

Mecanismos ecológicos involucrados en el establecimiento de múltiples simbiosis entre plantas y microorganismos en agroecosistemas

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

Alexia Minás

Licenciada en Biotecnología - Universidad Nacional de Quilmes - 2016

Lugar de trabajo: IFEVA-CONICET



FAUBA

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



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Marina Omacini

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad CAECE)

Dra. en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

Pablo A. García-Parisi

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Dr. en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Hugo D. Chludil

Farmacéutico (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco)

Dr. en Farmacia (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco)

JURADO DE TESIS

JURADO

Alejandra Gabriela Becerra

Bióloga (Universidad Nacional de Córdoba)

Máster en Ciencias del Suelo (Universidad de Buenos Aires)

Dra. en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba)

JURADO

María Beatriz Rodríguez Vazquez de Aldana

Lic. en Ciencias Químicas (Universidad de Salamanca)

Dra. en Ciencias Químicas (Universidad de Salamanca)

JURADO

Leopoldo Javier Iannone

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Dr. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 8 de junio de 2023

DEDICATORIA

A Lucas, mi compañero de vida.

A mis padres, quienes me enseñaron a ser valiente y perseguir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A Lucas, por ser mi soporte durante todo este tiempo. Gracias por acompañarme, escucharme y aconsejarme cada vez que lo necesitaba.

A mis papás, por siempre estar ahí, brindándome cariño y apoyándome en todas mis decisiones. A mi hermana por ser una gran compañera y escucharme a pesar de que no tiene ni idea de lo que hago. A mi abuela, simplemente por creer en mí y prenderme una velita cada vez que lo necesitaba.

A mis directores Marina y Pablo, por la paciencia y confianza que tuvieron en mí desde el primer día. Gracias por enseñarme tanto y guiarme en estos años. Espero poder seguir investigando a su lado y llegar a ser un poquito de los grandes profesionales que son.

A Hugo por ayudarme con los análisis químicos que tanto me costaron.

Al gran grupo de Simbiosfera: Juanfi, Pau, Mechi, Male, las Catas, Romu, Mirta y Pato, por compartir viajes al campo, almuerzos de grupo y tiempo en el laboratorio. Gracias por las risas y por hacer más ameno el trabajo de cada día.

A todos mis compañeros del piso de becarios, por los incontables mates, almuerzos, asados y charlas.

A mi otra familia, Gladys, Néstor, Diego, Cyn y Mati, por incluirme y hacerme sentir siempre como en casa.

A Car y Andrea esas hermanas que me dio la vida. Gracias por estar siempre, escucharme y hacerme reír cuando más lo necesitaba.

A Flor, mi amiga más antigua. Esa persona con la que pasa el tiempo y seguimos tan compinches como el primer día.

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 esta u otra institución.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

Minás, A., García-Parisi, P.A., Chludil, H., y 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*, 35, 2870-2881. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13938>. – Incluye el experimento del capítulo 3 y el experimento 1 y los análisis químicos del capítulo 4.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DECLARACIÓN	v
PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. LOS AGROECOSISTEMAS Y LAS INTERACCIONES BIOLÓGICAS	2
1.2. INTERACCIONES SIMBIÓTICAS	3
1.2.1. Simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno	4
1.2.2. Simbiosis con hongos formadores de micorrizas arbusculares	7
1.2.3. Simbiosis con hongos endófitos foliares	9
1.2.4. Interacciones entre múltiples simbiosis	13
1.3. PROCESO DE RETROALIMENTACIÓN PLANTA-SUELO	15
1.3.1. Mecanismos de retroalimentación planta-suelo (PS).....	16
1.3.1.A. <i>Retroalimentación planta-suelo generado por la exudación radical</i>	17
1.3.1.B. <i>Retroalimentación planta-suelo generada por la acumulación de la broza</i>	18
1.3.2. El papel de la simbiosis en la retroalimentación planta-suelo	20
1.4. SISTEMA DE ESTUDIO	22
1.5. OBJETIVO E HIPÓTESIS GENERAL	26
1.6. APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL	28
Capítulo 2: RETROALIMENTACIÓN PLANTA-SUELO GENERADA POR LOS EXUDADOS RADICALES PRODUCIDOS POR LA SIMBIOSIS GRAMÍNEA-ENDÓFITO	33
2.1. INTRODUCCIÓN.....	34
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.2.1. Diseño Experimental.....	36
2.2.2 Etapa de acondicionamiento.....	37
2.2.3. Fase de respuesta	39
2.2.4. Análisis Estadísticos	42

2.3. RESULTADOS	43
2.4. DISCUSIÓN	48
Capítulo 3: RETROALIMENTACIÓN PLANTA-SUELO GENERADA POR LA BROZA PRODUCIDA POR LA SIMBIOSIS GRAMÍNEA-ENDÓFITO	52
3.1. INTRODUCCIÓN.....	53
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.2.1. Diseño experimental	55
3.2.2. Análisis Estadísticos	57
3.3. RESULTADOS.....	58
3.4. DISCUSIÓN	61
Capítulo 4: RETROALIMENTACIÓN PLANTA-SUELO GENERADA POR LOS LIXIVIADOS DE LA BROZA PRODUCIDA POR LA SIMBIOSIS GRAMÍNEA- ENDÓFITO.....	66
4.1. INTRODUCCIÓN.....	67
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	69
4.2.1. Diseño experimental	69
4.2.2. Experimento 1: Efecto de los lixiviados de la broza sobre la germinación.....	70
4.2.3. Experimento 2: Efecto de los lixiviados de la broza sobre los simbioses de raíz	71
4.2.4. Caracterización química de la broza de <i>Lolium multiflorum</i>	73
4.2.5. Análisis Estadísticos	75
4.3. RESULTADOS	76
4.3.1. Experimento 1: Efecto de los lixiviados de la broza sobre la germinación	76
4.3.2. Experimento 2: Efecto de los lixiviados de la broza sobre los simbioses de raíz....	77
4.3.3. Análisis químicos de la broza de <i>Lolium multiflorum</i>	80
4.4. DISCUSIÓN	81
Capítulo 5: DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL	85
5.1. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS	86
5.2. CONTRIBUCIONES A LA ECOLOGÍA DE LAS COMUNIDADES.....	89
5.3. IMPLICANCIAS PARA EL MANEJO DE LOS AGROECOSISTEMAS	93
5.4. PERSPECTIVAS	94
5.5. CONCLUSIONES GENERALES	96
BIBLIOGRAFÍA.....	97

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Análisis estadísticos de cómo la emergencia, el establecimiento (número de plántulas a los 7 y 42 días de la siembra) y la velocidad de germinación se ve afectado por el legado dejado por la planta que acondicionó el suelo (E) y la inoculación con AMF (M). El cuadro muestra los grados de libertad (gl) de la prueba de chi cuadrado (χ^2). Las diferencias significativas están indicadas con los símbolos * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), *** ($p<0.0001$) y con letra negrita.

Cuadro 3.1. Análisis estadísticos del experimento (total de 72 unidades experimentales, con $n=6$): emergencia y establecimiento (número de plántulas 7 y 97 días luego de la siembra), biomasa, nodulación (número de nódulos por planta) y micorrización (porcentaje de raíz colonizada por arbusculos) afectados por la infección endofítica de las plantas que produjeron la broza (E), el tipo (B) y la cantidad (C) de broza usada en cada tratamiento. El cuadro muestra los grados de libertad (gl) de la prueba de chi cuadrado (χ^2). Las diferencias significativas están indicadas con los símbolos * ($p<0.05$), *** ($p<0.0001$) y con letra negrita.

Cuadro 4.1. Análisis estadísticos de la caracterización química de la broza de *Lolium multiflorum* (contenido de fenólicos y flavonoides, total de 12 unidades experimentales, con $n=3$) afectada por la infección endofítica de las plantas (E) y el tipo de broza (B). El cuadro muestra los grados de libertad (gl) de la prueba de chi cuadrado (χ^2). Las diferencias significativas están indicadas con los símbolos ** ($p<0.01$), *** ($p<0.0001$) y con letra negrita.

Cuadro 5.1. Comparación entre los mecanismos y las vías por las cuales la simbiosis gramínea-endófito genera un legado en el suelo que afecta (Sí, No, ¿?: Indeterminado) el establecimiento de una leguminosa. Las variables de respuesta en donde se observó este efecto (positivo: verde, negativo: rojo) fueron germinación (G), emergencia (Em), establecimiento (Es), nodulación (N) y micorrización (M).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Raíces de *Trifolium repens* con nódulos indeterminados. Foto: Alexia Minás.

Figura 1.2. Hifas, arbusculos y vesículas de hongos micorrícicos arbusculares observados en las raíces de *Trifolium repens*. Observación microscópica x40. Foto: Mirta Rabadán.

Figura 1.3. Hifas del hongo endófito *Epichloë occultans* en las semillas de *Lolium multiflorum*. Vista microscópica x100. Foto: Mirta Rabadán.

Figura 1.4. Representación esquemática de los efectos de legado. Las plantas pueden modificar las propiedades del suelo a través de la liberación de exudados radicales durante su crecimiento o, al morir a través de la acumulación del material muerto (broza aérea y broza subterránea). Estos dos mecanismos pueden, a su vez, darse por vías físicas o químicas. La broza puede actuar mediante vías físicas que están relacionadas con la formación de una barrera que modifica las condiciones micro climáticas afectando directamente (líneas llenas) la germinación e impide la emergencia de plántulas. Por otro lado, las vías químicas pueden darse a través de la liberación de compuestos químicos al suelo por las raíces de plantas vivas o durante los procesos de lixiviación y descomposición de la broza. Una vez en el suelo, los compuestos liberados pueden afectar directamente a las plantas o afectarlas indirectamente (línea punteada) a través de modificar la microbiota. Dependiendo de la naturaleza de esos compuestos químicos, los efectos pueden ser positivos o negativos.

Figura 1.5. Región Pampeana de la Argentina, donde se muestra (A) un mapa de esta región con los límites provinciales y de las subregiones (1=Pampa Ondulada, 2= Pampa Interior, 3=Pampa Deprimida o Inundable, 4= Pampa Austral y 5=Pampa Mesopotámica, obtenida de León et al. 1984) y (B) la imagen de una pastura ubicada en la Pampa Ondulada dedicada a la cría de ganado, donde coexisten leguminosas y gramíneas.

Figura 1.6. Plántulas de *Trifolium repens* (flechas rosas) creciendo junto a las plantas vivas (flechas rojas) y la broza (flechas amarillas) de *Lolium multiflorum* en una pastura pampeana. Foto: Marina Omacini.

Figura 1.7. Esquema de tesis. En cada capítulo (recuadros punteados en color) se analizaron los mecanismos por los cuales los hongos endófitos (E+) podrían modificar los efectos de legado generado por su planta hospedante y así afectar el establecimiento de la leguminosa. En cada caso, también se analizó si el legado generado por la simbiosis gramínea-endófito afectaba directamente el establecimiento de la leguminosa o si lo hacía indirectamente a través de modificar su interacción con rizobios (R) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA).

Figura 2.1. Representación esquemática del proceso de retroalimentación planta-suelo estudiado en este capítulo. La presencia de endófitos (E) modula el legado que los tejidos vivos de su planta hospedante dejan en el suelo (llave roja) a través de modificar la composición y concentración de los exudados radicales. Estos efectos de legado pueden ser alelopáticos y afectar directamente (línea llena) el establecimiento de una leguminosa que crece en la siguiente generación, o indirectamente (línea punteada) a través de modificar a la microbiota del suelo y la capacidad que tiene la leguminosa de asociarse a rizobios (R: círculo color rosa) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (M: círculo color azul).

Figura 2.2. Representación esquemática del enfoque experimental. La etapa de acondicionamiento del suelo se generó cultivando plantas de *Lolium multiflorum* con niveles bajos o altos de infección endofítica (E- y E+, respectivamente) en macetas inoculadas o no con hongos formadores de micorrizas arbusculares (M+: macetas rayadas, M-: macetas lisas). También, se generaron dos tipos de control cultivando plantas de *Trifolium repens* inoculadas con

rizobios y con M+ o M-. Después de cuatro meses, se recolectaron los 6 tipos de suelo que contenían los distintos tipos de legado. Esos suelos se utilizaron en la etapa de respuesta, donde se sembraron plantas de *T. repens* inoculadas nuevamente con rizobios. Es decir, en esta etapa se obtuvieron 6 tratamientos donde plantas de *T. repens* crecieron en suelos inoculados o no con micorrizas y acondicionadas por su propia especie (Control M+: macetas blancas y rayadas, Control M-: macetas blancas y lisas), o por plantas de *L. multiflorum* con baja (E-M+: macetas grises y rayadas, E-M-: macetas grises y lisas) o alta (E+M+: macetas negras y rayadas, E+M-: macetas negras y lisas) frecuencia de infección endofítica.

Figura 2.3. Representación esquemática de los efectos de retroalimentación planta-suelo (PS). Para analizar estos efectos, aquí se compara el número de plántulas de *Trifolium repens* establecidas en suelos acondicionados por su propia especie (macetas blancas) con el número de plántulas establecidas en suelos acondicionados por *Lolium multiflorum* independientemente del nivel de infección endofítica (macetas negras). Esto se hizo según la ecuación (2). La retroalimentación PS negativa indica un menor establecimiento en suelos acondicionados por *T. repens* que en suelos acondicionados por *L. multiflorum*. Una retroalimentación PS neutra, indica que el establecimiento fue el mismo en suelos acondicionados por *T. repens* y por *L. multiflorum*. Por último, una retroalimentación PS positiva indica un mayor establecimiento en suelos acondicionados por *T. repens* que en suelos acondicionados por *L. multiflorum*.

Figura 2.4. Número de plántulas de *Trifolium repens* (media \pm EE, n=6) establecidas en macetas con la adición de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares (M+: macetas con agregado de inóculo, línea punteada y M-: macetas sin el agregado de inóculo, línea llena), y acondicionadas por su propia especie (Control: triángulo) o por *Lolium multiflorum* con bajo (E-: círculo gris) o alto (E+: círculo negro) nivel de infección endofítica. Solo se muestran los análisis estadísticos para los valores de emergencia (7 días después de la siembra) y establecimiento (42 días después de la siembra). Las letras diferentes indican diferencias significativas para ($p < 0.05$).

Figura 2.5. Efecto de la retroalimentación planta-suelo (media \pm IC 95%, n=6). Esto se estimó utilizando la ecuación (2). Este cálculo se realizó por separado teniendo en cuenta si el suelo fue inoculado o no con hongos formadores de micorrizas arbusculares (M+: suelos con la adición y M-: suelos sin la adición de inóculo, barras lisas) y el nivel de infección endofítica en las plantas de *L. multiflorum* (E-: bajo nivel de infección, barras grises y E+: alto nivel de infección, barras negras). * representa el tratamiento distinto de cero.

Figura 2.6. Interacción entre *Trifolium repens* y sus simbioses de raíz. (A) Micorrización (% de raíces colonizadas por arbusculos, media \pm EE, n=6) y (B) Nodulación (número de nódulos, media \pm EE, n=12) presentes en las raíces de *T. repens* cuando crecían en suelos acondicionados por su propia especie (Control: barras blancas) o por *Lolium multiflorum* con bajo (E-: barras grises) o alto (E+: barras negras) nivel de infección endofítica. En el caso de la nodulación, las barras son un promedio entre los tratamientos con distinto nivel de inóculo de hongos micorrícicos (M+ y M-). Letras distintas indican diferencias significativas para ($p < 0.05$).

Figura 2.7. Biomasa aérea de *Trifolium repens*, (A) en suelos acondicionados por su propia especie (media \pm EE, n=6), con la adición de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares (CM-: sin la adición de inóculo, barras lisas, CM+: con la adición de inóculo, barras rayadas), o (B) en suelos acondicionados por *Lolium multiflorum* (media \pm EE, n=12) con bajo (E-: barras grises) o alto (E+: barras negras) nivel de infección endofítica. Las barras de éstos últimos son un promedio entre los tratamientos con distinto nivel de inóculo (M+ y M-). * indican diferencias significativas para ($p < 0.05$).

Figura 3.1. Esquema del experimento. Al final de la etapa de crecimiento, se recolectaron las hojas y tallos muertos (broza aérea) y las raíces muertas (broza subterránea) de plantas *Lolium multiflorum* con niveles bajos y altos de infección endofítica (E- y E+ respectivamente) que

crecían en un campo bajo las mismas condiciones (parcelas de 1 m² sembradas con 1500 semillas). Este experimento incluyó los diferentes tipos de broza producida por plantas E- o E+ (B= BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de BS y BA) y dos cantidades de broza (C= baja y alta). De la combinación de estos tres factores se obtuvieron 12 tratamientos, los cuales se replicaron 6 veces, alcanzando un total de 72 macetas.

Figura 3.2. Número de plántulas de *Trifolium repens* determinado a los (A) 7 días (media + EE, n=12) y (B) 97 días (media + EE, n=12) luego de la siembra, en macetas con distintos tipos de broza (BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-}, barras lisas) y alto (B_{E+}, barras rayadas) nivel de infección endofítica. Las barras representan un promedio entre las dos cantidades de broza (ver Cudaro 3.1). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

Figura 3.3. Biomasa aérea de *Trifolium repens* en macetas (media + EE, n=12) con el agregado de distintos tipos de broza (BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-}, barras lisas) y alto (B_{E+}, barras rayadas) nivel de infección endofítica. Las barras representan un promedio entre las dos cantidades de broza (ver Cuadro 3.1). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

Figura 3.4. Interacción entre *Trifolium repens* y sus simbioses de raíz. (A) Número de nódulos por planta (media + EE, n=12) y (B) porcentaje de raíz colonizada por arbuscúlos (% , media + EE, n=24) en los tratamientos con distintos tipos de broza (BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-}, barras lisas) y alto (B_{E+}, barras rayadas) nivel de infección endofítica. Las barras representan un promedio entre las dos cantidades de broza (ver Cuadro 3.1). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

Figura 4.1. Representación esquemática de la aproximación experimental. (A) Al final de la etapa de crecimiento, se recolectaron las hojas y tallos muertos (broza aérea) y las raíces muertas (broza subterránea) de plantas *Lolium multiflorum* con niveles bajos y altos de infección endofítica (E- y E+ respectivamente) que crecían en un campo bajo las mismas condiciones (parcelas de 1 m² sembradas con 1500 semillas). Con ella se generaron los lixiviados de los distintos tipos de broza producidas por plantas E+ y E- (LB= LBS: broza subterránea, LBA: broza aérea y LBS+LBA: la combinación de LBS y LBA y Control: solo con agua). En el primer experimento (B), a partir de estos lixiviados se generaron dos concentraciones (C= 100% y 50%) que se utilizaron para regar semillas de *Trifolium repens* colocadas en cajas de Petri. En el segundo experimento (C), estos mismos lixiviados se utilizaron para regar macetas con plántulas de *T. repens* en presencia de rizobios (R) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA).

Figura 4.2. Impacto de los lixiviados sobre la velocidad de germinación de *Trifolium repens* (media ± 95% intervalo de confianza, n=18). Esto fue estimado mediante la diferencia de la velocidad de germinación de *T. repens* en las placas regadas con los diferentes tipos de lixiviados (LBS: lixiviado de broza subterránea, LBA: lixiviado de broza aérea y LBS+LBA: lixiviado de la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-}, barras lisas) y alto (B_{E+}, barras rayadas) nivel de infección endofítica, con un control regado con agua (media = 14.65). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

Figura 4.3. Impacto de los lixiviados sobre la interacción de *Trifolium repens* con sus simbioses de raíz. Se calculó el RII índice para el (A) Número de nódulos (media ± 95% intervalos de confianza, n=6) y (B) porcentaje de raíz colonizada por arbuscúlos (% , media ± 95% intervalos de confianza, n=6) en los tratamientos regados con los lixiviados de los distintos tipos de broza (LBS: lixiviado de broza subterránea, LBA: lixiviado de broza aérea y LBS+LBA: lixiviado de la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-}, barras

lisas) y alto (B_{E+} , barras rayadas) nivel de infección endofítica. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Figura 4.4: Cromatograma en sílica gel realizado para la cualificación de compuestos alcaloides. En cada placa se corrieron los extractos de la broza subterránea (BS) y broza aérea (BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo y alto nivel de infección endofítica (E^- y E^+ , respectivamente). Estas placas luego de ser eluidas fueron rociadas con reactivo Dragendorff, el cual reacciona cambiando su color en presencia de alcaloides. La ausencia de manchas en color marrón indica que los alcaloides no se encuentran presentes en los extractos de broza utilizados.

Figura 4.5. Concentración de (A) compuestos fenólicos (media + EE, $n=3$) y (B) compuestos flavonoides (media + EE, $n=3$) en los diferentes tipos de broza (BS: broza subterránea, BA: broza aérea) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E^-} , barras lisas) y alto (B_{E^+} , barras rayadas) nivel de infección endofítica. Las diferencias significativas están representadas con letras diferentes ($p < 0.05$).

Figura 5.1. Mecanismos para analizar la retroalimentación planta-suelo (PS). Las plantas pueden dejar un legado en el suelo durante su crecimiento a través de la liberación de exudados, o al morir a través de la acumulación de la broza (BA: broza aérea, BS: broza subterránea, BA+BS: combinación de ambos tipos de broza). Ambos mecanismos, pueden darse por vías químicas (líneas celestes) que pueden tener efectos directos (líneas llenas) o indirectos (líneas punteadas) sobre el establecimiento de las plantas. La broza aérea también puede afectar a otras plantas a través de vías físicas (línea violeta) que pueden afectar directamente a las plantas a través de la formación de una barrera. Los simbios (llaves grises) pueden modular los efectos de retroalimentación a través de modificar la calidad y cantidad de los tejidos vivos y muertos.

Figura 5.2. Esquema de cómo los endófitos influyen en los procesos de los ecosistemas a través de cambios en el legado de su hospedante. Estos efectos de legado pueden tener repercusiones a distintas escalas teniendo impactos sobre los pastizales y pasturas dedicados a la cría del ganado (adaptado de Rillig et al. 2004).

ABREVIATURAS

Retroalimentación PS: retroalimentación planta-suelo

E: hongos endófitos foliares

E-: plantas de *Lolium multiflorum* con bajo nivel de infección endofítica (<5%)

E+: plantas de *Lolium multiflorum* con alto nivel de infección endofítica (>90%)

HMA: hongos formadores de micorrizas arbusculares

M-: macetas en las que, luego de esterilizar el suelo, no se agregó inóculo de HMA

M+: macetas en las que, luego de esterilizar el suelo, se les agregó un inóculo que consistía en la combinación de tres especies distintas de HMA

R: rizobios, bacterias fijadoras de nitrógeno

BS: broza subterránea (raíces muertas)

BA: broza aérea (hojas y tallos muertos)

BS+BA: combinación de la broza subterránea y aérea

LBS: lixiviados producidos por la broza subterránea

LBA: lixiviados producidos por la broza aérea

LBS+LBA: lixiviados producidos por la combinación de la broza subterránea y aérea

NO: noroeste

%: porcentaje

#: número

l: litro

ml: mililitro

μl: microlitro

g: gramo

μg: microgramo

m²: metro cuadrado

mm: milímetro

μm: micrómetro

nm: nanómetro

μM: micromol

°C: grados centígrados

h: hora

min: minutos

atm: atmósfera

>: mayor

<: menor

GLM: modelos lineales generalizados

LMM: modelos lineales mixtos

LR: Likelihood Ratio, prueba de razón de verosimilitud

gl: grados de libertad

χ²: chi cuadrado

EE: error estándar

IC: intervalos de confianza

n: número de repeticiones

N: número de unidades experimentales

ATP: adenosin trifosfato o trifosfato de adenosina, nucleótido fundamental en la obtención de energía celular

RESUMEN

Las plantas afectan el crecimiento o establecimiento de otras plantas que crecen en el vecindario o en la siguiente generación, a través de modificar las propiedades bióticas y abióticas del suelo. Este proceso, conocido como “retroalimentación planta-suelo (PS)” ha adquirido gran importancia en los últimos años debido al papel que desempeña en la composición de las comunidades vegetales y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres. A pesar de su importancia, poco se sabe de los mecanismos por los cuales las plantas generan la retroalimentación PS, ni el impacto que los simbioses tienen sobre estos procesos. El **objetivo general** de esta tesis fue evaluar los mecanismos por los cuales la simbiosis entre gramíneas y hongos endófitos del género *Epichloë* afecta el establecimiento de una leguminosa y su interacción con otras simbiosis mutualistas (rizobios y hongos micorrícicos arbusculares (HMA)) en un pastizal o pastura. La **hipótesis general** es que los hongos endófitos reducen la capacidad que tienen las leguminosas de establecerse y formar simbiosis mutualistas a través de modificar los compuestos químicos que son liberados de los tejidos vivos y muertos de su gramínea hospedante. Para ello, se realizó un experimento donde se evaluó si los exudados radicales liberados por los tejidos vivos generados por la simbiosis gramínea-endófito deja un legado en el suelo que afecta el establecimiento de la simbiosis tripartita entre leguminosas, rizobios y HMA (capítulo 2). Además, se realizaron 3 experimentos para estudiar si la acumulación de los tejidos muertos producidos por la simbiosis gramínea-endófito al final de la etapa de crecimiento afecta a la leguminosa y sus simbioses benéficos a través de vías físicas o químicas (capítulo 3 y 4). Esta tesis proporciona una mejor comprensión acerca de cómo puede darse el proceso de retroalimentación PS y la forma en que un simbionte foliar modifica dicho proceso. También, a través de este estudio se determinaron los mecanismos por los cuales la simbiosis gramínea-endófito

promueve o inhibe el establecimiento de una leguminosa. Estos resultados, tendrían implicancias sobre la ecología de las comunidades, ya que a través de la retroalimentación PS, se podría promover la coexistencia entre especies. Además, proporcionan información esencial que podría utilizarse para generar prácticas de manejo adecuadas que permitan el establecimiento y la prevalencia de las leguminosas en estos sistemas.

Palabras clave: Mutualismos - *Epichloë occultans* - endófitos, *Rhizobium leguminosarum* - rizobios - *Glomeromycota* - micorrizas arbusculares - retroalimentación

ABSTRACT

Plants can affect the growth or establishment of other plants through changing the biotic and abiotic soil environment. In the recent years, this process known as “plant-soil feedback (PSF)”, has gained a great importance due to the role that plays in the structuring of plant communities and the functioning of terrestrial ecosystems. Despite its importance, little is known about the mechanisms by which plants generate this PSF or the impact that symbionts have on these processes. The general objective of this thesis was to test the mechanisms by which the symbiosis between grasses and endophytic fungi of the genus *Epichloë* affect the establishment of a legume and its interaction with other mutualistic symbioses (rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)) in grasslands and pastures. The general hypothesis is that the endophyte reduces the establishment of the legume and their ability to form mutualistic symbioses by modifying the chemical compounds that are released from the living and dead tissues of their grass host. To analyze these, we performed an experiment whether the root exudates released by the living tissues of the grass-endophyte symbiosis leave a legacy in the soil that affect the establishment of the tripartite symbiosis between legumes, rhizobia, and AMF (chapter 2). Also, we carried out three experiments to study whether the accumulation of the dead tissues produced by the grass-endophyte symbiosis at the end of the growing season affects the legume and its beneficial symbionts through physical and chemical pathways (chapter 3 and 4). This thesis provides a better understanding of how PSF can occur and how a foliar symbiont modifies this process. Also, through this study, the mechanisms by which the grass-endophyte symbiosis promotes or inhibits the establishment of a legume were determined. These results would have implications for the ecology of communities since we can promote or inhibit the coexistence of species through PSF process. Also,

they provide essential information that could be used to generate appropriate management practices that allow the establishment and the prevalence of legumes in these systems.

Key words: Mutualism - *Epichloë occultans* - endophytes, *Rhizobium leguminosarum* – rhizobia – *Glomeromycota* – arbuscular mycorrhizal fungi – feedback

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. LOS AGROECOSISTEMAS Y LAS INTERACCIONES BIOLÓGICAS

Los agroecosistemas, son ecosistemas modificados por el ser humano que tienen como fin producir alimentos, fibras u otros productos agrícolas (Altieri y Koohafkan 2003, Conway 1987). La provisión de estos productos, generalmente se da a expensas de la biodiversidad y de muchos otros servicios ecosistémicos (Foley et al. 2005, Hails 2002, Liu et al. 2007, Newbold et al. 2015, Paruelo y Sierra 2022). Es por ello, que en los últimos años se ha planteado la necesidad de un cambio hacia un modelo más sustentable como la intensificación ecológica (Bender et al. 2016, Bommarco et al. 2013, Díaz et al. 2018, Doré et al. 2011). Este modelo propone mantener y/o aumentar la producción minimizando el impacto ambiental, a través del reemplazo de insumos externos (fertilizantes, herbicidas, insecticidas, etc.) mediante un manejo más adecuado y eficiente de los servicios o contribuciones de los agroecosistemas (Bender et al. 2016, Bommarco et al. 2013, Díaz et al. 2018, Doré et al. 2011). Es por ello que, para lograr maximizar la producción y generar prácticas de manejo sustentables, primero, es necesario entender los procesos y las interacciones biológicas que ocurren en él.

Las interacciones interespecíficas (es decir, entre especies diferentes) son consideradas como uno de los factores que determinan la dinámica y el funcionamiento tanto de los ecosistemas naturales como de diferentes sistemas de producción (Tilman et al. 2014). Históricamente, la competencia por recursos entre distintas especies vegetales ha sido propuesta como el factor principal que influye la diversidad y el dominio de ciertas especies dentro de las comunidades vegetales (Grace y Tilman 1990). Esto se debe a que la competencia puede determinar la coexistencia o la exclusión de especies (Callaway et al. 1996, Grace y Tilman 1990, Gurevitch et al. 1992, Lotka 1925, Tilman 1982, Volterra 1926). Sin embargo, los ecólogos han reconocido que otras interacciones como las que

establecen las plantas con microorganismos mutualistas (Bascompete 2019, Thrall et al. 2007, van der Heijden et al. 1998), herbívoros (Hulme 1996, Maron y Crone 2006) y patógenos (Bever et al. 2015) también afectan el desempeño de las plantas hospedantes y la organización de las comunidades vegetales.

Particularmente, los mutualismos pueden tener grandes implicancias sobre la estructura de una comunidad y el funcionamiento de un ecosistema (Kothamasi et al. 2010). Esto se debe a que, al proveerle múltiples beneficios a sus plantas asociadas, los mutualistas no solo mejoran la aptitud de sus hospedantes, sino que también pueden modificar las interacciones de competencia y desempeñar importantes roles en el movimiento de nutrientes y energía en los ecosistemas (Hay et al. 2004, Kothamasi et al. 2010). Recientemente, las interacciones mutualistas que se dan entre las plantas y los insectos polinizadores han adquirido gran atención debido a los beneficios que éstos generan para la producción de alimentos (Fontaine et al. 2006, Garibaldi et al. 2011, 2013, 2014, Kothamasi et al. 2010, Potts et al. 2016). Sin embargo, las interacciones que forman las plantas con los microorganismos simbiotes también tienen grandes implicancias sobre los agroecosistemas (Andrews et al. 2010, 2011, Dodd et al. 2010, Douglas 2010, Newton et al. 2010, Tikhonovich y Provorov 2011). Realizando un manejo adecuado de los microorganismos simbiotes se podrían reemplazar o disminuir el uso de fertilizantes, herbicidas y pesticidas, obteniendo sistemas más sustentables e igual de productivos (Andrews et al. 2010, 2011, Dodd et al. 2010, Newton et al. 2010).

1.2. INTERACCIONES SIMBIÓTICAS

Se denomina simbiosis a un tipo de mutualismo con características particulares debido a que son, principalmente, relaciones con contacto estrecho y de larga duración (Douglas 2010). En un principio, éstas interacciones se han estudiado de a pares,

analizando los beneficios que los integrantes de la simbiosis reciben. Actualmente sabemos que las plantas pueden formar simbiosis simultáneas con distintos microorganismos y que estas pueden tener grandes implicancias sobre plantas vecinas simbióticas y no simbióticas (García-Parisi y Omacini 2019, Vignale et al. 2018, 2020).

Esta tesis aborda de manera integrada las simbiosis que las plantas mantienen con tres tipos de microorganismos: bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios), hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y hongos endófitos foliares. Se seleccionaron estos simbiosistas ya que suelen estar presentes en la mayoría de los agroecosistemas y, además, median importantes procesos fisiológicos como la adquisición de nutrientes, protección y la tolerancia de las plantas a distintos tipos de estrés (Andrews et al. 2011, Bauer et al. 2012, Omacini 2013). A continuación, se describen algunas particularidades de estos tres tipos de simbiosistas.

1.2.1. Simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno

Una de las simbiosis más importantes y reconocidas en el mundo debido a su impacto ecológico y económico es aquella que forman las leguminosas (*Fabaceae*) con las bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios) de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium* y *Azorhizovium* (Sawada et al. 2003, Sprent 2007). Estas simbiosis constituyen la principal fuente de nitrógeno (N) en los ecosistemas naturales y en diversos agroecosistemas (Graham y Vance 2003, Sprent et al. 2017). Esto se debe a que, a cambio de productos fotosintéticos, los rizobios le otorgan a la planta N cuando este nutriente está en concentraciones limitantes o no se encuentra disponible para la planta (Seefeldt et al. 2009, Sprent et al. 2017). La fijación de N se debe a que las bacterias fijadoras poseen un complejo enzimático denominado nitrogenasa que les permite fijar nitrógeno atmosférico (N_2) y convertirlo en amonio (NH_4^+), que luego es exportado a la planta (Mylona et al. 1995). La nitrogenasa es

inactivada en presencia de oxígeno, razón por la cual este proceso debe realizarse en condiciones anóxicas o casi anóxicas. Es por ello, que el establecimiento y el éxito de la simbiosis está dado por la formación de unas estructuras nodulares en las raíces de las plantas (Figura 1.1), que proporcionan el microambiente necesario para que los rizobios puedan fijar N_2 (Gage 2004, Long 1989).

La formación de estos nódulos se da a partir de un proceso complejo que implica una serie de mecanismos de señalización y reconocimiento por parte del simbiote y la planta. El proceso inicia con la secreción de compuestos flavonoides por parte de la planta, los cuales inducen la expresión de los genes de nodulación en el simbiote (Gage 2004). Estos genes a su vez codifican para una serie de proteínas que inducen la deformación de los pelos radicales y la división de células corticales, que terminan con la formación del nódulo (Gage 2004). Existen dos tipos de nódulos, los determinados e indeterminados, dependiendo de la especie de leguminosa a la que se asocian. Los nódulos determinados se caracterizan por tener una estructura esférica y se encuentran en géneros de leguminosas subtropicales como *Glycine*, *Lotus* o *Phaseolus*. Los nódulos indeterminados poseen una morfología mucho más alargada y cilíndrica a causa de la presencia de un meristema apical permanente que continuamente se encuentra creciendo y se encuentran en leguminosas templadas como *Medicago*, *Trifolium* y *Pisum* (Denison 2000, Hirsch 1992, Mayz 1997). En los nódulos determinados, las bacterias que lo forman se transforman en bacteroides perdiendo su capacidad de reproducirse. Sin embargo, al morir el nódulo, los bacteroides liberados al suelo recuperan su capacidad de multiplicarse y lo hacen dependiendo de la cantidad de sustancias de reserva que acumularon durante su estadio simbiótico. En cambio, en los nódulos indeterminados, no todas las bacterias que lo forman se diferencian en bacteroides. Algunos continúan indiferenciados y se multiplican dentro del nódulo a expensas de la planta. Estas bacterias indiferenciadas

reconstituyen las poblaciones del suelo al morir el nódulo, dado que la capacidad de multiplicarse de los bacteroides en este tipo de nódulo no se recupera (Denison 2000, Denison y Kiers 2004).



Figura 1.1. Raíces de *Trifolium repens* con nódulos indeterminados. Foto: Alexia Minás.

La presencia de esta simbiosis tiene grandes impactos sobre la estructura de las comunidades y el funcionamiento de los ecosistemas (Kothamasi et al. 2010). Al fijar N, las leguminosas aumentan la disponibilidad de este nutriente en el sistema mediante dos mecanismos: a través de la liberación de los recursos del suelo y a través de transferir parte del N fijado a otras plantas (Ayres et al. 2007, Haynes 1980, Hodge y Fitter 2013). El primero está dado por la utilización diferencial de los recursos. Esto significa que las leguminosas al utilizar el N₂ fijado por los rizobios en lugar al N del suelo, genera un aumento de los reservorios presentes en el suelo, que pueden ser utilizados por otras plantas. Por el contrario, la transferencia de N está relacionado con el N que queda

disponible en el suelo por la exudación radical o la descomposición de los tejidos muertos. Estos cambios en el perfil de nutrientes del suelo pueden afectar las relaciones de competencia entre las especies presentes en la comunidad, lo que altera la composición específica de la comunidad en favor de las especies más demandantes de N (Kothamasi et al. 2010). También, modifican la productividad del ecosistema ya que está vinculado principalmente a sus efectos sobre el ciclo del N debido a que aumenta su entrada mediante la fijación simbiótica (Sprent 2007).

1.2.2. Simbiosis con hongos formadores de micorrizas arbusculares

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) son considerados como uno de los grupos de simbiosis más importantes, ya que forman asociaciones con más del 80% de las plantas terrestres (Smith y Read 1997, van der Heijden et al. 1998, van der Heijden et al. 2015). Una de las funciones principales o más conocidas que cumplen los HMA, es mejorar la captura de nutrientes para la planta hospedante a cambio del suministro de compuestos carbonados (Leigh et al. 2011, Parniske 2008, Smith y Read 2008). Esto se debe a que las hifas de HMA se extienden en el suelo recorriendo grandes superficies en búsqueda de recursos. Además de esta función, los HMA mejoran la tolerancia al estrés hídrico (Smith y Read 1997) y sus defensas contra algunos insectos (Akiyama y Hayashi, 2002, Babikova et al. 2014, Fontana et al. 2009, Shrivastava et al. 2015, Vierheilig et al. 2000). Debido a estos beneficios, varios estudios sugieren que la simbiosis con HMA puede modificar las relaciones de competencia entre las plantas, lo que, a su vez, tiene un impacto sobre la estructura y la diversidad de las comunidades vegetales (Bennet et al. 2017, Lin et al. 2015, Teste y Dickie 2017).

La colonización de las raíces de las plantas por parte de los HMA involucra una serie de eventos que están altamente regulados por ambos participantes (Feddermann et

al. 2010). Al inicio, las raíces de las plantas exudan estrigolactonas que actúan como moléculas señal responsables de inducir la germinación de las esporas (conocidas como glomeroesporas que son la unidad reproductiva de los HMA) (Akiyama et al. 2005, García-Garrido et al. 2009, López-Ráez et al. 2008, Smith y Smith 2011). En respuesta, se produce la ramificación hifal y la producción de factores Myc que inducen oscilaciones de calcio en las células epidérmicas de las raíces y activan distintos genes de la planta relacionados con la simbiosis (Kosuta et al. 2003, Maillet et al. 2011). Al ponerse en contacto con la raíz de la planta, la hifa del hongo penetra la epidermis de la raíz y crece intracelularmente en el parénquima cortical. En algunas células de la corteza, el hongo penetra las paredes de la célula vegetal e invagina la membrana plasmática la cual crece acompañando el desarrollo de unas estructuras denominadas “arbusculos” (Figura 1.2; Genre et al. 2008). Estas estructuras son las que les dan el nombre a estos hongos y son considerados como los principales indicadores de una colonización funcional, ya que allí es donde se da el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Genre et al. 2008, Parniske 2008, Smith y Read 2008). Estos hongos también pueden formar unas estructuras intrasradicales denominadas “vesículas” (Figura 1.2). Las vesículas se originan a partir del ensanchamiento de una hifa y se las considera como estructuras de reserva (Peterson et al. 2004, Smith y Read 2008). Nunca hay colonización de las células de la endodermis ni en el cilindro vascular. Tampoco se han observado estructuras fúngicas en los ápices meristemáticos de las raíces micorrizadas.

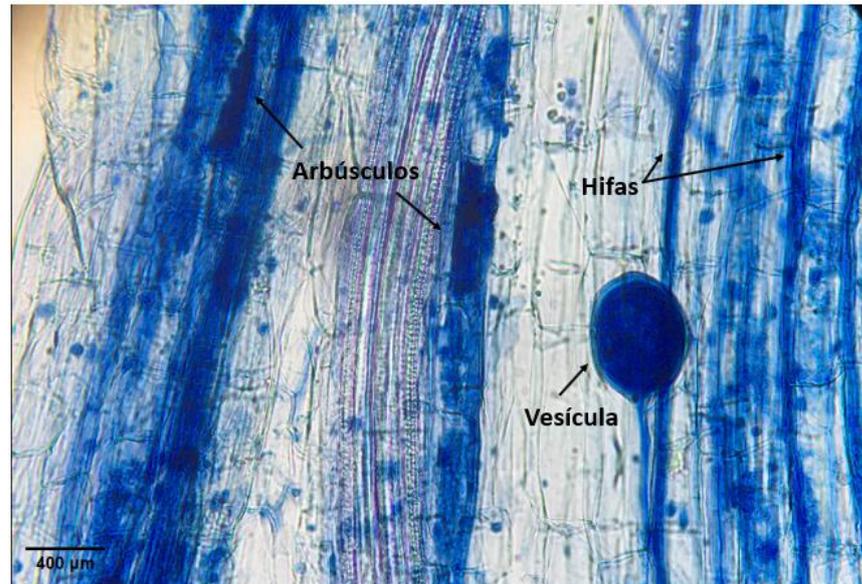


Figura 1.2. Hifas, arbúsculos y vesículas de hongos micorrícicos arbusculares observados en las raíces de *Trifolium repens*. Observación microscópica x100. Foto: Mirta Rabadán.

Dentro de un ecosistema, los HMA tienen la capacidad de formar redes de comunicación entre diferentes plantas formando una red común de micorrizas (denominadas en inglés como “Common Mycorrhizal Networks”; Barto et al. 2012). La presencia de estas redes no solo aumenta el crecimiento de una planta individual, sino que también permite el éxito ecológico de las plantas que intervienen en dicha red a través del intercambio de nutrientes e incluso compuestos de defensa (Babikova et al. 2013, van der Heijden et al. 2009, van der Heijden et al. 2015). La formación de estas redes podría explicar cómo los HMA promueven la productividad y la diversidad de las comunidades vegetales (van der Heijden et al. 1998, Wagg et al. 2014).

1.2.3. Simbiosis con hongos endófitos foliares

Los hongos endófitos del género *Epichloë* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) establecen simbiosis con numerosas especies de gramíneas templadas (Leuchtman et al. 2014). Dentro de el género *Epichloë* podemos encontrar especies sexuales y asexuales, que se alojan únicamente en los tejidos aéreos de sus hospedantes (Clay y Schardl 2002).

Si bien existen muchas especies de endófitos, la evidencia molecular sugiere que las gramíneas hospedantes están infectadas por un solo genotipo fúngico (Kover et al. 1997, Meijer y Leuchtammn 1999).

Una de las funciones principales o más conocidas que los endófitos le otorgan a su planta hospedante es la protección contra herbívoros vertebrados e invertebrados (Bush et al. 1997, Clay y Scharld 2002) y hongos patógenos (Pérez et al. 2016). Esta protección está asociada principalmente a que el hongo produce alcaloides (Bush et al. 1997, Clay y Scharld 2002). Sin embargo, el tipo de alcaloide producido depende del genotipo del hongo y el hospedante (Bush et al. 1997). Por ejemplo, algunas asociaciones producen alcaloides ergot e índole-diterpenos que son tóxicos para el ganado (Gallagher et al. 1981, Porter et al. 1981). Mientras que otras, producen peraminas y lolinas que son tóxicas para algunos herbívoros invertebrados (Bush et al. 1997, Clay y Schardl 2002, Rowan y Gaynor 1986), por lo que podrían ser promovidas en sistemas pastoriles (Iannone et al. 2017, McCargo et al. 2020, Vignale et al. 2020). Sin embargo, estos estudios no definen si estos compuestos participan efectivamente en el mecanismo de protección, ya que solo encuentran correlaciones entre la disminución de la herbivoría y la concentración de los alcaloides (Wilkinson et al. 2000). Actualmente, también se ha visto que los endófitos inducen cambios en la emisión de compuestos orgánicos volátiles (Fiorenza et al. 2021, Fuchs y Krauss 2019, Pańka et al. 2013, Rostás et al. 2015) que podrían actuar como compuestos defensivos contra insectos (Hennessy et al. 2021).

Los endófitos le otorgan múltiples beneficios a sus hospedantes, entre ellos, se ha visto que generan un aumento en la absorción de nutrientes (Belesky et al. 2008, García-Parisi et al. 2015, Malinowski y Belesky 2000), lo que podría estar dado por cambios en la morfología de las raíces (Malinowski y Belesky 2000). Incluso, los endófitos inducen una mayor tolerancia a la sequía en sus plantas hospedantes, producto de cambios en la

estructura y funcionamiento de tejidos aéreos y subterráneos (Malinowski y Belesky 2000, Manzur et al. 2021). Sin embargo, esta tolerancia depende de la historia evolutiva de la gramínea y de los hongos endófitos en los diferentes contextos ecológicos (Decunta et al. 2021). A partir de todos los cambios anteriormente nombrados (metabólicos, nutricionales y de tolerancia a estrés), los endófitos aumentan la habilidad competitiva de su planta hospedante, pudiendo aumentar su crecimiento y/o su reproducción (Clay 1990, Clay et al. 1993, Clay y Schardl 2002, Malinowski y Belesky 2000).

A cambio de los múltiples beneficios que la planta hospedante obtiene de la simbiosis, el hongo recibe productos fotosintéticos, protección y una vía de dispersión (Clay et al. 1993, Clay y Schardl 2002). Esto se debe a que los endófitos se transmiten verticalmente a través de las semillas de la planta (Figura 1.3). El hongo se hospeda y crece en los espacios intersticiales de los tejidos aéreos e inflorescencias, dando como resultado una colonización asintomática (Clay y Schardl 2002, Moon et al. 2000). Cuando la semilla germina, el micelio del hongo, ubicado en los espacios intercelulares del embrión, coloniza los primordios foliares y se distribuye por los tejidos aéreos (Clay y Schardl 2002). El hongo crece durante la estación de crecimiento del hospedante y luego coloniza los óvulos en crecimiento para alojarse en la semilla, que constituye la unidad de dispersión no solo para la planta sino también para el hongo (Clay y Schardl 2002). Una vez alcanzada la semilla, su persistencia depende de su habilidad por mantenerse vivo durante la etapa seminal (Gundel et al. 2008).

Los endófitos asexuales se caracterizan por ser transmitidos exclusivamente de forma vertical, pero las formas sexuales, bajo ciertos contextos, pueden generar estromas en los tallos de sus gramíneas hospedantes y transmitirse de manera contagiosa reduciendo las semillas producidas por su hospedante (Clay y Schardl 2002). En general, la tasa de transmisión de los endófitos es bastante eficiente (Clay y Schardl, 2002), pero

depende del genotipo y del contexto ecológico (García-Parisi et al. 2012, Gundel et al. 2008, 2009, 2011 y 2012).

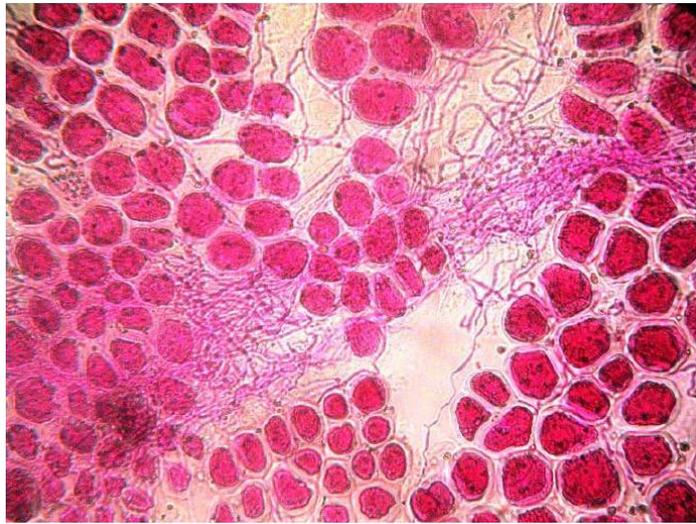


Figura 1.3. Hifas del hongo endófito *Epichloë occultans* en las semillas de *Lolium multiflorum*. Vista microscópica x100. Foto: Mirta Rabadán.

Los endófitos producen múltiples cambios en su hospedante que podrían afectar a otros miembros de la comunidad vegetal (Clay y Schardl 2002, Omacini et al. 2005, Omacini et al. 2014). Por un lado, los endófitos pueden tener efectos positivos sobre otras especies de plantas al transferirle protección contra insectos y patógenos a plantas vecinas no simbióticas (García-Parisi et al. 2014, García-Parisi et al. 2021, Pérez et al. 2016). Por otro lado, se han visto efectos negativos sobre la diversidad de especies vegetales (Clay y Holah 1999, Rudgers et al. 2007) ya que los endófitos alteran las interacciones competitivas entre sus plantas hospedantes y otras plantas (Cheplick et al. 1989, Marks et al. 1991, Malinowski et al. 1997, Stevens y Hickey 1990, Sutherland y Hoglund 1989). También se ha detectado que la simbiosis gramínea-endófito puede afectar a los consumidores de varios niveles tróficos (Krauss et al. 2007, Lehton et al. 2005, Omacini et al. 2001) y afectar el ambiente subterráneo (Antunes et al. 2008, Bowatte et al. 2011, Casas et al. 2011, Eerens et al. 1998, Franzluebbbers 2006, Franzluebbbers et al. 1999, García-Parisi et al. 2017, Iqbal et al. 2013, Jenkins et al. 2006, Omacini et al. 2004, 2006).

A partir de todos estos cambios, los endófitos podrían tener impactos sobre la estructura y composición de las comunidades vegetales y los ecosistemas.

1.2.4. Interacciones entre múltiples simbiosis

En los sistemas naturales y los agroecosistemas es usual encontrar plantas asociadas a distintos tipos de simbiontes. La presencia simultánea de dos o más simbiontes pueden inducir efectos aditivos o interactivos sobre los beneficios que pueden obtener tanto la planta hospedante como las plantas presentes en el vecindario (García-Parisi y Omacini 2019). Los primeros, ocurren cuando los beneficios que la planta obtiene por la presencia simultánea de dos o más simbiontes, son equivalentes a los efectos acumulativos de cada uno (García-Parisi y Omacini 2019). Encambio, los efectos interactivos, ocurren cuando la combinación de los simbiontes genera un beneficio mayor (sinergismo) o menor (antagonismo) en el rendimiento de la planta en comparación a los efectos acumulativos de cada uno de ellos (García-Parisi y Omacini 2019).

Los rizobios y los HMA pueden formar simbiosis con la mayoría de las leguminosas. Esta simbiosis tripartita juega un papel fundamental en los ecosistemas terrestres ya que influye en la productividad de las plantas, la nutrición y la estructura de las comunidades (Bauer et al. 2012, Ossler et al. 2015). Generalmente, estos simbiontes actúan de forma sinérgica aumentando el crecimiento y el rendimiento de sus hospedantes (Antunes y Gross 2005, de Varennes y Goss 2007, Meghvansi et al. 2008, Kaschuk et al. 2009). Esto se debe a que los rizobios y los HMA proporcionan nutrientes que son necesarios no solo para las plantas, sino también para los simbiontes. La enzima nitrogenasa (encargada de fijar N_2 en los rizobios) tiene un alto requisito en fósforo (P; (Suliman y Tran 2013). La simbiosis con HMA alivia el estrés de P para la planta, y a su vez aumenta la nodulación de la raíz y los niveles de fijación de N_2 (Bethlenfalvay y

Le Tacón 1990, Graham et al. 1981, Larimer et al. 2014). Contrariamente, los HMA son demandantes de N (Johnson 2010), por lo que, al mejorar el estado de N de la planta, la presencia de los rizobios también beneficia el desarrollo de las micorrizas (Bethlenfalvay y Le Tacón 1990, Graham et al. 1981).

Las gramíneas pueden formar simbiosis tanto con hongos endófitos como con HMA, y estas simbiosis simultáneas pueden ocurrir en ecosistemas naturales y agrícolas. Sin embargo, la presencia de endófitos genera efectos contrastantes sobre la colonización de HMA en el mismo hospedante. Por un lado, se ha visto que los endófitos disminuyen la colonización de HMA en plantas de *Schenodorus phoenix* (Mack y Rudgers 2008), *Lolium perenne* (Liu et al. 2011) y *L. multiflorum* (Omacini et al. 2006). Por el contrario, se observó una mayor tasa de colonización de micorrizas en las plantas de *Poa bonariensis* y *Bromus auleticus* en presencia de endófitos (Arrieta et al. 2015, Novas et al. 2005, 2009, Vignale et al. 2016 y 2018). Según investigaciones recientes, el efecto que producen los endófitos sobre la micorrización de la planta hospedante dependería de la identidad de los HMA (Larimer et al. 2012, Liu et al. 2011, Zhou et al. 2016) y del nivel de infección de la planta que creció antes en el mismo suelo (García-Parisi y Omacini 2017) o en el vecindario junto con otras plantas (Omacini et al. 2006). Con respecto al rendimiento de la gramínea hospedante, se ha visto que la presencia simultánea de estos dos simbiontes puede generar efectos no interactivos (Mack y Rudgers 2008, Larimer et al. 2012, Vignale et al. 2016), antagónicos (Liu et al. 2011, Guo et al. 2017) o sinérgicos (Li et al. 2018, Zhou et al. 2016). Estos resultados contrastantes dependen principalmente de la especie de la planta y la especie de HMA.

En algunos agroecosistemas es usual encontrar gramíneas asociadas a endófitos coexistiendo con leguminosas asociadas a rizobios. En estos casos, se ha visto que la presencia de endófitos puede aumentar la nodulación (Eerens et al. 1998) o disminuir la

nodulación sin afectar la cantidad de N fijado por la planta hospedante (García-Parisi et al. 2015). Incluso, algunos trabajos detectaron que la presencia de endófitos no aumentó la tasa de fijación de N₂ por la simbiosis leguminosa-rizobio, pero sí aumentó la cantidad de N que fue transferido a la gramínea hospedante (Slaughter et al. 2016). Además, la presencia de endófitos puede proteger no solo a sus gramíneas hospedantes sino también a las leguminosas vecinas contra insectos (García-Parisi et al. 2014). Como esta protección se da únicamente cuando la leguminosa está asociada a los rizobios, el efecto sinérgico surge de la presencia simultánea de ambas especies de plantas y ambos simbioses (García-Parisi et al. 2014, García-Parisi y Omacini 2019).

Los estudios que incluyen la interacción de endófitos *Epichloë*, HMA y rizobios son escasos. La formación de redes comunes de micorrizas entre las gramíneas y leguminosas podrían actuar como canales de transferencia para nutrientes y señales que inducen protección (Barto et al. 2012). Teniendo en cuenta esto, las redes podrían ser los canales por los cuales se transfiere el N fijado desde la leguminosa a la gramínea vecina (Slaughter et al. 2016) o por donde las gramíneas asociadas a endófitos defienden a las leguminosas asociadas a rizobios (García-Parisi et al. 2014). Sin embargo, se necesitan más estudios para desentrañar el papel que cumplen las redes de HMA entre estas dos simbiosis.

1.3. PROCESO DE RETROALIMENTACIÓN PLANTA-SUELO

En los últimos años, el concepto de retroalimentación planta-suelo (retroalimentación PS o “plant-soil feedback” en inglés) ha adquirido gran importancia en la ecología debido al papel que desempeña en la composición de las comunidades vegetales y el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (van der Putten et al. 2013, 2016). Se denomina retroalimentación PS, al proceso en el que las plantas afectan el

crecimiento de la misma o de diferentes especies al modificar las propiedades bióticas y abióticas del suelo en el que viven (Klironomos 2002, Rudgers y Orr 2009, van der Putten et al. 2013). Los cambios en las propiedades del suelo - también conocidos como “efectos de legado”- pueden persistir a lo largo del tiempo, afectando no solo a plantas vecinas sino también a plantas que crecen en la siguiente generación (Bever et al. 1997, van der Putten et al. 2013). De esta manera, a través de un legado “invisible” las plantas presentes podrían afectar a otras a pesar de no estar presentes en suelo, lo que tendrían grandes implicancias sobre la diversidad, composición y productividad de una comunidad vegetal (Bever et al. 1997, van der Putten et al. 2013). Sin embargo, el impacto que una planta tiene sobre otra es específico de cada especie y esto determinará cómo los efectos de la retroalimentación PS afectan la composición y funcionamiento de la comunidad vegetal (Bardgett y Wardle 2010).

1.3.1. Mecanismos de retroalimentación planta-suelo (PS)

En un principio, la retroalimentación PS se estudiaba considerando a los efectos de legado (i.e. cambios en el suelo inducidos por las plantas) como una “caja negra” (Cortis y de Devn 2012). Sin embargo, hoy en día sabemos que las plantas pueden generar estos efectos de legado a través de dos mecanismos: mediante la liberación de exudados radicales o mediante la deposición y acumulación del material muerto vegetal (broza) (Figura 1.4; Ehrenfeld et al. 2005, van der Putten et al. 2013, Veen et al. 2019). A pesar de que, durante el crecimiento de la planta, una pequeña porción de tejidos muere y se deposita en el suelo (es decir, hojas que se caen, pequeñas raíces que mueren para que nuevas raíces puedan explorar más suelo, etc.) es necesario desentrañar las interacciones entre todos estos procesos para comprender cómo funciona la retroalimentación PS. A su vez, a través de estos dos mecanismos, las plantas pueden tener efectos **directos** sobre otras plantas o **indirectos** a través de modificar a la comunidad biótica del suelo. Para

entender realmente los procesos de retroalimentación PS es necesario estudiar qué sucede cuando estos son producidos por los tejidos vivos y muertos por separado y reconocer si hay otros grupos de especies involucrados.

1.3.1.A. *Retroalimentación planta-suelo generada por los exudados radicales*

Durante su crecimiento, las plantas fijan carbono, absorben nutrientes y, además, liberan una enorme variedad de compuestos químicos a la rizósfera a través de la exudación radical. Dentro de los exudados, es usual encontrar metabolitos primarios como los azúcares, aminoácidos y ácidos carboxílicos, así como también encontramos metabolitos especializados (antes denominados metabolitos secundarios, i.e. compuestos que no están involucradas en el metabolismo primario, pero que tienen funciones claves en las adaptaciones de las plantas a ciertas situaciones ecológicas) (Pichersky y Lewinsohn 2011) tales como los compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, terpenos, etc. (Cesco et al. 2010, Uren 2000). La composición y cantidad de los compuestos exudados al suelo está determinada por la especie de planta, su etapa de desarrollo, el ambiente abiótico del suelo rizosférico y los componentes bióticos (Bardi y Vivanco 2009, Uren 2000). También, los componentes bióticos aéreos y subterráneos del ecosistema (como los herbívoros, las plantas competidoras, los patógenos, los simbioses y los descomponedores) pueden alterar la concentración y cantidad de los exudados radicales (Bais et al. 2006, Bardegett et al. 1998, Guo et al. 2015, Inderjit et al. 2011, Inderjit y Weston 2003).

La retroalimentación PS generada por la exudación radical, se da únicamente por **vías químicas** (Figura 1.4) y juega un papel importante en las interacciones entre plantas y, entre plantas y microorganismos presentes en la rizósfera (Huang et al. 2014). Esto se debe a que las plantas, a través de los exudados radicales, pueden tener efectos

alelopáticos sobre plantas vecinas y/o plantas que crecen en la siguiente generación. Según la “Sociedad Internacional de Alelopatía” (<http://allelopathy-society.osupytheas.fr/about/>), se denomina alelopatía al efecto directo o indirecto, positivo o negativo, que las plantas tienen sobre otras plantas través de la producción de metabolitos primarios o específicos (aleloquímicos) que afectan su crecimiento y/o desarrollo (Figura 1.4). Estos compuestos alelopáticos pueden afectar **directamente** a otras plantas y generar efectos positivos o negativos. Por ejemplo, la liberación de nutrientes en el suelo puede generar un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas debido a que aumentan su disponibilidad en el suelo (Keiluweit et al. 2015, Malamy 2005). Pero existen otro tipo de compuestos que pueden generar efectos negativos reduciendo el crecimiento y/o establecimiento de otras plantas (Bais et al. 2006, Inderjit et al. 2011, Inderjit y Weston 2003). Además, las plantas pueden influir **indirectamente** en su propio desarrollo y el de otras plantas a través de modificar la composición de diferentes componentes de la comunidad biótica del suelo (Figura 1.4; Bever 1994, van der Putten et al. 1993). Esto se debe a que, a través de los exudados, las plantas pueden liberar compuestos alelopáticos al suelo que modifican la densidad de patógenos o de mutualistas generando una reducción o un aumento en la productividad de las plantas (Bais et al. 2004, Bever et al. 1997, Klironomos 2002).

1.3.1.B. *Retroalimentación planta-suelo generada por la acumulación de la broza*

Al final de la estación de crecimiento, los tallos y hojas muertas de las plantas (en adelante, broza aérea: BA) se acumulan sobre la superficie del suelo, mientras que las raíces muertas (en adelante, broza subterránea: BS) se acumulan dentro del suelo. Hasta el momento de su descomposición, los tejidos muertos pueden inducir efectos positivos o negativos sobre otras plantas a través de vías físicas y/o químicas (ver Figura 1.4; Bennet y Klironomos 2019, van der Putten et al. 2013, Veen et al. 2019). Si bien en

condiciones naturales, las vías físicas y químicas por las que se genera la retroalimentación PS mediada por la broza se da en forma simultánea, esta clasificación nos permite entender qué es lo que sucede en los sistemas naturales o en los agroecosistemas. Las **vías físicas** están relacionadas con la acumulación de broza aérea que actúa como una barrera que puede afectar **directamente** a otras plantas a través de modificar las condiciones micro-climáticas para la germinación de semillas (es decir, la radiación entrante, la temperatura y la amplitud térmica, la humedad del suelo y la evaporación del agua; Eckstein y Donath 2005, Facelli y Pickett 1991a y 1991b) y/o impedir la emergencia de las plántulas (Donath y Eckstein 2008, Facelli y Pickett 1991a, Ruprecht y Szabo 2012). Por otro lado, las **vías químicas** están relacionadas con la liberación de compuestos alelopáticos como nutrientes y metabolitos especializados, durante los procesos de lixiviación y de descomposición (Wardle et al. 1998). La lixiviación y descomposición de la broza dependen de las condiciones ambientales, principalmente las lluvias, la temperatura, la capacidad de la biota presente, el material vegetal y la naturaleza de ese tejido (Lemons et al. 2005, Omacini et al. 2004). Al igual que con los exudados radiculares, la liberación de compuestos químicos al suelo puede alterar **directamente** las interacciones entre plantas o hacerlo **indirectamente** a través de afectar a la comunidad biótica del suelo (Figura 1.4; Manrubia et al. 2020).

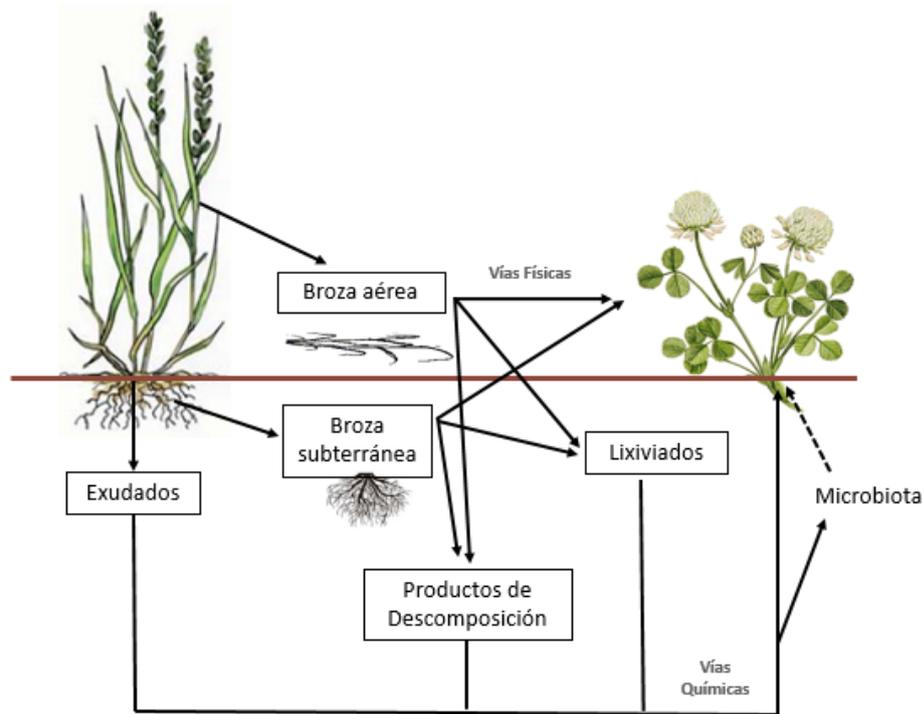


Figura 1.4. Representación esquemática de los efectos de legado. Las plantas pueden modificar las propiedades del suelo a través de la liberación de exudados radicales durante su crecimiento o, al morir a través de la acumulación del material muerto (broza aérea y broza subterránea). Estos dos mecanismos pueden, a su vez, darse por vías físicas o químicas. La broza puede actuar mediante vías físicas que están relacionadas con la formación de una barrera que modifica las condiciones micro climáticas afectando directamente (líneas llenas) la germinación e impide la emergencia de plántulas. Por otro lado, las vías químicas pueden darse a través de la liberación de compuestos químicos al suelo por las raíces de plantas vivas o durante los procesos de lixiviación y descomposición de la broza. Una vez en el suelo, los compuestos liberados pueden afectar directamente a las plantas o afectarlas indirectamente (línea punteada) a través de modificar la microbiota. Dependiendo de la naturaleza de esos compuestos químicos, los efectos pueden ser positivos o negativos.

1.3.2. El papel de la simbiosis en la retroalimentación planta-suelo

La retroalimentación PS puede ser modificada por la presencia de patógenos, insectos, microorganismos simbiotes y descomponedores (van der Putten et al. 2016, Wardle 2002). Esta tesis se centra en comprender cómo las interacciones simbióticas entre plantas y microorganismos beneficiosos pueden modificar los procesos de retroalimentación PS y así afectar la composición y funcionamiento de una comunidad vegetal.

Los simbioses pueden afectar los procesos de retroalimentación PS de diferentes formas. Por un lado, las plantas pueden seleccionar y promover cambios en la densidad de microorganismos simbioses del suelo afectando a plantas de la misma especie o distinta especie. Esto sucede, por ejemplo, a través de la selección y promoción de algunos genotipos de rizobios y de HMA, los cuales podrían aumentar el éxito de una especie en particular y promover así su establecimiento (Smith y Read 1997, Wagg et al. 2015). Sin embargo, dado que los microorganismos del suelo responden diferente a la identidad de la planta, la promoción o desarrollo de algún microorganismo podrían beneficiar a algunas especies de plantas, pero perjudicar a otras presentes en el vecindario (Bennet y Klironomos 2019).

Por otro lado, los simbioses foliares, como los hongos endófitos asexuales del género *Epichloë*, pueden inducir cambios en su planta hospedante que a su vez afectan las propiedades del suelo, lo que tendría consecuencias sobre la retroalimentación PS (van der Putten et al. 2013, Wardle et al. 2004). Particularmente, se ha visto que los endófitos pueden afectar la actividad de distintos grupos de hongos y bacterias presentes en el suelo (Bowatte et al. 2011, Casas et al. 2011, Iqbal et al. 2013), de microorganismos descomponedores (Jenkins et al. 2006, Omacini et al. 2004), e incluso, pueden afectar a simbioses de raíz como los rizobios y los HMA (Antunes et al. 2008, Arrieta et al. 2015, Eerens et al. 1998, García-Parisi et al. 2017, Novas et al. 2005, 2009, 2011, Omacini et al. 2006, Vignale et al. 2016, 2018, 2020). Si bien se desconocen los mecanismos por los que esto sucede, estudios previos muestran que los endófitos inducen cambios en el metabolismo primario y especializado de su hospedante (Bastías et al. 2017, Bastías et al. 2018, Dupont et al. 2015, Rasmussen et al. 2009). Estos cambios, a su vez, pueden generar impactos en la composición y la concentración de los compuestos exudados por sus plantas hospedantes (Guo et al. 2015, 2016, Vignale et al. 2018). Por ejemplo, se ha

detectado que la presencia de endófitos aumenta la cantidad y la variedad de compuestos fenólicos exudados por su gramínea hospedante *Lolium multiflorum* (Ponce et al. 2009). Si bien el hongo solo subsiste en las semillas, al morir la planta todos los cambios químicos inducidos por el endófito en los tejidos vivos podrían alterar la calidad de la broza depositada por el hospedante (Gundel et al. 2016, Omacini et al. 2004). Debido a la protección contra la herbivoría y la disminución de su tasa de descomposición, también podría aumentar la cantidad de broza depositada (Omacini et al. 2004, pero ver Gundel et al. 2016). Por lo tanto, a través de modificar el legado que deja su hospedante (Omacini et al. 2009), los endófitos podrían afectar directa o indirectamente el establecimiento de otras plantas teniendo impactos sobre la estructura y funcionamiento de una comunidad.

1.4. SISTEMA DE ESTUDIO

Con la necesidad de aumentar la producción de alimentos, la agricultura y la ganadería se ha expandido hacia hábitats naturales (Foley 2011, Foley et al. 2005, Godfray et al. 2010). Dentro de los ecosistemas más alterados en el planeta se encuentran los pastizales y los bosques (Baldi y Paruelo 2008, Caride et al. 2012, Hoekstra et al. 2005, Paruelo y Sierra 2022, Sanderson et al. 2002). Particularmente, los pastizales concentran las principales áreas de agricultura y ganadería a nivel global (Hoekstra et al. 2005, Sanderson et al. 2002) y representan aproximadamente un tercio de la apropiación humana de la producción primaria global (Krausmann et al. 2013). Este bioma críticamente amenazado, además de contribuir con la producción de alimentos y poseer un gran valor de conservación (Sala y Paruelo 1997, Oyarzabal et al. 2020), provee diversos beneficios vinculados al ciclado de nutrientes, la productividad primaria, el suministro y la retención de agua, la regulación de flujos, el almacenamiento de carbono, el control de la erosión, la mitigación del clima, y la polinización (Bengtsson et al. 2019,

Lemaire et al. 2011). A pesar de su relevancia, los pastizales tienden a ocupar progresivamente parches más pequeños rodeados por tierras de cultivo (Perelman et al. 2017).

En nuestro país, la Región Pampeana (Figura 1.5) concentra la mayor cantidad de pastizales y pasturas (Soriano 1991, Gibson 2009, Viglizzo et al. 2011). Esta región, que incluye total o parcialmente a las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y La Pampa, se encuentra dedicada principalmente a la agricultura y la cría de ganado para la producción de carne (Baldi et al. 2006, Bilenca y Miñarro 2004, Soriano et al. 1991). Los pastizales y las pasturas de la Pampa Deprimida, en los que se promueven especies forrajeras, exóticas o naturalizas, son los recursos forrajeros que constituyen el principal sustento de la actividad y la economía ganadera (Cauhépé e Hidalgo 2005, Lemaire et al. 2011, Soriano 1991). Sin embargo, existen relictos de esta actividad en otras regiones (Oyarzabal et al. 2019, Soriano 1991, Viglizzo et al. 2001).

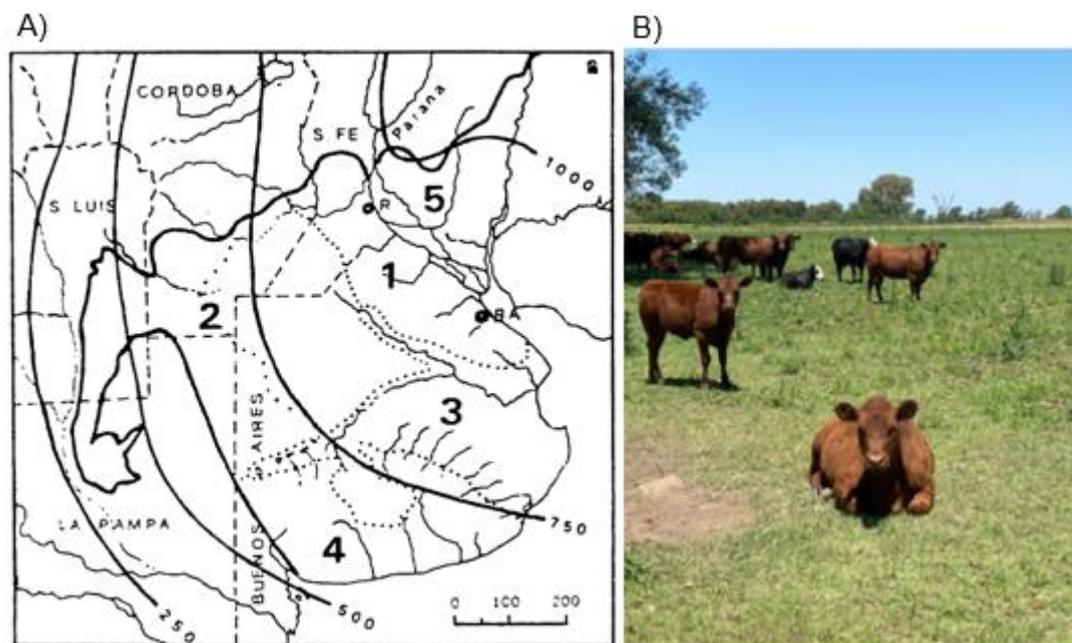


Figura 1.5. Región Pampeana de la Argentina, donde se muestra (A) un mapa de esta región con los límites provinciales y sus subregiones (1=Pampa Ondulada, 2= Pampa Interior, 3=Pampa Deprimida o Inundable, 4= Pampa Austral y 5=Pampa Mesopotámica, obtenida de León et al. 1984) y (B) la imagen de una pastura ubicada en la Pampa Ondulada dedicada a la cría de ganado, donde coexisten leguminosas y gramíneas.

En los ecosistemas pastoriles del mundo es usual encontrar una red de interacciones entre plantas, microorganismos simbiotes y herbívoros tanto domésticos como silvestres. Entender las interacciones que forman esta red podría ayudar a generar sistemas más sustentables que promuevan el aumento de la producción en los pastizales y pasturas del mundo. Las gramíneas, debido a su alta habilidad competitiva, tienden a dominar estos sistemas. Sin embargo, mediante distintas prácticas de manejo, se suelen introducir especies de leguminosas para aumentar no solo la calidad del forraje, sino también la productividad primaria y secundaria del sistema (Haynes 1980, Mortenson et al. 2005, Rani et al. 2022). Esto se debe a que las leguminosas tienen un mayor contenido de nitrógeno, un bajo contenido en fibra y un alto contenido en proteínas (Mortenson et al. 2005, Rani et al. 2022), características que benefician la nutrición animal (Chestnutt y Lowe 1970). Es por ello, que la coexistencia entre estas especies y el mantenimiento de las leguminosas ha sido durante mucho tiempo, de gran interés ecológico y agronómico (Andrews et al. 2011, Haynes 1980, Herben et al. 2017, Li et al. 2015, Sutherland et al. 1999).

Teniendo en cuenta las interacciones simbióticas en estos sistemas, se ha visto que la presencia de hongos endófitos puede afectar el establecimiento de las leguminosas (Bryant et al. 2009, Hoveland et al. 1999, Malinowski et al. 1999, Quigley 2000, Stevens y Hickey 1990, Sutherland y Hoglund 1989, Thom et al. 1999). Estos estudios sugieren que la inhibición de la leguminosa es causada por el impacto que el endófito tiene en la capacidad competitiva de su hospedante. Sin embargo, hoy en día se sabe que estos simbiotes modifican múltiples rasgos del hospedante que podrían afectar el establecimiento de las leguminosas y su interacción con los rizobios y HMA (García-Parisi et al. 2015 y 2017, Slaughter et al. 2016 y 2019, Vignale et al. 2016, 2018). De hecho, se ha propuesto que todos estos efectos podrían deberse a que el endófito afecta

los procesos de retroalimentación PS a través de cambios generados en el ambiente de la rizósfera del hospedante (Casas et al. 2011, García-Parisi et al. 2017, García-Parisi y Omacini 2017, Guo et al. 2015, 2016, Matthews y Clay 2001, Rudgers y Orr 2009). Para entender si estos efectos están dados por cambios inducidos por los hongos endófitos en la retroalimentación PS, es fundamental estudiar los mecanismos por los cuales esto sucede y separar los efectos de legado generados por las plantas vivas y muertas (Figura 1.6). Además, para promover el establecimiento de las leguminosas, es necesario analizar si estos efectos de retroalimentación se dan indirectamente a través de modificar su interacción con sus simbiontes de raíz (García-Parisi et al. 2015, 2017) o si lo hace directamente a través de liberación de compuestos alelopáticos que afectan negativamente el crecimiento y/o desarrollo de la planta (Sutherland et al. 1999, Vazquez-Aldana et al. 2011). Particularmente, se ha visto que los extractos de hojas vivas de *L. perenne* infectados con endófitos afectan el crecimiento de plantas de *T. repens* comparado con extractos de plantas libres de endófito (Sutherland et al. 1999). Efectos similares se observaron en *Festuca rubra* infectados con *Epichloë festucae* (Vazquez-Aldana et al. 2011). A través de los extractos de raíz y hojas liofilizadas de esta simbiosis se redujo la germinación de las semillas de *T. repens* (Vazquez- Aldana et al. 2011).



Figura 1.6. Plántulas de *Trifolium repens* (flechas rosas) creciendo junto a las plantas vivas (flechas rojas) y la broza (flechas amarillas) de *Lolium multiflorum* en una pastura pampeana. Foto: Marina Omacini.

1.5. OBJETIVO E HIPÓTESIS GENERAL

El **objetivo general** de esta tesis fue evaluar los mecanismos por los cuales la simbiosis entre gramíneas y hongos endófitos del género *Epichloë* afecta el éxito de una leguminosa y su interacción con otros simbiontes mutualistas (Figura 1.7). La **hipótesis general** es que los hongos endófitos reducen la capacidad que tienen las leguminosas de establecerse y de formar simbiosis mutualistas a través de la modificación de los compuestos químicos liberados por los tejidos vivos o muertos de su gramínea hospedante. Se **predice** que (1) los exudados radicales de las plantas de *Lolium multiflorum* asociadas a *Epichloë occultans* y (2) los compuestos lixiviados de su broza aérea y subterránea disminuyen el establecimiento de una leguminosa (efectos directos) y la colonización de sus raíces por HMA y rizobios (efectos indirectos).

Para cumplir con el objetivo de esta tesis, se estudiaron los distintos mecanismos por los cuales los hongos endófitos pueden modificar los procesos de retroalimentación PS (Figura 1.7). En primer lugar, se analizaron los efectos de retroalimentación PS

generados durante el crecimiento de la planta (tejidos vivos) en ausencia de la broza depositada (**Capítulo 2**). Allí se estudió si los endófitos afectan directa o indirectamente el establecimiento de la leguminosa a través de cambios en el legado químico dejado por su planta hospedante. En segundo lugar, se analizaron los efectos de retroalimentación PS generados por los tejidos muertos, en ausencia del legado químico generado por las plantas vivas. Particularmente, se evaluó el impacto que los distintos tipos de broza producidos por plantas con endófitos tienen sobre el establecimiento de la leguminosa y su interacción con los rizobios y los HMA (**Capítulo 3**). Para diferenciar las vías por las cuales esto sucede, se realizó una caracterización química de la broza aérea y subterránea generada por las gramíneas con o sin endófitos y se evaluó si los lixiviados generados a partir de los distintos tipos de broza afectan directa o indirectamente el establecimiento de una leguminosa (**Capítulo 4**).

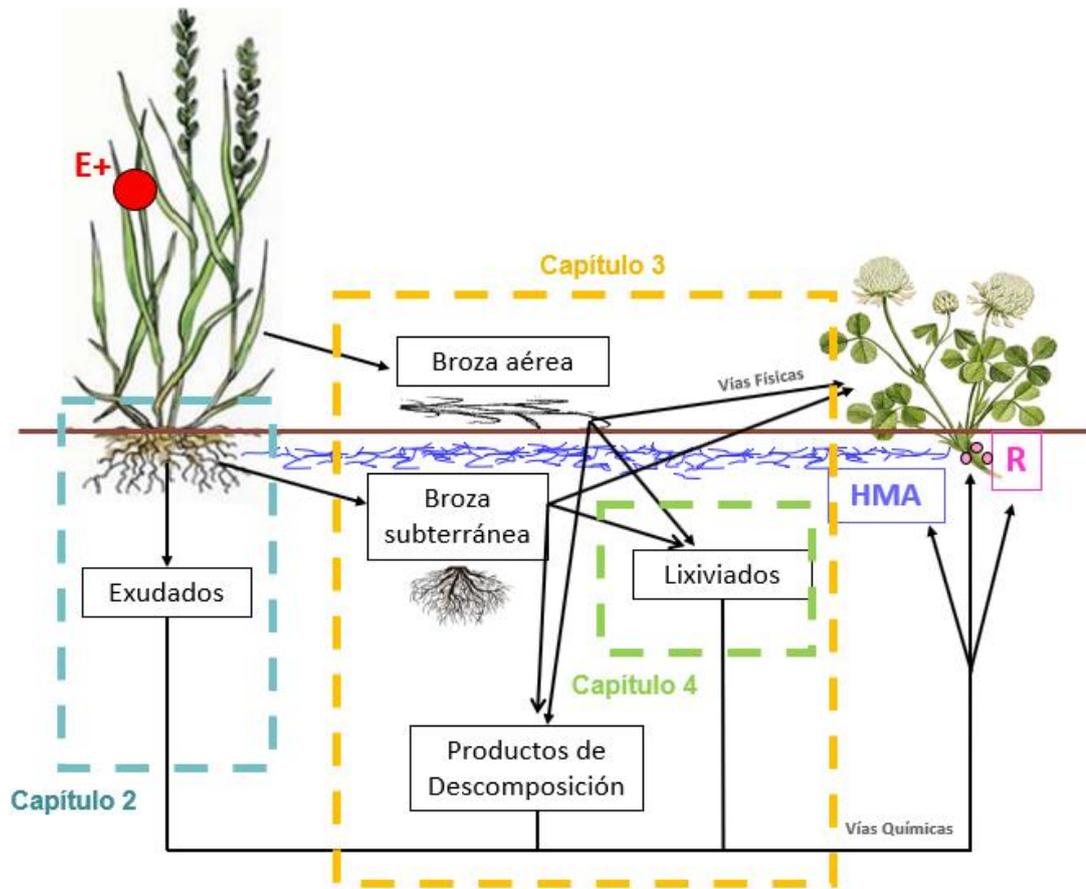


Figura 1.7. Esquema de la tesis. En cada capítulo (recuadros punteados en color) se analizaron los mecanismos por los cuales los hongos endófitos (E+) podrían modificar los efectos de legado generado por su planta hospedante y así afectar el establecimiento de la leguminosa. En cada caso, también se analizó si el legado generado por la simbiosis gramínea-endófito afectaba directamente el establecimiento de la leguminosa o si lo hacía indirectamente a través de modificar su interacción con rizobios (R) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA).

1.6. APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

En esta tesis se utilizó como modelo de estudio a *Lolium multiflorum* (Lam.), y a *Trifolium repens* (L.). *L. multiflorum* es una gramínea anual invernal, nativa de Europa que naturalmente hospeda al endófito asexual *E. occultans* (Leutchman et al. 2014). Esta gramínea se encuentra naturalizada en pastizales pampeanos (Soriano et al. 1991) y es promovida como forrajera invernal ya que forma una asociación que no es tóxica para el ganado (de Battista 2005). En estudios a largo plazo, se ha detectado que *L. multiflorum* persiste luego de 25 años de sucesión post-agrícola en campos de cultivo abandonados de

la Pampa Interior (Omacini et al. 2005, Tognetti et al. 2010). Por medio de experimentos a campo también se observó que el endófito favorece el establecimiento de la gramínea en diferentes comunidades con distintos estadios sucesionales en la Pampa Interior (Uchitel et al. 2011), al igual que aumenta su capacidad invasora en pastizales pastoreados de la Pampa Deprimida (Casas et al. 2016).

Las semillas, broza y lixiviados con distintos niveles de infección endofítica para todos los experimentos se generaron a partir de semillas de *L. multiflorum* provenientes de una población que presenta naturalmente un nivel de infección de aproximadamente 95% (Omacini et al. 2004). Estas semillas fueron cosechadas hace unos años en un pastizal sucesional tardío localizado en la Pampa Interior (Estancia San Claudio, Pdo. De Carlos Casares, Argentina 34°06' S 60°25'O). La mitad de esas semillas fueron tratadas con el fungicida triadimenol (0.5 g p.a./ 100 g de semillas) para remover al endófito (Omacini et al. 2006, 2009). Las semillas tratadas y no tratadas con fungicida (E- y E+, respectivamente) fueron cultivadas en 20 parcelas adyacentes de 1m² en el campo experimental del IFEVA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34°35'S, 58°35'O). Las semillas producidas por esas plantas luego de un ciclo de crecimiento fueron cosechadas (F1). Estas semillas se sembraron al año siguiente, para obtener semillas F2. Este proceso de sembrar semillas de *L. multiflorum* con distintos niveles de infección obtenidas del año anterior, se repitió cada año, durante 4 años consecutivos. Para cada experimento, se utilizaron las semillas y brozas obtenidas el año anterior a su realización. La presencia del endófito fue corroborada en cada caso mediante la observación de una sub-muestra de 30 semillas que fueron recolectadas en diciembre de cada año y teñidas con el colorante rosa de bengala (Bacon y White 1994). Las proporciones de individuos simbióticos y no simbióticos mencionadas en cada capítulo son las resultantes de esas observaciones.

La recolección de la broza se realizó siempre en el mes de febrero. Para ello, se recolectaron las hojas y tallos (BA: broza aérea) y las raíces muertas (BS: broza subterránea) producidas por plantas E+ y E- (Omacini et al. 2004, 2009). Tanto la BA como la BS fueron secadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta la realización de los experimentos. La BA no incluía las semillas ni las espigas de *L. multiflorum*. Y antes de cada experimento, las raíces fueron limpiadas con un pincel para eliminar la tierra remanente en dicho tejido.

La leguminosa *T. repens* es un trébol invernal perenne que se asocia con los rizobios de la especie *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. Esta leguminosa también se encuentra ampliamente distribuida en los pastizales pampeanos y presenta una amplia distribución potencial en zonas templadas a frías. En pastizales y pasturas se encuentra frecuentemente coexistiendo con *L. multiflorum*, razón por la cual constituye un buen modelo de estudio. Las semillas de *T. repens* utilizadas en esta tesis fueron obtenidas de un semillero (cv. Aquiles, Gentos S.A). En cada uno de los experimentos, se utilizó un inoculante líquido comercial que contiene $>10^9$ bacterias viables de *R. leguminosarum biovar trifolii* por ml (Ribol - Rizobacter Argentina S.A., Pergamino, Argentina). La nodulación se evaluó visualmente contabilizando el número de nódulos activos (determinado por la coloración rosa; Ott et al. 2005).

El inóculo de HMA consistió en una mezcla de hifas internas, externas y esporas (aproximadamente 30 esporas/g, García-Parisi et al. 2017, García-Parisi y Omacini 2017) de tres especies de hongos que naturalmente se observan en comunidades naturales y pastizales y son conocidos por colonizar gramíneas y tréboles: *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 irregularis* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler (BAFC 3108). El inóculo se obtuvo de la

multiplicación de cultivos puros de cada hongo en plantas de *Lotus tenuis* y *Bromus unioloides*. Se eligieron estas plantas debido a que son plantas muy micorrícicas y distintas a las utilizadas en los experimentos de esta tesis, lo que evita que se produzca una selección o especificidad por parte de algunas especies de las micorrizas anteriormente nombradas. Estas plantas se cultivaron en macetas con un sustrato que consistió en una mezcla de perlita y vermiculita estéril. Las plantas se regaron durante la primera semana con agua destilada y posteriormente con una solución Hoagland Half, tal como se han utilizado en experimentos previos del grupo (García-Parisi et al. 2017). A los tres meses, el riego se detuvo y las raíces de las plantas mostraron una colonización de HMA >80%. Una vez secas las plantas, se eliminó la parte aérea y se recolectó el resto de la maceta. De esta forma el inóculo consistió en una mezcla del sustrato, las raíces de las plantas y las esporas contenidas en las macetas. Si bien no se conoce la cantidad de esporas, en inóculos anteriores realizados en las mismas condiciones se encontraron 32 ± 3.4 esporas/g de suelo con un porcentaje de colonización menor. Esto nos permite inferir que los inóculos utilizados en este experimento son viables y podrían tener una cantidad de esporas similares, aunque lamentablemente, no podemos asegurar esta información. La micorrización (% de raíz colonizada por hifas, arbuscúlos y vesículas) se cuantificó mediante la observación microscópica (con un aumento de 200x; Phillips y Hayman 1970) de las raíces teñidas con azul de tripano que previamente fueron clarificadas en hidróxido de potasio (KOH), y acidificadas con ácido clorhídrico (HCL; McGonigle et al. 1990).

El sustrato utilizado en todos los experimentos fue extraído de un campo ubicado en Rojas, provincia de Buenos Aires (Establecimiento La Eternidad, 34°11'00"S 60°44'00"O), el cual posee pasturas perennes de sistemas con rotación agrícola-ganadero. Se seleccionó este establecimiento ya que no se siembra ni se promociona a *L.*

multiflorum. Cuando fue necesario, el suelo (clasificado como Argiudol típico) fue tindalizado para eliminar la carga de rizobios y HMA. El proceso de tindalización consistió en la esterilización del suelo mediante autoclave a 1 atm de presión y 100°C, durante 1 h, tres veces consecutivas con un intervalo de 24 h.

Capítulo 2

RETROALIMENTACIÓN PLANTA-SUELO GENERADA POR LOS EXUDADOS RADICALES PRODUCIDOS POR LA SIMBIOSIS GRAMÍNEA-ENDÓFITO

2.1. INTRODUCCIÓN

El proceso de retroalimentación planta-suelo (PS) involucra dos etapas (Bever 1994, Kardol et al. 2007). En una primera etapa, las plantas a través de distintos mecanismos modifican las propiedades bióticas y abióticas del suelo. Durante la segunda etapa, son estos cambios en el suelo los que pueden afectar el desempeño de plantas de la misma o distinta especie (Bever 2002, Ehrenfeld et al. 2005). Estudios previos, demostraron que la presencia de hongos endófitos foliares puede inducir cambios en el ambiente biótico y abiótico de su hospedante, y modificar así los procesos de retroalimentación PS (Casas et al. 2011, Cripps et al. 2013, García-Parisi et al. 2017, García-Parisi y Omacini 2017, Guo et al. 2015, 2016, Matthews y Clay 2001, Rudgers y Orr 2009). Sin embargo, estos estudios no separan los efectos inducidos por los tejidos vivos de aquellos inducidos por los tejidos muertos (Veen et al. 2019).

Particularmente, se sabe que los endófitos modifican la concentración y composición de los compuestos radicales que son exudados por sus plantas hospedantes (Guo et al. 2015, Patchett y Newman 2021, Ponce et al. 2009, Vignale et al. 2018). Una vez en el suelo, estos compuestos podrían afectar directamente a otras plantas o afectarlas indirectamente a través de modificar a la comunidad biótica del suelo (Figura 1.4). La microbiota del suelo cumple un papel clave en la retroalimentación PS (Bever 1994, van der Putten et al. 1993, van der Putten y Peters 1997) ya que, al modificar a los microorganismos presentes en la rizósfera, las plantas pueden afectar las interacciones entre plantas (Manrubia et al. 2019). De hecho, se sabe que la presencia de endófitos puede modificar la colonización de HMA en su propia planta hospedante (Arrieta et al. 2015, Liu et al. 2011, Mack y Rudgers 2008, Novas et al. 2005, 2009, Omacini et al. 2006, Vignale et al. 2016) y la interacción de otras plantas con HMA y rizobios (Antunes et al. 2008, García-Parisi et al. 2015, 2017, Omacini et al. 2006, Vignale et al. 2016,2020).

A través de estos cambios, los endófitos podrían tener impactos sobre la estructura y composición de la comunidad vegetal.

Los HMA y los rizobios pueden formar simbiosis con las leguminosas. En pastizales y pasturas, estos dos tipos de simbioses pueden actuar de forma sinérgica, teniendo impactos no solo en el rendimiento de su planta hospedante, sino que también tienen el potencial de reducir las ventajas competitivas que las gramíneas tienen sobre las leguminosas permitiendo el establecimiento de las mismas (Hall 1978, Siefert et al, 2018, Thompson et al. 2011, Wagg et al. 2011). Por lo tanto, al modificar la interacción que las leguminosas tienen con sus simbioses benéficos, los endófitos podrían afectar su establecimiento.

El objetivo de este capítulo fue estudiar cómo el legado químico producido por los tejidos vivos de las plantas con endófitos del género *Epichloë* modifica los procesos de retroalimentación PS (Figura 1.7, Figura 2.1). Para dilucidar los mecanismos por los cuales la simbiosis gramínea-endófito afecta el establecimiento de una leguminosa, aquí solo se analizaron los procesos de retroalimentación PS mediados por las plantas vivas, en ausencia de los distintos tipos de broza depositada (Veen et al. 2019). Como hipótesis, se planteó que los exudados liberados por la simbiosis gramínea-endófito perjudican a una leguminosa indirectamente a través de reducir su capacidad de asociarse a sus simbioses de raíz. Para analizar esto, se realizó un ensayo en dos etapas en donde se comparó el establecimiento de *T. repens* creciendo en suelos acondicionados por *L. multiflorum* con distintos niveles de infección endofítica y de inoculación con HMA, con suelos acondicionados por *T. repens* inoculados con rizobios y HMA (Figura 2.2). Se predice que los suelos acondicionados por *L. multiflorum* asociado a *E. occultans* reduce el establecimiento de *T. repens* solo en presencia de ambos tipos de simbioses de raíz.

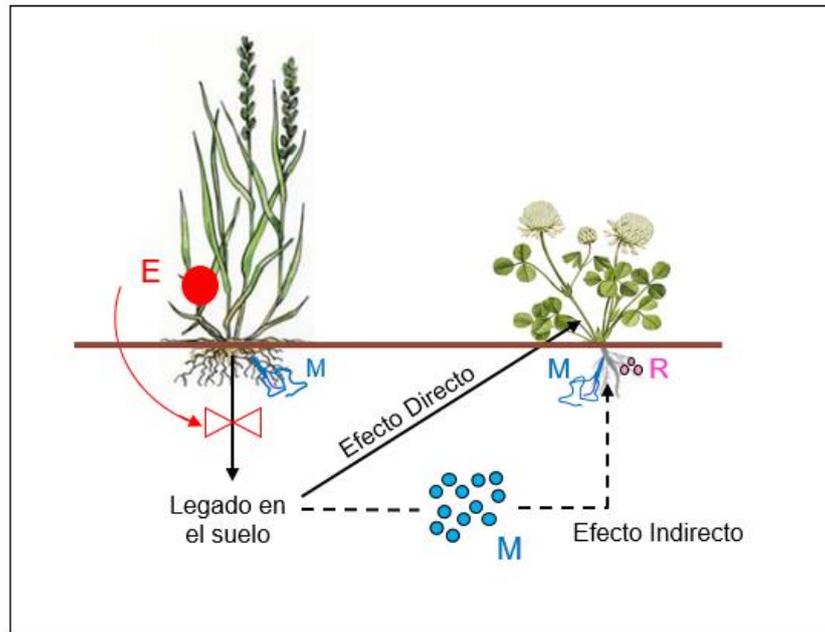


Figura 2.1. Representación esquemática del proceso de retroalimentación planta-suelo estudiado en este capítulo. La presencia de endófitos (E) modula el legado que los tejidos vivos de su planta hospedante dejan en el suelo (llave roja) a través de modificar la composición y concentración de los exudados radicales. Estos efectos de legado pueden ser alelopáticos y afectar directamente (línea llena) el establecimiento de una leguminosa que crece en la siguiente generación, o indirectamente (línea punteada) a través de modificar la microbiota del suelo y la capacidad que tiene la leguminosa de asociarse a rizobios (R: círculo color rosa) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (M: círculo color azul).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Diseño Experimental

Se realizó un experimento en dos etapas en macetas que fueron colocadas en el invernáculo de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (UBA). En la etapa de acondicionamiento (1era etapa), el suelo esterilizado fue acondicionado por plantas de *L. multiflorum* con niveles contrastantes de infección endofítica ($E^- < 5\%$ y $E^+ > 95\%$), inoculadas o no con HMA. En la fase de respuesta (2da etapa), se cultivaron plantas de *T. repens* inoculadas con rizobios en estos suelos acondicionados. Por lo tanto, el experimento consistió en un diseño factorial completo, en bloques al azar, con 6 repeticiones y dos factores: el nivel de infección endofítica de las plantas que generaron el legado (E^- : plantas de *L. multiflorum* con bajo nivel de infección endofítica, y E^+ :

plantas de *L. multiflorum* con alto nivel de infección endofítica) y la adición de inóculo de HMA (M= M+: suelos con la adición de inóculo en la etapa de acondicionamiento, y M-: suelos sin la adición de inóculo en la fase de acondicionamiento). Además, se generaron dos tipos de controles en la etapa de acondicionamiento que consistieron en macetas con plantas de *T. repens* inoculadas con rizobios y con la adición o no de inóculo de HMA (Control M+ y Control M-). De la combinación de estos factores y sus repeticiones, se obtuvieron 36 macetas (Figura 2.2). Los materiales biológicos utilizados en este experimento se describieron en el Capítulo 1, sección 1.6. Este experimento permite comparar el establecimiento de *T. repens* en suelos acondicionados por su misma especie (control) con los suelos acondicionados por *L. multiflorum* en presencia de niveles contrastantes de infección con dos tipos de simbioses diferentes.

2.2.2 Etapa de acondicionamiento

La etapa de acondicionamiento se llevó a cabo durante los meses de junio y octubre del 2019. Para generar los diferentes tipos de legado en el suelo, se llenaron 36 macetas de 1.5 L con tierra esterilizada. En 12 macetas se sembraron 20 semillas de *L. multiflorum* E-, en otras 12 macetas se sembraron semillas de *L. multiflorum* E+ y en las últimas 12 se sembraron 20 semillas de *T. repens* a las que se le agregó 1 ml de inóculo de rizobio que contenía *R. leguminosarum* biovar *trifolli*. Además, a la mitad de ellas se les agregó 10 g de inóculo de HMA, mientras que la otra mitad no fue inoculada (Figura 2.2).

Después de 4 meses de riego continuo, se interrumpió el suministro de agua por 2 semanas para que el suelo se secase. Luego de ese tiempo, los suelos fueron recolectados para utilizarse en la segunda etapa del experimento. Para ello, en todas las macetas se cortaron las hojas y tallos vivos y muertos. Para quitar las raíces vivas y muertas, el suelo

fue tamizado dos veces consecutivas con tamices de 1 mm de tamaño de poro. En esta etapa no se encontraron diferencias ni en la biomasa, ni en el porcentaje de raíces colonizadas por HMA en las plantas de *L. multiflorum* E- y E+ ($p > 0.05$). Tampoco hubo signos de daño por patógenos o herbívoros.

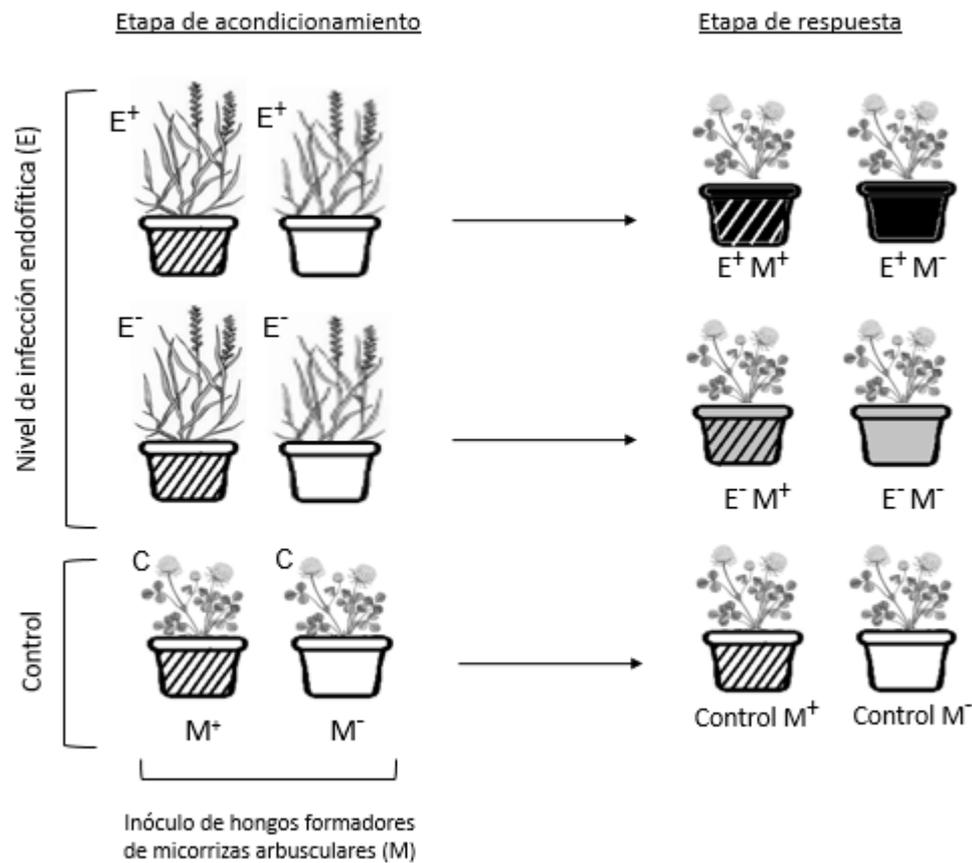


Figura 2.2. Representación esquemática del enfoque experimental. La etapa de acondicionamiento del suelo se generó cultivando plantas de *Lolium multiflorum* con niveles bajos o altos de infección endofítica (E- y E+, respectivamente) en macetas inoculadas o no con hongos formadores de micorrizas arbusculares (M+: macetas rayadas, M-: macetas lisas). También, se generaron dos tipos de control cultivando plantas de *Trifolium repens* inoculadas con rizobios y con M+ o M-. Después de cuatro meses, se recolectaron los 6 tipos de suelo que contenían los distintos tipos de legado. Esos suelos se utilizaron en la etapa de respuesta, donde se sembraron plantas de *T. repens* inoculadas nuevamente con rizobios. Es decir, en esta etapa se obtuvieron 6 tratamientos donde plantas de *T. repens* crecieron en suelos inoculados o no con micorrizas y acondicionadas por su propia especie (Control M+: macetas blancas y rayadas, Control M-: macetas blancas y lisas), o por plantas de *L. multiflorum* con baja (E-M+: macetas grises y rayadas, E-M-: macetas grises y lisas) o alta (E+M+: macetas negras y rayadas, E+M-: macetas negras y lisas) frecuencia de infección endofítica.

2.2.3. Fase de respuesta

La segunda etapa se llevó a cabo en el mismo invernáculo entre octubre y diciembre del 2019. Aquí se sembraron 10 semillas de *T. repens* en los 6 tipos de suelos acondicionados que fueron generados en la etapa anterior (Figura 2.2). Cada maceta se inoculó nuevamente con rizobios, sin embargo, no se agregó inóculo de HMA (la presencia o ausencia de HMA en esta etapa dependió de los propágulos que quedaron en la fase de acondicionamiento).

Una vez por semana se contabilizó el número de plántulas de *T. repens*. Aquí solo se muestra el número de plántulas establecido desde el día 7 (considerado como emergencia) hasta el día 42 después de la siembra (considerado como establecimiento), ya que el número de plántulas en todas las macetas se mantuvo constante a partir de entonces. No se detectaron plántulas muertas ni daños por herbívoros o patógenos. Con estos datos se calculó la velocidad de establecimiento como:

$$S = \frac{(N_1 \times 1)}{1} + \frac{(N_2 - N_1)}{2} + \frac{(N_3 - N_2)}{3} + \dots + \frac{(N_n - 1)}{n} \quad (1)$$

Donde N_1 , N_2 , N_3 y N_n representan la proporción de semillas que germinaron la primera (1), segunda (2), tercera (3) y última (n) semana del experimento (Chiapusio et al. 1997).

Además, se calculó el efecto de retroalimentación PS utilizando los datos de establecimiento en el índice RII modificado de Armas et al. (2004) para que se ajuste a las definiciones de retroalimentación PS planteadas por Bever (1994) y Klironomos (2004). Este índice fue calculado de la siguiente manera:

$$ER = \frac{(\text{establecimiento en suelos Control} - \text{establecimiento en suelos acondicionados por } L.\text{multiflorum})}{(\text{establecimiento en suelos Control} + \text{establecimiento en suelos acondicionados por } L.\text{multiflorum})} \quad (2)$$

Donde “establecimiento” corresponde al número de plántulas establecidas en cada tratamiento. Estos efectos se calcularon por separado para los suelos con o sin la adición de inóculo de HMA (M+ y M-) y para los distintos niveles de infección endofítica de las plantas de *L. multiflorum* (E+ y E-). Para cada caso, también se calcularon los intervalos de confianza (IC) del 95%. Teniendo en cuenta este índice, los efectos de retroalimentación PS pueden tomar valores entre -1 y 1, y ser considerados como neutros, positivos o negativos (Figura 2.3):

- Si el IC del 95% contiene el valor cero, el efecto de retroalimentación PS fue considerado **neutro** (ver Figura 2.3); lo que indica que el establecimiento de plantas de *T. repens* fue igual en suelos acondicionados por sí mismo y por las plantas de *L. multiflorum* (Bever 1994, Klironomos 2004).
- Si el IC del 95% no contiene el valor cero y toma valores positivos (>0), el efecto de retroalimentación fue considerado **positivo** (ver Figura 2.3); lo que significa que el establecimiento de *T. repens* fue mayor en los suelos control que en los suelos acondicionados por *L. multiflorum* (Bever 1994, Klironomos 2004).
- Si el IC del 95% no contiene el valor cero y toma valores negativos (<0), la retroalimentación se consideró **negativa** (ver Figura 2.3); lo que significa que el establecimiento de *T. repens* fue menor en suelos acondicionados por sí mismo en relación con los suelos acondicionados por *L. multiflorum* (Bever 1994, Klironomos 2004).

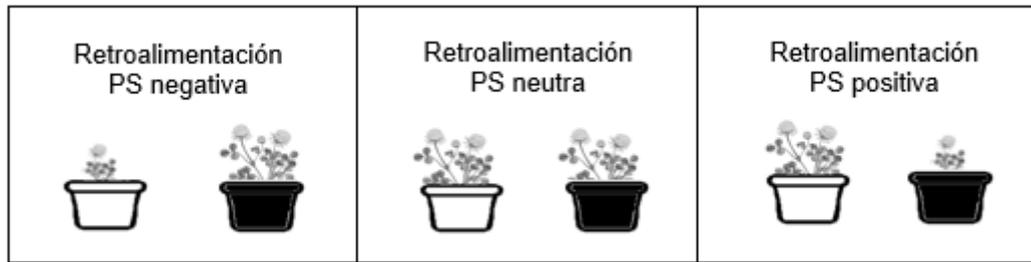


Figura 2.3. Representación esquemática de los efectos de retroalimentación planta-suelo (PS). Para analizar estos efectos, se comparó el número de plántulas de *Trifolium repens* establecidas en suelos acondicionados por su propia especie (macetas blancas) con el número de plántulas establecidas en suelos acondicionados por *Lolium multiflorum* independientemente del nivel de infección endofítica (macetas negras). Esto se hizo según la ecuación (2). La retroalimentación PS negativa indica un menor establecimiento en suelos acondicionados por *T. repens* que en suelos acondicionados por *L. multiflorum*. Una retroalimentación PS neutra, indica que el establecimiento fue el mismo en suelos acondicionados por *T. repens* y por *L. multiflorum*. Por último, una retroalimentación PS positiva indica un mayor establecimiento en suelos acondicionados por *T. repens* que en suelos acondicionados por *L. multiflorum*.

Al final del experimento, se extrajo el sustrato con las plantas presentes en cada una de las macetas. Este sustrato fue sumergido en un cajón de aproximadamente 20 L de capacidad, el cual contenía agua. Esto permitió la separación de las raíces y la obtención de las plantas individuales presentes en cada una de ellas. La biomasa aérea fue recolectada y secada en estufa a 60°C durante 48 h. Luego, se evaluó la nodulación y la micorrización en las raíces obtenidas como se describe en la sección 1.6 de la introducción. Con respecto a la micorrización, por un lado, no se observaron vesículas en ninguna de las raíces analizadas. Por el otro lado, sólo se encontraron hifas y arbusculos en las raíces de *T. repens* que crecieron en los suelos inoculados con HMA (M+) al inicio de la fase de acondicionamiento. Debido a que ninguna estructura fue observada en las raíces de *T. repens* que crecieron en suelos sin inocular (M-), es que en los resultados solo se muestran los datos correspondientes a los tratamientos M+.

2.2.4. Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados con modelos lineales mixtos (LMM) y modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) con las funciones *lmer* y *glmmTMB* del paquete *lme4* y *glmmTMB*, utilizando el software estadístico R. Para el número de plántulas de *T. repens*, se analizaron estadísticamente los datos correspondientes a la velocidad de establecimiento, la emergencia (7 días después de la siembra) y establecimiento (42 días después de la siembra). La velocidad de establecimiento, la emergencia y el establecimiento de plántulas de *T. repens*, la, el efecto de retroalimentación PS, el porcentaje de raíz colonizada por HMA y el número de nódulos, se analizaron en modelos separados que incluían el nivel de infección endofítica de la planta que dejó el legado (E), la adición de inóculo de HMA (M) y su interacción (ExM) como factores fijos y los bloques como efecto aleatorio. La emergencia y el establecimiento de las plántulas, la velocidad de establecimiento y el porcentaje de raíz colonizado por las distintas estructuras de HMA fueron analizadas con LMM asumiendo una distribución normal. También se realizó una prueba de T-Student para analizar si el efecto de la retroalimentación PS difería significativamente de cero. El número de nódulos se analizó utilizando GLMM. Debido a la sobre-dispersión de los datos, se utilizó la función *glmmTMB* y se especificó la familia “binomial negativa” para el modelo. Además, se realizó un análisis de la nodulación que incluía el número de plántulas y la maceta como factor aleatorio. Sin embargo, como la inclusión de estos factores no provocó cambios significativos en los resultados del análisis y la varianza explicada por estos factores fue muy baja, se decidió utilizar el modelo más simple y parsimonioso.

La biomasa de *T. repens* se analizó dependiendo de la planta que generó el legado en el suelo. Esto se hizo debido a la gran diferencia de biomasa obtenida entre ellos y para comparar el impacto de los diferentes simbiontes en la biomasa de las plantas. Por un

lado, se analizó la biomasa de *T. repens* en los suelos control utilizando la adición de inóculo de HMA (M) como factor fijo y los bloques como aleatorios. Por otro lado, se analizó la biomasa de *T. repens* creciendo en suelos acondicionados por *L. multiflorum* utilizando el nivel de infección endofítica de la gramínea (E), la inoculación con HMA (M) y su interacción (ExM) como factores fijos y los bloques como aleatorios. Ambos fueron analizados con LMM, asumiendo una distribución normal.

La distribución normal de los residuos se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk, la homogeneidad de varianza con la prueba de Levene y en ambos casos los residuos se evaluaron gráficamente. En todos los casos, la importancia de los factores fijos en los modelos de *lmer* y *glmmTMB* se probó utilizando la prueba de razón de probabilidad (Likelihood Ratio Test, LRT).

2.3. RESULTADOS

La emergencia de plántulas de *T. repens*, fue afectada interactivamente por el nivel de infección endofítica de las plantas de *L. multiflorum* y la adición de inóculo de HMA (Figura 2.4, Cuadro 2.1, ExM: $p=0.03$). La inoculación con HMA al inicio de la etapa de acondicionamiento, no aumentó la emergencia de plántulas de *T. repens* cuando ésta crecía en suelos acondicionados por su propia especie (Control M- y Control M+). Sin embargo, la adición de inóculo de HMA en los suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* con alto nivel de infección endofítica (E+M+) aumentó la emergencia en un 64% en comparación con los otros tratamientos (E-M+, E-M-, E+M-, $p<0.05$).

De igual forma, el establecimiento de las plántulas de *T. repens* dependió del nivel de infección endofítica y de la adición de inóculo de HMA (Figura 2.4, Cuadro 2.1, ExM: $p<0.001$). Aquí, el inóculo de HMA, incrementó el establecimiento de las plántulas de *T. repens* en un 66% cuando éstas crecían en suelos acondicionados por su propia especie

(Control M+) y por *L. multiflorum* con alto nivel de infección endofítica (E+M+) en comparación con el resto de los tratamientos (Control M-, E+M-, E-M- y E-M+, $p < 0.05$).

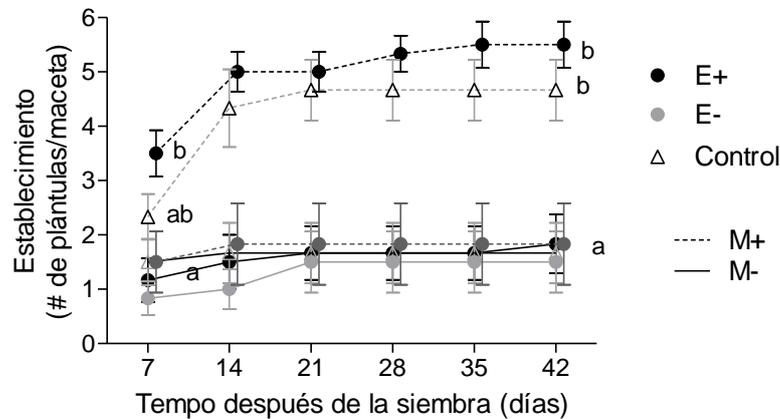


Figura 2.4. Número de plántulas de *Trifolium repens* (media \pm EE, $n=6$) establecidas en macetas con la adición de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares (M+: macetas con agregado de inóculo, línea punteada y M-: macetas sin el agregado de inóculo, línea llena), y acondicionadas por su propia especie (Control: triángulo) o por *Lolium multiflorum* con bajo (E-: círculo gris) o alto (E+: círculo negro) nivel de infección endofítica. Solo se muestran los análisis estadísticos para los valores de emergencia (7 días después de la siembra) y establecimiento (42 días después de la siembra). Las letras diferentes indican diferencias significativas para ($p < 0.05$).

Con el número de plántulas establecidas por día, también se calculó la velocidad de establecimiento (Cuadro 2.1, ExM: $p=0.015$). Los tratamientos Control M+ y E+M+ tuvieron una velocidad de establecimiento casi tres veces superior al resto de los tratamientos (Control M-, E+M-, E-M- y E-M+, $p < 0.05$).

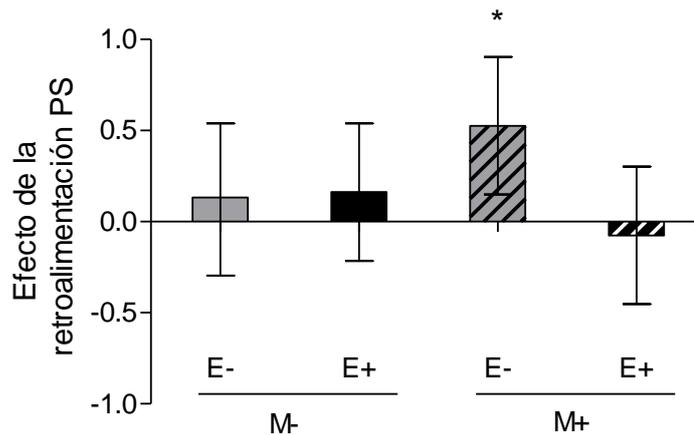


Figura 2.5. Efecto de la retroalimentación planta-suelo (media \pm IC 95%, n=6). Esto se estimó utilizando la ecuación (2) y se realizó por separado teniendo en cuenta si el suelo fue inoculado o no con hongos formadores de micorrizas arbusculares (M+: suelos con la adición de inóculo, barras rayadas y M-: suelos sin la adición de inóculo, barras lisas) y el nivel de infección endofítica en las plantas de *L. multiflorum* (E-: bajo nivel de infección, barras grises y E+: alto nivel de infección, barras negras). * representa el tratamiento distinto de cero.

En tratamientos M+, el efecto de retroalimentación PS pasó de positivo a neutro debido a la presencia previa del endófito en la gramínea que acondicionó el suelo (Figura 2.5). Se encontró una retroalimentación PS positiva en los suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* con bajos niveles de infección endofítica (Figura 2.5; IC del 95% de E-M+= 0.149 a 0.904, T=3.39, p=0.02). Esto significa que en presencia del inóculo de HMA, el número de plántulas de *T. repens* fue mayor en los suelos acondicionados por sí mismo que en suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* E-. Por el contrario, se encontró una retroalimentación PS neutra en suelos acondicionados por plantas con altos niveles de infección endofítica (Figura 2.5; IC de 95% de E+M+= -0.453 a 0.302, T=-1.25, p=0.27). Esto implica que el número de plántulas de *T. repens* fue el mismo en suelos acondicionados por sí mismo que en suelos acondicionados por plantas de *L. multiflorum* E+.

En los tratamientos M-, sólo se observó una retroalimentación neutra (Figura 2.5). Esto significa que en ausencia de inóculo de HMA, el número de plántulas de *T. repens* fue el mismo en suelos acondicionados por sí mismo y en suelos acondicionados por *L.*

multiflorum con niveles bajos y altos de infección endofítica (IC del 95% de E-M=- -0.296 a 0.539, T=0.47, p=0.65; IC del 95% de E+M=- -0.215 a 0.540, T=0.81, p=0.46).

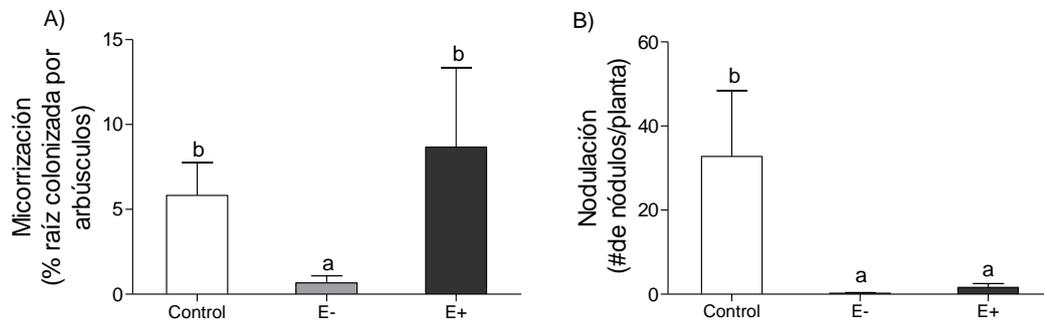


Figura 2.6. Interacción entre *Trifolium repens* y sus simbiotes de raíz. (A) Micorrización (% de raíces colonizadas por arbuscúlos, media \pm EE, n=6) y (B) Nodulación (número de nódulos, media \pm EE, n=12) presentes en las raíces de *T. repens* cuando crecían en suelos acondicionados por su propia especie (Control: barras blancas) o por *Lolium multiflorum* con bajo (E-: barras grises) o alto (E+: barras negras) nivel de infección endofítica. En el caso de la nodulación, las barras son un promedio entre los tratamientos con distinto nivel de inóculo de hongos micorrícicos (M+ y M-). Letras distintas indican diferencias significativas para ($p < 0.05$).

El porcentaje de raíces colonizadas por arbuscúlos se vio afectada por el nivel de infección endofítica de las plantas que generaron el legado (Figura 2.6.A, E: $gl=2$, $\chi^2=10.9$, $p=0.004$). Allí, se encontró una disminución del 90% en los arbuscúlos presentes en las raíces de *T. repens* que crecía en suelos acondicionados por *L. multiflorum* E- en comparación con los otros tratamientos (Control y E+). El % raíces colonizadas por hifas, también fue afectado la infección endofítica de las plantas que generaron el legado (E: $gl=2$, $\chi^2=14.89$, $p < 0.0001$). En este caso, sólo se encontrará una disminución del 69% en las hifas presentes en las raíces de *T. repens* que crecían en suelos condicionados por *L. multiflorum* E- en comparación con el tratamiento Control (media y EE para Control=32 \pm 2.63, E-= 9.67 \pm 6.16, E+=26.16 \pm 9.18). No se detectaron vesículas en ninguno de los tratamientos.

El número de nódulos aumentó en un 97% cuando *T. repens* crecía en suelos acondicionados por su propia especie (Control) en comparación a los suelos

acondicionados por *L. multiflorum* E+ y E- (Figura 2. 6.B, E: $gl=2$, $\chi^2= 40.4$, $p<0.0001$). El número de nódulos no se vio afectado significativamente por la presencia de inóculo de HMA al inicio de la etapa de acondicionamiento (M: $gl=1$, $\chi^2= 0.2$, $p=0.64$) ni por la interacción entre este y la infección endofítica de la planta que dejó el legado (ExM: $gl=2$, $\chi^2= 3.2$, $p=0.19$).

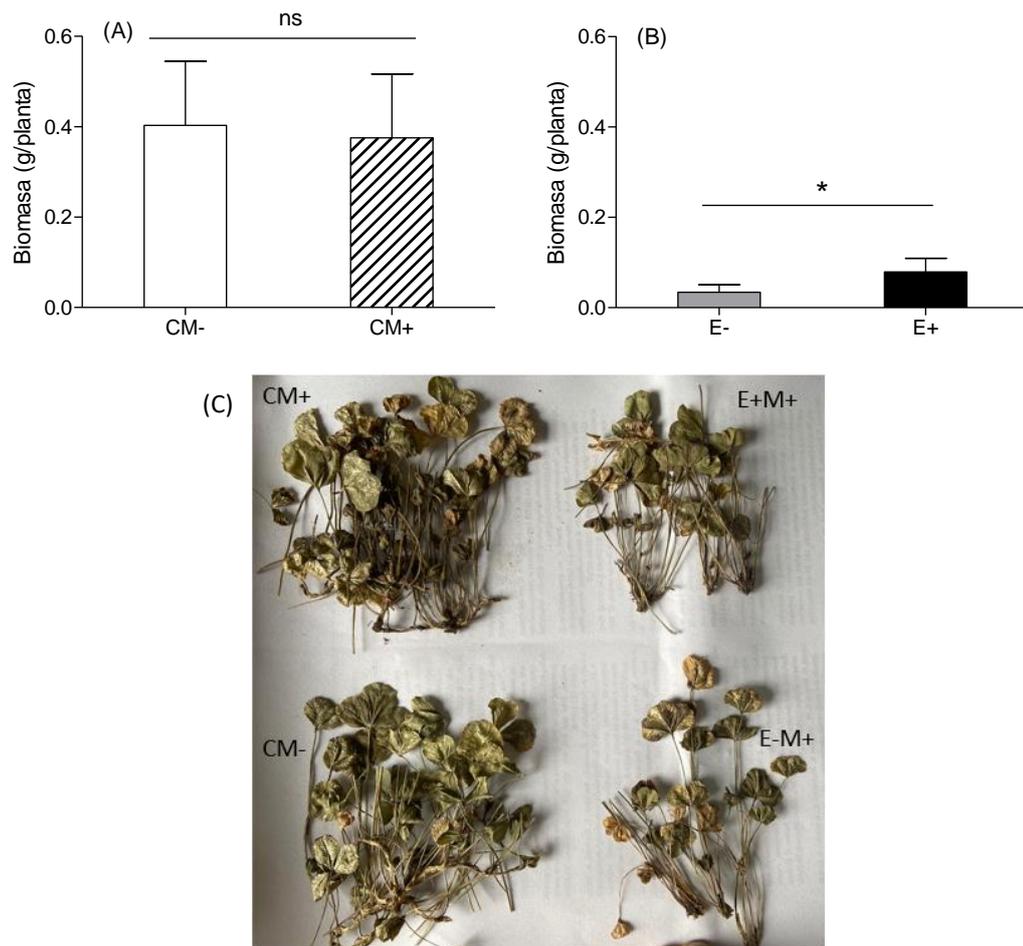


Figura 2.7. Biomasa aérea de *Trifolium repens*, (A) en suelos acondicionados por su propia especie (media \pm EE, $n=6$), con la adición de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares (CM-: sin la adición de inóculo, barras lisas, CM+: con la adición de inóculo, barras rayadas), o (B) en suelos acondicionados por *Lolium multiflorum* (media \pm EE, $n=12$) con bajo (E-: barras grises) o alto (E+: barras negras) nivel de infección endofítica. Las barras de éstos últimos son un promedio entre los tratamientos con distinto nivel de inóculo (M+ y M-). * indica diferencias significativas para ($p<0.05$). (C) Imagen de la biomasa seca de cada tratamiento.

La biomasa de las plántulas que crecieron en suelos acondicionados por *T. repens* fue mayor que las que crecieron en suelos acondicionados por *L. multiflorum*. En los suelos acondicionados por *T. repens* (control) no se encontró un efecto de la adición del

inóculo de HMA sobre la biomasa (Figura 2.7.A, M: $gl=1$, $\chi^2= 0.03$, $p=0.86$), por lo que no hubo diferencias entre los tratamientos ($p=0.87$). Por otro lado, en suelos acondicionados por *L. multiflorum*, no se encontró un efecto interactivo entre el nivel de infección endofítica en la gramínea que acondicionó el suelo y la adición del inóculo de HMA en el suelo donde crecieron dichas plantas (ExM: $gl=1$, $\chi^2= 0.5$, $p=0.48$). Solo se encontró un efecto simple del nivel de infección endofítica de la gramínea que acondicionó el suelo (Figura 2.7.B, E: $gl=1$, $\chi^2= 4.54$, $p=0.0.3$; M: $gl=1$, $\chi^2= 2.3$, $p=0.13$). Aquí la presencia de endófitos (E+) aumentó la biomasa en un 60% en comparación con aquellas que crecieron en suelos acondicionados por *L. multiflorum* E-.

Cuadro 2.1. Análisis estadísticos de cómo la emergencia, establecimiento (número de plántulas a los 7 y 42 días de la siembra) y la velocidad de germinación *Trifolium repens* se ve afectado por el legado dejado por la planta que acondicionó el suelo (E) y lo inoculación con HMA (M).

	gl	Establecimiento		
		7 días	42 días	Velocidad
E	1	19.3***	31.9***	23.8***
M	2	11.0**	19.9***	14.4***
ExM	2	6.6*	16.7***	8.3*

El cuadro muestra los grados de libertad (gl) de la prueba de chi cuadrado (χ^2). Las diferencias significativas están indicadas con los símbolos * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), *** ($p<0.0001$) y con letra negrita.

2.4. DISCUSIÓN

En este capítulo, se encontró que el endófito afectó el éxito de una leguminosa sucesora través de modificar el legado químico que las raíces vivas de su gramínea hospedante dejan en el suelo. Estos cambios de legado estarían dados por la liberación de compuestos alelopáticos que afectan indirectamente a la leguminosa a través de modificar la interacción con sus simbioses de raíz. La simbiosis gramínea-endófito, por un lado, tuvo efectos negativos sobre la biomasa a través de una reducir el número de nódulos

presentes en las raíces de *T. repens*. Por el otro lado, se encontró la interacción entre la gramínea y el endófito afectó el establecimiento de la leguminosa al contrarrestar el efecto adverso que la gramínea hospedante tuvo sobre la micorrización de *T. repens*. Estos hallazgos sugieren que los efectos que las plantas de *L. multiflorum* tienen sobre la persistencia de *T. repens* pueden estar mediados indirectamente por la interacción que los endófitos asexuales del género *Epichloë* tienen con los HMA y los rizobios.

A partir de estos resultados, se demostró que las plantas de *L. multiflorum* dejan un legado químico en el suelo generado por la exudación radical de compuestos alelopáticos, que no afecta directamente el establecimiento de *T. repens*, sino que lo hacen indirectamente a través de afectar a sus simbiontes benéficos. Esto se puede inferir ya que la retroalimentación PS fue neutra en ausencia de inóculo de HMA. Aquí, la retroalimentación PS negativa sólo se observó en los tratamientos con la adición de inóculo de HMA y desaparecieron cuando las plantas de *L. multiflorum* se encontraban asociadas a *E. occultans*. Esto indicaría que el establecimiento de *T. repens* depende de la presencia previa tanto de endófitos como de HMA.

Se ha visto que la interacción entre endófitos y HMA puede ser específica de la especie (García-Parisi y Omacini 2017, Larimer et al. 2012, Liu et al. 2020, Zhou et al. 2016). Teniendo en cuenta esto, las diferencias observadas en el porcentaje de raíces colonizadas por HMA en los distintos tipos de suelos acondicionados pueden atribuirse a cambios en la identidad de HMA. Investigaciones anteriores han demostrado que la composición y la diversidad de HMA pueden influir fuertemente en el establecimiento de plántulas (Dag et al. 2009, Habte et al. 2001, Kapulnik et al. 2010, Manaut et al. 2015, van der Heijden 2003, 2004). Por lo tanto, es posible que las plantas de *L. multiflorum* promuevan selectivamente solo una de las tres especies o ecotipos de HMA utilizados en este capítulo, lo que podría causar un efecto negativo en el establecimiento de *T. repens*

debido a diferencias en la “selección” de las especies de HMA a la hora de formar la simbiosis. Otra posible explicación podría estar relacionada con la fuente de propágulos que quedaron disponibles para la leguminosa en la fase de respuesta. Esta fuente de propágulos probablemente esté compuesta únicamente por las esporas presentes en el suelo. Esto se debe a que al tamizar el suelo al final de la etapa de acondicionamiento se perturbó el micelio externo de HMA. Teniendo en cuenta esto, y que los endófitos pueden reducir la germinación de las esporas de HMA (Antunes et al. 2008), es posible que en los suelos acondicionados por *L. multiflorum* E+ exista un mayor número de esporas viables que generan un aumento en la micorrización y en el establecimiento de las plantas de *T. repens* que crecieron en la siguiente generación (Antunes et al. 2008).

Se sabe que los rizobios y los HMA otorgan múltiples beneficios a las leguminosas hospedantes. Muchos estudios han demostrado que el crecimiento, el rendimiento y la nutrición de las leguminosas que interactúan con rizobios y HMA, generalmente son mayores que las plantas inoculadas con solo uno de ellos (Antunes y Goss 2005, de Varennes y Goss 2007, Kaschuk et al. 2009, Meghvansi et al. 2008). Aquí, la presencia simultánea de rizobios y HMA aumentó establecimiento y la velocidad de establecimiento de las plántulas de *T. repens*. Esto significa que ambos simbiontes tuvieron un efecto positivo en el número de plántulas de *T. repens* desde el inicio del experimento, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la emergencia de las plántulas. Con respecto a la biomasa de *T. repens*, las diferencias observadas entre los distintos tratamientos podrían deberse a cambios en la nodulación. Independientemente de la presencia del endófito las plantas de *L. multiflorum* dejaron un legado químico en el suelo que redujo considerablemente el número de nódulos presentes en las raíces de *T. repens*. Si bien en estudios previos han observado un efecto negativo del endófito sobre la nodulación de plantas vecinas (Eerens et al. 1998, García-Parisi et

al. 2015, 2017), esta reducción podría ser la causante de cambios en la biomasa. Esto se debe a que una menor nodulación podría generar una disminución de N fijado y afectar la biomasa. Las diferencias encontradas en la biomasa de plantas que crecían en suelos acondicionados por *L. multiflorum* E+ y E- podría deberse a la mayor micorrización presente en los primeros.

En resumen, en este capítulo se encontró que la retroalimentación PS mediada por los tejidos vivos de *L. multiflorum* sólo se produce en presencia de HMA y que el sentido de dicho efecto está dado por la presencia o ausencia de hongos endófitos foliares. Estos hallazgos demuestran que, en ausencia de broza, *L. multiflorum* reduce la biomasa de *T. repens* a través de modificar su interacción con rizobios y promueve el número de plántulas establecidas en presencia de endófitos y HMA. En los agroecosistemas el uso generalizado de agroquímicos como el glifosato, puede reducir la abundancia de HMA en los suelos (Druille et al. 2016). Dado que la simbiosis gramínea-endófito promueve el establecimiento de la leguminosa sucesora al mejorar su interacción con HMA, sería interesante generar prácticas que permitan mantener y promover estos hongos, de lo contrario, se perderían los beneficios que este simbiote genera en los procesos de retroalimentación PS. Finalmente, y teniendo en cuenta el objetivo general de esta tesis, se puede concluir que la simbiosis gramínea-endófito deja un legado químico en el suelo que permite el establecimiento de las leguminosas en los pastizales y pasturas, su éxito podría ser afectado por cambios en la biomasa.

Capítulo 3

RETROALIMENTACIÓN PLANTA-SUELO GENERADA POR LA BROZA PRODUCIDA POR LA SIMBIOSIS GRAMÍNEA-ENDÓFITO

* **Minás, A.**, García-Parisi, P.A., Chludil, H., y 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*, 35, 2870-2881. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13938>.

3.1. INTRODUCCIÓN

Tanto en los agroecosistemas como en los ecosistemas naturales, la acumulación de la broza tiene un gran impacto sobre el funcionamiento del suelo, el establecimiento y crecimiento de las plantas (Ehrenfeld et al. 2005, van der Putten et al. 2013, Veen et al. 2019). La importancia y el rol de la retroalimentación planta-suelo (PS) mediada por la broza ha sido ampliamente estudiada (Bennett y Klironomos 2019, Ehrenfeld et al. 2005, Veen et al. 2019, Wardle et al. 2004). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se enfocan en los efectos producidos por la acumulación de tallos y hojas muertas (broza aérea: BA) en la superficie del suelo. En cuanto a las raíces muertas (broza subterránea: BS), no se han encontrado estudios previos en donde se analice su impacto sobre la retroalimentación PS ni los efectos interactivos con la broza aérea.

La retroalimentación PS mediada por la broza puede tener lugar a través de vías físicas y químicas (Figura 1.4; Bennet y Klironomos 2019, van der Putten et al. 2013, Veen et al. 2019). Las vías físicas están relacionadas con la formación de una barrera que puede afectar la germinación y la emergencia de las plántulas (Donath y Eckstein 2008, Eckstein y Donath 2005, Facelli y Pickett 1991a, 1991b, García et al. 2002, Rupert y Szabó 2012). Mientras que, las vías químicas están relacionadas con la liberación de compuestos químicos al suelo durante los procesos de lixiviación y descomposición (Manrubia et al. 2020, Wardle et al. 1998).

Los hongos endófitos del género *Epichloë* pueden alterar la cantidad y calidad de la broza depositada por su hospedante (Omacini et al. 2004, 2009). La cantidad de broza puede aumentar debido a la protección que estos hongos le proveen a su hospedante contra una variedad de insectos (Bush et al. 1997, Clay y Schardl 2002). En cuanto a la calidad, se sabe que los hongos endófitos modifican el metabolismo primario y

especializado de sus plantas hospedantes (Dupont et al. 2015, Rasmussen et al. 2009), lo que tendría, por ejemplo, impactos en la producción de alcaloides (Bush et al. 1997, Clay y Scharld 2002), compuestos orgánicos volátiles (Fiorenza et al. 2021, Fuchs y Krauss 2019, Pańka et al. 2013, van der Putten et al. 2013) y compuestos fenólicos (Pańka et al. 2013, Ponce et al. 2009, Qawasmeh et al. 2012). Aunque el hongo solo subsiste en las semillas cuando la planta muere, todos estos cambios químicos inducidos por el endófito en los tejidos vivos pueden podrían permanecer en la broza producida por su planta hospedante. Estos cambios, no sólo modificarían la calidad de la broza, sino también su tasa de descomposición debido a los efectos que estos tendrían sobre la comunidad de descomponedores presentes en el suelo (Gundel et al. 2016, 2017, Lemons et al. 2005, Omacini et al. 2004). Por lo tanto, al modificar la cantidad y calidad de la broza producida por su hospedante, los endófitos podrían tener impactos sobre el establecimiento de las leguminosas a través de distintas vías.

El objetivo de este capítulo fue estudiar cómo los tejidos muertos aéreos y subterráneos depositados por las plantas con endófitos del género *Epichloë* modifican los procesos de retroalimentación PS (Figura 1.7). Para dilucidar los mecanismos por los cuales la simbiosis gramínea-endófito inhibe el éxito de una leguminosa, se separaron los efectos de la retroalimentación PS mediados por los distintos tipos de broza de aquellos mediados por las plantas vivas (Veen et al. 2019). Para ello, se realizó un experimento donde las semillas de *T. repens* asociadas a HMA y rizobios, fueron expuestas a distintas cantidades y tipos de broza producidas por plantas de *L. multiflorum* con niveles contrastantes de infección endofítica. Como hipótesis se planteó que los endófitos reducen el éxito de una leguminosa y su interacción con sus simbioses de raíz, a través de modificar la cantidad y calidad de la broza aérea y subterránea depositada por su hospedante. Se predice que los distintos tipos de broza producida por la simbiosis que

forma *L. multiflorum* con *E. occulants* reducen el número de plántulas de *T. repens* y su interacción con rizobios y HMA.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Diseño experimental

Para evaluar el efecto de los endófitos sobre la retroalimentación PS mediada por la broza de su hospedante, se realizó un experimento manipulativo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34°35'S, 58°35'W, Figura 3.1). La broza de *L. multiflorum* con bajo y alto nivel de infección endofítica (E-: <5% y E+: >90% respectivamente) fue generada en el campo experimental del IFEVA (ver Capítulo 1, sección 1.6) y almacenada a temperatura ambiente durante 5 meses hasta la realización de este experimento.

El experimento se llevó a cabo en un invernáculo entre los meses de agosto y noviembre del 2017. Este consistió en un diseño factorial completamente aleatorizado con seis repeticiones y tres factores: el nivel de infección endofítica de las plantas que produjeron la broza (E= E+ o E-), el tipo de broza (B= BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de las dos anteriores) y la cantidad de broza depositada (C= baja y alta). De la combinación de estos tres factores se obtuvieron 12 tratamientos, con un total de 72 macetas (Figura 3.1). Las cantidades de broza utilizadas fueron las siguientes, para la BS baja: 1g/m² y alta: 2 g/m², para la BA baja: 4 g/m² y alta 8 g/m² y para BS+BA baja: 1 g/m² de BS + 4 g/m² de BA y alta: 2 g/m² de BS + 8 g/m² de BA (Omacini et al. 2004, 2009). La BA se colocó sobre la superficie del suelo (y por encima de las semillas de *T. repens*), mientras que la BS fue enterrada a 5 cm de profundidad en el suelo (sin estar en contacto con las semillas de *T. repens*).

En las macetas de 2.5 l que fueron llenadas con suelo tamizado, se sembraron 30 semillas de *T. repens* y añadieron diferentes tipos y cantidades de broza producidas por plantas E+ y E-. Veintiún días después de la siembra se agregó 1 ml de inóculo de rizobios que contenía exclusivamente *R. leguminosarum biovar trifolii*. Una vez por semana se contabilizó el número de plántulas de *T. repens* que emergen de la broza aérea. Aquí solo se muestran los resultados correspondientes a la emergencia (registrada a los 7 días después de la siembra) y el establecimiento (registrado el último día del experimento, 97 días después de la siembra). Durante el experimento, no se detectaron signos de daño por patógenos ni por herbívoros. Al final del experimento, se descartó la broza aérea y se extrajo el sustrato con las plantas presentes en cada una de las macetas. Este sustrato fue sumergido en un cajón de aproximadamente 20 L de capacidad, el cual contenía agua. Esto permitió la separación de las raíces y la obtención de las plantas individuales presentes en cada una de ellas. La biomasa aérea fue recolectada y secada en estufa a 60°C durante 48 h. Luego, se evaluó la nodulación y micorrización en las raíces obtenidas tal como se ha desarrollado en la sección 1.6 de la introducción. Debido a la ausencia de un tratamiento sin ningún tipo de broza, todas las comparaciones fueron realizadas entre los tratamientos E+ y E-. Esto me permitió comparar el efecto que el endófito genera en la broza y el impacto que estos cambios tienen sobre la leguminosa.

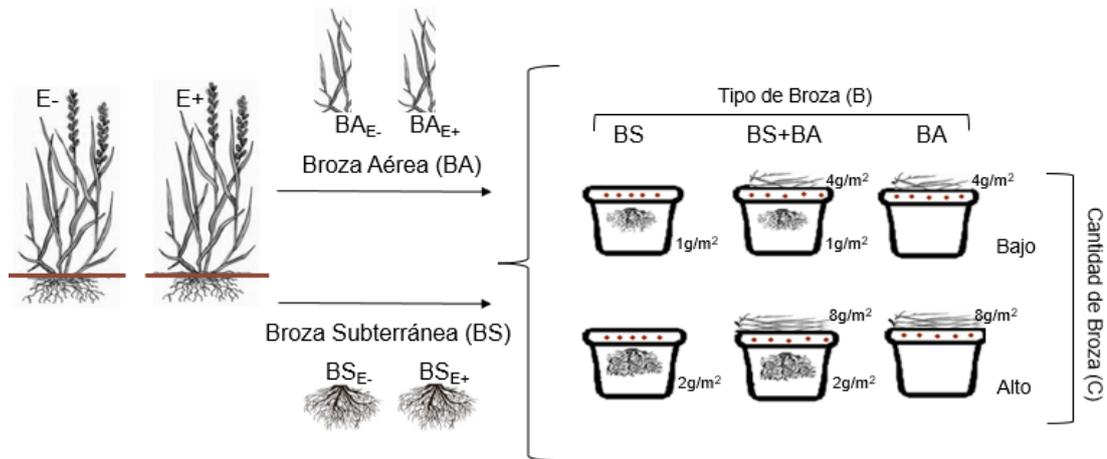


Figura 3.1. Esquema del experimento. Al final de la etapa de crecimiento, se recolectaron las hojas y tallos muertos (broza aérea) y las raíces muertas (broza subterránea) de plantas *Lolium multiflorum* con niveles bajos y altos de infección endofítica (E- y E+ respectivamente) que crecían en un campo bajo las mismas condiciones (parcelas de 1 m² sembradas con 1500 semillas). Este experimento incluyó los diferentes tipos de broza producida por plantas E- o E+ (B= BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de BS y BA) y dos cantidades de broza (C= baja y alta). De la combinación de estos tres factores se obtuvieron 12 tratamientos, los cuales se replicaron 6 veces, alcanzando un total de 72 macetas.

3.2.2. Análisis Estadísticos

Los análisis se realizaron utilizando modelos lineales generalizados (GLM) con las funciones de *glm* del paquete *lme4* utilizando el software estadístico R. La emergencia, el establecimiento, el número de nódulos activos y la colonización de raíces por diferentes estructuras de HMA se analizaron en modelos separados que incluían los tres factores fijos (B, E y C). La emergencia y el establecimiento de plántulas presentaron distribución Poisson. Estos datos fueron analizados con la familia Poisson de GLM y utilizando log como función de enlace. La sobre-dispersión en cada modelo GLM fue evaluada estadísticamente. La biomasa, el número de nódulos y el porcentaje de colonización por HMA (hifas, arbuscúlos y vesículas) presentaron distribución normal y se analizaron con la familia Gaussian de GLM. Además, para el número de nódulos se realizó un análisis que incluía el número de plántulas y la maceta como factor aleatorio. Sin embargo, como la inclusión de estos factores no provocó cambios significativos en los resultados del

análisis y la varianza explicada por estos factores fue muy baja, se decidió utilizar el modelo más simple y parsimonioso.

La distribución normal de los residuales se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk, la homogeneidad de varianzas se analizó mediante la prueba de Levene y en ambos casos se evaluaron gráficamente los residuos. El ajuste de los modelos *glm* se corroboró mediante la prueba de razón de verosimilitud (Likelihood Ratio, LR).

3.3. RESULTADOS

La emergencia de las plántulas de *T. repens* fue afectada de forma interactiva por el tipo de broza y la infección endofítica de las plantas que produjeron esa broza (Figura 3.2.A, Cuadro 3.1, BxE: $p < 0.001$). Los tratamientos con ambos tipos de broza producida por plantas E+ ($BS_{E+} + BA_{E+}$) aumentaron la emergencia de plántulas en un 56% en comparación con $BS_{E-} + BA_{E-}$. Se encontró el mismo efecto en los tratamientos que contenían únicamente la broza aérea (BA). La BA_{E+} aumentó la emergencia de las plántulas en un 30% comparado con la BA_{E-} . Sin embargo, se observó el efecto contrario en los tratamientos que contenían únicamente broza subterránea (BS). La BS_{E+} redujo la emergencia de plántulas en un 76% en comparación con BS_{E-} . La emergencia de las plántulas no fue significativamente afectada por la interacción entre estos dos factores y la cantidad de broza (Cuadro 3.1, BxExC: $p = 0.06$).

De manera similar, el establecimiento de plántulas de *T. repens* fue afectado por el tipo de broza y la infección endofítica de las plantas que la produjeron (Figura 3.2.B, Cuadro 3.1, BxE: $p < 0.001$; BxExC: $p = 0.37$). No se encontraron diferencias entre los tratamientos con la adición de BS+BA producidas por plantas E+ y E-. Tampoco se observaron diferencias en el establecimiento de plántulas entre los tratamientos que

contenían solo broza aérea (BA), pero sí entre los tratamientos con broza subterránea (BS). La BS_{E+} redujo el número de plántulas establecidas en un 73% comparado con los tratamientos con BS_{E-}.

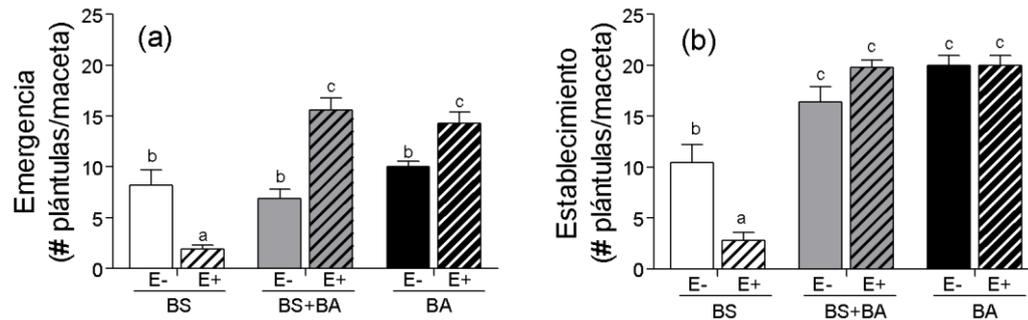


Figura 3.2. Número de plántulas de *Trifolium repens* determinado a los (A) 7 días (media + EE, n=12) y (B) 97 días (media + EE, n=12) luego de la siembra, en macetas con distintos tipos de broza (BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-}, barras lisas) y alto (B_{E+}, barras rayadas) nivel de infección endofítica. Las barras representan un promedio entre las dos cantidades de broza (ver Cuadro 3.1). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

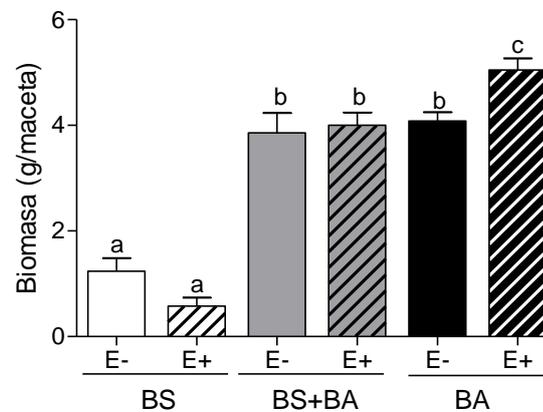


Figura 3.3. Biomasa aérea de *Trifolium repens* en macetas (media + EE, n=12) con el agregado de distintos tipos de broza (BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-}, barras lisas) y alto (B_{E+}, barras rayadas) nivel de infección endofítica. Las barras representan un promedio entre las dos cantidades de broza (ver Cuadro 3.1). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

La biomasa fue afectada interactivamente por el tipo de broza y la infección endofítica de las plantas que la produjeron (Figura 3.3, Cuadro 3.1, Bx_E: p=0.0001). Sólo la presencia de BA_{E+} aumentó la biomasa de *T. repens* en un 19% en comparación a los

tratamientos con BA_{E+} . Sin embargo, independientemente de la infección endofítica de las plantas que produjeron la broza, la presencia de BS redujo la biomasa de *T. repens* entre un 77% y 82% comparado con los otros tipos de broza.

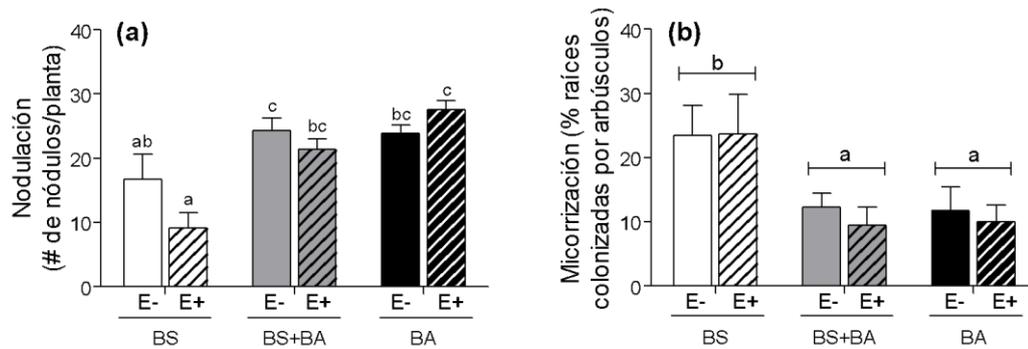


Figura 3.4. Interacción entre *Trifolium repens* y sus simbiontes de raíz. (A) Número de nódulos por planta (media + EE, n=12) y (B) porcentaje de raíz colonizada por arbuscúlos (% , media + EE, n=24) en los tratamientos con distintos tipos de broza (BS: broza subterránea, BA: broza aérea y BS+BA: la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-} , barras lisas) y alto (B_{E+} , barras rayadas) nivel de infección endofítica. Las barras representan un promedio entre las dos cantidades de broza (ver Cuadro 3.1). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

La nodulación fue afectada interactivamente por el tipo de broza y la infección endofítica de las plantas que la produjeron (Figura 3.4.A, Cuadro 3.1, $B \times E$: $p = 0.03$). No se encontraron diferencias entre los tratamientos con ambos tipos de broza (BS+BA) producida por plantas E+ y E-; ni entre los tratamientos que contenían la BA y BS por separado. Sin embargo, la presencia de BS_{E+} redujo más del 50% el número de nódulos por planta en comparación con los tratamientos que incluían BA y BS+BA. En relación con la micorrización, solo el tipo de broza afectó el porcentaje de raíces colonizadas por arbuscúlos (Figura 3.4.B, Cuadro 3.1, B: $p < 0.001$). La presencia de BS aumentó el porcentaje de arbuscúlos en aproximadamente un 52% en comparación con los tratamientos que contenían BA y BS+BA. El % de raíces colonizadas por hifas y vesículas mostró el mismo patrón que el porcentaje de raíz colonizada por arbuscúlos. En el caso del % de raíz colonizada por hifas, la presencia de la BS lo aumentó en un 21% comparado

con los tratamientos con BA y BS+BA (B: $gl= 2$, $\chi^2= 15.11$, $p<0.001$; media y EE para BS= 54.37 ± 4.47 , BA= 40.75 ± 3.60 , BS+BA= 44.58 ± 3.33). Mientras que en el caso del % de raíz colonizada por vesículas, la presencia de BS aumentó en un 75% comparado con los tratamientos BA y BS+BA (B: $gl= 2$, $\chi^2= 15.11$, $p<0.001$; media y EE para BS= 2.71 ± 0.61 , BA= 0.67 ± 0.24 , BS+BA= 0.67 ± 0.24).

Cuadro 3.1. Análisis estadísticos del experimento (total de 72 unidades experimentales, con $n=6$): emergencia y establecimiento (número de plántulas 7 y 97 días luego de la siembra), biomasa, nodulación (número de nódulos por planta) y micorrización (porcentaje de raíz colonizada por arbusculos) afectados por la infección endofítica de las plantas que produjeron la broza (E), el tipo (B) y la cantidad (C) de broza usada en cada tratamiento.

	Gl	Emergencia	Establecimiento	Biomasa	Nodulación	Micorrización por arbusculos
E	1	11.44***	1.89	0.89	1.02	0.26
B	2	101.25***	202.45***	410.25***	55.64***	16.16***
C	1	4.80*	2.63	28.64***	0.56	1.64
BxE	2	93.55***	52.9***	17.79***	6.62*	0.35
ExC	1	0.08	1.10	0.18	0.22	1.97
BxC	2	3.55	19.96***	11.78**	1.89	1.19
BxExC	2	5.62	2.00	5.23	4.14	3.28

El cuadro muestra los grados de libertad (gl) de la prueba de chi cuadrado (χ^2). Las diferencias significativas están indicadas con los símbolos * ($p<0.05$), *** ($p<0.0001$) y con letra negrita.

3.4. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en el que se analizaron los efectos separados e interactivos de la broza aérea y subterránea sobre la retroalimentación PS. Estos resultados, en primer lugar, muestran que los hongos endófitos inducen cambios en la broza depositada por su hospedante, modificando los efectos de legado. En segundo lugar, en este experimento se muestra cómo la broza aérea y subterránea producida por la simbiosis gramínea-endófito afecta de forma diferente la biomasa y el establecimiento de *T. repens*. Sorprendentemente, el efecto negativo que la broza subterránea de plantas E+ tuvo sobre las plántulas de *T. repens* se anula cuando la broza aérea estaba presente en la superficie

del suelo. La broza subterránea también afectó de manera diferente la biomasa y la interacción de *T. repens* con los rizobios y los HMA. Estos resultados muestran la importancia de la broza subterránea y el impacto que esta puede tener sobre el establecimiento de otras plantas. Por último, no se encontró un efecto de la cantidad de broza, lo que indica que esta variable no afecta ni las vías químicas ni físicas de la broza.

Los efectos negativos que la broza subterránea de plantas E+ tuvo sobre la emergencia y establecimiento de *T. repens* podría deberse a la presencia de compuestos alelopáticos. Como la broza subterránea ya se encuentra incorporada al suelo, es posible que no forme una barrera que afecte físicamente a las plantas o modifique la estructura del suelo (Veen et al. 2019). Teniendo en cuenta esto, y que se encontraron diferencias entre los tratamientos E+ y E-, es más probable que la broza subterránea actúe a través de vías químicas en lugar de físicas. Estudios previos encontraron que los endófitos modifican la identidad y la concentración de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en las raíces de sus plantas hospedantes (Malinowski et al. 1998, Pańka et al. 2013, Powell et al. 1994, Zhou et al. 2003). Estos compuestos pueden tener actividad alelopática negativa, afectando la germinación y el crecimiento de otras plántulas (Inderjit 1996, Qawasmeh et al. 2012). Por lo que es posible que, a través de inducir cambios químicos en las raíces de su hospedante, los endófitos podrían afectar el establecimiento de las leguminosas. Algunos estudios experimentales mostraron que los endófitos pueden afectar la retroalimentación PS a través de cambios generados en el ambiente biótico y abiótico de la rizósfera de su hospedante (Casas et al. 2011, García-Parisi et al. 2017, García-Parisi y Omacini 2017, Matthews y Clay 2001, Rudgers y Orr 2009). Particularmente, se ha visto que la presencia previa del endófito redujo el establecimiento de *T. repens* a través de modificar la microbiota del suelo. Sin embargo, tanto este estudio como los anteriormente mencionados, no consideran el efecto de la broza subterránea,

por lo que no se sabe si dichos efectos de legado son generados por los tejidos vivos o muertos. Esto resalta el papel de la broza subterránea en la retroalimentación PS y la razón por la que debe ser considerada en futuras investigaciones.

Los efectos positivos que la broza aérea de plantas E+ tuvo sobre la biomasa y la emergencia de *T. repens* podría deberse tanto a vías físicas como químicas. Se sabe que la broza aérea puede promover el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas a través de mejorar las condiciones microclimáticas del sitio (Donath y Eckstein 2008, Facelli y Pickett 1991a y 1991b, Ruprecht y Szabó 2012, Veen et al. 2019). Por lo que el aumento observado en la biomasa, emergencia y el establecimiento de *T. repens* con respecto a los tratamientos que tenían solo la parte subterránea podría deberse a las vías físicas. Sin embargo, las diferencias entre los tratamientos E+ y E-, podría deberse a cambios en las vías químicas inducidos por el endófito. Curiosamente, en los tratamientos con ambos tipos de broza producida por plantas E+ se observó un efecto positivo sobre el número de plántulas de *T. repens* y no el efecto negativo observado en presencia de la broza subterránea de plantas E+. Esto podría deberse a que los efectos generados por las vías físicas de la parte aérea superaron los efectos químicos generados por la parte subterránea. Otra posible explicación podría deberse a que el endófito induce cambios químicos diferentes en los tejidos aéreos y subterráneos, y que los compuestos presentes en la broza aérea superaron o anularon el efecto alelopático negativo que deja la parte subterránea. Además, en estudios previos se ha visto que la broza aérea producida por plantas de *L. multiflorum* E+ reducen la emergencia de plántulas de su misma especie (Omacini et al. 2009). Sin embargo, en este trabajo, la broza aérea fue colocada en suelos que contenían las raíces muertas de *L. multiflorum*. Si bien, en este capítulo se observó que la presencia de ambos tipos de broza estimula la emergencia de plántulas de *T. repens*, estas diferencias podrían deberse a cambios químicos inducidos por el endófito en los

tejidos aéreos que afectan la germinación de *L. multiflorum* y *T. repens* de forma diferente. Pero para confirmarlo, en el Capítulo 4 se analizará qué efectos son generados por las vías químicas.

Los diferentes tipos de broza tuvieron efectos contrastantes sobre la interacción de *T. repens* con otros simbiosntes de raíz. Independientemente de la presencia de endófitos, la broza subterránea aumentó la micorrización de las raíces de *T. repens*. Este aumento podría deberse a que la broza subterránea actuó como una fuente de propágulos. Sin embargo, en los tratamientos que se combinó la broza subterránea con la aérea se observó el efecto contrario. En estudios previos, se ha visto que los exudados de *Epichloë tembladera* en cultivo puro o en simbiosis con plantas de *Bromus auleticus* aumentaban la germinación de esporas y el % de colonización de HMA (Vignale et al. 2018). También se encontró evidencia que los lixiviados producidos por la broza aérea de plantas con endófitos redujeron la germinación de esporas de micorrizas y su colonización en las raíces de *Bromus inermis* (Antunes et al. 2008). Esto podría indicar que los hongos endófitos inducen cambios químicos diferentes en los tejidos aéreos y subterráneos que podrían estar afectando la micorrización de distinta manera. Por el contrario, la reducción en el número de nódulos en presencia de la broza subterránea producida por plantas E+, podría explicar el efecto negativo que los suelos acondicionados por la simbiosis gramínea-endófito tuvieron sobre la nodulación de *T. repens* y otras plantas (García-Parisi et al. 2015, 2017). Si bien en este experimento no se pudo separar las vías físicas de las químicas, los efectos producidos por la broza subterránea sobre la asociación de *T. repens* con HMA y rizobios podrían estar relacionados con la liberación de compuestos químicos como los fenólicos y los flavonoides. Se sabe que los flavonoides juegan un papel importante durante la nodulación y la micorrización (Bagga y Straney 2000, Scervinio et

al. 2005, Sundaravarathan y Kannaiyan 2002), por lo que cambios en estos compuestos podrían afectar su interacción con la leguminosa.

En resumen, se puede afirmar que los cambios inducidos por los hongos endófitos en el legado que la broza de su hospedante deja en el suelo, tiene grandes impactos sobre el establecimiento de la leguminosa. En este capítulo se pudo comparar el efecto que tiene la broza aérea y la subterránea. Además, el efecto producido por la broza subterránea difiere de la broza aérea debido a cambios en las vías físicas y/o químicas inducidas por el endófito en el tipo de tejido. Incluso modificando la cantidad de broza, no se detectaron diferencias en la emergencia o el establecimiento de *T. repens*. Esto indicaría que, si bien el endófito puede aumentar la cantidad de broza producida por su hospedante al conferirle protección y modificar su tasa de descomposición, esta no estaría afectando los efectos físicos o químicos que la broza tiene sobre otras plantas. Generalmente, la broza subterránea no es considerada en estos tipos de análisis, pero aquí se demostró que este tipo de tejido puede ser un impulsor de la retroalimentación PS mediados por la broza y debe ser considerado en futuras investigaciones.

RETROALIMENTACIÓN PLANTA-SUELO
GENERADA POR LOS LIXIVIADOS DE
LA BROZA PRODUCIDA POR LA
SIMBIOSIS GRAMÍNEA-ENDÓFITO

* **Minás, A.**, García-Parisi, P.A., Chludil, H., y 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*, 35, 2870-2881. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13938>.

4.1. INTRODUCCIÓN

Para entender los efectos de la retroalimentación planta-suelo (PS) mediada por la broza, es necesario discernir entre las vías físicas y químicas (ver Capítulo 3). Las vías químicas están relacionadas con la liberación de nutrientes y metabolitos especializados durante los procesos de lixiviación y descomposición (Facelli y Pickett 1991a, Mazzoleni et al. 2015, Veen et al. 2019). Estos compuestos químicos pueden afectar directamente el crecimiento y/o establecimiento de otras plantas, o hacerlo indirectamente a través de modificar a la comunidad biótica del suelo (Figura 1.4). Dependiendo de la naturaleza de estos compuestos, los efectos pueden ser positivos o negativos. Por ejemplo, algunos de ellos pueden tener actividad alelopática negativa, reduciendo la germinación de semillas, el crecimiento o establecimiento de plántulas (Babu y Kandasamy 1997, Bonanomi et al. 2011, Bosy y Reader 1995, Chomel et al. 2016, Dhwan y Gupta 1996, Schlatterer y Tisdale 1969, Werner 1975). Otros compuestos, pueden atraer o inhibir a los microorganismos simbiotes (van der Putten et al. 2016, Wardle 2002), lo que subsecuentemente tendría impactos sobre las plantas que crecen en la siguiente generación.

La broza producida por plantas con endófitos tiene efectos contrastantes sobre el establecimiento de una leguminosa (Capítulo 3, Figura 3.2) y su interacción con sus simbiotes benéficos (Capítulo 3, Figura 3.3). Estos efectos podrían deberse a cambios químicos inducidos por el endófito en los tejidos vivos (Dupont et al. 2015, Rasmussen et al. 2009). Particularmente, se sabe que los endófitos modifican la producción de al menos tres tipos de compuestos: los compuestos alcaloides (Bush et al. 1997, Clay y Schardl 2002), los compuestos orgánicos volátiles (Fiorenza et al. 2021, Fuchs y Krauss 2019, Pańka et al. 2013; Rostás et al. 2015) y los compuestos fenólicos y flavonoides (Pańka et al., 2013, Ponce et al. 2009, Qawasmeh et al. 2012). Con respecto a los

alcaloides, trabajos previos sugieren que dos tipos de alcaloides, las lolinas y los ergot, no estarían presentes en la broza depositada sobre el suelo ya que se degradan en menos de dos meses después de la muerte de la planta hospedante (Siegrist et al. 2010). Por otro lado, los compuestos orgánicos volátiles tampoco tendrían efectos sobre los procesos del suelo y las respuestas de las plantas ya que no son emitidos por la broza en pie (Fiorenza et al. 2021). Por último, los compuestos fenólicos y flavonoides sí están presentes en la broza y se les ha atribuido una amplia gama de actividades biológicas: antimicrobiana, antioxidante y sobre todo alelopática (Qawasmeh et al. 2012).

Los compuestos fenólicos y flavonoides son compuestos polares que podrían ser liberados durante los procesos de lixiviación y descomposición de la broza (Bruckert et al. 1971). Particularmente, la lixiviación ocurre al inicio de la descomposición y está dada principalmente por la presencia de lluvias, la cual actúa como solvente extrayendo los compuestos solubles en agua que están presentes en la broza. Una vez en el suelo, estos compuestos pueden afectar la germinación, el crecimiento y el establecimiento de plántulas (Das et al. 2012, Hartley y Whitehead 1985, Li et al. 2010, Mierziak et al. 2014, Reigosa et al. 1999, Treutter 2005, Williams y Hoagland 1982,). Cabe destacar que estos compuestos también pueden afectar a los simbiontes, ya que están involucrados en el inicio de la formación de nódulos y la germinación de esporas de HMA (Bagga y Straney 2000, Scervinio et al. 2005, Sundaravarathn y Kannaiyan 2002). Por lo tanto, los endófitos podrían afectar el establecimiento de la leguminosa y su interacción con sus simbiontes benéficos (Figura 1.4) a través de la modificación en la concentración y composición de estos compuestos (Pańka et al. 2013, Ponce et al. 2009, Qawasmeh et al. 2012).

El objetivo de este capítulo fue analizar si los lixiviados de la broza aérea y subterránea producidas por plantas con endófitos del género *Epichloë* son los

responsables de los efectos de retroalimentación PS observado en el capítulo 3 (Figura 1.7). Se planteó como hipótesis que la broza aérea y subterránea producida por la simbiosis gramínea-endófito afectan el éxito de una leguminosa directamente, a través de la liberación de compuestos alelopáticos durante los procesos de lixiviación. Se predice que los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en los lixiviados de la broza aérea y subterránea producida por plantas de *L. multiflorum* con *E. occultans* reducirán la tasa de germinación de *T. repens*, pero no su capacidad de asociarse con los rizobios y los HMA. Para ello, se realizaron dos experimentos, donde se expusieron las semillas de *T. repens* y las plántulas de *T. repens* asociadas a HMA y rizobios a los lixiviados de los distintos tipos de broza producidos con plantas con distintos niveles de infección endofítica (E- y E+). Por último, se realizó un análisis químico de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la broza.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Diseño experimental

Se analizó el efecto que los lixiviados de los distintos tipos de broza producidas por plantas con niveles contrastantes de infección endofítica tuvieron sobre la germinación de *T. repens* y su interacción con sus simbioses de raíz. La broza utilizada fue producida como se explicó en el Capítulo 1 (sección 1.6). Para la generación de los lixiviados, se consideró que, durante este proceso, los iones minerales y los compuestos químicos de bajo peso molecular y polares presentes en la broza fluyen con el agua de lluvia hasta el suelo (Harborne 1993, Hussain et al. 2017, Rice 1984). Es por ello, que estos compuestos se recolectaron en forma de lixiviados sumergiendo a los distintos tipos de broza en agua (Figura 4.1; Hussain et al. 2017). Los lixiviados de la broza subterránea (LBS) y de la broza aérea (LBA) se prepararon a razón de 10 g/l de BS y 40 g/l de BA respectivamente;

mientras que los lixiviados de la combinación de ambos tipos de broza (LBS+LBA) se prepararon haciendo una mezcla de las dos anteriores. Dichas soluciones, se incubaron en agua durante 24 h a 4°C (metodología adaptada de Vázquez-de-Aldana et al. 2011) y luego se filtraron con dos filtros de diferente tamaño de poro: 1 mm y 70 µm (Marca Macotest) con el fin de eliminar los restos de broza. Esto fue realizado para la broza producida por plantas con distintos niveles de infección endofítica.

4.2.2. Experimento 1: Efecto de los lixiviados de la broza sobre la germinación

Para estudiar si los lixiviados de la broza afectan la germinación de *T. repens*, se llevó a cabo un experimento de germinación en placas de Petri sin la adición de tierra ni de broza (Figura 4.1). En este ensayo, las semillas de *T. repens* fueron expuestas a los lixiviados de los diferentes tipos de broza producidas por plantas de *L. multiflorum* con niveles contrastantes de infección endofítica (E-<5% y E+>90%). El experimento consistió en un diseño factorial completamente aleatorizado en bloques con 9 repeticiones y 3 factores: el nivel de infección endofítica de las plantas que produjeron la broza (E= E+ o E-), los lixiviados de los distintos tipos de broza (LB= LBS: lixiviados de broza subterránea, LBA: lixiviados de broza aérea y LBS+LBA: lixiviados de la combinación de BS y BA) y dos concentraciones distintas de lixiviados (C= 100% y 50%). De la combinación de estos tres factores, se obtuvieron 12 tratamientos dispuestos en tres bloques con tres repeticiones cada uno (con un total de 108 unidades experimentales). Para cada uno de ellos, se generó una solución de lixiviados y luego de la filtración (ver sección 4.2.1), la solución obtenida se dividió en dos para obtener las distintas concentraciones utilizadas en este experimento. Una mitad se usó pura (solución al 100%), mientras que la otra mitad se diluyó con agua destilada al 50% (solución al 50%). Además, en cada bloque se incluyeron tres placas correspondientes al tratamiento control, que consistían en placas de Petri regadas únicamente con agua destilada.

En cada una de las placas de Petri y sobre un papel de filtro esterilizado se colocaron 30 semillas de *T. repens*. Al inicio del experimento, cada placa fue tratada con 3 ml de una solución de lixiviados generadas a partir de los distintos tipos de broza. Las placas de Petri fueron colocadas por 6 días en una cámara de cultivo a 25°C con 12 h de luz. Todos los días las semillas germinadas (consideradas así por la aparición de la radícula) fueron contabilizadas en cada placa. Con los datos obtenidos, se calculó la velocidad de germinación: $S=(N1*1)/1 + (N2-N1)/2 + (N3-N2)/3 + \dots + (Nn-(Nn-1))/n$, donde N1, N2, N3 y Nn representan la proporción de semillas que germinaron en el primer (1), segundo (2), tercer (3) y último (n) día del experimento (Chiapusio et al. 1997). El impacto de los lixiviados sobre la velocidad de germinación de cada tratamiento se calculó restando dichos valores con los obtenidos en el tratamiento control (tratados con agua).

4.2.3. Experimento 2: Efecto de los lixiviados de la broza sobre los simbioses de raíz

Se realizó un ensayo en donde las macetas que contenían plántulas de *T. repens* asociadas a HMA y rizobios fueron regadas con los lixiviados de los diferentes tipos de broza producidas por plantas de *L. multiflorum* con distintos niveles de infección endofítica (E-<5% y E+>90%). El experimento consistió en un ensayo factorial completamente aleatorizado en bloques con 6 repeticiones y 2 factores: el nivel de infección endofítica de las plantas que produjeron la broza (E= E+ o E-) y los lixiviados de los distintos tipos de broza (LB= LBS: lixiviados de broza subterránea, LBA: lixiviados de broza aérea y LBS+LBA: lixiviados de la combinación de BS y BA). De la combinación de estos 2 factores, se obtuvieron 6 tratamientos, con un total de 36 unidades experimentales. Además, se generó un control, que consistía en macetas regadas únicamente con agua destilada.

Como en el capítulo anterior se observó que los distintos tipos de broza afectaron la emergencia de plántulas (Capítulo 3, Figura 3.2), en este experimento se trasplantaron 5 plántulas de *T. repens*, previamente germinadas en perlita y vermiculita, en macetas de 1.5 l que contenían suelo tinalizado. A todas las macetas se les agregó 10g de inóculo de HMA (que fue generado como se describe en la sección 1.6 de la introducción), y 1 ml de inóculo de rizobios que contenía *R. leguminosarum biovar trifolli*. Una vez por semana éstas macetas fueron regadas con 200 ml de los lixiviados producidos por los distintos tipos de broza E+ y E-. El resto de los días se las regaba con agua a demanda. Durante el experimento, no se detectaron signos de daño por patógenos ni herbívoros. Tres meses después, al finalizar el experimento, se extrajo el sustrato con las plantas presentes en cada una de las macetas. Este sustrato fue sumergido en un cajón de aproximadamente 20 L de capacidad, el cual contenía agua. Esto permitió la separación de las raíces y la obtención de las plantas individuales presentes en cada una de ellas. Se recolectaron los tallos y se secaron en estufa a 60°C durante 48 h para medir la biomasa. Luego, las raíces de *T. repens* fueron utilizadas para estimar la nodulación y la micorrización tal como se ha desarrollado en la sección 1.6 de la introducción. Para medir el impacto de los lixiviados sobre los distintos simbiontes, se calculó el índice RII (Armas et al. 2004) con los datos de nodulación y micorrización de los distintos tratamientos. Esto fue realizado de la siguiente forma:

$$RII = \frac{(\text{número de nódulos en los tratamientos regados con LB} - \text{número de nódulos en los tratamientos Control})}{(\text{número de nódulos en los tratamientos regados con LB} + \text{número de nódulos en los tratamientos Control})} \quad (3)$$

Donde LB corresponde a los tratamientos regados con los distintos tipos de lixiviados. Esto también se hizo con los datos de % de raíz colonizada por hifas y vesículas. Para analizar el impacto de los lixiviados sobre la biomasa simplemente se restó la biomasa aérea de cada tratamiento con la biomasa aérea del tratamiento control.

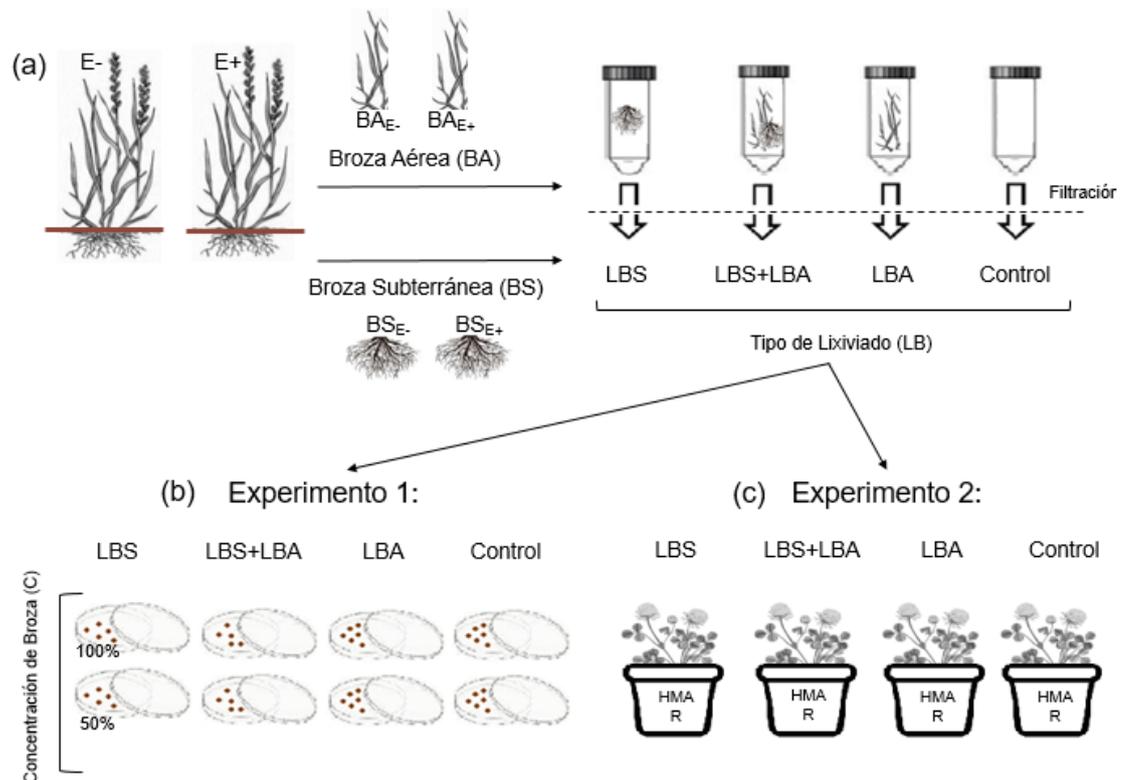


Figura 4.1. Representación esquemática de la aproximación experimental. (A) Al final de la etapa de crecimiento, se recolectaron las hojas y tallos muertos (broza aérea) y las raíces muertas (broza subterránea) de plantas *Lolium multiflorum* con niveles bajos y altos de infección endofítica (E- y E+ respectivamente) que crecían en un campo bajo las mismas condiciones (parcelas de 1 m² sembradas con 1500 semillas). Con ella se generaron los lixiviados de los distintos tipos de broza producidas por plantas E+ y E- (LB= LBS: broza subterránea, LBA: broza aérea y LBS+LBA: la combinación de LBS y LBA y Control: solo con agua). En el primer experimento (B), a partir de estos lixiviados se generaron dos concentraciones (C= 100% y 50%) que se utilizaron para regar semillas de *Trifolium repens* colocadas en cajas de Petri. En el segundo experimento (C), estos mismos lixiviados se utilizaron para regar macetas con plántulas de *T. repens* en presencia de rizobios (R) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA).

4.2.4. Caracterización química de la broza de *Lolium multiflorum*

A través de distintas técnicas espectrofotométricas se realizó una cuantificación del contenido total de fenólicos y flavonoides y un análisis cualitativo para determinar la presencia de alcaloides (Pękal y Pyrzynska 2014, Sembiring et al. 2018, Stahl 1969). Estos análisis exploratorios se realizaron, por un lado, para corroborar que los alcaloides producidos por la simbiosis que forma *L. multiflorum* con *E. occultans* (lolinas) están ausentes en la broza (Siegrist et al. 2010). Por otro lado, se cuantificó el contenido de fenólicos y flavonoides para corroborar si estos compuestos están presentes en la broza y

si la presencia de endófitos modifica su concentración (Pańka et al., 2013, Ponce et al. 2009, Qawasmeh et al. 2012).

Para generar los extractos, se colocaron por triplicado 0.5 g de broza subterránea (BS) producida por *L. multiflorum* E+ y E- en tubos de ensayo con 5 ml de metanol (CH₃OH) por 24 h. Este procedimiento se repitió para generar los extractos de la broza aérea (BA). El metanol y el agua son disolventes que permiten la extracción de compuestos polares. A diferencia de lo realizado con los lixiviados, en estos análisis químicos se usó metanol porque es un solvente que permite extraer los mismos (o incluso más) compuestos que utilizando agua (Lapornik et al. 2005). Por lo tanto, es posible que los compuestos presentes en estas extracciones sean los mismos y estén en concentraciones mayores que los compuestos extraídos en los lixiviados.

Para el análisis cualitativo de alcaloides se utilizó el reactivo Dragendorff, que permite la identificación del nitrógeno heterocíclico presente en los alcaloides (Stahl 1969). Los extractos de alcaloides se colocaron en placas de sílica gel (conocidas también como placas TLC, por las siglas de su nombre en inglés “thin layer chromatography”) con una micropipeta graduada (25 µl) y se eluyeron usando una fase móvil compuesta de metanol-cloroformo-hidróxido de amonio (50:50:1). Luego, las placas fueron rociadas con el reactivo Dragendorff y se dejaron secar a temperatura ambiente. En presencia de alcaloides, el reactivo cambia su color a marrón.

El contenido de compuestos flavonoides se determinó mediante un ensayo colorimétrico con cloruro de aluminio (AlCl₃) que se basa en la formación de una solución amarilla debido a la presencia de un complejo de aluminio (Pełkal y Pyrzyńska 2014, Sembiring et al. 2018). En un tubo de ensayo, se agregaron 500 µl de extracto generado a partir del tipo de broza, 1.7 ml de metanol (CH₃OH), 100 µl de cloruro de aluminio (AlCl₃(H₂O)₆), 100 µl de acetato de sodio (CH₃COONa) y 2.8 ml de agua destilada. La

mezcla se homogeneizó y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se midió la absorbancia a 415 nm con un espectrofotómetro. Los análisis cuantitativos se realizaron mediante una curva de calibración con quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$, rango de concentración de 0-160 $\mu\text{g/ml}$) como compuesto de referencia. Por lo tanto, el contenido de flavonoides se expresó como mg equivalentes de quercetina (QE) por g de broza.

El contenido de compuestos fenólicos se determinó con el reactivo Folin-Ciocalteu. En un tubo de ensayo se agregaron 300 μl del extracto generado a partir de cada tipo de broza, 4.15 ml de agua destilada y 50 μl de reactivo Folin (Pękal y Pyrzynska 2014, Sembiring et al. 2018). La mezcla fue homogeneizada y luego los tubos se mantuvieron en oscuridad durante 5 min. Al finalizar ese período se agregaron 500 μl de carbonato de sodio (CO_3Na_2) y se dejó 45 min extra en oscuridad para que se forme el color azul. Finalmente se midió la absorbancia a 725 nm. Para los análisis cuantitativos se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico ($C_{16}H_{18}O_9$, rango de concentración de 0-135.36 μM) como compuesto de referencia. Por lo tanto, el contenido de fenólicos se expresó como μmol de equivalentes de ácido clorogénico (CE) por g de broza. Tanto para el contenido de fenólicos como el de flavonoides, se generó una solución blanco reemplazando la cantidad de extracto de broza por agua destilada.

4.2.5. Análisis Estadísticos

Los análisis se realizaron mediante modelos lineales generalizados (GLM) y modelos lineales mixtos (LMM) con las funciones de *glm* y *lmer* del paquete lme4 utilizando el software estadístico R. En el primer experimento, se analizó el impacto de los lixiviados sobre la velocidad de germinación con modelos que incluyeron los tres factores fijos (LB, E y C) y los bloques en el tiempo como efectos aleatorios. Estos presentaron una distribución normal y se analizaron con LMM. En el segundo

experimento, se analizó el impacto de los lixiviados sobre la nodulación, la micorrización y la biomasa aérea, con modelos que incluyeron los dos factores fijos (LB y E) y los bloques como factor aleatorio. Para analizar la nodulación, también se incluyó en el modelo el número de plántulas y la maceta como factor aleatorio. Sin embargo, como la inclusión de estos factores no provocó cambios significativos en los resultados del análisis y la varianza explicada por estos factores fue muy baja, se decidió utilizar el modelo más simple y parsimonioso. Todos los análisis realizados en este experimento presentaron distribución normal y se analizaron con LMM. El contenido de compuestos fenólicos y flavonoides fueron analizados con modelos que incluyeron dos factores fijos (B y E). Ambos presentaron distribución normal y fueron analizados con la familia Gaussian de GLM. La distribución normal de los residuos se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk, la homogeneidad de varianzas se analizó mediante la prueba de Levene y en ambos casos se evaluaron gráficamente los residuos. El ajuste de los modelos *lmer* y *glm* se corroboró mediante la prueba de razón de verosimilitud (Likelihood Ratio, LR).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Experimento 1: Efecto de los lixiviados de la broza sobre la germinación

En el primer experimento se analizó el impacto de los lixiviados sobre la velocidad de germinación. Esta variable fue afectada interactivamente por el tipo de lixiviado generado a partir de los distintos tipos de broza (i.e. área o subterránea) y el nivel de infección endofítica de la planta que la produjo (Figura 4.2, LBxE: $gl=2$, $\chi^2=20.32$, $p<0.001$). El lixiviado producido por ambos tipos de broza E+ (LBS_{E+} + LBA_{E+}) no fue diferente al control (tratamientos regados con agua). Sin embargo, se observó una disminución en la velocidad de germinación en los tratamientos que fueron regados con LBS_{E-} + LBA_{E-}. En el caso de los tratamientos con los lixiviados de la broza aérea (LBA_{E+}

y LBA_{E-}), el nivel de infección endofítica no modificó la velocidad de germinación, a diferencia de los tratamientos con los lixiviados de broza subterránea (LBS). Si bien LBS_{E-} no fue diferente al control, la presencia de LBS_{E+} disminuyó la velocidad de germinación. No se encontraron diferencias significativas debido a la concentración de los lixiviados (C: $gl=1$, $\chi^2=3.72$, $p=0.054$) ni una interacción triple de los tratamientos (LBxExC: $gl=2$, $\chi^2=0.317$, $p=0.85$) sobre la velocidad de germinación. Al final del experimento, todos los tratamientos tuvieron, en promedio, el mismo número de semillas germinadas.

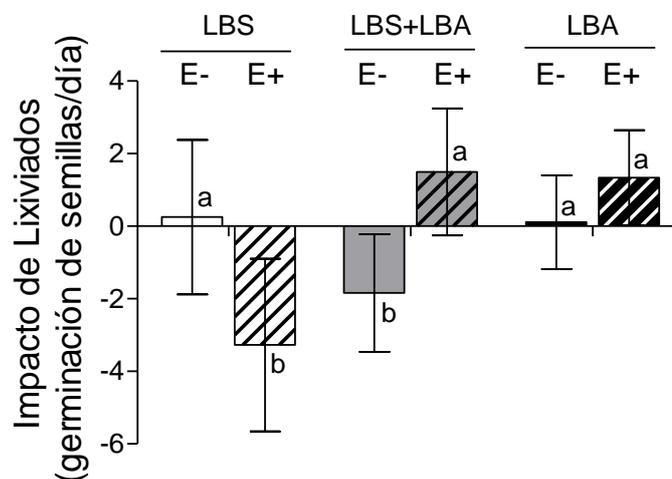


Figura 4.2. Impacto de los lixiviados sobre la velocidad de germinación de *Trifolium repens* (media \pm 95% intervalo de confianza, $n=18$). Esto fue estimado mediante la diferencia de la velocidad de germinación de *T. repens* en las placas regadas con los diferentes tipos de lixiviados (LBS: lixiviado de broza subterránea, LBA: lixiviado de broza aérea y LBS+LBA: lixiviado de la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (B_{E-}, barras lisas) y alto (B_{E+}, barras rayadas) nivel de infección endofítica, con un control regado con agua (media = 14.65). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0.05$).

4.3.2. Experimento 2: Efecto de los lixiviados de la broza sobre los simbioses de raíz

En el segundo experimento, se analizó el impacto de los lixiviados sobre la nodulación y la micorrización de *T. repens*. La nodulación fue afectada interactivamente por el lixiviado generado a partir de los distintos tipos de broza y la infección endofítica de la planta que lo produjo (Figura 4.3.A, LBxE: $gl=2$, $\chi^2=17.66$, $p<0.001$, LB: $gl=2$,

$\chi^2=7.19$, $p=0.02$, E: $gl=1$, $\chi^2=0.15$, $p=0.69$). En los tratamientos que fueron regados con los lixiviados de ambos tipos de broza (LBS+LBA) se encontró que la presencia de endófitos generó un efecto positivo, aumentando la nodulación. En el caso de los tratamientos regados con LBA y LBS por separado, no se encontraron diferencias significativas entre los tipos de broza producida por las plantas E+ y E-. Sin embargo, la presencia de LBA_E aumentó el número de nódulos con respecto a la LBS_{E+} teniendo impactos positivos sobre la nodulación.

En relación con la micorrización, el % de raíz colonizada por hifas fue afectado por el lixiviado producido por los distintos tipos de broza (Figura 4.3.B, LB: $gl=2$, $\chi^2=9.78$, $p=0.007$, E: $gl=1$, $\chi^2=2.54$, $p=0.11$, LBxE: $gl=2$, $\chi^2=0.72$, $p=0.69$). Si bien, ninguno de los tratamientos fue diferente al control, se encontró que la presencia de LBS disminuyó el porcentaje de colonización en comparación con los tratamientos que contenían LBA y LBS+LBA. El % de raíz colonizado por arbusculos no fue afectada por el agregado de los lixiviados de los distintos tipos de broza producida por plantas E+ y E- (LB: $gl=2$, $\chi^2=3.24$, $p=0.19$; E: $gl=1$, $\chi^2=0.81$, $p=0.37$; LBxE: $gl=2$, $\chi^2=0.71$, $p=0.7$; media y EE para LBS= -0.18 ± 0.077 , LBA= -0.04 ± 0.06 , LBS+LBA= 0.06 ± 0.081). En el caso del % de raíz colonizada por vesículas sólo se encontró un efecto de simple del nivel de infección endofítica (E: $gl=1$, $\chi^2=6.64$, $p<0.01$; LB: $gl=2$, $\chi^2=3.23$, $p=0.19$; LBxE: $gl=2$, $\chi^2=3.65$, $p=0.16$; media y EE para E-: 0.12 ± 0.09 , E+: -0.08 ± 0.09).

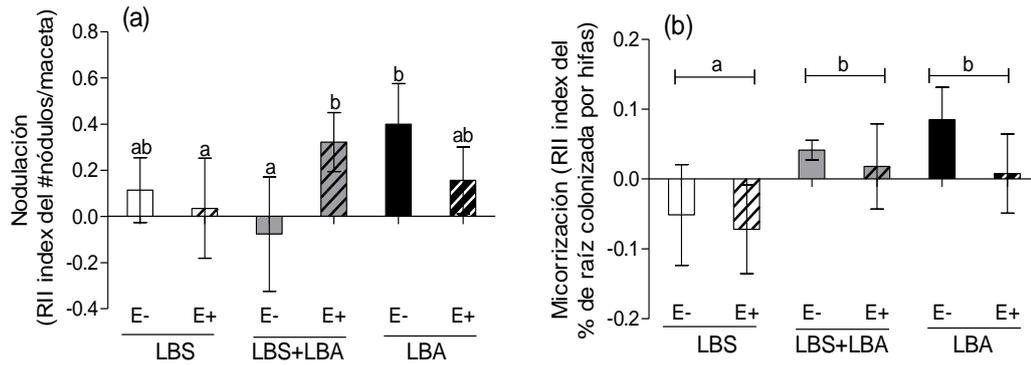


Figura 4.3. Impacto de los lixiviados sobre la interacción de *Trifolium repens* con sus simbiontes de raíz. Se calculó el RII índice para el (A) Número de nódulos (media \pm 95% intervalos de confianza, n=6) y (B) porcentaj de raíces colonizadas por hifas (% , media \pm 95% intervalos de confianza, n=6) en los tratamientos regados con los lixiviados de los distintos tipos de broza (LBS: lixiviado de broza subterránea, LBA: lixiviado de broza aérea y LBS+LBA: lixiviado de la combinación de BS y BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (E_{E-}, barras lisas) y alto (E_{E+}, barras rayadas) nivel de infección endofítica. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

En este experimento, también se contabilizó la biomasa de *T. repens* para saber si los lixiviados de los distintos tipos de broza producida por plantas E+ y E- tenía impactos sobre ella. La biomasa no fue afectada por el agregado de lixiviado generado a partir de los distintos tipos de broza (LB: $gl=2$, $\chi^2=1.18$, $p=0.55$), ni por la infección endofítica de las plantas que produjeron esa broza (E: $gl=1$, $\chi^2=1.09$, $p=0.29$), ni por la interacción entre estos factores (LBx E: $gl=2$, $\chi^2=4.42$, $p=0.11$).

4.3.3. Análisis químicos de la broza de *Lolium multiflorum*

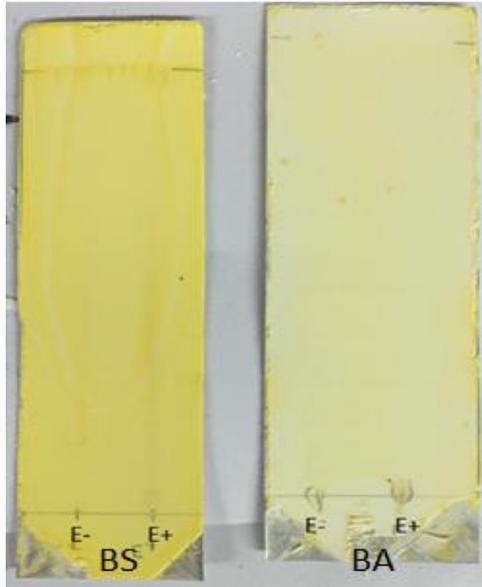


Figura 4.4: Cromatograma en sílica gel realizado para la cualificación de compuestos alcaloides. En cada placa se corrieron los extractos de la broza subterránea (BS) y broza aérea (BA) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo y alto nivel de infección endofítica (E- y E+, respectivamente). Estas placas luego de ser eluidas fueron rociadas con reactivo Dragendorff, el cual reacciona cambiando su color en presencia de alcaloides. La ausencia de manchas en color marrón indica que los alcaloides no se encuentran presentes en los extractos de broza utilizados.

Por último, se realizó una caracterización química de la broza de *L. multiflorum*. No se detectó la presencia de alcaloides en la broza aérea y ni en la broza subterránea de *L. multiflorum* (Figura 4.4). El contenido de fenólicos fue afectado interactivamente por el tipo de broza y la infección endofítica de las plantas que la produjeron (Figura 4.5, Cuadro 4.1, BxE: $p=0.003$). En general, el contenido de fenólicos fue mayor en la BA que en la BS. La infección endofítica aumentó en un 19.6% el contenido de compuestos fenólicos en la BA_{E+} en comparación con la BA_{E-} ($p=0.02$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el contenido fenólico de la BS producida por plantas E+ y E- ($p=0.66$). El contenido de flavonoides no se vio afectado por la interacción entre los factores (Figura 4.5, Cuadro 4.1, BxE: $p=0.32$), pero sí fue afectada por el tipo de broza (Cuadro 4.1, B: $p=0.003$) y por la infección endofítica de las plantas que produjeron dicha broza (Cuadro 4.1, E: $p=0.003$). Tanto en la BA como la BS, la infección endofítica aumentó el contenido de flavonoides en un 24% en comparación con la broza producida por plantas E-.

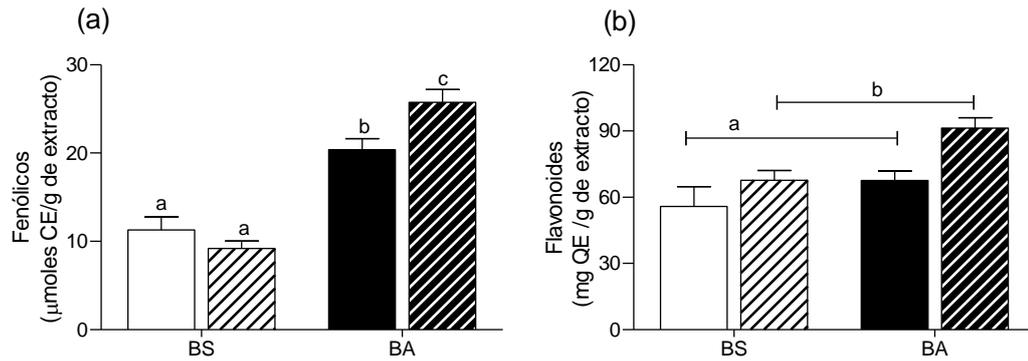


Figura 4.5. Concentración de (A) compuestos fenólicos (media + EE, n=3) y (B) compuestos flavonoides (media + EE, n=3) en los diferentes tipos de broza (BS: broza subterránea, BA: broza aérea) producida por plantas de *Lolium multiflorum* con bajo (BE-, barras lisas) y alto (BE+, barras rayadas) nivel de infección endofítica. Las diferencias significativas están representadas con letras diferentes ($p < 0.05$).

Cuadro 4.1. Análisis estadísticos de la caracterización química de la broza de *Lolium multiflorum* (contenido de fenólicos y flavonoides, total de 12 unidades experimentales, con n=3) afectada por la infección endofítica de las plantas (E) y el tipo de broza (B).

	gl	Contenido de fenólicos	Contenido de flavonoides
E	1	1.63	8.96**
B	1	98.86***	8.83**
BxE	1	8.37**	0.99

El cuadro muestra los grados de libertad (gl) de la prueba de chi cuadrado (χ^2). Las diferencias significativas están indicadas con los símbolos ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.0001$) y con letra negrita.

4.4. DISCUSIÓN

Los resultados de este capítulo muestran que los efectos de la retroalimentación PS mediada por la broza producida por plantas con endófitos estarían dados por la liberación de compuestos químicos durante los procesos de lixiviación. En dos experimentos diferentes, se muestra que los lixiviados de los distintos tipos de broza tienen efectos sobre la germinación de *T. repens* y su interacción con sus simbiontes benéficos. Los efectos generados por los lixiviados de broza subterránea fueron diferentes a los lixiviados generados a partir de la broza aérea sola o acompañada de la subterránea, lo

que indica que los cambios químicos inducidos por el endófito dependen del tipo de tejido. El legado químico dejado por la broza podría deberse a cambios en los compuestos fenólicos y flavonoides.

Los efectos negativos generados por la broza subterránea de plantas E+ sobre la germinación (Capítulo 4), la emergencia y el establecimiento (Capítulo 3) de *T. repens* podría deberse a la presencia de compuestos flavonoides. Los flavonoides pueden inhibir la germinación y el crecimiento de las plántulas (Mierziak et al. 2014, Treutter 2005), al afectar el crecimiento celular, generando alteraciones en la producción de ATP o dificultando el funcionamiento de las auxinas (Berhow y Vaughn 1999). Estudios previos muestran que los endófitos aumentan el tipo y la concentración de fenólicos en las raíces de sus hospedantes (Malinowski et al. 1998; Pańka et al. 2013, Powell et al. 1994, Zhou et al. 2003). Si bien no se detectaron diferencias en la concentración de compuestos fenólicos en la broza subterránea de plantas E+ y E-, podría haber diferencias en la identidad de los mismos. Teniendo en cuenta estos trabajos, es posible que el endófito modifique el tipo de compuesto fenólico producido por su hospedante y, por lo tanto, la broza subterránea de plantas E+ y E- generan efectos diferentes sobre *T. repens*. Con respecto a los alcaloides, el tipo de compuesto producido depende de la especie endófitica (Bush et al. 1997, Saikkonen et al. 2013). En particular, la simbiosis entre *L. multiflorum* y *E. occultans* solo produce lolinas (Sugawara et al. 2005), que tienen efectos sobre insectos invertebrados (Schardl et al. 2012). Al no detectar la presencia de lolinas en la broza, como también reportó Siegrist et al. (2010), este tipo de alcaloide no sería el responsable de los efectos que la broza tuvo sobre *T. repens*.

Los lixiviados de la broza aérea sola o acompañada de la subterránea tuvieron efectos diferentes sobre la germinación de *T. repens*. Los lixiviados de la broza aérea no generaron un efecto sobre la leguminosa. Si bien se observaron diferencias en la

concentración de fenólicos y flavonoides en este tejido, estos no afectaron la germinación de *T. repens*. Esto indicaría que la broza aérea no genera efectos sobre la leguminosa a través de las vías químicas, sino que probablemente los efectos observados en el capítulo anterior estuvieran dados por vías físicas. Sorprendentemente, los lixiviados generados por la combinación de la broza aérea y subterránea de plantas E+ estimularon la germinación de *T. repens*. Al igual que lo observado en el capítulo anterior, esto demostraría que ambos tipos de broza generan efectos directos sobre *T. repens* a través de cambios químicos inducidos por el endófito. Una posible explicación podría estar relacionada con la presencia de algún compuesto químico (diferente a los analizados en este capítulo) inducido por el endófito en los tejidos aéreos que reacciona con los compuestos presentes en la broza subterránea teniendo efectos interactivos. Estos efectos interactivos, no solo borran el efecto negativo de la broza subterránea, sino que también estimulan la germinación.

Los lixiviados de los distintos tipos de broza producidos por plantas E+ tuvieron efectos contrastantes sobre la interacción de *T. repens* con los rizobios y los HMA. Sin embargo, la mayoría de ellos no fueron distintos al control. Esto indicaría que los lixiviados de los distintos tipos de broza no estarían afectando indirectamente a *T. repens* a través de modificar a sus simbioses de raíz. Las diferencias encontradas entre los distintos tipos de broza, sin embargo, podrían estar relacionados con la presencia de compuestos químicos inducidos por el endófito en los distintos tejidos. A pesar de que no se pudo identificar el tipo de compuesto involucrado en estos procesos, se ha demostrado que los fenólicos y los flavonoides pueden influir la nodulación y la micorrización (Bagga y Straney 2000, Scervino et al. 2005, Singla y Grag 2017, Sundaravarathan y Kannaiyan 2002, Wagay et al. 2020). Los flavonoides juegan un papel importante durante la formación de los nódulos y la germinación de esporas de micorrizas (Bagga y Straney

2000, Scervino et al. 2005, Sundaravarathan y Kannaiyan 2002). A su vez, los endófitos pueden inducir la desglicosilación de los flavonoides (Tian et al. 2014), que produce cambios en la solubilidad y la actividad biológica de estos compuestos, lo que podría tener un impacto sobre la colonización de HMA y rizobios. La respuesta de los simbiontes de raíz a los compuestos fenólicos son bastantes diversas. Los monohidroxi fenólicos inhiben la nodulación, mientras que los di- o poli-hidroxi fenólicos estimulan la nodulación y el crecimiento de las leguminosas (Neera y Garg 1989, Purushothaman y Balarman 1973). Los compuestos fenólicos también pueden inhibir la germinación y crecimiento de los HMA (Becker y Drapier 1984, Coté y Thibault 1988, Rose et al. 1983). Para entender en mayor profundidad cuáles son los efectos que los distintos tipos de broza tienen sobre la nodulación y micorrización es necesario realizar análisis químicos para identificar qué tipos de compuestos están presentes en estos lixiviados.

En resumen, los resultados de este capítulo muestran que la broza subterránea sola o acompañada de la broza aérea afecta el establecimiento de *T. repens* a través de la liberación de compuestos químicos durante los procesos de lixiviación. Estos resultados muestran que los lixiviados de la broza subterránea generan efectos diferentes a los lixiviados de la broza aérea sola o combinada con la broza subterránea. Esto demuestra la importancia de la broza subterránea y el rol que puede cumplir en los sistemas naturales y los agroecosistemas. Por último, los resultados químicos sugieren que los compuestos fenólicos y flavonoides podrían ser los responsables de los efectos observados en este capítulo, aunque se necesitan más estudios para poder identificarlos y analizar el rol que cumple cada uno.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN
GENERAL

5.1. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS

Esta investigación representa una contribución novedosa a la comprensión actual de cómo puede darse el proceso de retroalimentación planta-suelo (PS) y la forma en que un simbionte foliar de gramíneas templadas puede modificar este proceso (Figura 1.4 y Figura 1.7). A partir de los experimentos realizados, no solo se demostró que los hongos endófitos afectan los procesos de retroalimentación PS a través de modificar el legado que deja su planta hospedante, sino que este legado es diferente dependiendo de si es producido por los tejidos vivos o muertos, aéreos o subterráneos. También, se muestran los mecanismos y vías por los cuales la simbiosis gramínea-endófito modifica el establecimiento de una leguminosa. A continuación, se integran los principales resultados obtenidos en los distintos capítulos.

Este es el primer trabajo que analiza el legado químico que los tejidos vivos de las plantas con endófitos dejan en el suelo en ausencia de los tejidos muertos (broza subterránea). La retroalimentación PS mediada por los tejidos vivos se da únicamente a través de vías químicas relacionadas con la liberación de compuestos químicos durante la exudación radical (Capítulo 1, Figura 1.4). Si bien la presencia del endófito moduló el legado que dejan los tejidos vivos de sus plantas hospedantes, aumentando el establecimiento de *T. repens*, este legado redujo la biomasa de las plantas (**Capítulo 2**). Estos resultados no estuvieron dados por un efecto directo sobre la leguminosa, sino por cambios en la comunidad biótica, particularmente de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) y los rizobios (Cuadro 5.1). Esto indicaría que los compuestos exudados producidos por la simbiosis gramínea-endófito durante el crecimiento de la planta, afecta a la leguminosa a través de modificar a la comunidad de HMA y su interacción con los rizobios (efecto indirecto, Cuadro 5.1). Estos resultados no solo resaltan el papel que cumplen estos dos hongos, sino que también muestra los efectos

interactivos que pueden darse entre los simbioses foliares y de raíz en los procesos de retroalimentación PS.

Cuadro 5.1. Comparación entre los mecanismos y las vías por las cuales la simbiosis gramínea-endófito genera un legado en el suelo que afecta (Sí, No, ¿?: indeterminado) el establecimiento y rendimiento de una leguminosa. Las variables de respuesta en donde se observó este efecto positivo (verde) o negativo(rojo) fueron germinación (G), emergencia (Em), establecimiento (Es), nodulación (N) y micorrización (M).

Tipo de Legado	Vías Físicas		Vías Químicas	
	Efecto directo	Efecto indirecto	Efecto directo	Efecto indirecto
Plantas Vivas	No	No	No	Sí ^{MN}
Broza:				
Subterránea (BS)	No	No	Sí ^{G Em Es}	No
Aérea (BA)	Sí ^{Em}	No	No	No
BS + BA	¿?	No	Sí ^{G Em}	No

Por otra parte, se evaluaron los efectos interactivos y separados de la broza aérea y subterránea y cómo estos efectos varían en presencia de microorganismos simbioses. Como se explicó anteriormente, la retroalimentación PS mediada por la broza puede darse a través de vías físicas o químicas (Capítulo 1, Figura 1.4, Bennet y Klironomos 2019, van der Putten et al. 2013, Veen et al. 2019). Las vías físicas están relacionadas con la formación de una barrera que puede afectar la germinación y la emergencia de las plántulas (Donath y Eckstein 2008, Eckstein y Donath 2005, Facelli y Pickett 1991a, 1991b, Rupert y Szabó 2012). Las vías químicas, por otro lado, están relacionadas con la liberación de compuestos químicos al suelo durante los procesos de lixiviación y descomposición (Manrubia et al. 2020, Wardle et al. 1998). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los **Capítulos 3 y 4**, se demostró que los endófitos modulan el legado de la broza depositada por su hospedante y que los efectos de la broza aérea son diferentes a la broza subterránea (Figura 1.7, Cuadro 5.1).

Por un lado, se observó que la broza subterránea producida por plantas con endófitos reduce el establecimiento de una leguminosa. Estos resultados indicarían que el mecanismo por el cual los endófitos inhiben el establecimiento de una leguminosa en pastizales y pasturas podría estar dado por la acumulación de las raíces muertas en el suelo. Particularmente, a través de los experimentos realizados en el **Capítulo 4**, se demostró que esta reducción se debe a la liberación de compuestos alelopáticos inducidos por el endófito en los tejidos subterráneos durante los procesos de lixiviación (vías químicas, Cuadro 5.1). Estos compuestos alelopáticos tendrían un efecto directo sobre *T. repens* (Cuadro 5.1). Si bien los análisis químicos sugieren que los fenólicos y flavonoides podrían ser los responsables de estos efectos, se necesitan más estudios para poder confirmarlo e identificar cuál es el compuesto que genera esta reducción. Por otro lado, el efecto negativo que la broza subterránea producida por la simbiosis gramínea-endófito tiene sobre *T. repens* se anula en presencia de la broza aérea. Como se ha discutido en los **Capítulos 3 y 4**, es probable que la broza aérea actué a través de vías físicas, ya que no se observó un efecto de los lixiviados de este tipo de broza sobre la germinación de *T. repens* (Cuadro 5.1). Los efectos físicos de la broza aérea han sido ampliamente estudiados (Donath y Eckstein 2008, Eckstein y Donath 2005, Facelli y Pickett 1991a, 1991b, Ruprecht y Szabó 2012). De hecho, en trabajos previos se ha determinado que los efectos físicos pueden ser más fuertes que los químicos o los biológicos (Grime 2001, Hovstad y Ohlson 2008). Sin embargo, debido a que los lixiviados producidos por la combinación de la broza aérea y subterránea de plantas con alto nivel de infección endofítica (E+) tuvieron un efecto positivo sobre la germinación, no se puede descartar que la combinación de ambos tipos de broza afecta a otras plantas tanto a través de las vías físicas como químicas (Cuadro 5.1).

A diferencia del legado que dejan las plantas vivas, la acumulación de la broza tanto aérea como subterránea tendría efectos directos sobre el establecimiento de la leguminosa. En esta tesis no se observó ningún patrón que demuestre que la presencia de los distintos tipos de broza y sus lixiviados afectan el establecimiento de *T. repens* a través de cambios en la nodulación y la micorrización. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la descomposición de la broza haya influido la micorrización y nodulación, ya que en esta tesis no fue evaluado este proceso. En el **Capítulo 4**, los simbiontes fueron expuestos a los lixiviados de la broza, en donde solo se extrajeron los compuestos que eran solubles en agua. En cambio, en el **Capítulo 3**, las plantas y sus simbiontes estuvieron expuestos durante mucho más tiempo a la broza, donde los procesos de descomposición pueden haberse llevado a cabo. Si bien los fenólicos y flavonoides son compuestos que intervienen en la interacción de la leguminosa con sus simbiontes de raíz (Bagga y Straney 2000, Scervinio et al. 2005, Sundaravarathn y Kannaiyan 2002) y al ser compuestos polares es probable que sean liberados durante la lixiviación, mientras que otros pueden hacerlo durante la descomposición (Bruckert et al. 1971). Para poder determinar el rol que cumplen estos compuestos y los efectos que podrían ejercer sobre el establecimiento de *T. repens*, es necesario realizar más experimentos e identificar qué tipo de compuestos son liberados en los procesos de descomposición y lixiviación.

5.2. CONTRIBUCIONES A LA ECOLOGÍA DE LAS COMUNIDADES

Este estudio representa una contribución novedosa a la comprensión actual de cómo puede darse la retroalimentación PS. Los endófitos afectan los procesos de retroalimentación PS al modificar el legado que deja su gramínea hospedante (Casas et al. 2011, Cripps et al. 2013, García-Parisi et al. 2017, García-Parisi y Omacini 2017, Guo

et al. 2015, Matthews y Clay 2001, Rudgers y Orr 2009). Particularmente, en estos estudios se analizaron los efectos que esta simbiosis genera sobre otras plantas a través de cambios en el ambiente abiótico del suelo y/o en las comunidades bióticas de la rizósfera (por ejemplo, patógenos y simbiontes). Sin embargo, estos estudios no separaron si los cambios en el suelo analizados (efectos de legado) fueron generados a partir de los exudados liberados por las plantas vivas o por la acumulación de la broza (principalmente la subterránea). En esta tesis, se demostró que la presencia de hongos endófitos modula de manera diferente el legado que las plantas vivas y muertas dejan en el suelo. Al estudiar estos mecanismos por separado, se determinaron las vías por las cuales la simbiosis gramínea-endófito promueve o inhibe el establecimiento de otra planta. Estos resultados, no solo resaltan la importancia de analizar los mecanismos por los que suceden los procesos de retroalimentación PS, sino que también representa una forma novedosa de estudiar estos procesos (Figura 5.1).

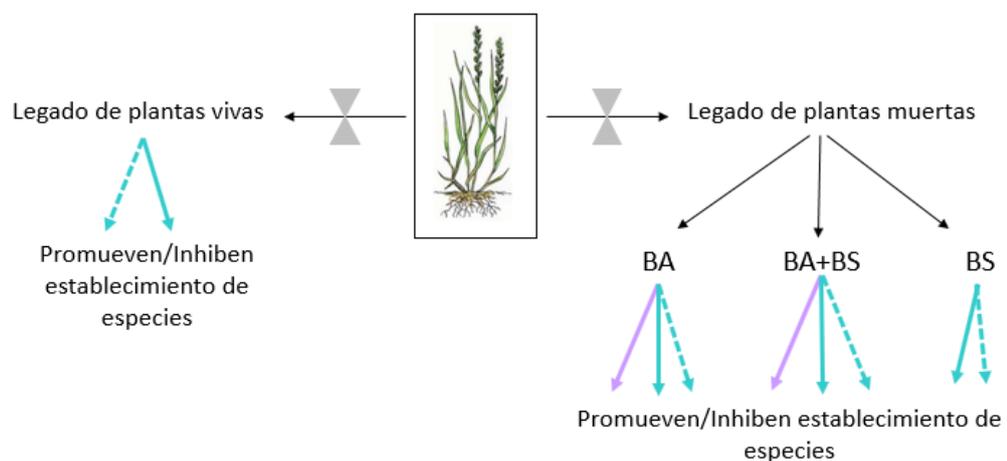


Figura 5.1. Mecanismos para analizar el proceso de retroalimentación planta-suelo (PS). Las plantas pueden dejar un legado en el suelo durante su crecimiento a través de la liberación de exudados, o al morir a través de la acumulación de la broza (BA: broza aérea, BS: broza subterránea, BA+BS: combinación de ambos tipos de broza). Ambos mecanismos, pueden darse por vías químicas (líneas celestes) que pueden tener efectos directos (líneas llenas) o indirectos (líneas punteadas) sobre el establecimiento de las plantas. La broza aérea también puede afectar a otras plantas a través de vías físicas (línea violeta) que pueden afectar directamente a las plantas a través de la formación de una barrera. Los simbiontes (llaves grises) pueden modular los efectos de retroalimentación a través de modificar la calidad y cantidad de los tejidos vivos y muertos.

En segundo lugar, esta tesis presenta un nuevo mecanismo por el cual los hongos endófitos modifican la estructura de las comunidades y el funcionamiento de los ecosistemas (Figura 5.2; Clay et al. 2005, Clay y Holah 1999, Kothamasi et al. 2010, Omacini et al. 2001, Omacini et al. 2014, Stanton 2003, van der Heijden et al. 2008). Estos mecanismos están relacionados con cambios en los procesos de retroalimentación PS. Teniendo en cuenta lo analizado en esta tesis, pudimos determinar que el legado que deja la simbiosis gramínea-endófito en ausencia de broza, promueve el establecimiento de una leguminosa indirectamente a través de los HMA. Si bien en esta tesis solo se analizó el porcentaje de raíces colonizadas por estos simbioses, es posible que los efectos observados en este capítulo se deben a cambios en la germinación de esporas de HMA (Antunes et al. 2008) y/o la identidad de las especies de HMA (García-Parisi et al. 2017, García-Parisi y Omacini 2017). Estos resultados aportan datos al entendimiento de cómo los endófitos pueden tener impactos sobre la estructura de una comunidad y la funcionalidad de los ecosistemas modificando la comunidad biótica del suelo (Figura 5.2; García-Parisi et al. 2015, 2017, García-Parisi y Omacini 2017, Novas et al. 2005, 2009, Omacini et al. 2014, Slaughter et al. 2016 y 2019, Vignale et al. 2016, 2020, Zhou et al. 2018).

Como bien se ha discutido, pocos trabajos han analizado la interacción que se da entre los endófitos, los HMA y los rizobios. El **Capítulo 2** aporta nueva información acerca de cómo estos tres simbioses interactúan entre sí a través de procesos de retroalimentación PS. También ayudan a entender el rol que los HMA cumplen mediando las interacciones que se dan entre la simbiosis que forman las gramíneas con endófitos y las leguminosas con rizobios.

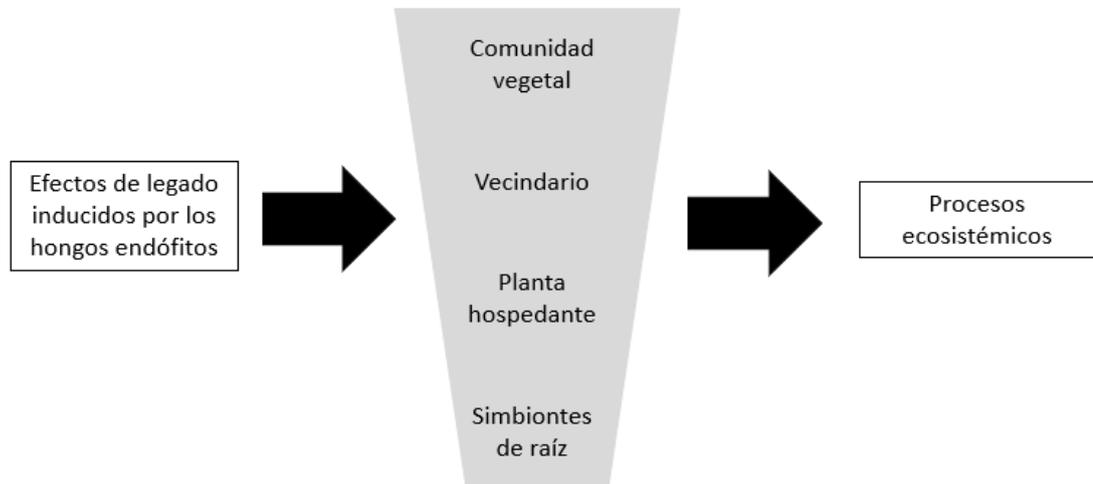


Figura 5.2. Esquema de como los endófitos influyen en los procesos ecosistémicos a través de los cambios en el legado de su hospedante. Estos efectos de legado pueden tener repercusiones a distintas escalas teniendo impactos sobre los pastizales y pasturas dedicados a la cría del ganado (adaptado de Rillig et al. 2004).

La broza ha tenido un rol principal en los procesos de retroalimentación PS (Bennett y Klironomos 2019, Ehrenfeld et al. 2005, Veen et al. 2019, Wardle et al. 2004) debido al impacto que tiene sobre el funcionamiento del suelo, el establecimiento y el crecimiento de las plantas (Ehrenfeld et al. 2005, van der Putten et al. 2013, Veen et al. 2019). Sin embargo, la mayoría de estos estudios solo analizan el impacto de la broza aérea y no separan las vías por las cuales estos pueden darse. En esta tesis se demostró que los hongos endófitos inducen cambios en los tejidos vivos de su hospedante y así modifican el legado generado por la broza aérea y subterránea depositada al final de la etapa de crecimiento. Estos resultados, en primer lugar, muestran cómo los simbiontes a través de cambios inducidos en los tejidos de su hospedante, promueven la exclusión o coexistencia de las especies teniendo impactos sobre la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Figura 5.2; Minás et al. 2021, Omacini et al. 2009, Omacini et al. 2014). En segundo lugar, en este trabajo se separaron los efectos generados por la broza aérea y subterránea producida por las plantas con endófitos demostrando que difieren entre sí. Esto muestra la importancia de analizar los efectos generados por los distintos tipos de broza en los procesos de retroalimentación PS (Figura 5.1). Particularmente, porque la

broza subterránea está incluida en la matriz del suelo y suele no ser considerada en estos estudios. Pero, esta investigación muestra que los tejidos subterráneos tienen un rol importante en la retroalimentación PS y debe ser considerado en futuras investigaciones (Minás et al. 2021).

5.3. IMPLICANCIAS PARA EL MANEJO DE LOS AGROECOSISTEMAS

Los resultados que emanan de estas tesis son importantes para los pastizales y pasturas dedicados a la cría de ganado. En estos sistemas, el sobrepastoreo, las cargas excesivas, o los tiempos de descanso cortos impiden la acumulación de los tejidos aéreos en la superficie, dejando a los subterráneos enterrados en el suelo. Si esa broza subterránea es producida por la simbiosis gramínea-endófito esto podría tener consecuencias para la prevalencia de las leguminosas en las comunidades de pastizales (Figura 5.2). La pérdida de las leguminosas en estos sistemas tiene grandes implicancias sobre la funcionalidad y los servicios ecosistémicos (Rani et al. 2022), ya que aumentan la calidad del forraje y la productividad tanto primaria como secundaria (Andrews et al. 2011, Haynes 1980, Li et al. 2015). Teniendo en cuenta esto y la información generada en esta tesis, quisiera proponer que, si se manejan presiones de pastoreo más bajas y tiempos de descanso más largos, se podría evitar que los tejidos aéreos sean removidos en su totalidad, promoviendo el establecimiento posterior de la leguminosa.

Por otro lado, en los agroecosistemas, el uso extendido de agroquímicos como el glifosato reduce la abundancia de HMA en los suelos (Druille et al. 2016). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el **Capítulo 2** y que los HMA promueven el establecimiento de las plántulas (van der Heijden 2004) sería interesante generar prácticas

que permitan mantener y promover a estos hongos en los procesos de retroalimentación PS mediados por las plantas vivas.

5.4. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis surgen varios interrogantes. El primero comprende la microbiota presente en el suelo. En esta tesis se observó que los efectos de legado generados por las plantas con endófitos afectan indirectamente a la leguminosa a través de modificar a los HMA y los rizobios. Sin embargo, estos procesos no solo podrían ser modificados por la presencia de estos simbioses, sino también por la presencia de patógenos, insectos y hongos descomponedores (Wardle 2002, van der Putten et al. 2016). Teniendo en cuenta esto, sería interesante incluir a alguno de estos organismos en los procesos de retroalimentación PS mediados por las plantas con endófitos. Por ejemplo, se ha visto que la presencia de patógenos puede generar retroalimentaciones PS negativas (reducción en el rendimiento y/o establecimiento de una planta; ver **Capítulo 2**, Figura 2.3). Sin embargo, dado que los endófitos les confieren protección a sus plantas hospedantes (Bush et al. 1997, Clay y Scharld 2002, Pérez et al. 2016) y a las plantas vecinas (García-Parisi et al. 2014, García-Parisi et al. 2021, Pérez et al. 2016), la presencia simultánea de endófitos y patógenos podría originar efectos de retroalimentación PS nulos o incluso positivos.

El segundo interrogante hace referencia a los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la broza. Los análisis químicos realizados sugieren que estos compuestos podrían ser los responsables de los efectos observados en los **Capítulos 3 y 4**, aunque se necesitan más estudios para poder confirmarlo. Resultaría interesante llevar a cabo la cuantificación e identificación de estos compuestos en los extractos obtenidos de ambos tipos de broza. De esta manera, se podría corroborar la posible explicación planteada en

el **Capítulo 4**, la cual sugiere que el endófito produce diferentes compuestos en la broza aérea y subterránea de su hospedante que pueden interactuar entre sí generan efectos positivos sobre la germinación de *T. repens*.

El último interrogante está relacionado con la descomposición de la broza. Se ha visto que la broza aérea producida por las plantas con endófitos se descompone más lentamente que la producida por plantas libres de endófitos (Omacini et al. 2004,) y esto puede tener implicancias sobre las vías físicas y químicas. En el **Capítulo 3** tanto las plantas como sus simbiontes pueden haber estado expuestos a los productos de descomposición, pero en esta tesis no se aislaron ni estudiaron los efectos generados por este proceso. Las diferencias encontradas entre los efectos que la broza y sus lixiviados tuvieron sobre la micorrización y la nodulación de *T. repens* tiene que ver con los compuestos liberados durante este proceso. Para corroborarlo sería necesario utilizar la broza en un estado de mayor descomposición. Además, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, resultaría interesante analizar el establecimiento de *T. repens* en presencia del legado generado por las plantas vivas, junto con los productos de la lixiviación y descomposición de la broza subterránea.

5.5. CONCLUSIONES GENERALES

- Los hongos endófitos, simbioses foliares restringidos a los tejidos aéreos, afectan los procesos de retroalimentación PS a través de modificar el legado químico que sus plantas hospedantes dejan en el suelo.
- Los tejidos vivos de la simbiosis gramínea-endófito dejan un legado químico en el suelo que afectan indirectamente a *T. repens* a través de modificar su interacción con rizobios y HMA.
- A través de los procesos de lixiviación, la broza producida por la simbiosis gramínea-endófito deja un legado químico en el suelo que afecta directamente el establecimiento de *T. repens*. Mientras que la broza subterránea genera efectos negativos, la broza aérea sola o acompañada de la subterránea genera efectos positivos.
- Los análisis químicos realizados sugieren que los fenoles y los flavonoides podrían ser los responsables de los efectos producidos por los distintos tipos de broza, pero se necesita más investigación para poder identificarlos.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, M., Edwards, G.R., Ridgway, H.J., Cameron, K.C., Di, H.J., y Raven, J.A. (2011). Positive plant microbial interactions in perennial ryegrass dairy pasture systems. *Annals of Applied Biology*, 159, 79-92.
- Andrews, M., Hodge, S., y Raven, J. A. (2010). Positive plant microbial interactions. *Annals of Applied Biology*, 157, 317-320.
- Antunes, P.M., y Goss, M.J. (2005). Communication in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia, and legume plants: a review. *Roots and soil management: Interactions between roots and the soil*, 48, 199-222.
- Antunes, P.M., Miller, J., Carvalho, L.M., Klironomos, J.N., y Newman, J.A. (2008). Even after death the endophyte fungus of *Schedonorus phoenix* reduced the arbuscular mycorrhizas of other plants. *Functional Ecology*, 22, 912-918.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K.I., y Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435, 824-827.
- Akiyama, K., y Hayashi, H. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungus-promoted accumulation of two new triterpenoids in cucumber roots. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66, 762-769.
- Altieri, M.A., y Koohafkan, P. (2003). Globally Important Ingenious Agricultural Heritage Systems (GIAHS): extent, significance, and implications for development. In *Proceedings of the second international workshop and steering committee meeting for the globally important agricultural heritage systems (GIAHS) project*. FAO, Rome, Italy (pp. 7-9).
- Armas, C., Ordiales, R., y Pugnaire, F.I. (2004). Measuring plant interactions: a new comparative index. *Ecology*, 85, 2682-2686.
- Arrieta, A.M., Iannona, L.J., Scervinio, J.M., Vinagle, M.V., y Novas, M.V. (2015). A foliar endophyte increases the diversity of phosphorus-solubilizing rhizospheric fungi and mycorrhizal colonization in the wild grass *Bromus auleticus*. *Fungal Ecology*, 17, 146-154.
- Ayres, E., Dromph, K.M., Cook, R., Ostle, N., y Bardgett, R.D. (2007). The influence of below-ground herbivory and defoliation of a legume on nitrogen transfer to neighbouring plants. *Functional Ecology*, 21, 256-263.
- Babikova Z., Gilbert L., Bruce T.J.A., Birkett M., Caulfield J.C., Woodcock C., Pickett J.A., y Johnson D. (2013). Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack. *Ecology Letters*, 16, 835-843.
- Babikova, Z., Gilbert, L., Bruce, T.J.A, Dewhurst, S.Y., Pickett, J.A., y Johnson, D. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi and aphids interact by changing host plant quality and volatile emission. *Functional Ecology*, 28, 375-385.
- Babu, C.M., y Kandasamy, O.S. (1997). Allelopathic effects of *Eucalyptus globules* Labill.
- Bacon, C.W., y White Jr., J.F. (1994). Stains, media, and procedures for analyzing endophytes. *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*, 47-56.
- Bagga, S., y Straney, D. (2000). Modulation of cAMP and phosphodiesterase activity by flavonoids which induce spore germination of *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani*). *Physiological and molecular plant pathology*, 56, 51-61.
- Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M., y Vivanco, J.M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant science*, 9, 26-32.

- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., y Vivanco, J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology*, 57, 233-266.
- Baldi, G., Guerschman, J.P., y Paruelo, J.M. (2006). Characterizing fragmentation in temperate South America grasslands. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 116(, 197-208.
- Baldi, G., y Paruelo, J. M. (2008). Land-use and land cover dynamics in South American temperate grasslands. *Ecology and Society*, 13.
- Bardgett, R.D., y Wardle, D.A. (2010). *Aboveground-belowground linkages: biotic interactions, ecosystem processes, and global change*. Oxford University Press.
- Bardgett, R.D., Wardle, D.A., y Yeates, G.W. (1998). Linking above-ground and below-ground interactions: how plant responses to foliar herbivory influence soil organisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1867-1878.
- Bardi, D.V., y Vivanco, J.M. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ*, 32, 666–681.
- Barrett, L.I. (1931). Influence of forest litter on the germination and early survival of chestnut oak, *Quercus montana*, Willd. *Ecology*, 12, 476-484.
- Barto, E.K., Weidenhamer, J.D., Cipollini, D., y Rillig, M.C. (2012). Fungal superhighways: do common mycorrhizal networks enhance below ground communication? *Trends in Plant Science*, 17, 633-637.
- Bascompte, J. (2019). Mutualism and biodiversity. *Current Biology*, 29(11), R467-R470.
- Bastías, D.A., Martínez-Ghersa, M.A., Ballaré, C.L., y Gundel, P.E. (2017). Epichloë fungal endophytes and plant defenses: not just alkaloids. *Trends in Plant Science*, 22, 939-948.
- Bastías, D.A., Alejandra Martínez-Ghersa, M., Newman, J.A., Card, S.D., Mace, W.J., y Gundel, P.E. (2018). The plant hormone salicylic acid interacts with the mechanism of anti-herbivory conferred by fungal endophytes in grasses. *Plant, Cell y Environment*, 41, 395-405.
- Bauer, J.T., Kleczewski, N.M., Bever, J.D., Clay, K., y Reynolds, H.L. (2012). Nitrogen-fixing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, and the productivity and structure of prairie grassland communities. *Oecologia*, 170(4), 1089-1098.
- Becker, M., y Drapier, J. (1984). The part of allelopathy in the difficulties of white fir regeneration (*Abies alba* Mill.). 1. Phytotoxic properties of the aqueous extracts of fir needles [natural regeneration, forest site, humus, autotoxicity, mycorrhiza, chromatography]. *Acta Oecologica Oecologia Plantarum (France)*, 5, 347-356.
- Belesky, D.P., Burner, D.M., y Ruckle, J.M. (2008). Does endophyte influence resource acquisition and allocation in defoliated tall fescue as a function of microsite conditions? *Environmental and Experimental Botany* 63, 368–377.
- Bender, S.F., Wagg, C., y van der Heijden, M.G. (2016). An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends in ecology & evolution*, 31, 440-452.
- Bengtsson, J., Bullock, J.M., Egoh, B., Everson, C., Everson, T., O'Connor, T., O'Farrel, P.J., Smith, H.G., y Lindborg, R. (2019). Grasslands—more important for ecosystem services than you might think. *Ecosphere*, 10, e02582.
- Bennett, J.A., Maherali, H., Reinhart, K.O., Lekberg, Y., Hart, M.M., y Klironomos, J. (2017). Plant-soil feedbacks and mycorrhizal type influence temperate forest population dynamics. *Science*, 355, 181-184.
- Bennett, J.A., y Klironomos, J. (2019). Mechanisms of plant-soil feedback: Interactions among biotic and abiotic divers. *New Phytologist*, 222, 91–96.

- Berhow, M., y Vaughn, S. (1999). Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. *Principles Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions*. CRC Press, Boca Raton.
- Bethlenfalvai, G. J., Brown, M. S., y Franson, R. L. (1990). Glycine-Glomus-Bradyrhizobium symbiosis: X. Relationships between leaf gas exchange and plant and soil water status in nodulated, mycorrhizal soybean under drought stress. *Plant physiology*, 94, 723-728.
- Bever, J.D. (1994). Feedback between plants and their soil communities in an old field community. *Ecology*, 75, 1965-1977.
- Bever, J.D. (2002). Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269, 2595-2601.
- Bever, J.D. (2015). Preferential allocation, physio-evolutionary feedbacks, and the stability and environmental patterns of mutualism between plants and their root symbionts. *New Phytologist*, 205, 1503-1514.
- Bever, J.D., Westover, K.M., y Antonovics, J. (1997). Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal of Ecology*, 561-573.
- Bilenca, D., y Miñarro, F. (2004). Identificación de áreas valiosas de pastizal en las pampas y campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. *Fundación Vida Silvestre Argentina*, Buenos Aires.
- Bruckert, S., Toutain, F., Tchicaya, J., y Jacquin, F. (1971). Influence des pluviocessivats de hêtre et de pin sylvestre sur les processus d'humification. *Oecology of Plants*, 6, 329-339.
- Bryant, R.H., Parsons, A., Rasmussen, S., y Edwards, G. (2009). Pasture production and botanical composition of high sugar and control ryegrasses with or without endophyte under irrigation in Canterbury. *New Zealand Grassland Association*.
- Bush, L.P., Wilkinson, H.H., y Schardl, C.L. (1997). Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology*, 114, 1-7.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Barile, E., Lanzotti, V., y Scala, F. (2011). Decomposition of Medicago sativa residues affects phytotoxicity, fungal growth and soil-borne pathogen diseases. *Decomposition of Medicago Sativa Residues Affects Phytotoxicity, Fungal Growth and Soil-Borne Pathogen Diseases*, 57-69.
- Bommarco, R., Kleijn, D., y Potts, S.G. (2013). Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends in ecology & evolution*, 28, 230-238.
- Bosy, J.L., y Reader, R.J. (1995). Mechanisms underlying the suppression of forb seedling emergence by grass (*Poa pratensis*) litter. *Functional Ecology*, 635-639.
- Bowatte, S., Barrett, B., Luscombe, C., Hume, D.E., Luo, D., Theobald, P. y Newton, P.C. (2011). Effect of grass species and fungal endophyte on soil nitrification potential. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 54, 275-284.
- Callaway, R.M., DeLucia, E.H., Moore, D., Nowak, R., y Schlesinger, W.H. (1996). Competition and facilitation: contrasting effects of *Artemisia tridentata* on desert vs. montane pines. *Ecology*, 77, 2130-2141.
- Caride, C., Piñeiro, G., y Paruelo, J.M. (2012). How does agricultural management modify ecosystem services in the Argentine Pampas? The effects on soil C dynamics. *Agriculture, ecosystems & environment*, 154, 23-33.
- Casas, C., Gundel, P.E., Semmartin, M., Schnyder, H., y Omacini, M. (2016). The enhancement of invasion ability of an annual grass by its fungal endophyte depends on recipient community structure. *Biology Invasion*, 18, 1853-1865.

- Casas, C., Omacini, M., Montecchia, M.S., y Correa, O.S. (2011). Soil microbial community responses to the fungal endophyte *Neotyphodium* in Italian ryegrass. *Plant and Soil*, 340, 347–355.
- Cauhépé, M.A., y Hidalgo, L. (2005). La Pampa Inundable, el uso ganadero como base de la sustentabilidad social, económica y ambiental. *In: La Heterogeneidad de la Vegetación de los Agroecosistemas*. De: Oosterheld M., Aguiar M., Ghersa C., Paruelo J. (Eds.) Un homenaje a Rolando León. Buenos Aires. Editorial Facultad de Agronomía UBA. Págs. 401-411.
- Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R., y Weiskopf, L. (2010). Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil*, 329, 1-25.
- Cheplick, G.P., Faeth, S., y Faeth, S.H. (2009). Ecology and evolution of the grass-endophyte symbiosis. OUP USA.
- Chestnutt, D.M.B., y Lowe, J. (1970). White clover/grass relationships: agronomy of white clover/grass swards: a review. *White clover/grass relationships: agronomy of white clover/grass swards: a review.*, 191-213.
- Chiapusio, G., Sanchez, A.M., Reigosa, M.J., Gonzalez, L., y Pellissier, F. (1997). Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process?. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 2445-2453.
- Chomel, M., Guittonny-Larchevêque, M., Fernandez, C., Gallet, C., DesRochers, A., Paré, D., Jackson, B.G., y Baldy, V. (2016). Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. *Journal of Ecology*, 104, 1527-1541.
- Clay, K. (1990). The impact of parasitic and mutualistic fungi on competitive interactions among plants. *The impact of parasitic and mutualistic fungi on competitive interactions among plants*, 391-412.
- Clay, K., y Holah, J. (1999). Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, 285, 1742-1744.
- Clay, K., Marks, S., y Cheplick, G.P. (1993). Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology*, 74, 1767-1777.
- Clay, K. y Scharld, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160, 99-127.
- Conway, G.R. (1987). The properties of agroecosystems. *Agricultural systems*, 24, 95-117.
- Cortois, R., y De Deyn, G.B. (2012). The curse of the black box. *Plant and Soil*, 350, 27-33.
- Coté, J.F., y Thibault, J.R. (1988). Allelopathic potential of raspberry foliar leachates on growth of ectomycorrhizal fungi associated with black spruce. *American Journal of Botany*, 75, 966–970.
- Cripps, M.G., Edwards, G.R., y McKenzie, S.L. (2013). Grass species and their fungal symbionts affect subsequent forage growth. *Basic and Applied Ecology*, 14, 225-234.
- Dag, A., Yermiyahu, U., Ben-Gal, A., Zipori, I., y Kapulnik, Y. (2009). Nursery and post-transplant field response of olive trees to arbuscular mycorrhizal fungi in an arid region. *Crop Pasture Science*, 60, 427–433.
- Das C.R., Mondal N.K., Aditya P., Datta J.K., Banerjee A. y Das K. (2012). Allelopathic potentialities of leachates of leaf litter of some selected tree species on gram seeds under laboratory conditions. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences* 3, 59-65.

- de Battista, J.P. (2005). *Neotyphodium* research and application in South America. In: C. Roberts, C. West, y D. Spiers (Eds.). *Neotyphodium* in Cool Season Grasses pp. 63–69. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- de Varennes, A., y Goss, M.J. (2007). The tripartite symbiosis between legumes, rhizobia and indigenous mycorrhizal fungi is more efficient in undisturbed soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2603-2607.
- Decunta, F.A., Pérez, L.I., Malinowski, D.P., Molina-Montenegro, M.A., y Gundel, P.E. (2021). A systematic review on the effects of *Epichloë* fungal endophytes on drought tolerance in cool-season grasses. *Frontiers in plant science*, 12, 644731.
- Denison, R.F. (2000). Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist*, 156, 567–576.
- Denison, R.F., y Kiers, E.T. (2004). Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 87–193.
- Dhawan, S.R., y Gupta, S.K. (1996). Allelopathic potential of various leachate combinations towards SG and ESG of *Parthenium hysterophorus* Linn. *World Weeds*, 3, 135-144.
- Díaz, S., Pascual, U., Stenseke, M., Martín-López, B., Watson, R. T., Molnár, Z., Hill, R., Chan, K.M.A., Baste, I.A., Brauman, K.A., Polasky, S., Church, A., Lonsdale, M., Larigauderie, A., Leadley, P.W., van Oudernhoven, A.P.E., van der Plaats, F., Scröter, M., Lavorel, M., Aumneruddy-Thomas, Y., Bukvareva, E., Davies, K., Demissew, S., Erpul, P., Guerra, C.A., Hewitt, C.L., Keune, H., Lindley, S., y Shirayama, Y. (2018). Assessing nature's contributions to people. *Science*, 359, 270-272.
- Dodd, I.C., Zinovkina, N.Y., Safronova, V.I., y Belimov, A.A. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*, 157, 361-379.
- Donath, T.W., y Eckstein, R.L. (2008). Grass and oak litter exert different effects on seedling emergence of herbaceous perennials from grasslands and woodlands. *Journal of Ecology*, 96, 272–280.
- Doré, T., Makowski, D., Malézieux, E., Munier-Jolain, N., Tchamitchian, M., y Tittone, P. (2011). Facing up to the paradigm of ecological intensification in agronomy: revisiting methods, concepts, and knowledge. *European journal of agronomy*, 34, 197-210.
- Douglas, A.E. (2010). *The Significance of Symbiosis*. Princeton University Press. Princeton, NJ, USA. 214 pp.
- Druille, M., García-Parisi, P.A., Golluscio, R.A., Cavagnaro, F.P., y Omacini, M. (2016). Repeated annual glyphosate applications may impair beneficial soil microorganisms in temperate grassland. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 230, 184-190.
- Dupont, P.Y., Eaton, C., Wargent, J.J., Fectner, S., Solomon, P., Schmid, J., Day, R.C., Scott, B., y Cox, M.P. (2015). Fungal endophyte infection of ryegrass reprograms host metabolism and alters development. *New Phytologist*, 208, 1227–1240.
- Eckstein, R.L., y Donath, T.W. (2005). Interactions between litter and water availability affect seedling emergence in four familial pairs of floodplain species. *Journal of Ecology*, 93, 807–816.
- Eerens, J.P.J., Lucas, R.J., Easton, S. y White, J.G.H. (1998). Influence of the ryegrass endophyte (*Neotyphodium lolii*) in a cool-moist environment III Interaction with white clover. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 41, 201–207.
- Ehrenfeld, J. G., Ravit, B., y Elgersma, K. (2005). Feedback in the plant-soil system. *Annual Review of Environmental Resource*, 30, 75–115.

- Facelli, J.M., y Pickett, S.T.A. (1991a). Plant litter: Its dynamics and effects on plant community structure. *Botanical Review*, 57, 1–31.
- Facelli, J.M., y Pickett, S.T.A. (1991b). Plant litter: Light interception and effects on an old-field plant community. *Ecology*, 72, 1024–1031.
- Feddermann, N., Finlay, R., Boller, T., y Elfstrand, M. (2010) Functional diversity in arbuscular mycorrhiza—the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology* 3, 1-8.
- Fiorenza, J.E., Fernández, P.C., y 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.
- Foley, J.A. (2011). Can we feed the world sustain the planet?. *Scientific American*, 305(5), 60-65.
- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, T., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N., y Snyder, P. K. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309, 570-574.
- Fontaine, C., Dajoz, I., Meriguet, J., y Loreau, M. (2006). Functional diversity of plant–pollinator interaction webs enhance the persistence of plant communities. *PLoS biology*, 4, e1.
- Fontana, A., Reichelt, M., Hempel, S., Gershenson, J., y 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.
- Franzluebbers, A.J. (2006). Short-term responses of soil C and N fractions to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil*, 282, 153-164.
- Franzluebbers, A.J., Nazih, N., Stuedemann, J.A., Fuhrmann, J.J., Schomberg, H.H., y Hartel, P.G. (1999). Soil carbon and nitrogen pools under low-and high-endophyte-infected tall fescue. *Soil Science Society of America Journal*, 63, 1687-1694.
- Freschet, G.T., Aerts, R., y Cornelissen, J.H. (2012). A plant economics spectrum of litter decomposability. *Functional Ecology*, 26, 56-65.
- Fuchs, B., y Krauss, J. (2019). Can *Epichloë* endophytes enhance direct and indirect plant defence?. *Fungal Ecology*, 38, 98-103.
- Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68, 280-300.
- 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, D.M., Bañuelos, J., y Houle, G. (2002). Differential effects of acorn burial and litter cover on *Quercus rubra* recruitment at the limit of its range in eastern North America. *Canadian Journal of Botany*, 80, 1115–1120.
- García-Garrido, J.M., Lenzemo, V., Castellanos-Morales, V., Steinkellner, S., y Vierheilig, H. (2009). Strigolactones, signals for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 19, 449-459.
- García-Parisi, P.A., Casas, C., Gundel, P.E., y Omacini, M. (2012). Consequences of grazing on the vertical transmission of a fungal *Neotyphodium* symbiont in an annual grass population. *Austral Ecology*, 37, 620-628.
- García-Parisi, P.A., Gavilán, S.A., Casas, C., Gundel, P.E., y Omacini, M. (2021). A fungal endophyte of an annual weed reduces host competitive ability and confers associational protection to wheat. *Basic and Applied Ecology*, 50, 16-24.

- García-Parisi, P.A., Grimoldi, A.A., y Omacini, M. (2014). Endophytic fungi of grasses protect other plants from aphid herbivory. *Fungal Ecology*, 9, 61-64.
- García-Parisi, P.A., Lattanzi, F.A., Grimoldi, A.A., Druille, M., y Omacini, M. (2017). Three symbionts involved in interspecific plant-soil feedback: epichloid endophytes and mycorrhizal fungi affect the performance of rhizobia-legume symbiosis. *Plant and Soil*, 412, 151-162.
- García-Parisi, P.A., Lattanzi, F., Grimoldi, A., y Omacini, M. (2015). Multi-symbiotic systems: Functional implications of the coexistence of grass-endophyte and legume-rhizobia mutualisms. *Oikos*, 124, 553-560.
- García-Parisi, P.A., y 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.
- García-Parisi, P.A., y Omacini, M. (2019). Interactive effects of co-occurring epichloid endophytes, rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi modulating their benefits to grasses and legumes. *Endophyte Biotechnology: Potential for Agriculture and Pharmacology*, 8, 109.
- Garibaldi, L.A., Carvalheiro, L.G., Leonhardt, S.D., Aizen, M.A., Blaauw, B.R., Isaacs, R., Kuhlmann, M., Kleijn, D., Klein, A.M., Kremen, C., Morandin, L., Scheper, J., y Winfree, R. (2014). From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12, 439-447.
- Garibaldi, L.A., Steffan-Dewenter, I., Kremen, C., Morales, J. M., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Carvalheiro, L.G., Chacoff, N.P., Dudenhöffer, J.H., Greenleaf, S.S., Holzschuk, A., Isaacs, R., Krewenka, K., Mandelik, Y., Morandin, L.A., Potts, S.G., Ricketts, T.H., Szentgyörgyi, H., Viana, B.F., Westphal, C., Winfree, R., y Klein, A. M. (2011). Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honeybee visits. *Ecology letters*, 14, 1062-1072.
- Garibaldi, L.A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Kremen, C., Carvalheiro, L.G., Harder, L.D., Afik, O., Bartomeus, I., Benjamin, F., Boreux, V., Cariveau, D., Chacoff, N.P., Dudenhöffer, J.H., Freitas, B.M., Ghazoul, J., Greenleaf, S., Hipólito, J., Holzschuh, A., Howlett, B., Isaacs, R., Javorek, S.K., Kennedy, C.M., Krewenka, K.M., Krishnan, S., Mandelik, Y., Mayfield, M.M., Motzke, I., Munyuli, T., Nault, B.A., Otieno, M., Petersen, J., Pisanty, J., Pisanty, G., Potts, S.G., Rader, R., Ricketts, T.H., Rundlöf, M., Seymour, C.L., Schüepp, C., Szentgyörgyi, H., Taki, H., Tscharrntke, T., Vergara, C.H., Viana, B.F., Wanger, T.C., Westphal, C., Williams, N., y Klein, A.M. (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honeybee abundance. *Science*, 339, 1608-1611.
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D.G., y Bonfante, P. (2008). Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*, 20, 1407-1420.
- Gibson, D.J. (2009). *Grasses and grassland ecology*. Oxford University Press.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S., y Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812-818.
- Grace, J.B., y Tilman, D. (1990). *Perspectives on Plant Competition*. Academic Press, Inc., San Diego, USA. 484 pp.
- Graham, P.H., y Vance, C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131, 872-877.

- Graham, J.H., Leonard, R.T. and Menge, J.A. (1981) Membrane mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol*, 68, 548–552.
- Grime, J.P. (2006). *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. John Wiley y Sons.
- Gundel, P.E., Batista, W.B., Texeira, M., Omacini, M., y Ghera, C.M. (2008). *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings of the Royal Society* 275, 897–905.
- Gundel, P.E., Garibaldi, L.A., Martínez-Ghera, M.A., y Ghera, C.M. (2011). *Neotyphodium* endophyte transmission to *Lolium multiflorum* seeds depends on the host plant fitness. *Environmental and Experimental Botany*, 71, 359-366.
- Gundel, P.E., Garibaldi, L.A., Tognetti, P.M., Aragón, R., Ghera, C.M., y Omacini, M. (2009). Imperfect vertical transmission of the endophyte *Neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the Flooding Pampa. *Microbial Ecology*, 57, 740-748.
- Gundel, P.E., Helander, M., Garibaldi, L.A., Vázquez-de-Aldana, B.R., Zabalgogea, I., y Saikkonen, K. (2016). Role of foliar fungal endophytes in litter decomposition among species and population origins. *Fungal Ecology*, 21, 50-56.
- Gundel, P.E., Helander, M., Garibaldi, L.A., Vázquez-de-Aldana, B.R., Zabalgogea, I., y Saikkonen, K. (2017). Direct and indirect effects of the fungal endophyte *Epichloë uncinatum* on litter decomposition of the host grass, *Schedonorus pratensis*. *Plant Ecology*, 218, 1107-1115.
- Gundel, P.E., Martínez-Ghera, M.A., Omacini, M., Cuyeu, R., Pagano, E., Ríos, R., y Ghera, C.M. (2012). Mutualism effectiveness and vertical transmission of symbiotic fungal endophytes in response to host genetic background. *Evolutionary applications*, 5, 838-849.
- Guo, J., McCulley, R.L., y McNear, D.H. Jr. (2015). Tall fescue cultivar and fungal endophyte combinations influence plant growth and root exudate composition. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–13.
- Guo, J., McCulley, R., Phillips T., y McNear, D. (2016). Fungal endophyte and tall fescue cultivar interact to differentially effect bulk and rhizosphere soil processes governing C and N cycling. *Soil Biology Biochemistry*, 101, 165–174.
- Guo, Y.-E., Wang, X.-Y., Gao, P., y Duan, T.-Y. (2017). Effects of *Glomus mosseae* and grass endophytes on the growth of *Lolium perenne* under phosphorus addition. *Acta Prataculturae Sin.* 26, 160-169.
- Gurevitch, J., Morrow, L. L., Wallace, A., y Walsh, J. S. (1992). A meta-analysis of competition in field experiments. *The American Naturalist*, 140, 539-572.
- Habte, M., Miyasaka, S.C., y Matsuyama, D.T. (2001). Arbuscular mycorrhiza fungi improve early forest-tree establishment, in *Plant Nutrition: Food Security and Sustainability of Agroecosystems Through Basic and Applied Research*, eds WJ Horst, MK Schenk, A
- Hall, I.R. (1978). Effects of endomycorrhizas on the competitive ability of white clover. *New Zealand journal of agricultural research*, 21, 509-515.
- Hails, R.S. (2002). Assessing the risks associated with new agricultural practices. *Nature*, 418, 685-688.
- Harborne, J.B. (1993, September). Do natural plant phenols play a role in ecology?. In *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance* 381 (pp. 36-45).

- Hartley, R.D., y Whitehead, D.C. (1985). Phenolic acids in soils and their influence on plant growth and soil microbial processes. In *Soil organic matter and biological activity* (pp. 109-149). Springer, Dordrecht.
- Hay, M.E., Parker, J.D., Burkepille, D.E., Caudill, C.C., Wilson, A.E., Hallinan, Z.P., y Chequer, A.D. (2004). Mutualisms and aquatic community structure: the enemy of my enemy is my friend. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 175-197.
- Haynes, R.J. (1980). Competitive aspects of the grass-legume association. *Advances in agronomy*, 33, 227-261.
- Hennessy, L.M., Popay, A.J., Glare, T.R., Finch, S.C., Cave, V.M., y Rostás, M. (2022). Olfactory responses of Argentine stem weevil to herbivory and endophyte-colonisation in perennial ryegrass. *Journal of Pest Science*, 95, 263-277.
- Herben, T., Mayerová, H., Skálová, H., Hadincová, V., Pecháčková, S., y Krahulec, F. (2017). Long-term time series of legume cycles in a semi-natural montane grassland: evidence for nitrogen-driven grass dynamics?. *Functional Ecology*, 31, 1430-1440.
- Hirsch, A.M. (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122, 211-237.
- Hoekstra, J.M., Boucher, T.M., Ricketts, T.H., y Roberts, C. (2005). Confronting a biome crisis: global disparities of habitat loss and protection. *Ecology letters*, 8, 23-29.
- Hodge, A., y Fitter, A.H. (2013). Microbial mediation of plant competition and community structure. *Functional Ecology*, 27, 865-875.
- Hoveland, C.S., Bouton, J.H., y Durham, R.G. (1999). Fungal endophyte effects on production of legumes in association with tall fescue. *Agronomy Journal*, 91, 897.
- Hovstad, K.A., y Ohlson, M. (2008). Physical and chemical effects of litter on plant establishment in semi-natural grasslands. *Plant Ecology*, 196, 251-260.
- Huang, X.F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., y Vivanco, J.M. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92, 267-275.
- Hulme, P.E. (1996). Herbivory, plant regeneration, and species coexistence. *Journal of Ecology*, 609-615.
- Hussain, I., Singh, N.B., Singh, A., y Singh, H. (2017). Allelopathic potential of sesame plant leachate against *Cyperus rotundus* L. *Annals of Agrarian Science*, 15, 141-147.
- Iannone, L.J., Vignale, M. V., Pinget, A.D., Re, A., Mc Cargo, P.D., y 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.
- Inderjit. (1996). Plant phenolics in allelopathy. *The Botanical Review*, 186-202
- Inderjit, Wardle, D.A., Karban, R., y Callaway, R.M. (2011). The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends in Ecology and Evolution*, 26, 655-662.
- Inderjit, y Weston, L.A. (2003). Root Exudates: an Overview. In: Kroon H., Visser E.J.W (Eds). *Root Ecology. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, vol 168. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Iqbal, J., Nelson, J.A., y McCulley, R.L. (2013). Fungal endophyte presence and genotype affect plant diversity and soil-to-atmosphere trace gas fluxes. *Plant and Soil*, 364, 15-27.

- Jenkins, M.B., Franzluebbers, A.J., y Humayoun, S.B. (2006). Assessing short-term responses of prokaryotic communities in bulk and rhizosphere soils to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil*, 289, 309–320.
- Kapulnik, Y., Tsrur, L., Zipori, I., Hazanovsky, M., Wininger, S., y Dag, A. (2010). Effect of AMF application on growth, productivity and susceptibility to *Verticillium* wilt of olives grown under desert conditions. *Symbiosis*, 52, 103–111.
- Kardol, P., Cornips, N.J., van Kempen, M.M., Bakx-Schotman, J.T., y van der Putten, W. H. (2007). Microbe-mediated plant–soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly. *Ecological monographs*, 77, 147–162.
- Kaschuk, G., Kuyper, T. W., Leffelaar, P. A., Hungria, M., y Giller, K.E. (2009). Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses?. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1233–1244.
- Keiluweit, M., Bougoure, J.J., Nico, P.S., Pett-Ridge, J., Weber, P.K., y Kleber, M. (2015). Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nature Climate Change*, 5, 588–595.
- Klironomos, J.N. (2002). Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 417, 67–70.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Loughon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D.G., y Bécard, G. (2003). A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant physiology*, 131, 952–962.
- Kothamasi, D., Kiers, E.T., y van der Heijden, M.G.A. (2010). Mutualisms and community organization. *Community Ecology, Processes, Models and Applications*, 179–192.
- Kover, P.X., Dolan, T., y Clay, K. (1997). Potential versus actual contribution of vertical transmission to pathogen fitness. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Science*, 264, 903–909.
- Krauss, J., Härri, S.A., Bush, L., Husi, R., Bigler, L., Power, S.A., y Müller, C.B. (2007). Effects of fertilizer, fungal endophytes and plant cultivar on the performance of insect herbivores and their natural enemies. *Functional Ecology*, 21, 107–116.
- Krausmann, F., Erb, K.H., Gingrich, S., Haberl, H., Bondeau, A., Gaube, V., ... y Searchinger, T.D. (2013). Global human appropriation of net primary production doubled in the 20th century. *Proceedings of the national academy of sciences*, 110, 10324–10329.
- Kremer, K.N., Promis, Á.A., Mancilla, G., y Magni, C.R. (2019). Leaf litter and irrigation can increase seed germination and early seedling survival of the recalcitrant-seeded tree *Beilschmiedia miersii*. *Austral Ecology*, 44, 86–94.
- Lapornik, B., Prošek, M., y Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71, 214–222.
- Larimer, A.L., Bever, J.D., y Clay, K. (2012). Consequences of simultaneous interactions of fungal endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi with a shared host grass. *Oikos*, 121, 2090–2096.
- Larimer, A.L., Clay, K., y Bever, J.D. (2014). Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a Prairie legume. *Ecology*, 95, 1045–1054.
- Lehtonen, P., Helander, M., Wink, M., Sporer, F., y Saikkonen, K. (2005). Transfer of endophyte-origin defensive alkaloids from a grass to a hemiparasitic plant. *Ecology letters*, 8, 1256–1263.

- Leigh, J., Fitter, A.H., y Hodge, A. (2011). Growth and symbiotic effectiveness of an arbuscular mycorrhizal fungus in organic matter in competition with soil bacteria. *FEMS microbiology ecology*, 76, 428-438.
- Lemaire, G., Hodgson, J., y Chabbi, A. (Eds.). (2011). *Grassland productivity and ecosystem services*. Cabi.
- Lemons, A., Clay, K., y Rudgers, J.A. (2005). Connecting plant-microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. *Ecosystem Ecology*, 145, 595-604.
- Leuchtman, A., Bacon, C.W., Schardl, L., White, J.F., y Tadych, M. (2014). Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichoe*. *Mycologia*, 106, 202-215.
- Li, F., Christensen, M.J., Gao, P., Li, Y., y Duan, T. (2018). An arbuscular mycorrhizal fungus and *Epichloë festucae* var. *lolii* reduce *Bipolaris sorokiniana* disease incidence and improve perennial ryegrass growth. *Mycorrhiza*, 28, 159-169.
- Li, Q., Song, Y., Li, G., Yu, P., Wang, P., y Zhou, D. (2015). Grass-legume mixtures impact soil N, species recruitment, and productivity in temperate steppe grassland. *Plant and Soil*, 394, 271-285.
- Li, Z.H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.D., y Jiang, D.A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15, 8933-8952.
- Lin, G., McCormack, M.L., y Guo, D. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungal effects on plant competition and community structure. *Journal of Ecology*, 103, 1224-1232.
- Liu, Q., Parsons, A.J., Xue, H., Fraser, K., Ryan, G.D., Newman, J.A., y 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.
- Liu, J., Dietz, T., Carpenter, S.R., Alberti, M., Folke, C., Moran, E., ... y Taylor, W. W. (2007). Complexity of coupled human and natural systems. *Science*, 317, 1513-1516.
- Liu, H., Wu, M., Liu, J., Qu, Y., Gao, Y., Ren, A. (2020). Tripartite interactions between endophytic fungi, arbuscular mycorrhizal fungi, and *Leymus chinensis*. *Microbial Ecology*, 79, 98-109.
- Long, S.R. (1989). Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56, 203-214.
- López-Ráez, J.A., Charnikhova, T., Gómez-Roldán, V., Matusova, R., Kohlen, W., De Vos, R., Verstappen, F., Puech-Pages, V., Bécard, G., y Mulder, P. (2008). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist*, 178(4), 863-874.
- Lotka, A.J. (1925). *Elements of physical biology*. Williams y Wilkins.
- Mack, K.M.L., y Rudgers, J.A. (2008). Balancing multiple mutualists: asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. *Oikos*, 117, 310-320.
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., y Niebel, A. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469, 58-63.
- Malamy, J.E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, cell y environment*, 28, 67-77.
- Malinowski, D.P., y Belesky, D.P. (2000). Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40, 923-940.

- Malinowski, D.P., Alloush, G.A., y Belesky, D.P. (1998). Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Plant and Soil*, 205, 1–12.
- Malinowski, D.P., Belesky, D.P., y Fedders, J.M. (1999). Endophyte infection may affect the competitive ability of tall fescue grown with red clover. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 183, 91-101.
- Manaut, N., Sanguin, H., Ouahmane, L., Bressan, M., Thioulouse, J., Baudoin, E., Galiana, A., Hafidi, M., Prin, Y., y Duponnois, R. (2015). Potentialities of ecological engineering strategy based on native arbuscular mycorrhizal community for improving afforestation programs with carob trees in degraded environments. *Ecology Engineer*, 79, 113–119.
- Manrubia, M., van der Putten, W.H., Weser, C., y Veen, C. (2020). Rhizosphere and litter feedbacks to range-expanding plant species and related natives. *Journal of Ecology*, 108, 353-365.
- Manzur, M.E., Garello, F.A., Omacini, M., Schnyder, H., Sutka, M.R., García-Parisi, P.A., y Fricke, W. (2022). Endophytic fungi and drought tolerance: ecophysiological adjustment in shoot and root of an annual mesophytic host grass. *Functional Plant Biology*, 49, 272-282.
- Marks, S., Clay, K., y Cheplick, G.P. (1991). Effects of fungal endophytes on interspecific and intraspecific competition in the grasses *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. *Journal of applied ecology*, 194-204.
- Maron, J.L., y Crone, E. (2006). Herbivory: effects on plant abundance, distribution and population growth. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 2575-2584.
- Matthews, J.W., y Clay, K. (2001). Influence of fungal endophyte infection on plant–soil feedback and community interactions. *Ecology*, 82, 500-509.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4, 1-20.
- Mazzoleni, S., Bonanomi, G., Incerti, G., Chiusano, M.L., Termolino, P., Mingo, A., Senatore, M., Giannio, F., Cartenì, F., Rietkerk, M., y Lanzotti, V. (2015). Inhibitory and toxic effects of extracellular self-DNA in litter: a mechanism for negative plant–soil feedbacks?. *New Phytologist*, 205, 1195-1210.
- McCargo, P.D., Iannone, L.J., Soria, M., y 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. y 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.
- Meghvansi, M.K., Prasad, K., Harwani, D., y Mahna, S.K. (2008). Response of soybean cultivars toward inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* in the alluvial soil. *European Journal of Soil Biology*, 44, 316-323.
- Meijer, G., y Leuchtman, A. (1999). Multistrain infections of the grass *Brachypodium sylvaticum* by its fungal endophyte *Epichloë sylvatica*. *The New Phytologist*, 141, 355-368.
- Mierziak, J., Kostyn, K., y Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19, 16240-16265.
- Moon, C.D., Scott, B., Schardl, C.L., y Christensen, M.J. (2000). The evolutionary origins of *Epichloë* Endophytes from Annual Ryegrasses. *Mycologia*, 6, 1103-1118.

- Mortenson, M.C., Schuman, G.E., Ingram, L.J., Nayigihugu, V., y Hess, B.W. (2005). Forage production and quality of a mixed-grass rangeland interseeded with *Medicago sativa* ssp. *falcata*. *Rangeland ecology y management*, 58, 505-513.
- Mylona, P., Pawlowski, K., y Bisseling, T. (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 7, 869.
- Neera, G., y Garg, O.P. (1989). Effect of exogenous treatment with some phenolic compounds on nitrogen fixation, growth and yield in *Cicer arietinum* L.(chickpea). *Current Science*, 58, 31-32.
- Newbold, T., Hudson, L.N., Hill, S. L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R.A., ... y Purvis, A. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature*, 520, 45-50.
- Newton, A.C., Gravouil, C., y Fountaine, J.M. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*, 157, 343-359.
- Novas, M.V., Cabral, D., y Godeas, A.M. (2005). Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis*.
- Novas, M.V., Iannone, L.J., Godeas, A.M., y Cabral, D. (2009). Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycological progress*, 8, 75–81
- Novas M.V., Iannone L.J., Godeas A.M. y Scervino J.M. (2011). Evidence for leaf endophyte regulation of root symbionts: effect of *Neotyphodium* endophytes on the pre-infective state of mycorrhizal fungi. *Symbiosis*, 55, 19-28.
- Omacini, M. (2014). Asexual endophytes of grasses: invisible symbionts, visible imprints in the host neighborhood. In *Advances in endophytic research* (pp. 143-157). Springer, New Delhi.
- Omacini M., Chaneton E., Bush L. y Ghera C. (2009). A fungal endosymbiont affects host plant recruitment through seed and litter mediated mechanisms. *Functional Ecology*, 23, 1148-1156.
- Omacini, M., Chaneton, E.J., y Ghera, C.M. (2005). A hierarchical framework for understanding the ecosystem consequences of endophyte-grass symbioses. *en* C. Roberts, C. P. West, y D. E. Spiers (Eds.). *Neotyphodium* In *Cool-Season Grasses Current Research Applications* pp. 141–161. Blackwell Publishing.
- Omacini, M., Chaneton, E.J., Ghera, C.M., y Muller, C.B. (2001). Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature*, 409, 78.
- Omacini, M., Chaneton, E., Ghera, C., y Otero, P. (2004). Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos*, 104, 581-589.
- Omacini, M., Eggers, T., Bonkowski, M., Gange, A.C., y Jones, T.H. (2006). Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology*, 20, 226-232.
- Ossler, J.N., Zielinski, C.A., y Heath, K.D. (2015). Tripartite mutualism: Facilitation or trade-offs between rhizobial and mycorrhizal symbionts of legume hosts. *American journal of botany*, 102, 1332-1341.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Gu, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., y Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology*, 15, 531-535.
- Oyarzabal, M., Andrade, B., Pilar, V.D., y Paruelo, J. (2019). Pastizales templados subhúmedos del sur de América del Sur. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* Elsevier 345-356.

- Pańka, D., Piesik, D., Jeske, M., y Baturó-Ciesniewska, A. (2013). Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/*Neotyphodium lolii* association as response to infection by *Fusarium poae*. *Journal of Plant Physiology*, 170, 1010–1019.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 763-775.
- Paruelo, J.M., y Sierra, M. (2022). Sustainable intensification and ecosystem services: how to connect them in agricultural systems of southern South America. *Journal of Environmental Studies and Sciences*, 1-9.
- Patchett, A., y Newman, J.A. (2021). Comparison of plant metabolites in root exudates of *Lolium perenne* infected with different strains of the fungal endophyte *Epichloë festucae* var. *lolii*. *Journal of Fungi*, 7, 148.
- Perelman, S.B., Burkart, S.E., Oyarzabal, M., Bagnato, C., y Batista, W. (2017). Climatic and land-use drivers along a latitudinal gradient: species diversity in temperate grasslands on agricultural soils. *Journal of vegetation science*, 28, 1230-1239.
- Pérez, L.I., Gundel, P.E., y 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.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., y Melville, L.H. (2004). *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press.
- Pękal, A., y Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7, 1776-1782.
- Phillips, J.M., y 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-IN18.
- Pichersky, E., y Lewinsohn, E. (2011). Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual review of plant biology*, 62, 549-566.
- Ponce, M.A., Bompadre, M.J., Scervino, J.M., Ocampo, J.A., Chaneton, E.J., y Godeas, A.M. (2009). Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye grass (*Lolium multiflorum* Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 245-253.
- Porter, J.K., Bacon, C.W., Robbins, J.D., y Betowski, D. (1981). Ergot alkaloid identification in Clavicipitaceae systemic fungi of pasture grasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 653-657.
- Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H.T., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Breeze, T. D., ... y Vanbergen, A.J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540, 220-229.
- Powell, R.G., TePaske, M.R., Plattner, R.D., White, J.F., y Clement, S.L. (1994). Isolation of resveratrol from *Festuca versuta* and evidence for the widespread occurrence of this stilbene in the Poaceae. *Phytochemistry*, 35, 335-338.
- Purushothaman, D., y Balaraman, K. (1973). Effect of soil phenolics on the growth of *Rhizobium*. *Current Science*, 42, 507-508.
- Qawasmeh, A., Obied, H. K., Raman, A., y Wheatley, W. (2012). Influence of fungal endophyte infection on phenolic content and antioxidant activity in grasses: Interaction between *Lolium perenne* and different strains of *Neotyphodium lolii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3381–3388.
- Quigley, P.E. (2000). Effects of *Neotyphodium lolii* infection and sowing rate of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on the dynamics of ryegrass/subterranean clover

- (*Trifolium subterraneum*) swards. Australian Journal of Agricultural Research, 50, 47–56.
- Rani, K., Rani, A., Sharma, P., Dahiya, A., Punia, H., Kumar, S., Sheoran, S., y Banerjee, A. (2022). Legumes for agroecosystem services and sustainability. In Advances in Legumes for Sustainable Intensification (pp. 363-380). Academic Press.
- Rasmussen, S., Parsons, A.J., y Newman, J.A. (2009). Metabolomics analysis of the *Lolium perenne-Neothypodium lolli* symbiosis: More than just alkaloids? Phytochemistry Reviews, 8, 535–550.
- Reigosa, M.J., Souto, X.C. y González, L. (1999). Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. Plant Growth Regulation, 28, 83-88.
- Rice, E.L. (1984). Allelopathy 2nd (Ed) Academic Press Inc. Orlando, Florida, USA, 424.
- Rillig, M.C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. canadian journal of soil science, 84, 355-363.
- Rose, S.L., Perry, D.A., Pilz, D., y Schoeneberger, M.M. (1983). Allelopathic effects of litter on the growth and colonization of mycorrhizal fungi. Journal of Chemical Ecology, 9, 1153–1162.
- Rostás, M., Cripps, M.G., y Silcock, P. (2015). Aboveground endophyte affects root volatile emission and host plant selection of a belowground insect. Oecologia, 177, 487-497.
- Rowan, D.D., y 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.
- Rudgers, J.A., Holah, J., Orr, S.P., y Clay, K. (2007). Forest succession suppressed by an introduced plant–fungal symbiosis. Ecology, 88, 18-25.
- Rudgers, J.A., y Orr, S. (2009). Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. Journal of Ecology, 97, 247–255.
- Ruprecht, E., y Szabó, A. (2012). Grass litter is a natural seed trap in long-term undisturbed grassland. Journal of Vegetation Science, 23, 495–504.
- Saikkonen, K., Gundel, P.E., y Helander, M. (2013). Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. Journal of chemical ecology, 39, 962-968.
- Saikkonen, K., Saari, S., y Helander, M. (2010). Defensive mutualism between plants and endophytic fungi?. Fungal Diversity, 41, 101-113.
- Sala, O.E., y Paruelo, J.M. (1997). Ecosystem services in grasslands. Nature's services: Societal dependence on natural ecosystems, 237-251.
- Sanderson, E.W., Jaiteh, M., Levy, M.A., Redford, K.H., Wannebo, A.V., y Woolmer, G. (2002). The human footprint and the last of the wild: the human footprint is a global map of human influence on the land surface, which suggests that human beings are stewards of nature, whether we like it or not. BioScience, 52, 891-904.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D., y Young, J.M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. The Journal of general and applied microbiology, 49, 155-179.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., y Godeas, A. (2005). Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. Mycological Research, 109, 789-794.
- Schardl, C.L., Young, C.A., Faulkner, J.R., Florea, S., y Pan, J. (2012). Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. Fungal ecology, 5, 331-344.
- Schlatterer, E.F., y Tisdale, E.W. (1969). Effects of litter of *Artemisia*, *Chrysothamnus*, and *Tortula* on germination and growth of three perennial grasses. Ecology, 50, 869-873.

- Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M., y Dean, D.R. (2009). Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual review of biochemistry*, 78, 701.
- Sembaring, E.N., Elya, B., y Sauriasari, R. (2018). Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content, and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.). *Pharmacognosy Journal*, 10, 123-127.
- Shrivastava, G., Ownley, B.H., Augé, R.M., Toler, H., Dee, M., Vu, A., Köllner, T.G., y Chen, F. (2015). Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis*, 65, 65-74.
- Siefert, A., Zillig, K.W., Friesen, M.L., y Strauss, S.Y. (2018). Soil microbial communities alter conspecific and congeneric competition consistent with patterns of field coexistence in three *Trifolium* congeners. *Journal of Ecology*, 106, 1876-1891.
- Siegrist J.A., McCulley R.L., Bush L.P y Phillips T.D. (2010). Alkaloids may not be responsible for endophyte-associated reductions in tall fescue decomposition rates. *Functional Ecology*, 24, 460-468.
- Singla, P., y Garg, N. (2017). Plant Flavonoids: key players in signaling, establishment, and regulation of rhizobial and mycorrhizal endosymbioses. In: Varma, A., Prasad, R., Tuteja, N. (eds) *Mycorrhiza - Function, Diversity, State of the Art*. Springer, pp. 133-176.
- Slaughter, L.C., Carlisle, A.E., Nelson, J.A., y McCulley, R.L. (2016). Fungal endophyte symbiosis alters nitrogen source of tall fescue host, but not nitrogen fixation in co-occurring red clover. *Plant and Soil*, 405, 243-256.
- Slaughter, L.C., Nelson, J.A., Carlisle, A.E., Bourguignon, M., Dinkins, R.D., Phillips, T. D., y McCulley, R.L. (2019). Tall fescue and *E. coenophiala* genetics influence root-associated soil fungi in a temperate grassland. *Frontiers in microbiology*, 10, 2380.
- Smith, S.E. y Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 2da edición. Academic Press, Inc., London, UK. 800pp.
- Smith, S.E., y Read, D.J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Smith, S.E., y Smith, F.A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 227-250.
- Soriano, A. (1991). Río de La Plata grassland. In: Coupland R.T. (Eds.) *Ecosystem of the World-Natural grasslands*. Chapter 19, Volumen 8A. Elsevier Science Publishers, Anvsterdam, pp. 367-07.
- Soriano, A., León, R.J.C., Sala, O.E., Lavado, R.S., Deregibus, V.A., Cahuepé, M.A., Scaglia, O.A., Velázquez, C.A., y Lemcoff, J.H. (1991). Río de la Plata grasslands. Pp 367-407 en R. T. Coupland (ed.). *Ecosystems of the world 8A. Natural grasslands. Introduction and western hemisphere*. Elsevier, New York.
- Sprent, J.I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New phytology*, 174(1), 11-25.
- Sprent, J.I., Ardley, J., y James, E.K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215, 40-56.
- Stahl, E. (1969). *Thin Layer Chromatography 2nd Edn* Springer-Verlag. New York.
- Stanton, M.L. (2003). Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *The American Naturalist*, 162, S10-S23.
- Stevens, D. R., y Hickey, M. J. (1990). Effects of endophytic ryegrass on the production of ryegrass/white clover pastures. In S. S. Quisenberry y R. E. Joost (Eds.),

- Proceedings of the International Symposium on Acremonium/Grass Interactions (pp. 58–61). Louisiana Agricultural Experiment Station.
- Sugawara, K., Inoue, T., Yamashita, M., y 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.
- Suliaman, S., y Tran, L.S.P. (2013). Asparagine: an amide of particular distinction in the regulation of symbiotic nitrogen fixation of legumes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33, 309-327.
- Sundaravarathan, S., y Kannaiyan, S. (2002). 11. Role of Plant Flavonoids as Signal. *Biotechnology of biofertilizers*, 144.
- Sutherland, B.L., y Hoglund, J.H. (1989). Effect of ryegrass containing the endophyte (*Acremonium lolii*) on the performance of associated white clover and subsequent crops. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 50, 265–269.
- Sutherland, B.L., Hume, D.E., y Tapper, B.A. (1999). Allelopathic effects of endophyte-infected perennial ryegrass extracts on white clover seedlings. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42, 19-26.
- Teste, F.P., y Dickie, I.A. (2017). Mycorrhizas across successional gradients. In *Mycorrhizal Mediation of Soil* (pp. 67-89). Elsevier.
- Thom, E.R., Clark, D.A., y Waugh, C.D. (1999). Growth, persistence, and alkaloid levels of endophyte-infected and endophyte-free ryegrass pastures grazed by dairy cows in northern New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42, 241-253.
- Thompson, J.D., Turkington, R., y Holl, F.B. (1990). The influence of *Rhizobium leguminosarum biovar. trifolii* on the growth and neighbour relationships of *Trifolium repens* and three grasses. *Canadian journal of botany*, 68, 296-303.
- Thrall, P.H., Hochberg, M.E., Burdon, J.J., y Bever, J.D. (2007). Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 120-126.
- Tian, Y., Amand, S., Buisson, D., Kunz, C., Hachette, F., Dupont, J., Nay, B., y Prado, S. (2014). The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit. *Phytochemistry*, 108, 95–101.
- Tikhonovich, I.A., y Provorov, N.A. (2011). Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion. *Annals of Applied Biology*, 159, 155-168.
- Tilman, D. (1982). Competition for a single resource. *Resource competition and community structure*. Princeton University Press, Princeton, NJ, 43-60.
- Tilman, D., Isbell, F., y Cowles, J.M. (2014). Biodiversity and ecosystem functioning. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 45, 471-493.
- Tognetti, P.M., Chaneton, E.J., Omacini, M., Trebino, H.J., y León, R.J. (2010). Exotic vs. native plant dominance over 20 years of old-field succession on set-aside farmland in Argentina. *Biological Conservation*, 143, 2494-2503.
- Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7, 581–591.
- 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.
- Uren, N.C. (2000). Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: Pinto R, Varanini Z, Nannipieri P (eds)

- The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, New York, pp 19-40.
- van Der Heijden MG. (2003). Arbuscular mycorrhizal fungi as a determinant of plant diversity: in search of underlying mechanisms and general principles. In: Mycorrhizal ecology, MGA van der Heijden & IR Sanders (Eds), pp: 243-265.
- van Der Heijden, M.G. (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology letters*, 7, 293-303.
- Van Der Heijden, M.G., Bardgett, R.D., y Van Straalen, N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 11, 296-310.
- van der Heijden, M.G.A., y Horton, T.R. (2009). Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology*, 97, 1139-1150.
- van der Heijden, M.G.A., Martin, F.M., Selosse, M.A., y Sanders, I.R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present and the future. *New Phytologist*, 205, 1406-1423.
- van der Heijden, M.G.A., Kironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. y Sanders, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396, 69-72.
- van der Putten W.H., Bardgett R.D., Bever J.D., Bezemer T.M., Casper B.B., Fukami T., Kardol P., Klironomos J.N., Kulmatiski A., Schweitzer J.A., Suding K.N., Van de Voorde T.F.J. y Wardle D.A. (2013). Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology*, 101, 265–276.
- van der Putten, W.H., Bradford, M.A., Pernilla Brinkman, E., van de Voorde, T.F., y Veen, G.F. (2016). Where, when and how plant–soil feedback matters in a changing world. *Functional Ecology*, 30, 1109-1121.
- van der Putten, W.H., y Peters, B.A. (1997). How soil-borne pathogens may affect plant competition. *Ecology*, 78, 1785-1795.
- van der Putten, W.H., Van Dijk, C., y Peters, B.A.M. (1993). Plant-specific soil-borne diseases contribute to succession in foredune vegetation. *Nature*, 362, 53-56.
- Vázquez-de-Aldana, B.R., Romo, M., García-Ciudad, A., Petisco, C., y García-Criado, B. (2011). Infection with the fungal endophyte *Epichloë festucae* may alter the allelopathic potential of red fescue. *Annals of Applied Biology*, 159(2), 281-290.
- Veen, G.F., Fry, E.L., ten Hooven, F.C., Kardol, P., Morriën, E., y de Long, J.R. (2019). The role of plant litter in driving plant-soil feedbacks. *Fronteries in Environmental Science*, 7, 1–10.
- Vierheilig, H., Gagnon, H., Strack, D., y Maier, W. (2000). Accumulation of cyclohexenone derivatives in barley, wheat and maize roots in response to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 9, 291–293.
- Viglizzo, E.F., Frank, F.C., Carreño, L.V., Jobbagy, E.G., Pereyra, H., Clatt, J., Pincén, D., y Ricard, M.F. (2011). Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina. *Global change biology*, 17, 959-973.
- 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.
- Vignale, M.V., Iannone, L.J., Pinget, A.D., de Battista, J.P., y Novas, M.V. (2016). Effect of epichloid endophytes and soil fertilization on arbuscular mycorrhizal colonization of a wild grass. *Plant and Soil*, 405, 279-287.

- Vignale, M.V., Iannone, L.J., Scervino, J.M., y Novas, M.V. (2018). *Epichloë* exudates promote in vitro and in vivo arbuscular mycorrhizal fungi development and plant growth. *Plant and Soil*, 422, 267-281.
- Volterra, V. (1926) Variazioni e fluttuazioni del numero d'individui in specie animali conviventi. *Mem. Acad. Lincei Roma* 2, 31–113
- Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F. y van der Heijden, M.G.A. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 5266-5270.
- Wagg, C., Boller, B., Schneider, S., Widmer, F., y van der Heijden, M. G. (2015). Intraspecific and intergenerational differences in plant–soil feedbacks. *Oikos*, 124, 994-1004.
- Wagg, C., Jansa, J., Schmid, B., y van der Heijden, M.G. (2011). Belowground biodiversity effects of plant symbionts support aboveground productivity. *Ecology letters*, 14, 1001-1009.
- Wagay, N.A., Lone, R., Rafiq, S., y Bashir, S.U. (2020). Phenolics: a game changer in the life cycle of plants. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture: Volume 1*, 241-275.
- Wardle, D.A. (2002). *Communities and Ecosystems: Linking the aboveground and belowground components*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., van der Putten, W.H., y Wall, D.H. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304, 1629-1633.
- Wardle, D.A., Bonner, K.I., y Barker, G.M. (2002). Linkages between plant litter decomposition, litter quality, and vegetation responses to herbivores. *Functional Ecology*, 16, 585-595.
- Wardle, D.A., Nilsson, M.C., Gallet, C., y Zackrisson, O. (1998). An ecosystem-level perspective of allelopathy. *Biological Reviews*, 73, 305-319.
- Werner, P.A. (1975). The effects of plant litter on germination in teasel, *Dipsacus sylvestris* Huds. *American Midland Naturalist*, 470-476.
- Wilkinson, H.H., Siegel, M.R., Blankenship, J.D., Mallory, A.C., Bush, L.P., y Schardl, C.L. (2000). Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grassendophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 13, 1027–1033.
- Williams R. y Hoagland R.E. (1982). The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Science*, 30, 206-212.
- Zhou, Y., Li, X., Qin, J., Liu, H., Chen, W., Niu, Y., Ren, A., y 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.