



**Consecuencias de las fluctuaciones hídricas y la
inoculación con hongos micorrizicos arbusculares, sobre
el desempeño de la simbiosis pasto – endófito *Epichloë*.**

Tesis de Grado presentada para optar al título de Licenciado en Ciencias Ambientales

Carrera de Licenciatura en Ciencias Ambientales.

Plan 2017

José Esteban Adrogué Arancedo

Directora: Dra. Cecilia Casas

Codirector: Dr. Pedro E. Gundel

Consultor: Dr. Agustín A. Grimoldi

Facultad de Agronomía,
Universidad de Buenos Aires

Fecha de entrega:

INDICE

Contenido

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	8
HIPOTESIS	8
Materiales y métodos	9
Datos de la especie en estudio.....	9
Sistema o modelo de estudio	9
Diseño del experimento	11
Determinaciones	12
Análisis estadístico	13
RESULTADOS	15
Biomasa inicial.....	15
Biomasa al final del ciclo de vida de <i>Lolium multiflorum</i>	15
Componentes del rendimiento y esfuerzo reproductivo	17
Eficiencia de transmisión del endófito <i>Epichloë</i>	19
DISCUSIÓN.....	21
La presencia de los simbioses no influyó sobre la partición a biomasa de <i>L. multiflorum</i> .	
Fluctuaciones hídricas como factor determinante.	21
Hospedar a uno de los simbioses podría contribuir a la perpetuación de la especie hospedante mientras que ambos serían antagonicos.	22
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA.....	25
APENDICE	30
Correlación eficiencia de transmisión, número y producción de semillas.....	30
Análisis estadísticos	30
Biomasa aérea	30
Biomasa radical	31
Biomasa espigas	32
Biomasa total	32
Producción de semillas.....	33

Peso de 1000 semillas 34

Numero de semillas..... 35

Esfuerzo reproductivo 36

RESUMEN

De la coevolución entre plantas y hongos, algunas interacciones han resultado en simbiosis mutualistas. Si bien los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) que colonizan las raíces y los hongos endófitos foliares del género *Epichloë* son considerados mutualistas, sus efectos sobre el hospedante depende del contexto ecológico. No obstante, poco se sabe cómo varía la retroalimentación entre los simbiosiontes y los efectos sobre las plantas, en contextos variables. En este trabajo se estudió el efecto de ambas simbiosis sobre el desempeño del pasto hospedante ante distintas frecuencias de déficit hídrico y riego, y se evaluó eficiencia con la cual, el endófito *Epichloë* era transmitido a las semillas. Plantas de *Lolium multiflorum* con o sin, uno o ambos, simbiosiontes, fueron expuestas a tres tratamientos de disponibilidad hídrica: riego constante (control), fluctuaciones cada 5 y 15 días entre déficit hídrico y riego. Al final del ciclo de vida de las plantas, se evaluaron variables de desempeño del hospedante y del hongo endófito (eficiencia de transmisión). La presencia o ausencia de los simbiosiontes no afectó a los niveles finales de partición de las biomásas, estas solo se vieron sujetas a la variación en las fluctuaciones hídricas, dando menores valores aquellas sometidas a fluctuaciones largas. La presencia de los simbiosiontes por separado afectó positivamente al desempeño reproductivo de los hospedantes, y mostró efectos antagónicos cuando se encontraban juntos. La eficiencia de transmisión del *Epichloë* no se vio ligada a las fluctuaciones en el riego ni a la inoculación con HMA. Estos resultados sugieren que la inclusión de los simbiosiontes utilizados, no podría atenuar los efectos negativos de fluctuaciones hídricas poco frecuentes sobre los cultivos. Por otro lado, la presencia de HMA generaría un efecto negativo indirecto sobre la propagación del *Epichloë*, ya que la producción de semillas disminuye al encontrarse juntos.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos no patogénicos que conviven con las plantas pueden aportar distintos beneficios en lo que respecta a protección y la captación en el uso de nutrientes. La mayoría de los casos estudiados, se centran en los efectos de un simbiote en particular sobre la planta hospedante. Sin embargo, en la naturaleza suelen convivir más de un microorganismo simbiote en el mismo hospedante. Los efectos de estos simbioses no siempre se manifiestan de forma aditiva, lo que hace más complejo su estudio (Afkhami et al., 2020). Por ejemplo, en trigo se vio que cultivares de alta compatibilidad con hongos micorrícicos arbusculares permitían una mayor colonización de rizobacterias que aquellos que tenían baja compatibilidad (Perez de Luque et al., 2017). También se ha observado que, por falta de algún recurso, como ser falta de luz, la presencia de más de un simbiote termina siendo un costo mayor para la planta dando efectos negativos en la producción de semillas, como es el caso de rizobios y HMA en plantas de guisante blanco (Ballhorn et al., 2016). Mientras estos trabajos representan avances importantes para entender el efecto de múltiples simbioses sobre el desempeño de la planta hospedante, se sabe mucho menos respecto de cómo influye un simbiote sobre el otro y *viceversa* (i.e. efectos de retroalimentación entre microorganismos simbioses).

Un caso frecuente de simbiosis que involucra a dos microorganismos es el que establecen algunas especies de gramíneas de la subfamilia *Pooidae* que pueden hospedar en un mismo individuo a hongos endófitos aéreos del género *Epichloë* (Clay et al., 2002) y HMA (Smith & Read, 2008). Los endófitos *Epichloë*, son hongos de la familia *Clavicipitaceae* que realizan simbiosis con gramíneas de síndrome fotosintético C3 (Clay et al., 1993; Clay & Schardl, 2002). El principal beneficio para la planta hospedante, es el aporte de compuestos alcaloides repelentes de distintos herbívoros (Clay et al., 1993). Además, la presencia de *Epichloë* mejora la absorción de nutrientes y la resistencia al estrés hídrico (Elbersen & West, 1996; Malinowski & Belesky, 2000; Clay & Schardl, 2002; White & Torres, 2009;). Así, hospedar a *Epichloë*, generaría ventajas competitivas al hospedante. Sin embargo, se han visto situaciones en donde la restricción hídrica disminuye la frecuencia del simbiote. Esto fue observado en estudios en ambientes áridos del sur de Santa Cruz y Tierra del Fuego (Novas et al., 2005). Estos resultados sugieren que el

resultado de la simbiosis es contexto dependiente (continuo mutualismo-parasitismo, Saikkonen et al., 1998) y que en condiciones de estrés extremo los costos de mantener al endófito podrían ser mayores que los beneficios que estos aportan (Saikkonen et al., 2000; Ahlholm et al., 2002). Mientras tanto, no se sabe cuáles son los efectos netos ante condiciones fluctuantes, por ejemplo, entre condiciones benévolas y de estrés hídrico, frecuentemente encontradas en climas templados.

La asociación entre pastos de la familia *Pooidae* con endófitos *Epichloë*, puede modular el ambiente de la planta hospedante modificando, por ejemplo, la composición de la comunidad microbiana de la rizosfera (Casas et al., 2011), incluyendo en estos cambios a los HMA (Buyer et al., 2011; Arrieta et al., 2015). En estudios realizados sobre distintos pastos como, *Bromus auleticus*, *B. setifolius*, *Elymus hystrix* y *Poa bonaerensis*, se encontró que los individuos asociados a endófitos *Epichloë* tuvieron mayor colonización de HMA en las raíces que aquellos que no poseían *Epichloë* (Novas et al., 2005; Larimer et al., 2012; Arrieta et al., 2015; Vignale et al., 2018). Diferente es el caso de los estudios con especies forrajeras como *Lolium perenne* y *L. multiflorum* en donde la colonización micorrícica se vio relacionada negativamente con la presencia de *Epichloë* (Chu-Chou et al., 1992; Guo et al., 1992; Müller, 2003; Omacini et al., 2006; Mack & Rudgers, 2008; Liu et al., 2011); o el caso de *Festuca arundinacea* donde la presencia de *Epichloë* no influyó sobre la micorrización (Kalosa-Kenyion et al., 2018). Aún son desconocidos los mecanismos que regulan la interacción planta – micorriza – endófito, pero se ha propuesto que podría ser a través de los exudados radicales (Vignale et al., 2018). Mientras estos antecedentes se centraron en estudiar el efecto y los mecanismos de *Epichloë* asociados a la colonización de las raíces por parte de los HMA, aún no sabemos si la presencia de *Epichloë* influye sobre la generación de esporas de los HMA - una respuesta a las condiciones de estrés del hongo que asegura su persistencia y las chances de regenerar la relación simbiote.

La mayor parte de las familias de plantas vasculares, son capaces de interactuar con hongos formadores de HMA arbusculares (HMA, Phylum Glomeromycota) a través de sus raíces generando relaciones simbióticas (Read et al., 1992; Parniske, 2008; Smith & Read, 2008). Producto de estas interacciones con HMA, las plantas hospedantes mejoran su desempeño en la absorción de nutrientes, su estado hídrico y su capacidad de defenderse

contra los patógenos (Newsham et al., 1995; Smith & Read, 2008). Los HMA provocan un aumento en el volumen de suelo explorado por la raíz a través de su micelio externo, y pueden adentrarse en poros más pequeños debido al menor diámetro de las hifas facilitando el acceso a nutrientes y agua (Miller et al., 1995; Drew et al., 2003). Mediante la excreción de compuestos aglutinantes, por medio de las hifas, los HMA logran una estructura del suelo más estable (Wright & Upadhyaya, 1998), permitiendo que se mantenga la porosidad, aspecto clave para la retención de agua por parte del suelo. Otro aspecto importante de los HMA es que generan defensas contra patógenos de la raíz, esto lo logran a través de la liberación de compuestos antimicrobianos llamado fitoalexinas o la lignificación de las paredes celulares de la raíz, estos dos procesos se dan como respuesta a la colonización (Newsham et al., 1995). Los HMA también influyen en la actividad de microorganismos del suelo no simbióticos y otros organismos como los nematodos y colémbolos (Gange & Brown, 2003; de la Peña et al., 2006; Smith & Read, 2008). Estas interacciones pueden resultar en efectos positivos para las propiedades del suelo, que luego influirán en el crecimiento de la planta (Gange & Brown, 2003; Bennett et al., 2006; de la Peña et al., 2006). Se estima que entre un 4 y 20% del carbono fijado por la planta es destinado al mantenimiento y crecimiento de estos hongos simbiotes (Grimoldi et al., 2006; Smith & Read, 2008).

Así como en el caso de *Epichloë*, el resultado de la relación simbiote que involucra a HMA depende del contexto ambiental (Johnson et al., 1993). Ante condiciones de crecimiento cercanas al óptimo, los HMA resultarían un costo para la planta mayor al beneficio que recibe y esto atenuaría la colonización como se vio en condiciones de alta disponibilidad de fósforo (Janos., 2007). Se vio que plantas que crecen en suelos con bajo contenidos de nutrientes, generan más carbohidratos solubles en sus raíces, permitiendo la colonización de una mayor diversidad de HMA. En cambio, en suelos fertilizados, suele haber una mayor selectividad de HMA creciendo solo aquellas especies que pueden sobrevivir con bajos niveles de carbohidratos (Johnson, 1993). Podemos pensar esto como un sistema de defensa de la planta para no asignar tantos recursos al mantenimiento de una relación simbiótica que, en ese contexto ambiental, no es beneficiosa. Si bien se hicieron estudios sobre a qué niveles de fósforo la planta empieza a depender de las HMA para

extraerlo, se vio que esta dependencia varía con cada genotipo y también influyen otros factores ambientales que hacen más complejo el estudio (Janos., 2007).

Mientras que el efecto de la presencia de *Epichloë* sobre la colonización de HMA ha recibido cierta atención (Vignale et al., 2020), poco se ha evaluado el efecto de los HMA sobre la relación planta-*Epichloë*. Considerando que (i) las HMA aumentan el acceso de las plantas a los recursos del suelo y repercuten positivamente en la producción de semillas (Alonso et al., 2014; Zhang et al., 2019), y que (ii) la eficiencia de transmisión de hongos endófitos guarda una relación positiva con la aptitud ecológica del hospedante (Gundel et al., 2011), es posible pensar que el impacto negativo de las fluctuaciones hídricas contrastantes será atenuado por la presencia de micorrizas aumentando la producción de semillas y la transmisión de endófitos *Epichloë*.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta tesis es estudiar el efecto de la frecuencia en las fluctuaciones hídricas y la presencia de dos hongos simbioses no patogénicos (i.e., *Epichloë ocultans* y hongos micorrícicos arbusculares - HMA) sobre el desempeño del hospedante *Lolium multiflorum*. A su vez, evaluar cómo fluctuaciones hídricas y la presencia de HMA impactan sobre la persistencia del endófito *Epichloë*.

HIPOTESIS

1-La simbiosis con HMA y endófitos foliares *Epichloë* mejora el desempeño de la planta hospedante ante las fluctuaciones hídricas menos frecuentes.

2-El efecto positivo de los HMA sobre el desempeño de la planta hospedante ante las fluctuaciones hídricas menos frecuentes, impacta positivamente sobre la eficiencia de transmisión de los hongos endófitos *Epichloë* de transmisión vertical.

Materiales y métodos

Datos de la especie en estudio

Este proyecto de tesis se centra en el estudio de *Lolium multiflorum*, debido a su importancia como especie forrajera en climas templados. En particular, *L. multiflorum* es una especie anual con gran capacidad de resiembra natural, y sobre todo, es importante para cubrir la baja productividad forrajera durante el invierno. Esta especie suele presentar alta frecuencia de infección con el endófito *Epichloë occultans* (Gundel et al., 2009), un endófito particularmente interesante porque no resulta tóxico para el ganado. Y porque es parte de la amplia cantidad de pastos colonizados por hongos micorrícicos en sus raíces. Un plan de manejo que integre tanto a *Epichloë* como a los hongos micorrícicos en esta especie forrajera puede no solo favorecer la misma, sino también a las demás especies circundantes debido a los efectos benéficos de los HMA.

Sistema o modelo de estudio

Para poner a prueba las hipótesis planteadas, se llevó a cabo un experimento bajo condiciones controladas de temperatura y riego. El experimento se realizó utilizando al pasto anual *L. multiflorum*, al endófito *E. occultans* y a dos especies de hongos micorrícicos arbusculares (HMA: *Glomus mosseae* y *G. intraradices*) como modelo de estudio. Se combinó la presencia del endofito *Epichloë* (dos niveles) y la inoculación con HMA (dos niveles: con y sin inoculación) generando cuatro tipos de hospedante: E-M-, E+M-, E-M+ y E+M+. A su vez, estos hospedantes crecieron bajo distintos regímenes de fluctuación hídrica: períodos de déficit y riego (tres combinaciones) generando 12 tratamientos con 10 repeticiones y dos momentos de determinaciones dando un total de 160 macetas (40 al inicio y 120 al final del ciclo de las plantas). Los tratamientos se asignaron de manera completamente aleatorizada. Se logró una potencia del experimento de 0,81.

Las semillas de *L. multiflorum* con (E+) y sin (E-) el hongo endófito *E. occultans* fueron obtenidas del banco de semillas del equipo de trabajo. La presencia y ausencia del endófito *Epichloë* en las semillas se verificó mediante el método de corte y tinción

descrito en Gundel et al., (2018). Se prepararon aproximadamente 500 semillas de *L. multiflorum* con y sin *Epichloë*. Se colocaron aproximadamente 20 a 22 semillas por placa, en placas de Petri con papel secante. Las semillas germinaron en cámara con alternancia de temperatura y fotoperiodo de 25/15 °C y 12/12h D/N, respectivamente. Fueron trasplantadas a las macetas correspondientes. Poniendo dos semillas por maceta, con el objetivo de luego ralear las plantas desuniformes, de esta manera se redujo la posibilidad de tener macetas sin germinar y se logró homogeneización del tamaño de las plantas.

Para la producción del inóculo de hongos micorrícicos, se usaron macetas sopladas de 2 litros, con sustrato de arena y vermiculita, 1:1. Se armaron 16 macetas con inóculo de *G. mosseae* y *G. intrarradices*, 8 de cada especie. Se armaron además 10 macetas, con el mismo sustrato sin inocular, las cuales fueron sometidas a los mismos tratamientos que las macetas inoculadas de manera que funcionen como tratamiento control. En cada maceta se sembraron 3 especies de planta: trébol blanco (*Trifolium repens*), plantago (*Plantago lanceolata*) y cebadilla criolla (*Bromus unioloides*). Las semillas se germinaron en condiciones de oscuridad, con periodos de alternancia de temperatura 15°C y 25°C, cada tres días. Se trasplantaron dos o tres semillas de cada especie a las macetas. Luego se regaron con solución Hoagland (con baja disponibilidad de P). Se realizaron riegos con agua corriente para evitar acumulación de sales. Se colocaron bolsas de nylon transparente a modo de paredes para evitar salpicaduras y contaminación entre macetas. Oportunamente, se tomaron muestras de raíces con sacabocado para tinción y evaluación del nivel de colonización de las raíces con hongos micorrícicos. Una vez que los niveles de colonización alcanzaron un valor mínimo de 60%, se dejaron secar las plantas y se formó un solo inoculante con el sustrato y las raíces de *G. mosseae* y *G. intrarradices*, mezclando ambos en partes iguales.

Al finalizar los tratamientos de fluctuaciones hídricas, se tomaron 10 plantas al azar de cada tratamiento para verificar la efectividad de la inoculación con HMA. No se encontraron estructuras de HMA en los tratamientos no inoculados.

Diseño del experimento

Se rellenaron 160 macetas, numeradas y rotuladas, con el sustrato definido en los ensayos preliminares. En cada maceta se sembraron dos semillas, para luego ralear la planta más desigual. Luego se agregó, en cada una, 50 ml de agua para humedecer. Se sacaron 10g de sustrato y se agregó inóculo de hongos micorrícicos o control según corresponda y se colocaron semillas de E+ o E- de *L. multiflorum* según corresponda a los tratamientos. Se agregaron otros 20 ml de agua. El riego se mantuvo igual hasta que las plantas alcanzaron seis hojas expandidas, entonces se aplicaron los tratamientos de fluctuaciones entre déficit hídrico y riego. Se instaló un sensor HOBO para registrar valores de humedad y temperatura dentro del invernáculo.

Las macetas se colocaron azarosamente, sobre dos mesadas, en partes iguales. La plantas fueron sometidas a tres niveles de fluctuación entre períodos de déficit hídrico y riego: un tercio de las macetas se mantuvo a capacidad de campo durante todo el experimento (control), otro tercio se sometió a periodos de quince días de déficit (se mantuvo al 30% de su capacidad de campo) y quince días bajo riego (a capacidad de campo) durante dos meses y el tercer tercio se sometió a periodos de cinco días de déficit y cinco días bajo riego durante dos meses (Fig. 1). De este modo, las plantas sometidas a baja y alta frecuencia de fluctuaciones exploraron la misma cantidad de días con déficit y riego en total. Durante los riegos se pesaron las macetas y se llevaron a capacidad de campo. Los riegos se realizaron con solución Hoagland (con baja disponibilidad de P) o agua corriente para evitar concentración de sales cuando fue necesario.

Diseño experimental

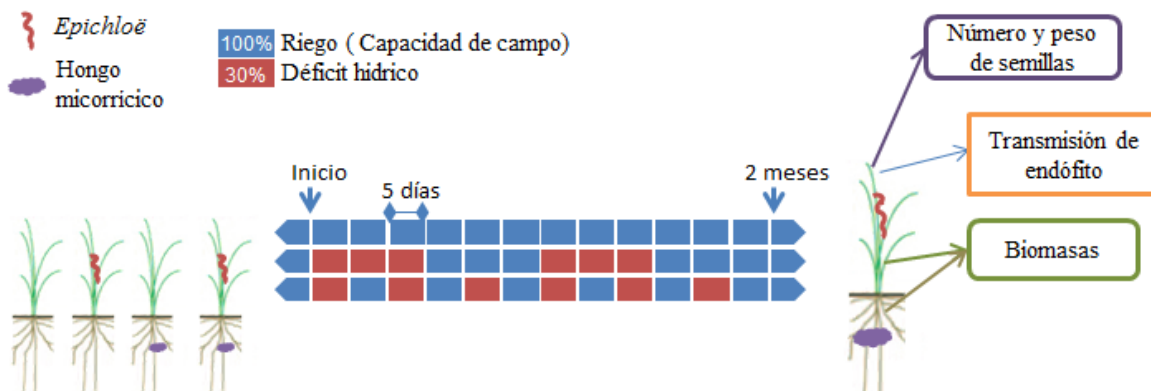


Figura 1: Esquema del diseño experimental. La imagen indica las combinaciones entre períodos de estrés hídrico (30% capacidad de campo; bloques rojos) y períodos de riego (100% capacidad de campo; bloques azules). Cada bloque representa un intervalo de 5 días y cada fila representa uno de los niveles del régimen de fluctuación hídrica: 100% CC constante, fluctuaciones cada cinco días, y quincenales entre 100% y 30% CC a lo largo de dos meses de duración del experimento. Las flechas verticales indican los momentos en que se realizarán las determinaciones: inicial y al final del ciclo de las plantas. En las plantas de la izquierda se puede ver aquellas inoculadas con HMA (círculo violeta) y las que hospedaron *Epichloë* (línea roja). El dibujo de la derecha representa las mediciones que se hicieron a final de ciclo sobre todas las plantas, esto es la Biomasa radical y aérea, el peso y número de las semillas y la transmisión del endófito.

Determinaciones

Para determinar la biomasa de las plantas al final del ciclo, se extrajeron las plantas y se lavaron las raíces. Se cortaron para separar en parte aérea (tallo y hojas), radical y espigas, y se las guardaron en sobres numerados para no perder la identificación de las plantas. Los vástagos y raíces se secaron en estufa (65°C hasta peso constante), para poder obtener el peso seco (gramos por planta).

Se determinaron los componentes del rendimiento de la planta hospedante. Para ello, se midió el peso de promedio de las semillas para cada planta a partir de tres submuestras de veinte semillas de cada una, las cuales se pesaron en una balanza de precisión. También se midió la biomasa total de semillas de cada planta, pesando todas las semillas juntas en la balanza. A partir de este valor y el peso promedio de las semillas se

obtuvo el número estimado de semillas por planta, como biomasa total sobre peso promedio. Se calculó el esfuerzo reproductivo de las plantas como el cociente entre la biomasa de semillas y la biomasa total.

Para evaluar la eficiencia de transmisión de endófito *Epichloë* a partir de las semillas de cada espiga se determinó la presencia en 20 semillas por espiga y luego se calculó el porcentaje de semillas infectadas. Para comprobar esta presencia se usaron los métodos de tinción y observación microscópica establecidos por Bacon & White (1994). Previo a la determinación se ablandaron los tejidos de las semillas remojándolas en una solución de hidróxido de sodio (10% p/v) en un vaso de precipitado a temperatura ambiente durante 8 horas. Para evaluar la presencia del *Epichloë* se retiró la gluma de las semillas con pinzas de disección y se colocó la aleurona en un portaobjetos con una gota de rosa bengala. Se aplastó la semilla debajo de un cubreobjeto y se examinó el preparado en busca del micelio asociado a la aleurona de la semilla teñida (Bacon & White, 1994). La infección se registró con valores lógicos (1= presencia de endófito, 0 = ausencia de endófito, NA = no fue posible una identificación clara). La transmisión se determinó como la proporción de semillas infectadas sobre las semillas totales de cada planta.

Análisis estadístico

Los efectos de los tratamientos de simbiosis con *Epichloë* (E+ y E-), con HMA (M+ y M-) y las fluctuaciones hídricas (control, frecuencias de 5 y 15 días) sobre las variables de respuesta biomasa aérea total, biomasa radical, biomasa vegetativa, biomasa de espigas y biomasa de semillas, así como el número y peso promedio de las semillas y el esfuerzo reproductivo fueron evaluadas mediante modelos lineales generalizados con distribución normal de los errores. En el caso de la variable respuesta eficiencia de transmisión de *Epichloë* se utilizó un modelo lineal generalizado con distribución binomial Bernoulli de los errores (Crawley, 2007). Los supuestos correspondientes a cada modelo fueron evaluados. En el caso de los modelos de distribución normal, los supuestos de homogeneidad de varianzas y distribución normal se evaluaron de manera gráfica. En el caso de los modelos con distribución binomial, se determinó el coeficiente Phi de sobredispersión. La inferencia sobre los efectos fijos de los modelos se realizó mediante

una prueba de cociente de verosimilitudes (LRT). Para los casos en los que se dio un efecto significativo de alguno de los tratamientos o sus combinaciones, se hicieron pruebas a posteriori, obteniendo una tabla de Tukey con la función emmeans de R. Los análisis se realizaron mediante los programas Infostat y R (desde RStudio).

RESULTADOS

Biomasa inicial

Al comienzo de los tratamientos de fluctuaciones hídricas no hubo diferencias en la biomasa de las plantas de *Lolium multiflorum* que hospedaron uno, ambos o ninguno de los hongos simbios (HMA o *Epichloë*; Tabla 1). La biomasa aérea y radical promedio fue de 0,48 g y 1,38g por planta, respectivamente.

Tabla 1: Biomasa de las plantas de *Lolium multiflorum* antes de aplicar los tratamientos correspondientes a las fluctuaciones hídricas. Las filas muestran los valores promedio (n=10) y error estándar EE de: biomasa total, aérea y radical (g peso seco/planta). Las columnas indican los tratamientos que combinan la presencia o ausencia de los simbiontes: M+ y M- inoculada o no con HMA respectivamente; E+ y E- planta hospedante o no del endófito *Epichloë*.

Biomasa	E-M-		E-M+		E+M-		E+M+	
	\bar{X}	EE	\bar{X}	EE	\bar{X}	EE	\bar{X}	EE
Total (g/planta)	1,63	0,40	1,56	0,38	1,97	0,38	1,40	0,38
Aérea (g/planta)	0,41	0,09	0,53	0,09	0,48	0,09	0,51	0,09
Radical(g/planta)	1,22	0,34	1,03	0,32	1,49	0,32	0,89	0,32

Biomasa al final del ciclo de vida de *Lolium multiflorum*

Al final del ciclo de vida de las plantas, la biomasa total, tanto aérea (tallos y espigas), radical como de espigas no varió debido a los tratamientos con distinta combinación de simbiontes, dentro de un mismo nivel de fluctuación hídrica. Las plantas bajo fluctuaciones con periodos de sequía y riego cada 15 días (baja frecuencia) tuvieron menor biomasa total respecto de las plantas bajo fluctuaciones cada 5 días y bajo control (Tabla 2). Esto significó una reducción del 25% de la biomasa total y aérea, y un 27% de la biomasa radical cuando las plantas estuvieron sometidas a los períodos largos de sequía y riego (Figura 2; Tabla 2). La biomasa de espigas de las plantas sometidas a periodos largos de fluctuación se redujo en un 22% en comparación al tratamiento control. Las plantas

sometidas a periodos cortos de fluctuación tuvieron valores de biomasa de espigas intermedios entre el control y la fluctuación larga (Figura 2).

Tabla 2: Efectos del régimen de fluctuación, HMA, endófito *Epichloë*. y sus respectivas interacciones sobre la biomasa Total, Aérea (tallo y hojas), Radical y Espigas de las plantas de *Lolium multiflorum*. Las columnas muestran el estadístico X^2 y el valor de probabilidad asociado (p). Los efectos significativos (p -valor <0.05) se indican en negrita.

Biomasa →	Total		Aérea		Radical		Espigas	
Factor ↓	X^2	P	X^2	P	X^2	P	X^2	P
Fluctuación	11.72	<0.01	13,75	<0,01	4,66	0,01	8.38	0.02
HMA	2.50	0.11	0,01	0,93	2,71	0,10	0.12	0.73
<i>Epichloë</i>	0.23	0.69	0,07	0,80	0,24	0,63	0.16	0.69
Fluc*HMA	1.92	0.34	1,36	0,26	1,52	0,22	2.17	0.34
Fluc*<i>Epic</i>	0.17	0.92	0,59	0,56	0,06	0,94	0.17	0.92
HMA*<i>Epic</i>	0.01	0.93	0,24	0,62	3,1E-04	0,99	2.00	0.16
Fluc*HMA*<i>Epic</i>			0,10	0,90	0,79	0,45		

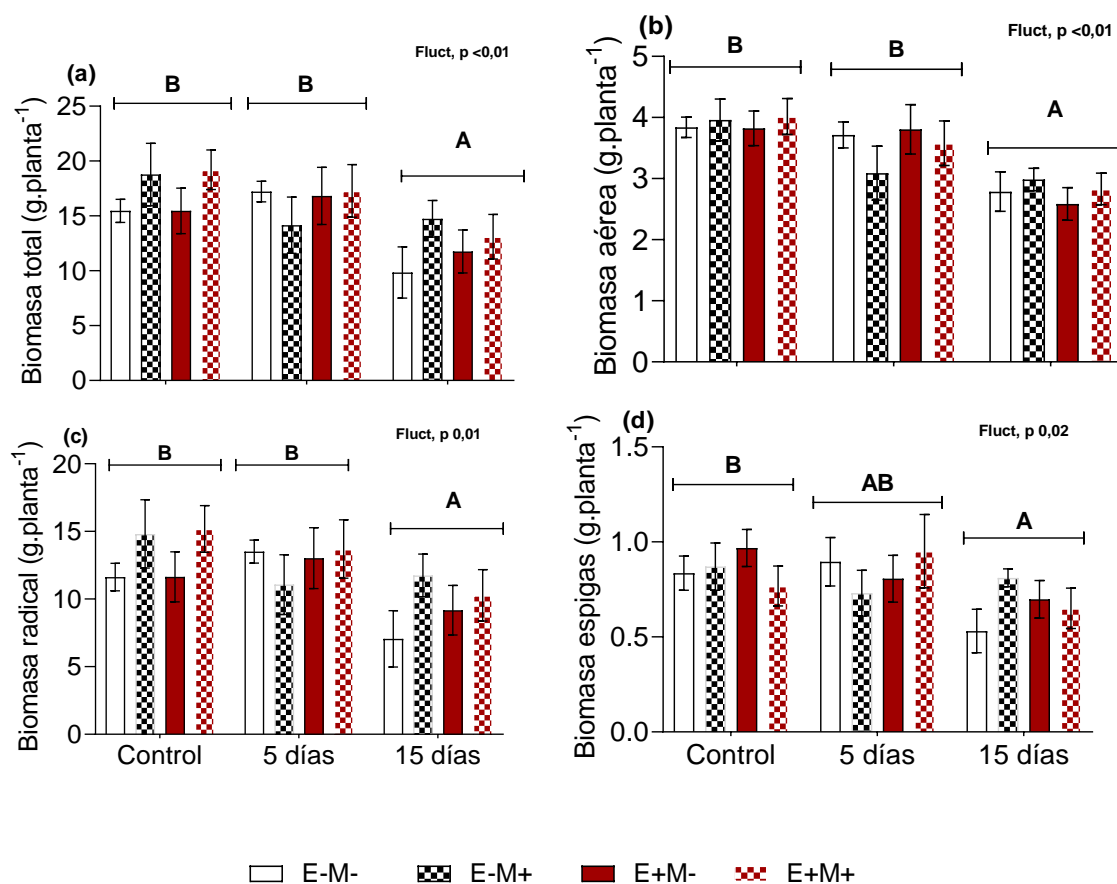


Figura 2: Biomasa total (a), aérea (tallos y hojas) (b), radical (c) y biomasa espigas (d) (todas en gramos por planta) de las plantas de *Lolium multiflorum* inoculadas o no inoculadas con HMA y *Epichloë*. En el eje x se muestran los tratamientos de fluctuaciones hídricas: control, fluctuación de 5 días y fluctuación de 15 días. El color blanco indica ausencia de *Epichloë* y HMA, el blanco punteado ausencia de *Epichloë* y presencia de HMA, el rojo presencia de *Epichloë* y ausencia de HMA y el rojo punteado presencia de HMA y *Epichloë*. Las barras muestran en valor medio y el error estándar (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas con un valor-p <0.05.

Componentes del rendimiento y esfuerzo reproductivo

Los análisis hechos a partir del peso de las semillas dieron resultados diversos. Por un lado, la producción de semillas mostró pequeñas diferencias ante la inoculación o no HMA y la presencia o ausencia de los endófitos *Epichloë*. La producción de semillas de plantas con ambos tipos de simbionte se redujo en un 10% con respecto a las plantas que no hospedaron simbiontes. Por el contrario, las plantas que solo fueron inoculadas con HMA

aumentaron su producción de semillas en un 15% y las que solo hospedaron a *Epichloë* lo hicieron en un 17% (Tabla 3, Figura 4 a). No hubo evidencias de diferencias en el peso de las semillas debidas a las fluctuaciones hídricas. La estimación del peso de 1000 semillas, no mostró diferencias significativas para ninguno de los tratamientos (Tabla 3, Figura 4 b).

El número de semillas por planta fue fuertemente influenciado por la fluctuación en el riego y por la interacción de HMA y *Epichloë*. Las plantas con fluctuaciones de riego de 5 días tuvieron un 14% menos cantidad de semillas que las control, mientras que las plantas sometidas a fluctuaciones de 15 días lo hicieron en un 30% (Tabla 3). Por otro lado, las plantas con ambos tipos de simbiontes tuvieron valores similares a las plantas que no hospedaron ninguno, pero aquellas que solo hospedaron HMA aumentaron su cantidad en un 33% y las que solo hospedaron a *Epichloë* lo hicieron en un 36%, sin diferencias entre ambos tratamientos (Tabla 3, Figura 4c).

El esfuerzo reproductivo vario con la interacción de HMA y *Epichloë*. Las plantas con ambos simbiontes tuvieron un esfuerzo reproductivo un 24% menor que aquellas que no hospedaban simbiontes (Tabla 3), un 34% menor a las que solo hospedaron HMA y un 42% menor a las que solo hospedaban *Epichloë* (Figura 4d).

Tabla 3: Efectos de fluctuación hídrica, HMA, endófito *Epichloë*. y sus respectivas interacciones sobre la producción de semillas(g/planta), peso de 1000 semillas(g/planta) y número de semillas(#/planta), y el esfuerzo reproductivo de las plantas de *L. multiflorum*. Las columnas muestran el estadístico X^2 y el valor de probabilidad asociado (p). Los efectos significativos (p -valor <0.05) se indican en negrita.

Variable →	Producción de semillas (g/planta)		Peso de 1000 Semillas (g/planta)		Número (#/planta)		Esfuerzo reproductivo	
Factor ↓	X^2	P	X^2	P	X^2	P	X^2	P
Fluctuación	4.15	0.13	3.96	0.14	9.97	<0.01	2.15	0.34
HMA	0.02	0.90	<0.01	0.99	<0.01	0.96	2.42	0.12
<i>Epichloë</i>	0.05	0.82	0.81	0.37	0.21	0.64	1.03	0.31
Fluc*HMA	1.46	0.48	0.98	0.61	1.17	0.56	0.44	0.80

Fluc*<i>Epichloë</i>	1.21	0.55	0.61	0.74	1.11	0.58	0.04	0.98
HMA*<i>Epichloë</i>	4.64	0.031	<0.01	0.95	15.12	<0.01	8.32	<0.01

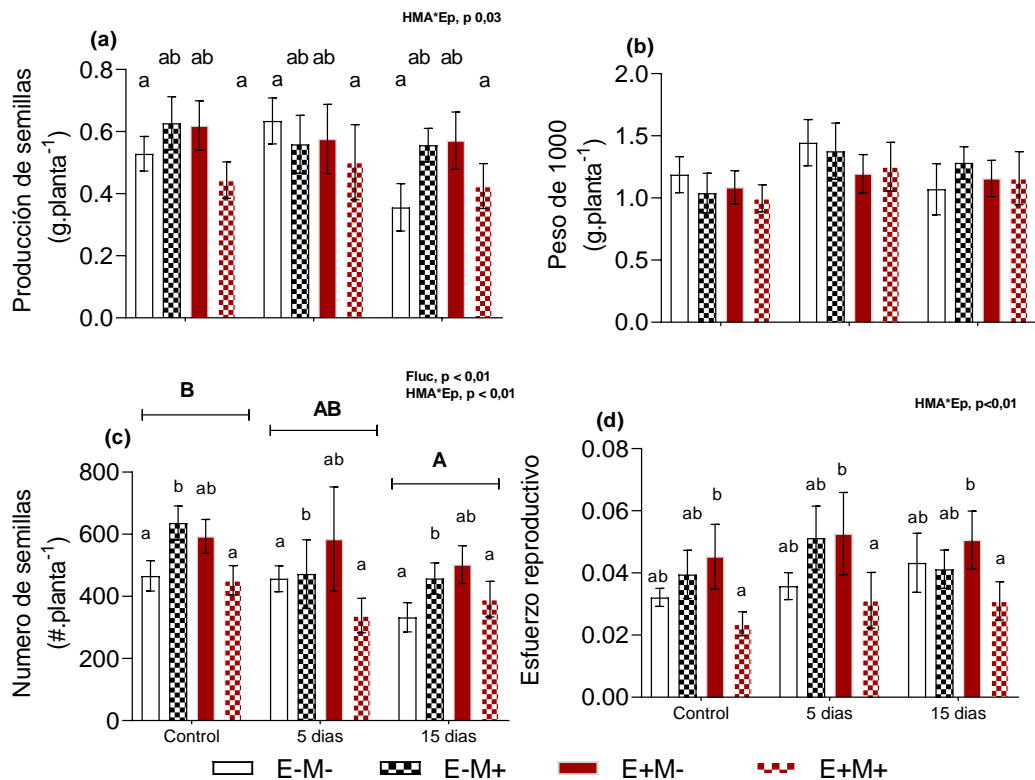


Figura 4: Producción de semillas (a), peso de mil semillas (ambas en gramos por planta) (b), número de semillas (número de semillas por planta) (c) y esfuerzo reproductivo (biomasa de semillas/biomasa total) (d) de las plantas de *Lolium multiflorum* inoculadas o no inoculadas con HMA y *Epichloë*. En el eje x se muestran los tratamientos de fluctuaciones hídricas: control, fluctuación de 5 días y fluctuación de 15 días. El color blanco indica ausencia de *Epichloë* y HMA, el blanco punteado ausencia de *Epichloë* y presencia de HMA, el rojo presencia de *Epichloë* y ausencia de HMA y el rojo punteado presencia de HMA y *Epichloë*. Las barras muestran en valor medio y el error estándar (n = 10). Letras distintas indican diferencias significativas con un valor-p <0.05.

Eficiencia de transmisión del endófito *Epichloë*

La eficiencia en la transmisión de endófitos *Epichloë* no se vio afectada significativamente ni por la inoculación con HMA ni por los tratamientos de fluctuación

hídrica (Tabla 4). Por otro lado, ni el número ni la producción total de las semillas por planta tuvieron una influencia significativa sobre la eficiencia de transmisión vertical del endófito (Figuras A.1 y A.2; Apéndice).

Tabla 4: Efectos de fluctuación hídrica, la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y su interacción, en la eficiencia de transmisión del *Epichloë* en plantas de *L. multiflorum*. Las columnas muestran el estadístico X^2 y el valor de probabilidad asociado (p). Los efectos significativos (p -valor <0.05) se indican en negrita.

Eficiencia de transmisión de <i>Epichloë</i>		
Factor	X^2	Valor p
HMA	0.65	0.42
Fluctuación	0.81	0.67
HMA \times Fluctuación	0.66	0.72

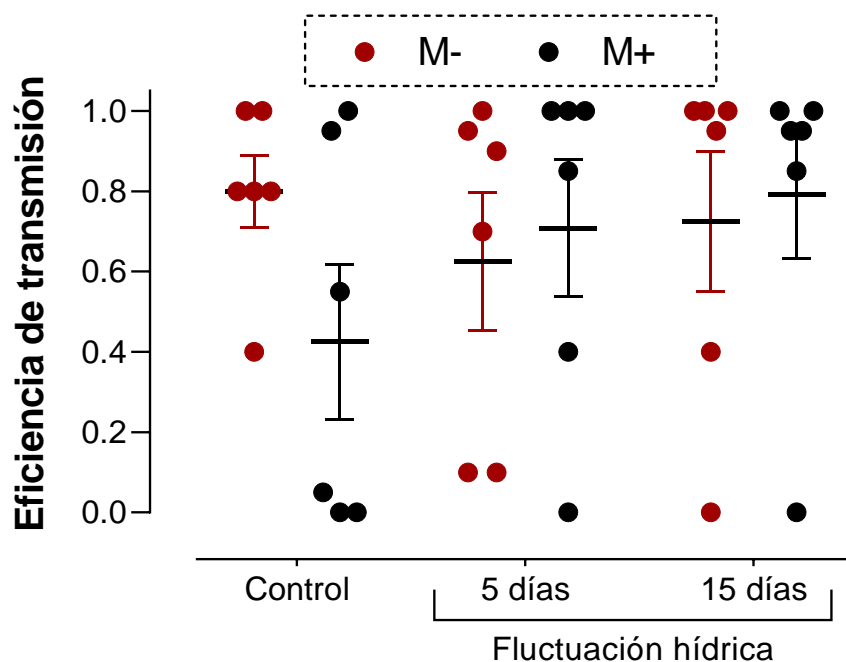


Figura 5: Eficiencia de transmisión (semillas con micelio de endófito sobre semillas observadas ($n = 20$) por planta) del hongo *Epichloë* en plantas de *Lolium multiflorum* - inoculadas (M+) o no (M-)

con HMA. En el eje x se muestran los tratamientos de fluctuaciones hídricas: control, fluctuación de 5 días y fluctuación de 15 días. Los puntos blanco representan las plantas no inoculadas con HMA y los puntos negro representan las plantas inoculadas con HMA. Las barras muestran el valor medio y el error estándar ($n = 6$).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que la relación entre la presencia de los simbiontes (HMA y *Epichloë*) y el desempeño del hospedante *Lolium multiflorum* es más compleja de lo que planteábamos en la hipótesis. Es decir, la presencia de los simbiontes no atenuó el efecto de las fluctuaciones hídricas sobre el desempeño del hospedante, siendo las fluctuaciones largas las principales responsables de menores valores en la partición de biomasa al final del ciclo de vida de la planta hospedante. La excepción a este fenómeno fueron los resultados de número y producción de semillas y esfuerzo reproductivo, que se vieron beneficiados ante la presencia de los simbiontes por separado dando mayores valores respecto a las plantas sin simbiontes y las que poseían ambos simbiontes, esto último sugiere un efecto antagónico. Por otro lado, no encontramos influencia de la inoculación con HMA sobre la transmisión del endófito *Epichloë*.

La presencia de los simbiontes no influyó sobre la partición a biomasa de *L. multiflorum*. Fluctuaciones hídricas como factor determinante.

Las fluctuaciones hídricas fueron el factor determinante con menores valores biomasa vegetativa, radical y de espigas en aquellas plantas de *L. multiflorum* sometidas a fluctuaciones largas. Cabe destacar que las plantas con fluctuaciones cada cinco días presentaron biomasa iguales a las plantas bajo riego constante (control) pero recibieron la mitad de agua de riego. Por otro lado, las plantas con fluctuaciones cada 15 días tuvieron menos biomasa que las con fluctuaciones cada cinco días, pero recibieron en total la misma cantidad de agua de riego. No observamos cambios en la partición sino, una reducción en la de la biomasa con las fluctuaciones largas de 15 días. Estos resultados sugieren que la periodicidad riego-sequía es clave en determinar el desempeño de la planta. Estos resultados coinciden con estudios anteriores donde se vio que las restricciones en el recurso hídrico provocaban la inhibición de biomasa en individuos de *Lolium perenne* (Farfan-

Vignolo et al., 2012). La no influencia de la presencia de *Epichloë* ni HMA sobre este aspecto del desempeño, refuta nuestra hipótesis inicial. La indiferencia a la presencia o ausencia de *Epichloë*, es contraria en cierta medida con estudios previos en pastos perennes como *L. perenne* y *Festuca arundínea* bajo condiciones de estrés hídrico y recuperación, donde se observó que la presencia del endófito redujo la biomasa aérea en ciertos genotipos (Hahn et al., 2007, Cheplick 2004, Assuero 2006). Sin embargo, para otros genotipos no se vieron efectos lo cual se asemeja a lo que pudimos ver nosotros (Hahn et al., 2007, Cheplick 2004). Para el caso de las HMA, el no haberse observado un efecto al encontrarse como único simbionte se contradice con un estudio previo donde, su presencia mejoro la resistencia de *Leymus chinensis* a las restricciones hídricas independientemente de la presencia de *Epichloë* (Liu et al., 2017). A diferencia de nuestro trabajo, los estudios descriptos anteriormente han evaluado hospedantes perennes, lo que podría explicar la diferencia en los resultados obtenidos. Será necesario trabajar sobre especies anuales con el fin de entender mejor los efectos de los simbiontes sobre la morfología del hospedante ante condiciones de fluctuaciones hídricas contrastantes.

Hospedar a uno de los simbiontes podría contribuir a la perpetuación de la especie hospedante mientras que ambos serían antagónicos.

Los componentes del rendimiento, producción y número de semillas, así como el esfuerzo reproductivo (biomasa de semillas / biomasa total) dependió de la interacción entre los simbiontes *Epichloë* y HMA. En particular, estas variables presentaron valores más altos ante la presencia de uno de los simbiontes. Más allá de no ir de acuerdo con nuestra hipótesis inicial, es un punto interesante de revisar. Estudios anteriores con *Epichloë* sobre *Lolium perenne* y *F. arundinacea* mostraron las ventajas reproductivas de las plantas infectadas con respecto a las no infectadas, dando mayor cantidad de semillas llenas y mayores tasas de germinación (Clay et al., 1987). El efecto obtenido sobre el desempeño reproductivo ante presencia de HMA contrasta con los resultados obtenidos por Omacini et al., (2006) donde el factor determinante para el crecimiento de la biomasa reproductiva fue la presencia de endófitos y donde las HMA no tuvieron una influencia significativa, pero a su vez coincide con el efecto positivo de las micorrizas sobre la producción de semillas de las plantas, el cual está bien documentado (Alonso et al., 2014;

Zhang et al., 2019). Nosotros hemos encontrado también efectos benéficos sobre la producción de semillas, en presencia de *Epichloë* y HMA, este efecto se atenuó cuando los simbiontes se encontraban juntos lo que nos da a entender que existe un efecto antagónico entre ambos. Los efectos sobre el número de semillas y esfuerzo reproductivo de las plantas podrían tener consecuencias sobre la capacidad de propagación y en la perpetuación del del hospedante anual *L. multiflorum* y en particular del endófito *Epichloë* en la población. Esto se debe a la gran dependencia que posee el endófito *Epichloë* con la semilla de la planta, como medio de propagación (Gundel et al., 2011). Podría especularse entonces, que la presencia de HMA para las siguientes generaciones, reduciría la presencia del *Epichloë* puesto que se vería afectada negativamente la reproducción de los individuos con ambos simbiontes. Sin embargo, es necesario considerar estudios recientes sobre *L. multiflorum*, en los cuales se encontró que la concentración de micelio de endófito en las semillas no dependió de la aptitud ecológica (i.e. producción de semillas) del hospedante (Ueno et al., 2020). Las ineficiencias en la transmisión vertical de *Epichloë* solo ocurren cuando la aptitud ecológica del hospedante se ve realmente muy reducida (Gundel et al., 2011), esta afirmación es compatible con nuestros resultados obtenidos al medir la eficiencia de transmisión, en los cuales no encontramos un efecto significativo de las fluctuaciones hídricas ni tampoco de la presencia o ausencia de HMA. Entonces podemos concluir que las fluctuaciones hídricas de 15 días no son una condición de estrés severo para la planta.

Es importante remarcar que el esfuerzo reproductivo y la producción de semillas fueron constantes para los distintos niveles de fluctuación, por lo que no hubo evidencias de contexto de dependencia del efecto de los simbiontes sobre el hospedante para los dos aspectos mencionados en primer lugar. Sería interesante para investigaciones futuras, indagar en que mecanismos fisiológicos explican, los efectos positivos de los simbiontes por separado y la anulación de los mismos cuando los simbiontes se encuentran juntos. Es necesario cuestionarse si se trata de señales hormonales, algún tipo de metabolismo secundario o alguna otra clase de señales.

CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo, rechazamos la primera hipótesis, pudiendo concluir que el efecto negativo de las fluctuaciones hídricas menos frecuentes sobre la biomasa final de *Lolium multiflorum* no fueron contrarrestadas por la presencia de simbiontes como los HMA o los endófitos *Epichloë*. Ello evidencia que no es tan simple la idea de la utilización de estos microorganismos como una posible solución a la ocurrencia de eventos de fluctuaciones en el recurso hídrico en el cultivo de especies forrajeras (Decunta et al. 2021). Por otro lado, vimos que las fluctuaciones de 15 días de riego no tuvieron una influencia clara sobre transmisión del endófito *Epichloë* a la siguiente generación, por lo que no pudimos contrastar nuestra segunda hipótesis, en la cual planteábamos que la presencia de las HMA iba a disminuir un supuesto efecto negativo de las fluctuaciones hídricas menos frecuentes sobre la transmisión.

BIBLIOGRAFÍA

- Afkhami, M. E., Almeida, B. K., Hernandez, D. J., Kieseewetter, K. N., & Revillini, D. P. (2020). Tripartite mutualisms as models for understanding plant–microbial interactions. In *Current Opinion in Plant Biology* 56, 28–36.
- Ahlholm, J. U., Helander, M., Lehtimäki, S., Wäli, P., & Saikkonen, K. (2002). Vertically transmitted fungal endophytes: Different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos* 9, 173 – 183.
- Alonso, G. M. M., Cañizarez, P. J. G., Espinosa, R. R., Arzola, J., & Pérez, A. (2014). Efecto de la aplicación de estiércol vacuno e inoculación micorrizica sobre el crecimiento y producción de semillas de *Canavalia ensiformis* en suelos ferralíticos rojos. *Cultivos Tropicales*, 35(1), 86–91.
- Arrieta, A. M., Iannone, L. J., Scervino, J. M., Vignale, M. V., & 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..
- Assuero, S. G., Tognetti, J. A., Colabelli, M. R., Agnusdei, M. G., Petroni, E. C., & Posse, M. A. (2006). Endophyte infection accelerates morpho-physiological responses to water deficit in tall fescue. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 49:4, 359-370 .
- Bacon CW, White Jr. JF (1994) Stains, media, and procedures for analyzing endophytes. En: *Biotechnology of endophytic fungi of grasses* 4, 47-56.
- Ballhorn, D. J., Schädler, M., Elias, J. D., Millar, J. A., & Kautz, S. (2016). Friend or foe - Light availability determines the relationship between mycorrhizal fungi, rhizobia and lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *PLoS ONE* 11(5).
- Bennett, A. E., Alers-Garcia, J., & Bever, J. D. (2006). Three-way interactions among mutualistic mycorrhizal fungi, plants, and plant enemies: Hypotheses and synthesis. In *American Naturalist* 167(2), 141–152.
- Buyer, J. S., Zuberer, D. A., Nichols, K. A., & Franzluebbers, A. J. (2011). Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. *Plant and Soil* 339(1-2), 401–412.
- Casas, C., Omacini, M., Montecchia, M. S., & Correa, O. S. (2011). Soil microbial community responses to the fungal endophyte *Neotyphodium* in Italian ryegrass. *Plant and Soil* 340(1-2), 347–355.
- Cheplick GP 2004. Recovery from drought stress in *Lolium perenne* (Poaceae): are fungal endophytes detrimental? *American Journal of Botany* 91:1960-1968.

- Chu-Chou, M., Guo, B., An, Z. Q., Hendrix, J. W., Ferriss, R. S., Siegel, M. R., Dougherty, C. T., & Burrus, P. B. (1992). Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the *acremonium coenophialum* endophyte. *Soil Biology and Biochemistry* 24(7), 633–637.
- Clay, K. (1987). Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*, 73(3), 358–362.
- Clay, K., Marks, S., & Cheplick, G. P. (1993). Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology* 74(6), 1767–1777.
- Clay, K., & Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* 160(S4), S99–S127.
- Crawley, M. J. (2007). *The R Book*. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, UK.
- Decunata, F.A.; Perez, L.I.; Malinowski, D.P.; Molina-Montenegro, M.A. & P.E. Gundel. 2021. A systematic review on the effects of Epichloë fungal endophytes on drought tolerance in cool-season grasses. *Frontiers in Plant Science*
- De La Peña, E., Echeverría, S. R., Van Der Putten, W. H., Freitas, H., & Moens, M. (2006). Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytologist* 169(4), 829–840.
- Drew, E. A., Murray, R. S., Smith, S. E., & Jakobsen, I. (2003). Beyond the rhizosphere: Growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. *Plant and Soil* 251(1), 105–114.
- Elbersen, H. W., & West, C. P. (1996). Growth and water relations of field-grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Science* 51(4), 333–342.
- Faeth, S. H., Helander, M. L., & Saikkonen, K. T. (2004). Asexual *Neotyphodium* endophytes in a native grass reduce competitive abilities. *Ecology Letters* 7(4), 304–313.
- Farfan-Vignolo, E. R., & Asard, H. (2012). Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59(2012), 55–62.
- Gange, A.C., Brown, V.K., (2003). Actions and Interactions of Soil Invertebrates and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Affecting the Structure of Plant Communities, in: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I.R. (Eds.), *Mycorrhizal Ecology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 321–344.
- Grimoldi, A. A., Kavanová, M., Lattanzi, F. A., Schäufele, R., & Schnyder, H. (2006). Arbuscular mycorrhizal colonization on carbon economy in perennial ryegrass: Quantification by ¹³CO₂/¹²CO₂ steady-state labelling and gas exchange. *New Phytologist* 172(3), 544–553.

- Gundel, P. E., Martínez-Ghersa, M. A., Garibaldi, L. A., & Ghersa, C. M. (2009). Viability of Neotyphodium endophytic fungus and endophyte-infected and noninfected *Lolium multiflorum* seeds. *Botany* 87(1), 88–96.
- Gundel, P. E., Garibaldi, L. A., Martínez-Ghersa, M. A., & Ghersa, 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., Irisarri, J. G. N., Fazio, L., Casas, C., & Pérez, L. I. (2016). Inferring field performance from drought experiments can be misleading: The case of symbiosis between grasses and *Epichloë* fungal endophytes. *Journal of Arid Environments* 132, 60–62.
- Gundel, P. E., Ueno, A. C., Panteix, M., & Iannone, L. J. (2018). Presence of *Epichloë* Fungus in the Endosperm-Side of the Seed Predicts the Symbiotic Status of the Seedling. *Seed Technology* Vol.39 No.2 , 117-127.
- Guo, B. Z., Hendrix, J. W., An, Z. Q., & Ferriss, R. S. (1992). Role of *Acremonium* endophyte of fescue on inhibition of colonization and reproduction of mycorrhizal fungi. *Mycologia* 84(6), 882.
- Hahn, H., McManus, M. T., Warnstorff, K., Monahan, B. J., Young, C. A., Davies, E., Tapper, B. A., & Scott, B. (2008). *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 63(1-3), 183–199.
- Janos, D. P. (2007). Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. In *Mycorrhiza* 17(2), 75–91.
- Johnson, N. C. (1993). Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* 3(4), 749–757.
- Kalosa-Kenyon, E., Slaughter, L. C., Rudgers, J. A., & McCulley, R. L. (2018). Asexual *Epichloë* Endophytes Do Not Consistently Alter Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonization in Three Grasses. *The American Midland Naturalist* 179(2), 157–165.
- Larimer, A. L., Bever, J. D., & Clay, K. (2012). Consequences of simultaneous interactions of fungal endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi with a shared host grass. *Oikos*. 121(12), 2090–2096.
- Leuchtmann A, Bacon CW, Schardl CL, White JF Jr, Tadych M. 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia* 106: 202–215.
- Liu, Q., Parsons, A. J., Xue, H., Fraser, K., Ryan, G. D., Newman, J. A., & Rasmussen, S. (2011). Competition between foliar *Neotyphodium lolii* endophytes and mycorrhizal *Glomus spp.* fungi

in *Lolium perenne* depends on resource supply and host carbohydrate content. *Functional Ecology* 25(4), 910–920.

- Liu, H., Chen, W., Wu, M., Wu, R., Zhou, Y., Gao, Y., & Ren, A. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungus inoculation reduces the drought-resistance advantage of endophyte-infected versus endophyte-free *Leymus chinensis*. *Mycorrhiza*, 27(8), 791–799.
- Mack, K. M. L., & Rudgers, J. A. (2008). Balancing multiple mutualists: Asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. *Oikos*. 117(2), 310–320.
- Malinowski, D. P., & Belesky, D. P. (2000). Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. In *Crop Science* 40(4), 923.
- Miller, R. M., Jastrow, J. D., & Reinhardt, D. R. (1995). External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia*. 103(1), 17–23.
- Müller, J. (2003). Artificial infection by endophytes affects growth and mycorrhizal colonisation of *Lolium perenne*. *Functional Plant Biology* 30(4), 419.
- Newsham, K. K., Fitter, A. H., & Watkinson, A. R. (1995). Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. In *Trends in Ecology & Evolution* 10(10), 407–411.
- Novas, M. V., Cabral, D., & Godeas, A. M. (2005). Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis* 40, 23-30.
- Novas, M., Iannone, L. J., Godeas, A. M., & Cabral, D. (2009). Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycological Progress* 8(1), 75–81.
- Omacini, M., Eggers, T., Bonkowski, M., Gange, A. C., & Jones, T. H. (2006). Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology* 20(2), 226–232.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. In *Nature Reviews Microbiology* 6(10), 763–775.
- Pérez-De-Luque, A., Tille, S., Johnson, I., Pascual-Pardo, D., Ton, J., & Cameron, D. D. (2017). The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogen. *Scientific Reports* 7(1).
- Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, A.H., Alexander, I.J., 1992. Mycorrhizas in Ecosystems, Experimental Agriculture. Cambridge University Press, Wallingford, Oxon.: *CAB International* 30(01), 108.

- Saikkonen, K., Ahlholm, J., Helander, M., Lehtimäki, S., & Niemeläinen, O. (2000). Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. *Ecography* 23(3), 360–366.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29(1), 319–343.
- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S., & Smith, F. A. (2010). Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 326(1-2), 3–20.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis Third Edition. In *Soil Science Society of America Journal* 137(3), 204.
- Ueno, A. C., Gundel, P. E., Ghera, C. M., Demkura, P. V., Card, S. D., Mace, W. J., & Martínez-Ghera, M. A. (2020). Ontogenetic and trans-generational dynamics of a vertically transmitted fungal symbiont in an annual host plant in ozone-polluted settings. *Plant Cell and Environment*, 43(10), 2540–2550.
- Vignale, M. V., Iannone, L. J., Scervino, J. M., & Novas, M. V. (2018). *Epichloë* exudates promote in vitro and in vivo arbuscular mycorrhizal fungi development and plant growth. *Plant and Soil* 422(1-2), 267–281.
- 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.
- White, J.F. and M.S. Torres. (2009). Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis. *Molecular Biology* (p. 430). BocaRaton, USA: CRC Pres.
- Wright, S. F., & Upadhyaya, A. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198:97–107.
- Zhang S, Lehmann A, Zheng W, You Z, Rillig MC. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi increase grain yields: a meta-analysis. *New Phytologist* 222: 543-555.
- Zuur, A., Ieno, E., Walker, N., Saveliev, A. y Smith, G. (2009). *Mixed Effects Models and Extension in Ecology with R*. Springer, New York.

APENDICE

Correlación eficiencia de transmisión, número y producción de semillas.

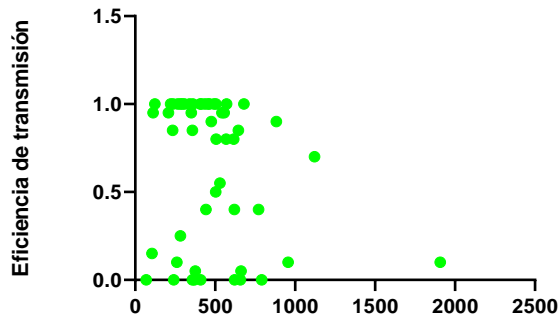


Figura A.1: Eficiencia de transmisión en función del número de semillas(#/Planta).

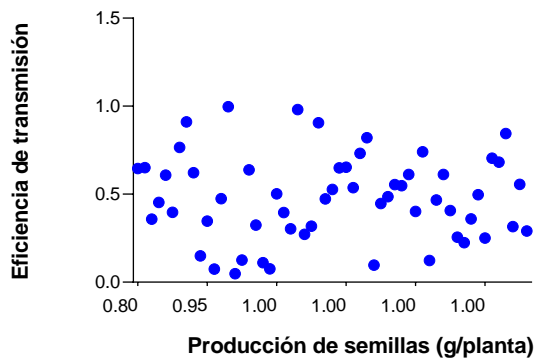


Figura A.2: Eficiencia de transmisión en función de la producción de semillas (g/planta).

Análisis estadísticos

Biomasa aérea

Test: Tukey Alfa=0,05

Error: 0,9367 gl: 108

Riego Medias n E.E.

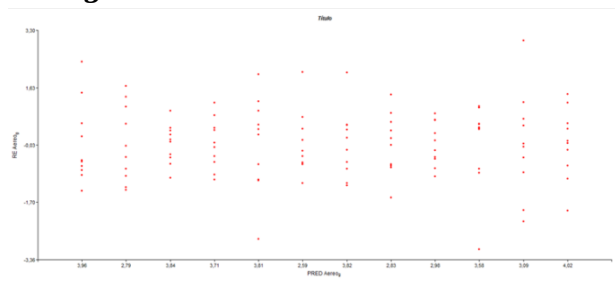
15d 2,80 40 0,15 A

5d 3,55 40 0,15 B

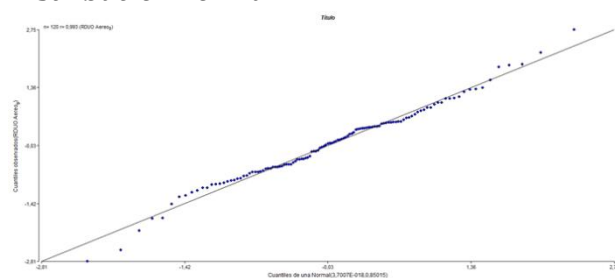
C 3,91 40 0,15 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Homogeneidad de varianzas



Distribución normal



Biomasa radical

Test: Tukey Alfa=0,05

Error: 35,7065 gl: 108

Riego Medias n E.E.

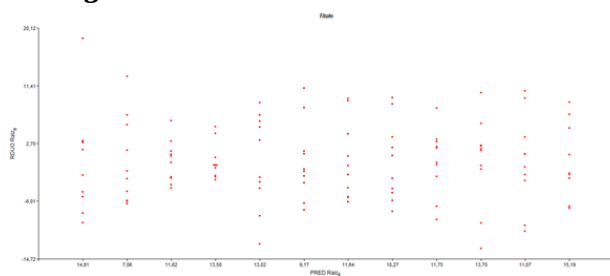
15d 9,56 40 0,94 A

5d 12,82 40 0,94 B

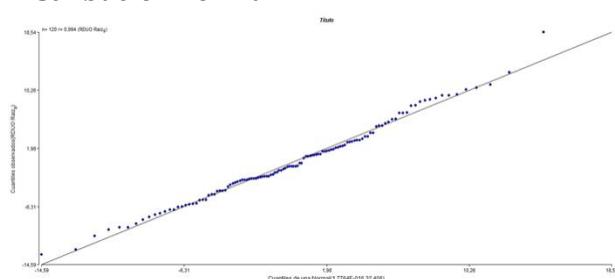
C 13,31 40 0,94 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Homogeneidad de varianzas



Distribución normal

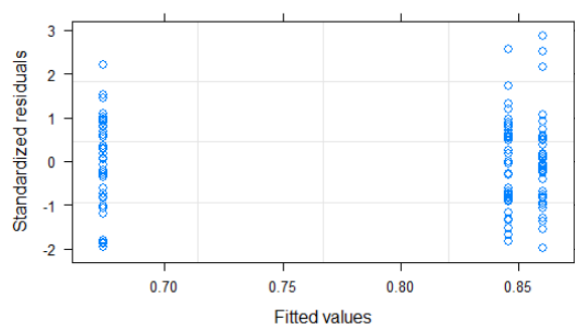


Biomasa espigas

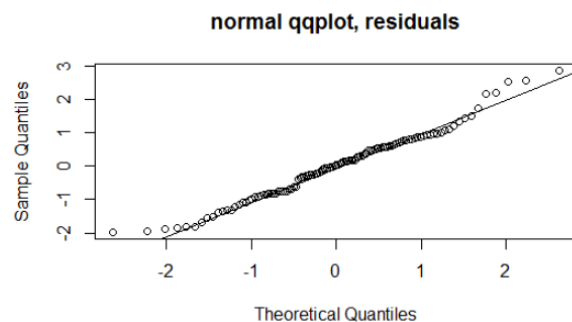
Test: Tukey Alfa=0,05

Riego	emmean	SE	df	Lower.CL	upper.CL	.group
15d	0.674	0.0484	40	0.553	0.794	A
5d	0.846	0.0716	40	0.667	1.024	AB
C	0.861	0.0513	39	0.733	0.989	B

Homogeneidad de varianzas



Distribución normal



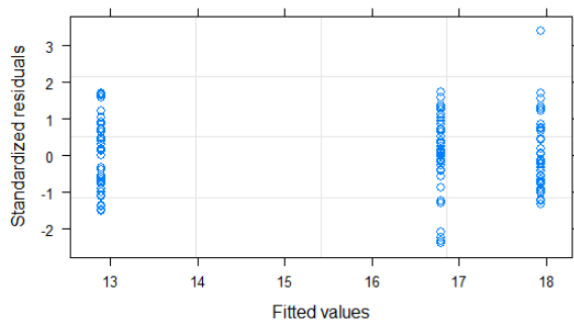
Biomasa total

Test: Tukey Alfa=0,05

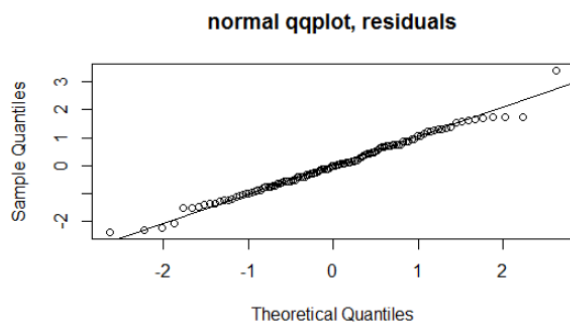
Riego	emmean	SE	df	Lower.CL	upper.CL	.group
15d	12.9	1.07	112	10.3	15.5	A

5d	16.8	1.07	112	14.2	19.4	B
C	17.9	1.05	112	15.4	20.5	B

Homogeneidad de varianzas



Distribución normal

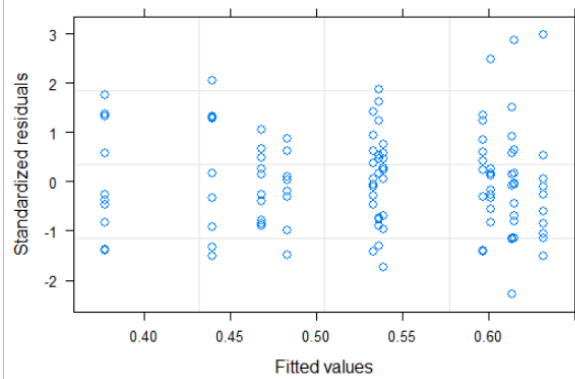


Producción de semillas

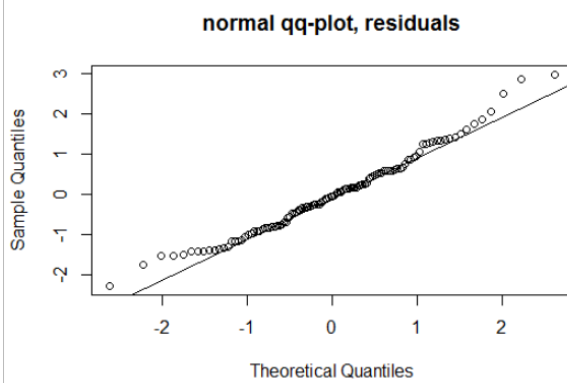
Test: Tukey Alfa=0,05

Micorriza	Endofito	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
M+	E+	0.457	0.0495	111	0.332	0.583	a
M-	E-	0.497	0.0469	111	0.378	0.616	a
M+	E-	0.581	0.0495	111	0.455	0.706	ab
M-	E+	0.588	0.0462	111	0.471	0.705	ab

Homogeneidad de varianzas

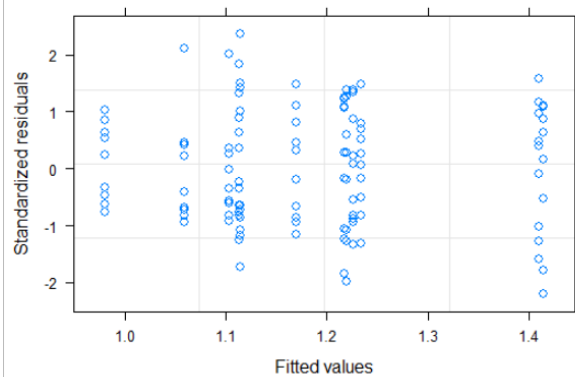


Distribución normal

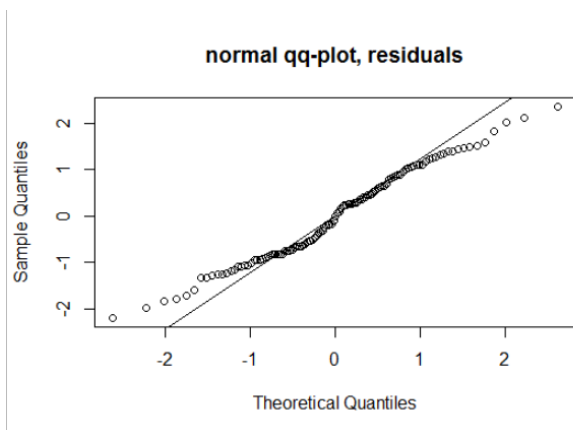


Peso de 1000 semillas

Homogeneidad de varianzas



Distribución normal



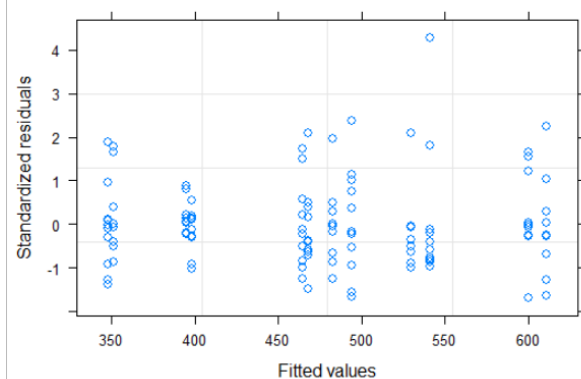
Numero de semillas

Test: Tukey Alfa=0,05

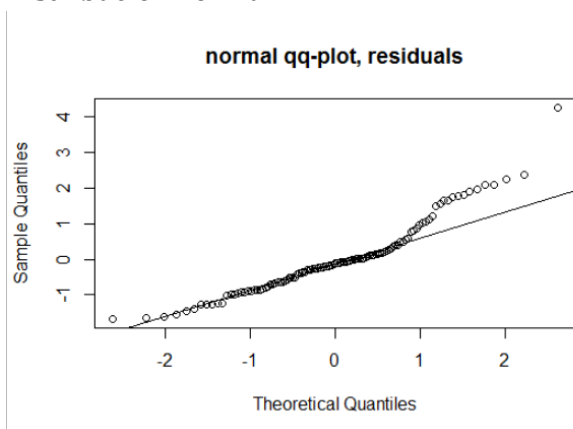
Riego	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
SL	419	26.8	45.0	352	485	A
SC	466	54.8	39.8	329	602	AB
C	536	25.3	39.2	473	599	B

Micorriza	Endofito	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
M-	E-	402	36.6	114	310	495	A
M+	E+	406	38.5	112	308	503	A
M+	E-	538	38.3	113	441	634	AB
M-	E+	549	36.2	114	457	640	B

Homogeneidad de varianzas



Distribución normal

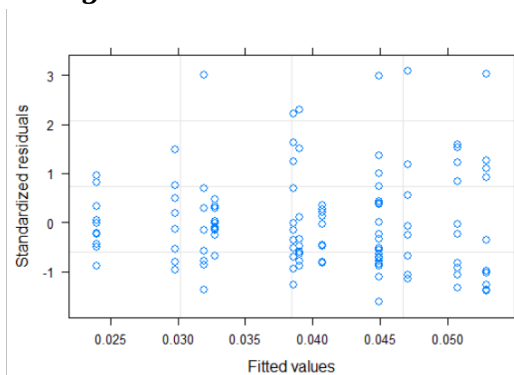


Esfuerzo reproductivo

Test: Tukey Alfa=0,05

Micorriza	Endofito	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
M+	E+	0.0286	0.00410	59.9	0.0180	0.0391	A
M-	E-	0.0374	0.00523	60.9	0.0239	0.0508	AB
M+	E-	0.0437	0.00410	59.9	0.0331	0.0542	AB
M-	E+	0.0495	0.00514	60.8	0.0363	0.0627	B

Homogeneidad de varianzas



Distribución normal

