojas que hacían que las hormigas cortadoras prefirieran más a las plantas sin endófito (Estrada et al., 2013). Además, la presencia del endófito produce

múltiples cambios en la expresión de genes de las plantas hospedantes (Dupont et al., 2015). Para poder asegurarnos de que son en particular los cambios inducidos en los VOC por el endófito deberíamos realizar un ensayo de no-elección en el que le ofrezcamos a las hormigas discos de papel de filtro embebidos con Z3-HAC y discos con un control, antes y después de alimentarlas durante una semana con plantas con alta y baja frecuencia de infección con el endófito. De esta forma conoceríamos si las hormigas asocian a este VOC con las plantas con endófito. Hasta el momento no hemos podido realizar ese estudio.

Conocemos muy pocos trabajos sobre cómo la presencia de endófitos foliares del género *Epichloë* en pastos afecta la preferencia de forrajeo de las hormigas cortadoras de hojas. Hasta donde sabemos, los únicos dos trabajos que evaluaron esta interacción, además del nuestro, son el Tibbets y Faeth (1999) y el de Omacini y colaboradores (2009). En el primero, si bien observaron que la presencia del hongo endófito perjudicaba fuertemente a la colonia de hormigas, cuando hicieron los ensayos de preferencia no encontraron que las hormigas prefiriesen a las plantas sin endófito (Tibbets y Faeth, 1999). En el segundo tampoco se hallaron diferencias significativas en la preferencia entre plantas con y sin endófito, aunque sí se descubrió un efecto protector de la broza de plantas simbióticas (Omacini et al., 2009); este efecto podría estar mediado por otro tipo de compuestos de defensas que estén presentes en la broza y que no sean ni alcaloides ni VOC (Minás et al., 2021). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se tuvo en cuenta la ventana temporal como para darle tiempo a las hormigas a cambiar su preferencia por la interacción de este material con el hongo *L. gongylophorus*.

En conclusión, consideramos que nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de expandir la escala temporal de los experimentos a fin de comprender la

complejidad de este tipo de interacciones multitróficas y multisimbióticas. Creemos que se necesitan más estudios para esclarecer el rol que cumplen los volátiles inducidos por la simbiosis de los pastos con endófitos foliares del género *Epichloë* en la detección de estos hongos, dentro de las plantas, por parte de las hormigas.

Capítulo 5

Discusión general

5.1. Contribuciones al estado del conocimiento

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar el impacto de la presencia de endófitos asexuales sobre la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC) de una gramínea hospedante a lo largo de su ciclo de vida en presencia de otras interacciones bióticas y dilucidar cuál es el papel que tienen estos cambios químicos, en la respuesta de los herbívoros. En los párrafos siguientes hago una breve reseña de los aportes al estado del conocimiento en el tema que se generaron a lo largo de la tesis.

Hasta donde sabemos, este trabajo muestra por primera vez en condiciones de campo cómo es el impacto de la infección con endófitos del género *Epichloë* en la producción de VOC durante el ciclo de vida completo de la planta hospedante y el simbionte asexual. Además, es la primera descripción de los VOC emitidos por la simbiosis entre *Epichloë occultans* y *Lolium multiflorum*. En el **Capítulo 2** encontramos que la simbiosis con el endófito y el daño mecánico aumentaron las emisiones totales de VOC de estas plantas (Figura 2.2) (Fiorenza et al., 2021). El principal componente de este perfil de VOC fue el volátil de hoja verde Z3-HAC. Esto coincide con los resultados reportados por Yue et al. (2001), quienes encontraron que este compuesto era el más abundante en plantas no dañadas de festuca alta (*Schedonorus arundinaceus*), significando el 77% y 89% del total de las emisiones de volátiles de las plantas E- y E+, respectivamente. En particular, no encontramos para este compuesto un efecto del daño mecánico, aunque la infección con el endófito indujo un aumento en su emisión en fases fenológicas tempranas del ciclo de vida de las plantas (Figura 2.3).

Por otra parte, este trabajo es el primero en el que se evalúa cuál es el efecto de la presencia conjunta de dos simbiosis fúngicas benéficas sobre la producción de VOC en la planta hospedante. En el **Capítulo 3** hallamos que la infección con el endófito *E. occultans* produjo un aumento en la emisión total de VOC solamente cuando las plantas

estaban colonizadas por HMA (Figura 3.2a). Este resultado estuvo fuertemente explicado por los cambios en la emisión de Z3-HAC (Figura 3.2b). Los dos compuestos más relevantes que observamos en el perfil de volátiles de las plantas de *L. multiflorum* fueron el Z3-HAC y el β -ocimeno (Tabla 3.1), compuestos involucrados en la comunicación planta-planta y en las defensas indirectas de las plantas (Yongjun et al., 1998; Engelberth et al., 2004; Zhang et al., 2009; Hu et al., 2019). Nos resulta sumamente interesante que estos cambios en el perfil de VOC que encontramos en las plantas a campo (**Capítulo 2**) y en invernáculo (sólo cuando estaban inoculadas con HMA, **Capítulo 3**) podrían explicar algunos patrones que se describieron para la simbiosis entre *Epichloë occultans* y *L. multiflorum* como la protección por asociación a plantas vecinas de *Trifolium repens* (García Parisi et al., 2014) o la disminución en el número de visitas de vectores de patógenos (Pérez et al., 2017).

Los VOC han sido muy estudiados como un mecanismo de defensa de las plantas frente a la herbivoría (Dicke y Baldwin, 2010). De aquí surge el concepto de volátiles inducidos por herbivoría. Más recientemente surgió el concepto de volátiles inducidos por microorganismos, que incluye tanto a los microbios patógenos como a los benéficos (Sharifi et al., 2018). Esto se debe a que cada vez hay más evidencia de la importancia en los cambios de emisión de estos compuestos inducidos por los microorganismos para algunos grupos de VOC (Ameye et al., 2017). Consideramos que, si bien existe un número creciente de estudios que evalúan el impacto de simbiosis benéficas sobre la emisión de VOC de las plantas, el campo de los volátiles inducidos por simbiontes todavía es un terreno que guarda muchas incógnitas y al que le queda mucho camino por recorrer (Figura 5.1).

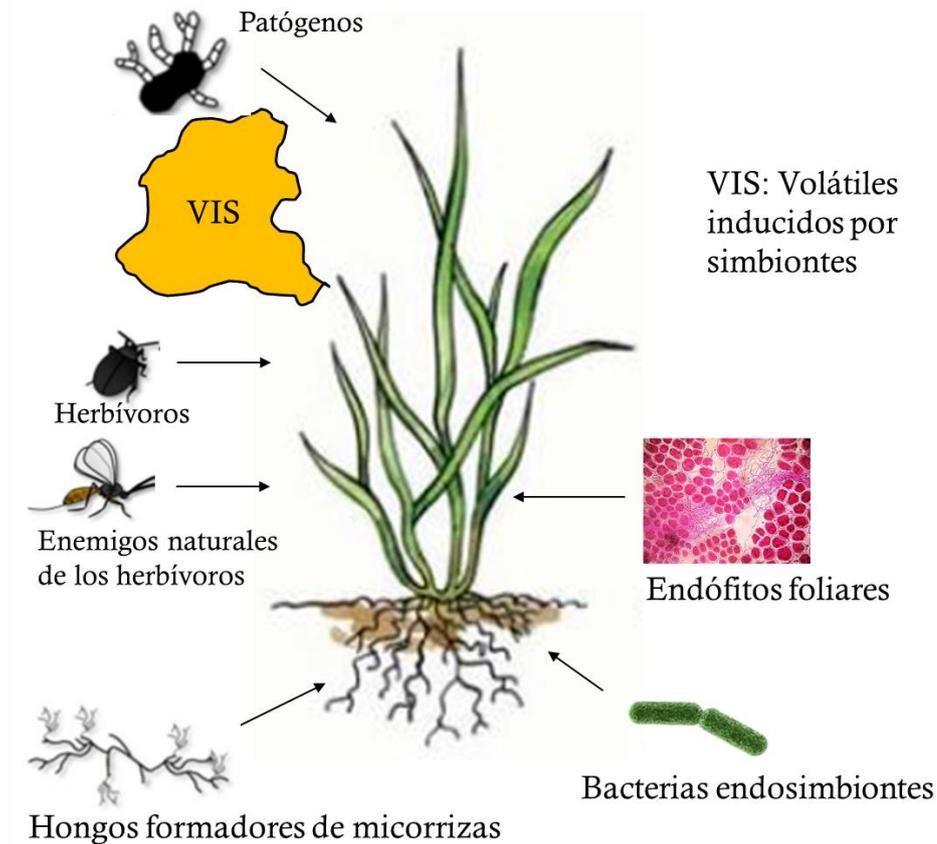


Figura 5.1. Adaptación de la figura de Dicke y Baldwin (2010), en la que se esquematiza a los simbiontes que, entre otros, pueden inducir la producción de VIS en las plantas. Y cómo éstos pueden afectar a diferentes componentes de la comunidad como herbívoros, sus enemigos naturales o patógenos.

En esta tesis también me propuse evaluar el efecto que tuvieron estos cambios en el perfil de VOC inducidos por el endófito sobre un herbívoro generalista como las hormigas cortadoras de hojas y su propio simbionte obligado, el hongo que cultivan en sus jardines subterráneos. En particular, trabajamos con la simbiosis entre *Acromyrmex ambiguus* y *Leucoagaricus gongylophorus*. En el **Capítulo 4** evaluamos si la presencia del endófito afectaba la preferencia de las hormigas por las plantas de *L. multiflorum*. Encontramos que la respuesta de las hormigas a los efectos antiherbívoro del hongo endófito está mediada por una respuesta negativa de su propio hongo simbiótico, evidenciando el comportamiento conocido como rechazo demorado (Figura 4.3) (Herz et al., 2008, Saverschek y Roces, 2011).

Consideramos que los VOC producidos por las plantas podrían estar involucrados en la preferencia de forrajeo de las hormigas, ya que después de pocas horas éstas dejaban de dañar a las plantas con endófitos. Esto nos lleva a pensar que podrían utilizar una clave olfativa para detectar la presencia de hongo endófito en la planta. La utilización de este tipo de señales por estos insectos fue comprobada (Kost et al., 2011; Thiele et al., 2014) e, inclusive, se considera que los VOC emitidos por *Leucoagaricus gongylophorus* y los que predominan en sus basureros son utilizados por las hormigas para guiar su comportamiento de forrajeo (Arenas y Roces, 2018). Además, nos propusimos evaluar si había un efecto directo del Z3HAC sobre el crecimiento de *L. gongylophorus*. En este caso, no encontramos un efecto de inhibición sobre el crecimiento, pero sí vimos una respuesta que podría sugerir una suerte de escape a la fuente de emisión del VOC (Figuras 4.5 y 4.6).

5.2. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis surgen varios interrogantes. Por ejemplo, basándonos en los resultados que hallaron Barton y Koricheva (2010) para plantas herbáceas, en el cual muestran que la importancia relativa de las defensas químicas constitutivas e inducidas cambia lo largo del ciclo de vida de las plantas, podemos construir un modelo análogo en el que los VOC inducidos por los simbiosntes tienen un rol más importante en las etapas tempranas del ciclo de vida. Mientras tanto, a medida que la planta envejece, cobran mayor relevancia los alcaloides fúngicos (Figura 5.2). Hay gran cantidad de evidencia de que la concentración de alcaloides en las plantas infectadas con endófitos aumenta a lo largo del ciclo de vida conjunto de la planta y el hongo, teniendo un máximo en la fase reproductiva (di Menna y Waller, 1986; Tepaske et al., 1993; Spiering et al., 2005; Repussard et al., 2014). En plantas anuales, en esa fase terminaría su ciclo de vida, pero en las perennes, después de ese

máximo, la concentración vuelve a disminuir y a aumentar al año siguiente en la nueva etapa reproductiva (Fuchs et al., 2017). Si el patrón que observamos en el **Capítulo 2**, en el que vemos que la emisión de VOC inducida por el endófito es más importante en las etapas tempranas del ciclo de vida de las plantas se repite para otras simbiosis pasto-endófito, y si estos compuestos funcionan efectivamente como un mecanismo de defensa inducida directa o indirecta (Scala et al., 2013; Fuchs y Krauss, 2018), sería interesante realizar un experimento similar al que realizamos, pero, además, midiendo los alcaloides al mismo tiempo que los VOC a lo largo de todo el ciclo de vida de las plantas para poner a prueba si este modelo funciona de esta manera.

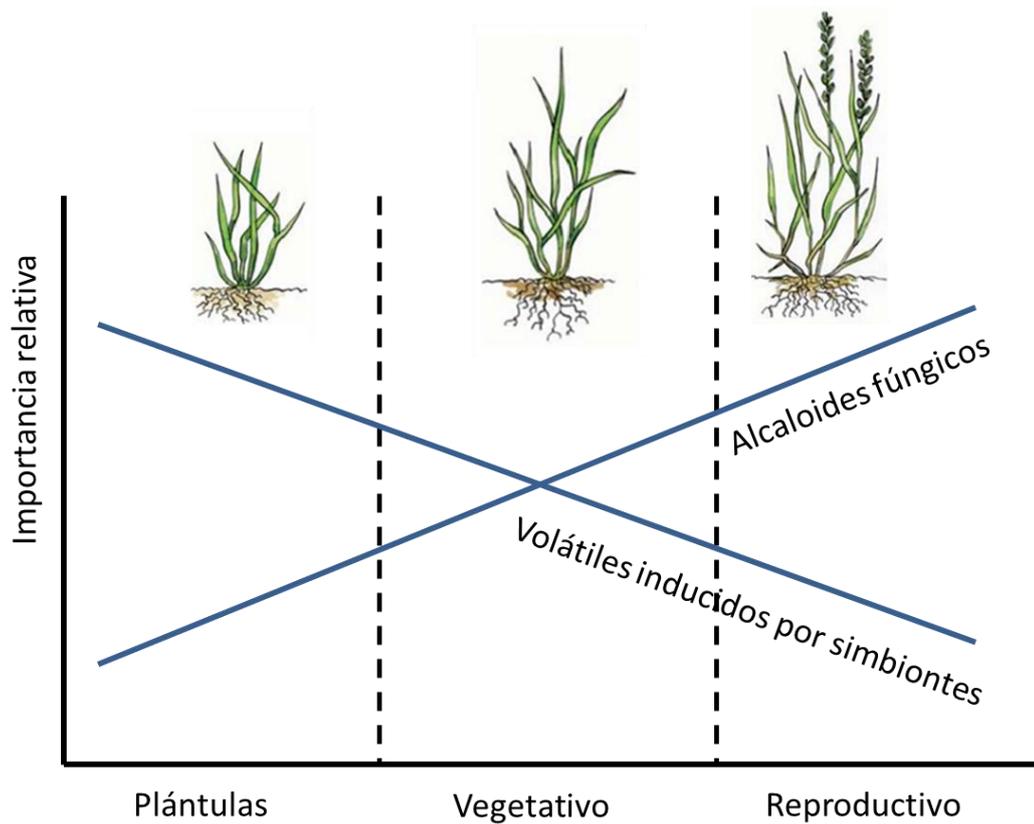


Figura 5.2. Esquema de Barton y Koricheva (2010) modificado en base a los resultados hallados para plantas herbáceas. En el cual se puede observar cómo la importancia relativa de los alcaloides fúngicos y de los volátiles inducidos por el simbionte va cambiando a lo largo del ciclo de vida del holobionte.

Otro interrogante que sería interesante responder a la luz de nuestros resultados es si el Z3-HAC inducido por la presencia del endófito en las plantas es efectivamente un mecanismo por el cual las plantas con endófitos confieren protección por asociación a plantas vecinas no simbióticas (García Parisi et al., 2014). Existen trabajos que demostraron que este volátil de hoja verde induce la expresión de genes de defensa contra herbívoros en plantas vecinas a través de inducir el ácido jasmónico (Engelberth et al., 2004; Hu et al., 2019). Sería interesante generar parches de plantas con alta y baja frecuencia de infección con el endófito y colocar dentro de estos parches plantas de *Trifolium repens* y después de un tiempo medir su concentración de fitohormonas y la expresión de genes de defensa.

Asimismo, consideramos que, como se discutió en el **Capítulo 4**, es necesario realizar experimentos para comprobar si este volátil de hoja verde es una señal que las hormigas cortadoras de hoja pueden utilizar para detectar la presencia del endófito en las plantas. También es necesario llevar a cabo nuevos experimentos evaluando la respuesta del hongo *L. gongylophorus* a la exposición al Z3-HAC teniendo en cuenta otro tipo de mediciones sobre el hongo que no sean solamente el área del halo. Otro experimento que sería interesante realizar es, con otro hongo del género *Epichloë* —pero que sea cultivable— hacer crecer conjuntamente a este hongo y a *L. gongylophorus* y evaluar su respuesta. Esto nos permitiría conocer si el rechazo de las hormigas está dado por una interacción directa entre el hongo endófito y *L. gongylophorus*. O si, lo que perjudica a este último está dado por fitoquímicos que produce la planta en presencia del endófito.

5.3. Conclusión

Los impactos de la presencia de endófitos simbiotes en pastos van más allá de la producción de alcaloides fúngicos. En esta tesis demostré cómo su presencia implica cambios en la producción de VOC a lo largo del ciclo de vida conjunto de la planta y el simbiote (**Capítulo 2**). Por otra parte, probé que hay que tener cautela cuando se reduce el foco y se describen los efectos de una simbiosis sobre un atributo de las plantas, dado que la presencia simultánea de otras simbiosis podría estar modificando o modulando ese mismo atributo (**Capítulo 3**). Nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de expandir la escala temporal de nuestros estudios para lograr comprender la complejidad de este tipo de interacciones multitróficas y multisimbióticas (**Capítulos 2 y 4**). Consideramos que en un contexto en el que las prácticas agropecuarias promueven a algunas simbiosis (e.g., el uso de endófitos no tóxicos para el ganado) y van en detrimento de otras (e.g., la pérdida de especies de HMA en los suelos al aplicar agroquímicos [Druille et al., 2016]), para poder tomar decisiones adecuadas es clave incluir toda esta complejidad en el conocimiento de cómo funcionan las comunidades.

Referencias bibliográficas

- Aartsma, Y., Bianchi, F.J.J.A., van der Werf, W., Poelman, E.H., Dicke, M. 2017. Herbivore-induced plant volatiles and tritrophic interactions across spatial scales. *New Phytologist* 216: 1054-1063.
- Agrawal, A.A. 1999. Induced Responses to Herbivory in Wild Radish: Effects on Several Herbivores and Plant Fitness. *Ecology* 80: 1713-1723.
- Ameye, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smaghe, G., Haesaert, G., Schuurink, R.C., Audenaert, K. 2017. Green leaf volatile production by plants: A meta-analysis. *New Phytologist* 220: 666-683.
- Ameye, M., Audenaert, K., De Zutter, N., Steppe, K., Van Meulebroek, L., Vanhaecke, L., De Vleeschauwer, D. et al. 2015. Priming of Wheat with the Green Leaf Volatile Z-3-Hexenyl Acetate Enhances Defense against *Fusarium graminearum* But Boosts Deoxynivalenol Production. *Plant Physiology* 167: 1671-1684.
- Arenas, A., Roces, F. 2018. Appetitive and aversive learning of plants odors inside different nest compartments by foraging leaf-cutting ants. *Journal of Insect Physiology* 109: 85-92.
- Babikova, Z., Gilbert, L., Bruce, T., Dewhurst, S.Y., Pickett, J.A., Johnson, D. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi and aphids interact by changing host plant quality and volatile emission. *Functional Ecology* 28: 375-385.
- Bacon, C.W., White Jr., J.F. 1994. Stains, media, and procedures for analyzing endophytes. En *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*, First edition, CRC Press. 47-56.
- Ballhorn, D.J., Kautz, S., Schädler, M. 2013. Induced plant defense via volatile production is dependent on rhizobial symbiosis. *Oecologia* 172: 833-846.
- Barton, K.E., Koricheva, J. 2010. The Ontogeny of Plant Defense and Herbivory: Characterizing General Patterns Using Meta-Analysis. *The American Naturalist* 175: 481-493.
- Bastias, D.A., Martínez-Ghersa, M.A., Ballaré, C.L., Gundel, P.E. 2017. *Epichloë* Fungal Endophytes and Plant Defenses: Not Just Alkaloids. *Trends in Plant Science* 22: 939-948.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015). "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4." *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01.
- Beltran-Garcia, M.J., White, J.F. 2021. Introduction to special issue: Plant microbiome augmentation and stimulation—new strategies to grow crops with reduced agrochemicals. *Microorganisms* 9: 10-11.
- Bich, G.A., Castrillo, M.L., Villalba, L.L., Zapata, P.D. 2017. Isolation of the symbiotic fungus of *Acromyrmex pubescens* and phylogeny of *Leucoagaricus gongylophorus* from leaf-cutting ants. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24: 851-856.
- Boege, K., Marquis, R.J. 2005. Facing herbivory as you grow up: The ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 441-448.
- Boland, W., Hopke, J., Donath, J., Nüske, J., Bublitz, F. 1995. Jasmonic Acid and

- Coronatin Induce Odor Production in Plants. *Angewandte Chemie International Edition in English* 34: 1600-1602.
- Brooks, Mollie E., Kristensen, Kasper, van Benthem, Koen J., Magnusson, Arni, Berg, Casper W., Nielsen, Anders, Skaug, Hans J., Maechler, Martin, Benjamin, M., Bolker (2017) glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R Journal* 9 (2), 378-400.
- Bultman, T.L., Bell, G., Martin, W.D. 2004. A fungal endophyte mediates reversal of wound-induced resistance and constrains tolerance in a grass. *Ecology* 85: 679-685.
- Bush, L.P., Wilkinson, H.H., Schardl, C.L. 1997. Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses. *Plant physiology* 114: 1-7.
- Casas, C., Gundel, P.E., Semmartin, M., Schnyder, H., Omacini, M. 2016. The enhancement of invasion ability of an annual grass by its fungal endophyte depends on recipient community structure. *Biological Invasions*. 18: p.1853-1865
- Cherret, J. M., Powell, R.J., Stradling, D.J. 1989. *The Mutualism between Leaf-Cutting Ants and their Fungus*.
- Clay, K. 2014. Defensive symbiosis: A microbial perspective. *Functional Ecology* 28: 293-298.
- Clay, K., Schardl, C.L. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160: S99-S127.
- Compant, S., Saikkonen, K., Mitter, B., Campisano, A., Mercado-Blanco, J. 2016. Editorial special issue: soil, plants and endophytes. *Plant and Soil* 405: 1-11.
- Dicke, M., Baldwin, I.T. 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the «cry for help». *Trends in Plant Science* 15: 167-175.
- Dicke, M., Van Loon, J.J.A., Soler, R. 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chemical Biology* 5: 317-324.
- De Battista, J., 2005. *Neotyphodium* research and application in South America. In: Roberts, C.A., West, C.P., Spiers, D.E. (Eds.), *Neotyphodium* in Cool-Season Grasses, first ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 65e71.
- Druille, M., García-Parisi, P.A., Golluscio, R.A., Cavagnaro, F.P., Omacini, M. 2016. Repeated annual glyphosate applications may impair beneficial soil microorganisms in temperate grassland. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 230: 184-190.
- Dupont, P.Y., Eaton, C.J., Wargent, J.J., Fechtner, S., Solomon, P., Schmid, J., Day, R.C. et al. 2015. Fungal endophyte infection of ryegrass reprograms host metabolism and alters development. *New Phytologist* 208: 1227-1240.
- Engelberth, J., Alborn, H.T., Schmelz, E. a, Tumlinson, J.H. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 1781-1785.
- Estrada, C., Degner, E.C., Rojas, E.I., Wcislo, W.T., Van Bael, S.A. 2015. The role of endophyte diversity in protecting plants from defoliation by leaf-cutting ants. *Current Science* 109: 19-25.

- Estrada, C., Weislo, W.T., Van Bael, S.A. 2013. Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytologist* 198: 241-251.
- Farji Brener, A.G., Ruggiero, A. 1994. Leaf-Cutting Ants (*Atta* and *Acromyrmex*) Inhabiting Argentina: Patterns in Species Richness and Geographical Range Sizes. *Journal of Biogeography* 21: 391-399.
- Fiorenza, J.E., Fernández, P.C., Omacini, M. 2021. Z-3-Hexenylacetate emissions induced by the endophyte *Epichloë occultans* at different levels of defoliation during the host plant's life cycle. *Fungal Ecology* 49: .
- Fontana, A., Reichelt, M., Hempel, S., Gershenzon, J., Unsicker, S.B. 2009. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on direct and indirect defense metabolites of *Plantago lanceolata* L. *Journal of Chemical Ecology* 35: 833-843.
- Francoeur, C.B., Khadempour, L., Moreira-Soto, R.D., Gotting, K., Book, A.J., Pinto-Tomas, A.A., Keefover-Ring, K., Currie, C.R. 2019. Bacteria contribute to plant secondary compound degradation in a generalist herbivore system. *bioRxiv* 11: 1-18.
- Fuchs, B., Krauss, J. 2018. Can *Epichloë* endophytes enhance direct and indirect plant defence? *Fungal Ecology*. 38: 98-103.
- Fuchs, B., Krischke, M., Mueller, M.J., Krauss, J. 2017. Plant age and seasonal timing determine endophyte growth and alkaloid biosynthesis. *Fungal Ecology* 29: 52-58.
- Gallagher, R.T., White, E.P., Mortimer, P.H. 1981. Ryegrass staggers: Isolation of potent neurotoxins lolitrem a and lolitrem b from staggers-producing pastures. *New Zealand Veterinary Journal* 29: 189-190.
- García Parisi, P.A., Grimoldi, A.A., Omacini, M. 2014. Endophytic fungi of grasses protect other plants from aphid herbivory. *Fungal Ecology* 9: 61-64.
- García Parisi, P.A., Omacini, M. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi can shift plant-soil feedback of grass-endophyte symbiosis from negative to positive. *Plant and Soil* 419, 13–23.
- Garcia Parisi P.A., Omacini M. (2019) Interactive effects of co-occurring epichloid endophytes, rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi modulating their benefits to grasses and legumes. In: Endophyte Biotechnology: Potential for Agriculture and Pharmacology. Edited by: Alexander Schouten. CABI.
- Grunseich, J.M., Thompson, M.N., Aguirre, N.M., Helms, A.M. 2020. The Role of Plant-Associated Microbes in Mediating Host-Plant Selection by Insect Herbivores. *Plants* 9: 1-23.
- Gundel, P.E., Batista, W.B., Texeira, M., Alejandra Martínez-Ghersa, M., Omacini, M., Ghersa, C.M. 2008. *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings of the Royal Society B*. Volume 275, Issue 1637, 897-905.
- Hansen A.P. (2017) Legume-*Rhizobium* Symbioses: Significance for Sustainable Plant Production. In: Varma A., Sharma A. (eds) Modern Tools and Techniques to Understand Microbes. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4_11
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano,

- A., Döring, M., Sessitsch, A. 2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79: 293-320.
- Hartig, Florian (2021). DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.4.4. <http://florianhartig.github.io/DHARMA/>
- Heil, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* 178: 41-61.
- Heil, M. 2004. Induction of two different defenses benefits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology* 92: 527-536.
- Herz, H., Hölldobler, B., Roces, F. 2008. Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Behavioral Ecology* 19: 575-582.
- Hölldobler B., Wilson E.O. 1990. The ants, Harvard University Press. 746 páginas
- Holopainen, J.K., Blande, J.D. 2013. Where do herbivore-induced plant volatiles go? *Frontiers in plant science* 4: 185.
- Hopke, J., Donath, J., Blechert, S., Boland, W. 1994. Herbivore-induced volatiles: The emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Letters* 352: 146-150.
- Hu, L., Ye, M., Erb, M. 2019. Integration of two herbivore-induced plant volatiles results in synergistic effects on plant defence and resistance. *Plant Cell and Environment* 42: 959-971.
- Iannone, L.J., Vignale, M. V., Pinget, A.D., Re, A., Mc Cargo, P.D., Novas, M. V. 2017. Seed-transmitted *Epichloë* sp. endophyte alleviates the negative effects of head smut of grasses (*Ustilago bullata*) on *Bromus auleticus*. *Fungal Ecology* 29: 45-51.
- Johnson, N.C., Graham, J.H., Smith, F.A. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135: 575-585.
- Karban, R., Agrawal, A.A., Mangel, M. 1997. The benefits of induced defense against herbivores. *Ecology* 78: 1351-1355.
- Karban, R., Myers, J.J.H. 1989. Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 331-348.
- Kassambara Alboukadel y Mundt Fabian (2020). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
- Kessler, A. 2001. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science* 291: 2141-2144.
- Kessler, A. 2018. Introduction to a special feature issue - New insights into plant volatiles. *New Phytologist* 220: 655-658.
- Kiers, T.E., Palmer, T.M., Ives, A.R., Bruno, J.F., Bronstein, J.L. 2010. Mutualisms in a changing world: An evolutionary perspective. *Ecology Letters* 13: 1459-1474.
- Kost, C., Heil, M. 2006. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in

- neighbouring plants. *Journal of Ecology* 94: 619-628.
- Kost, C., Tremmel, M., Wirth, R. 2011. Do leaf cutting ants cut undetected? testing the effect of Ant-Induced plant defences on foraging decisions in *Atta colombica*. *PLoS ONE* 6: 1-8.
- Kothamasi, D., E. Toby Kiers y M. G. A. van der Heijden. (2009) Mutualisms and community organization. Oxford University Press, Oxford. DOI:10.1093/acprof:oso/9780199228973.003.0014
- Larimer, A.L., Bever, J.D., Clay, K. 2012. Consequences of simultaneous interactions of fungal endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi with a shared host grass. *Oikos* 121: 2090-2096.
- Le Sebastien , Josse Julie, Husson Francois (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18. 10.18637/jss.v025.i01)
- Lenth, Russell V., (2016). Least-squares means: the R package lsmeans. *J. Stat. Software* 69 (1), 1e33. <https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01>>
- Leuchtman, A., Bacon, C.W., Schardl, C.L., White, J.F., Tadych, M. 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia* 106: 202-215.
- Li, T., Blande, J.D., Gundel, P.E., Helander, M., Saikkonen, K. 2014. *Epichloë* endophytes alter inducible indirect defences in host grasses. *PLoS ONE* 9: 1-11.
- Liu, Q., Parsons, A.J., Xue, H., Fraser, K., Ryan, G.D., Newman, J.A., Rasmussen, S. 2011. Competition between foliar *Neotyphodium lolii* endophytes and mycorrhizal *Glomus* spp. fungi in *Lolium perenne* depends on resource supply and host carbohydrate content. *Functional Ecology* 25: 910-920.
- Lugo, M.A., Crespo, E.M., Cafaro, M., Jofré, L. 2013. Hongos asociados con dos poblaciones de *Acromyrmex lobicornis* (formicidae) de san luis, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 48: 5-15.
- Martin, M.M., Martin, J.S. 1970. The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus. *Journal of Insect Physiology* 16: 109-119.
- Matsui, K. 2006. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 274-280.
- Mc Cargo, P.D., Iannone, L.J., Soria, M., Novas, M.V. 2020. Diversity of foliar endophytes in a dioecious wild grass and their interaction with the systemic *Epichloë*. *Fungal Ecology* 47: 100945.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J.A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- di Menna, M.E., Waller, J.E. 1986. Visual assessment of seasonal changes in amount of mycelium of *Acremonium loliae* in leaf sheaths of perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 29: 111-116.
- Minás, A., García-Parisi, P.A., Chludil, H., Omacini, M. 2021. Endophytes shape the legacy left by the above- and below-ground litter of the host affecting the

- establishment of a legume. *Functional Ecology* Volume 35, Issue 12, Pages 2870-2881.
- Moon, C.D., Scott, B., Schardl, C.L., Christensen, M.J. 2000. The evolutionary origins of *Epichloe* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia* 92: 1103-1118.
- De Moraes, C.M., Mescher, M.C., Tumlinson, J.H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* 410: 577-579.
- Nelson, A.S., Carvajal Acosta, N., Mooney, K.A. 2019. Plant chemical mediation of ant behavior. *Current Opinion in Insect Science* 32: 98-103.
- Omacini, M., Chaneton, E.J., Bush, L., Ghersa, C.M. 2009. A fungal endosymbiont affects host plant recruitment through seed- and litter-mediated mechanisms. *Functional Ecology* 23: 1148-1156.
- Omacini, M., Chaneton, E.J., Ghersa, C.M. 2005. A hierarchical framework for understanding the ecosystem consequences of endofhyte-grass symbioses. En Roberts, C., West, C. P., Spiers, D. E. (eds.), *Neotyphodium In Cool-Season Grasses Current Research Applications*, pp. 141-161. Blackwell Publishing.
- Omacini, M., Chaneton, E.J., Ghersa, C.M., Muller, C.B. 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* 409: 78-81.
- Omacini, M., Chaneton, E.J., Ghersa, C.M., Otero, P. 2004. Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos* 104: 581-590.
- Omacini, M., Eggers, T., Bonkowski, M., Gange, A.C., Jones, T.H. 2006. Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology* 20: 226-232.
- Pańka, D., Piesik, D., Jeske, M., Baturó-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.
- Perez, L.I., Gundel, P.E., García Parisi, P.A., Moyano, J., Fiorenza, J.E., Omacini, M., Nuñez, M.A. 2021. Can seed-borne endophytes promote grass invasion by reducing host dependence on mycorrhizas? *Fungal Ecology* 52: 101077.
- Perez, L.I., Gundel, P.E., Marrero, H.J., Arzac, A.G., Omacini, M. 2017. Symbiosis with systemic fungal endophytes promotes host escape from vector-borne disease. *Oecologia* 184: 237-245.
- Pérez, L.I., Gundel, P.E., Omacini, M. 2016. Can the defensive mutualism between grasses and fungal endophytes protect non-symbiotic neighbours from soil pathogens? *Plant and Soil* 405: 289-298.
- Perri, D., Gorosito, N., Fernandez, P., Buteler, M., Buteler, M. 2017. Plant-based compounds with potential as push-pull stimuli to manage behavior of leaf-cutting ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 163: 150-159.
- Perri, D. V., Gorosito, N.B., Schilman, P.E., Casaubón, E.A., Dávila, C., Fernández, P.C. 2021. Push-pull to manage leaf-cutting ants: an effective strategy in forestry plantations. *Pest Management Science* 77: 432-439.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining

- parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society* 55: 158-163.
- Piesik, D., Łyszczarz, A., Tabaka, P., Lamparski, R., Bocianowski, J., Delaney, K.J. 2010. Volatile induction of three cereals: Influence of mechanical injury and insect herbivory on injured plants and neighbouring uninjured plants. *Annals of Applied Biology* 157: 425-434.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., Van Wees, S.C.M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team, (2019). Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.1, p. 143. <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Porter, J.K., Bacon, C.W., Robbins, J.D., Betowski, D. 1981. Ergot Alkaloid Identification in Clavicipitaceae Systemic Fungi of Pasture Grasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29: 653-657.
- Pulido, H., Mauck, K.E., De Moraes, C.M., Mescher, M.C. 2019. Combined effects of mutualistic rhizobacteria counteract virus-induced suppression of indirect plant defences in soya bean. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286: 1903. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0211>
- Qawasmeh, A., Raman, A., Wheatley, W. 2015. Volatiles in perennial ryegrass infected with strains of endophytic fungus: Impact on African black beetle host selection. *Journal of Applied Entomology* 139: 94-104.
- Quintana-Rodriguez, E., Rivera-Macias, L.E., Adame-Alvarez, R.M., Torres, J.M., Heil, M., Enrique, L., Macías, R. et al. 2018. Shared weapons in fungus-fungus and fungus-plant interactions? Volatile organic compounds of plant or fungal origin exert direct antifungal activity in vitro. *Fungal Ecology* 33: 115-121.
- Rasmann, S., Agrawal, A.A. 2009. Plant defense against herbivory: progress in identifying synergism, redundancy, and antagonism between resistance traits. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 473-478.
- Rasmussen, S., Liu, Q., Parsons, A.J., Xue, H., Sinclair, B., Newman, J.A. 2012. Grass-endophyte interactions: A note on the role of monosaccharide transport in the *Neotyphodium lolii-Lolium perenne* symbiosis. *New Phytologist* 196: 7-12.
- Rasmussen, S., Parsons, A.J., Bassett, S., Christensen, M.J., Hume, D.E., Johnson, L.J., Johnson, R.D. 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, A.J., Newman, J.A. 2009. Metabolomics analysis of the *Lolium perenne-Neotyphodium lolii* symbiosis: More than just alkaloids? *Phytochemistry Reviews* 8: 535-550.
- Repussard, C., Zbib, N., Tardieu, D., Guerre, P. 2014. Endophyte infection of tall fescue and the impact of climatic factors on ergovaline concentrations in field crops cultivated in southern France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 9609-9614.
- Rivero, J., Gamir, J., Aroca, R., Pozo, M.J., Flors, V. 2015. Metabolic transition in

- mycorrhizal tomato roots. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-13.
- Rodriguez, R.J., White, J.F., Arnold, A.E., Redman, R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314-330.
- Rostás, M., Cripps, M.G., Silcock, P. 2015. Aboveground endophyte affects root volatile emission and host plant selection of a belowground insect. *Oecologia* 177: 487-497.
- Rowan, D.D., Gaynor, D.L. 1986. Isolation of feeding deterrents against Argentine Stem Weevil from Ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae*. *Journal of Chemical Ecology* 12: 647-658.
- Saverschek, N., Herz, H., Wagner, M., Roces, F. 2010. Avoiding plants unsuitable for the symbiotic fungus: learning and long-term memory in leaf-cutting ants. *Animal Behaviour* 79: 689-698.
- Saverschek, N., Roces, F. 2011. Foraging leafcutter ants: Olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Animal Behaviour* 82: 453-458.
- Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M.A., Schuurink, R.C. 2013. Green leaf volatiles: A plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 17781-17811.
- Schardl, C.L., Grossman, R.B., Nagabhyru, P., Faulkner, J.R., Mallik, U.P. 2007. Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry* 68: 980-996.
- Schausberger, P., Peneder, S., Jürschik, S., Hoffmann, D. 2012. Mycorrhiza changes plant volatiles to attract spider mite enemies. *Functional Ecology* 26: 441-449.
- Schliemann, W., Ammer, C., Strack, D. 2008. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69: 112-146.
- Sharifi, R., Lee, S.M., Ryu, C.M. 2018. Microbe-induced plant volatiles. *New Phytologist* 220: 684-691.
- Sharifi, R., Ryu, C.M. 2021. Social networking in crop plants: Wired and wireless cross-plant communications. *Plant Cell and Environment* 44: 1095-1110.
- Shtark, O., Puzanskiy, R., Avdeeva, G., Yemelyanov, V., Shavarda, A., Romanyuk, D., Kliukova, M. et al. 2021. Metabolic alterations in *Pisum sativum* roots during plant growth and arbuscular mycorrhiza development. *Plants* 10: .
- Siegel, M.R.R., Latch, G.C.M.C.M., Bush, L.P.P., Fannin, F.F.F., Rowan, D.D.D., Tapper, B.A.A., Bacon, C.W.W., Johnson, M.C.C. 1990. Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3301-3315.
- Siegrist, J.A., McCulley, R.L., Bush, L.P., Phillips, T.D. 2010. Alkaloids may not be responsible for endophyte-associated reductions in tall fescue decomposition rates. *Functional Ecology* 24: 460-468.
- Soriano, A. 1991. Temperate subhumid grasslands of South America. En *Temperate subhumid grasslands. R.T. Coupland (ed.) Ecosystems of the World, Volume 8A, Natural Grasslands.*, pp. 367-407. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

- Spiering, M.J., Lane, G.A., Christensen, M.J., Schmid, J. 2005. Distribution of the fungal endophyte *Neotyphodium lolii* is not a major determinant of the distribution of fungal alkaloids in *Lolium perenne* plants. *Phytochemistry* 66: 195-202.
- Sprent, J.I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: A taxonomic perspective on the occurrence of nodulation: Tansley review. *New Phytologist* 174: 11-25.
- Steinebrunner, F., Schiestl, F.P., Leuchtman, A. 2008a. Ecological role of volatiles produced by *Epichloë*: Differences in antifungal toxicity. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 307-316.
- Steinebrunner, F., Schiestl, F.P., Leuchtman, A. 2008b. Variation of insect attracting odor in endophytic *Epichloë* fungi: Phylogenetic constraints versus host influence. *Journal of Chemical Ecology* 34: 772-782.
- Steinebrunner, F., Twele, R., Francke, W., Leuchtman, A., Schiestl, F.P. 2008. Role of odour compounds in the attraction of gamete vectors in endophytic *Epichloë* fungi. *New Phytologist* 178: 401-411.
- Strauss, S.Y., Agrawal, A. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in ecology & evolution* 14: 179-185.
- Strauss, S.Y., Rudgers, J.A., Lau, J.A., Irwin, R.E. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 278-285.
- 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, T.J., Rodstrom, J., Vandop, J., Librizzi, J., Graham, C., Schardl, C.L., Bultman, T.L. 2007. Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: Evidence from changes in gene expression and leaf composition. *New Phytologist* 176: 673-679.
- Tepaske, M.J., Powell, R.G., Clement, S.L. 1993. Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *Journal of agricultural and food chemistry* 41: 2299-2303.
- Thiele, T., Kost, C., Roces, F., Wirth, R. 2014. Foraging Leaf-Cutting Ants Learn to Reject *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* Plants that Emit Herbivore-Induced Volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 40: 617-620.
- Thrall, P.H., Hochberg, M.E., Burdon, J.J., Bever, J.D. 2007. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 120-126.
- Tian, P., Nan, Z., Li, C., Spangenberg, G. 2008. Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 122: 593-602.
- Tibbets, T.M., Faeth, S.H. 1999. *Neotyphodium* endophytes in grasses: Deterrents or promoters of herbivory by leaf-cutting ants? *Oecologia* 118: 297-305.
- Tiffin, P. 2000. Mechanisms of tolerance to herbivore damage: What do we know? *Evolutionary Ecology* 14: 523-536.

- Tognetti, P.M., Chaneton, E.J. 2012. Invasive exotic grasses and seed arrival limit native species establishment in an old-field grassland succession. *Biological Invasions* 14: 2531-2544.
- Tognetti, P.M., Chaneton, E.J., Omacini, M., Trebino, H.J., León, R.J.C. 2010. Exotic vs. native plant dominance over 20 years of old-field succession on set-aside farmland in Argentina. *Biological Conservation* 143: 2494-2503.
- Tozin, L.R. dos S., Marques, M.O.M., Rodrigues, T.M. 2017. Herbivory by leaf-cutter ants changes the glandular trichomes density and the volatile components in an aromatic plant model. *AoB PLANTS* 9: 1-8.
- Uchitel, A., Omacini, M., Chaneton, E.J. 2011. Inherited fungal symbionts enhance establishment of an invasive annual grass across successional habitats. *Oecologia* 165: 465-475.
- Unsicker, S.B., Kunert, G., Gershenson, J. 2009. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 479-485.
- Van Bael, S.A., Seid, M.A., Wcislo, W.T. 2012. Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecological Entomology* 37: 318-321.
- Van Bael, S.A., Valencia, M.C., Rojas, E.I., Gómez, N., Windsor, D.M., Herre, E.A. 2009. Effects of foliar endophytic fungi on the preference and performance of the leaf beetle *Chelymorpha alternans* in Panama. *Biotropica* 41: 221-225.
- Van Der Heijden, M.G.A., Horton, T.R. 2009. Socialism in soil? the importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97: 1139-1150.
- Vignale, M.V., Iannone, L.J., Novas, M.V. 2020. *Epichloë* endophytes of a wild grass promote mycorrhizal colonization of neighbor grasses. *Fungal Ecology* 45: 100916.
- Wenda-Piesik, A., Piesik, D., Ligor, T., Buszewski, B. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) from cereal plants infested with crown rot: Their identity and their capacity for inducing production of VOCs in uninfested plants. *International Journal of Pest Management* 56: 377-383.
- White, J.F., Kingsley, K.L., Zhang, Q., Verma, R., Obi, N., Dvinskikh, S., Elmore, M.T. et al. 2019. Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. *Pest Management Science* 75: 2558-2565.
- White, J.F., Torres, M.S. 2010. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiologia Plantarum* 138: 440-446.
- Wilkinson, H.H., Siegel, M.R., Blankenship, J.D., Mallory, A.C., Bush, L.P., Schardl, C.L. 2000. Contribution of Fungal Loline Alkaloids to Protection from Aphids in a Grass-Endophyte Mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1027-1033.
- Yongjun, D.U., Poppy, G.M., Powell, W., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M. 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 24: 1355-1368.

- Yue, Q., Wang, C., Gianfagna, T.J., Meyer, W.A. 2001. Volatile compounds of endophyte-free and infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Phytochemistry* 58: 935-941.
- Zhang, P.J., Zheng, S.J., Van Loon, J.J.A., Boland, W., David, A., Mumm, R., Dicke, M. 2009. Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 21202-21207.
- Zhou, Y., Li, X., Qin, J., Liu, H., Chen, W., Niu, Y., Ren, A., Gao, Y. 2016. Effects of simultaneous infections of endophytic fungi and arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of their shared host grass *Achnatherum sibiricum* under varying N and P supply. *Fungal Ecology* 20: 56-65.
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS microbiology reviews* 32: 723-735.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., et al., (2009). *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*, first ed. Springer, New York.

Apéndice

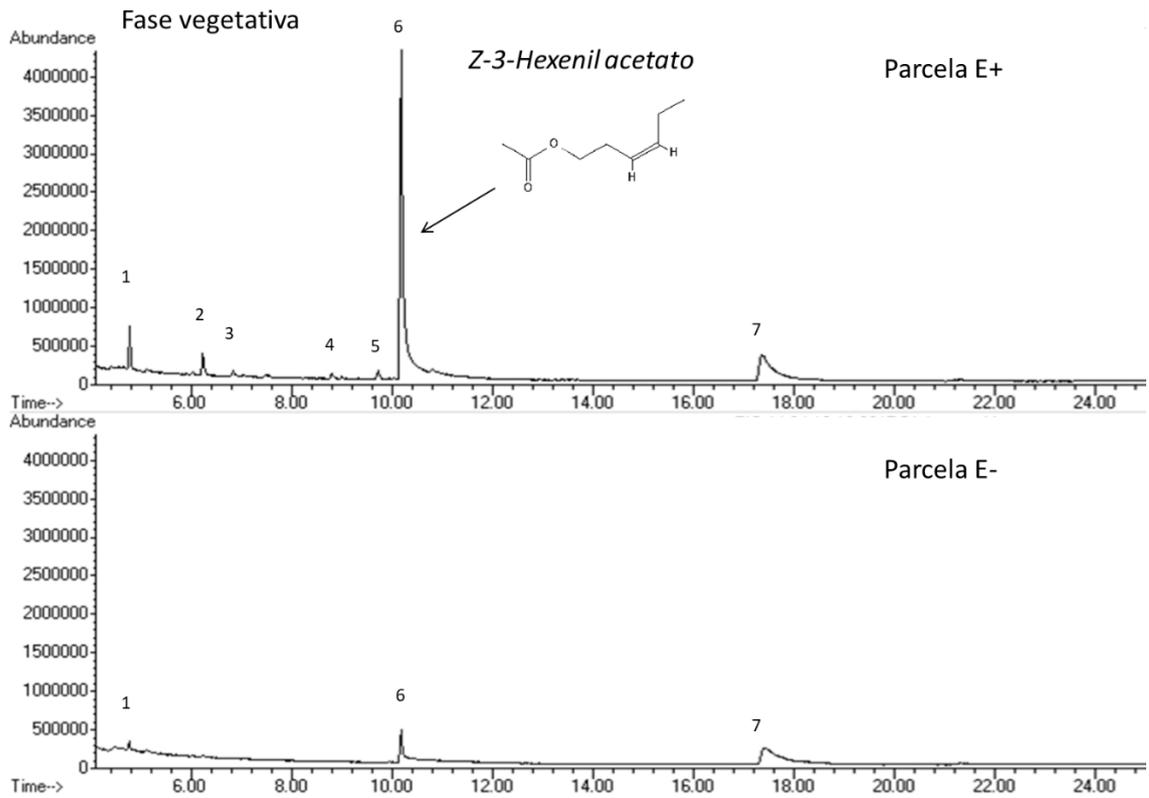


Figura 1 Apéndice: Cromatogramas TIC representativos de los VOC emitidos por parcelas sembradas con semillas de *Lolium multiflorum* con alta y baja frecuencia de infección con el endófito *Epichloë occultans* (E+ y E-) en la fase vegetativa. Los números sobre los picos indican a los diferentes compuestos identificados (1) Tetracloroetileno; (2) *p*-Xileno; (3) *o*-Xileno; (4) D-Cloroformo; (5) 1,2,3-Trimetilbenceno; (6) (*Z*)-3-Hexenil acetato; (EI) Estándar interno: Heptilbutirato. Los compuestos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron identificados como impurezas del solvente.