# Capítulo I: Introducción general y objetivos

## Introducción

El cambio climático global impulsado por las actividades humanas expone a las plantas a nuevas situaciones de estrés tanto abióticas como bióticas. En particular la herbivoría, una de las amenazas con mayor impacto sobre las plantas (Bale et al. (2002)), podría aumentar por las nuevas condiciones abióticas ((**Hamann2021?**)). Altas concentraciones de CO2 en la atmósfera aumentan la tasa fotosintética de las plantas, lo cual puede diluir la concentración de nitrógeno en las hojas al aumentar el contenido de carbohidrátos no-estrucutrales y disminuir el área foliar específica ((**Zavala2013?**)). El contenido de nitrógeno es un factor clave de la calidad nutricional del tejido, por lo que los insectos deberían consumir mayores cantidades de tejido vegetal para satisfacer sus necesidades nutricionales. Frente a la herbivoría, las plantas pueden responder mediante ajuste plástico-fenotípicas (e.g., fisiológicas y morfológicas) ((**Bellard2012?**) @Parmesan2006), y parte de este ajuste puede deberse a las nuevas capacidades que las plantas obtienen a través de las asociaciones simbióticas con microorganismos ((**Acuña?**)‐Rodriguez2020 @Petipas2021). Sin embargo, los resultados de las interacciones simbióticas son contexto-dependiente (Bastías et al., 2022; Müller y Krauss, 2005; Pineda et al., 2013). Por lo tanto, resulta fundamental entender los mecanismos subyacentes a las simbiosis para poder predecir la estabilidad y eficacia de los beneficios que los microorganismos brindan a las plantas hospedantes.

**La herbivoría subterránea y su efecto en poblaciones vegetales**

Históricamente la herbivoría subterránea ha sido menos estudiada que la aérea, principalmente debido a las dificultades metodológicas que conlleva. Sin embargo, los herbívoros subterráneos son actores clave del subsistema subterráneo, el cual provee importantes servicios ecosistémicos. Por ejemplo, para el caso de los pastizales, éstos juegan un papel importante en la regulación del clima por ser grandes sumideros de carbono en el suelo y sostener comunidades subterráneas ricas en mesofauna y microorganismos esenciales para el ciclo del carbono (Petermann & Buzhdygan 2021; Bai & Cotrufo 2022; Martins et al. 2024). Las gramíneas, el componente dominante de los pastizales, asignan más de la mitad de su biomasa a las raíces, la principal fuente de carbono orgánico hacia el suelo (De Deyn et al. 2008; Gherardi & Sala 2020; Petermann & Buzhdygan 2021). Es decir que la herbivoría subterránea es uno de los controladores de la provisión de estos servicios ecosistémicos.

La herbivoría de raíces no solo reduce el fitness de las plantas, sino que también altera las estructuras de la comunidad vegetal y modifica las interacciones de las plantas con otros organismos, como herbívoros foliares y microorganismos (De Deyn et al., 2003; Frew, 2022; Howard et al., 2020; Wardle et al., 2004). so what?

**Respuestas de las plantas frente a la herbivoría subterránea**

Al evolucionar en presencia de herbívoros, las plantas adquirieron la capacidad de producir compuestos secundarios de defensa (Karban et al., 1998). Cuando un insecto herbívoro ataca a una planta, esta activa su sistema inmune e induce una respuesta que termina con la síntesis de compuestos especializados de defensa (e.g., alcaloides, terpenoides) (War et al., 2012). Estas respuestas son coordinadas por distintas hormonas y distintos tipos de insectos herbívoros activan diferentes vías de señalización hormonal. Las dos vías centrales son la vía del ácido salicílico (SA) y la del ácido jasmónico (JA) (Ballaré, 2014). El modelo inicial indicaba que el SA era activado por patógenos biótroficos e insectos succionadores mientras que el JA lo era por patógenos necrotróficos o insectos masticadores – con cross-talk negativo entre ambas hormonas (Ballaré, 2014; Thaler et al., 2012). Sin embargo, evidencia más reciente sugiere que ese modelo no es tan generalizado, ya que se han encontrado ejemplos en los cuales herbívoros succionadores pueden estimular ambas vías de señalización (ver Nguyen et al., 2016). Además, los efectos de la herbivoría por insectos sobre las plantas puede separarse en distintos componentes (por ejemplo, la estimulación mecánica por movimiento o vibración, el daño en el tejido o la presencia de saliva del insecto) y la respuesta desencadenada depende de la combinación de esos componentes (Waterman et al. 2009). Esto es particularmente importante al investigar estas respuestas ya que, si bien la herbivoría por insectos real incluye todos esos componentes, distintas formas de simulación de herbivoría permiten separar la respuesta producida por cada componente dentro de la respuesta defensiva general. Una vez activadas estas defensas, las plantas pueden permanecer en un estado defensivo cebado (priming), que les permite responder de manera mas efectiva frente a futuros ataques (Frost et al., 2008; Thaler et al., 2012). Por ultimo, algunas de estas defensas actúan de forma sistémica, produciendo una respuesta defensiva en órganos que no han sido atacados (Bezemer y van Dam, 2005; Erb et al., 2009). Por ejemplo, el ataque de un herbívoro masticador aéreo podría activar la vía de defensa mediada por el JA de manera tal que la defensa de la planta quede en un estado cebado para futuros ataques de herbívoros del mismo gremio, como puede ser una larva subterránea.

**Mutualismo defensivo entre pastos y hongos *Epichloë***

Las interacciones entre plantas y microorganismos pueden modular la interacción planta-herbívoro (Bastias et al., 2017; Pineda et al., 2013). En particular, la simbiosis que ciertas gramíneas invernales (subfamilia: Poaceae) establecen con hongos endófitos del género *Epichloë* (familia: Clavicipitaceae) es considerada un “mutualismo defensivo” (Clay, 1988). En esta simbiosis, las hifas del hongo crecen por el apoplasto de los tejidos aéreos de la planta colonizando los meristemas que dan origen a macollos, espigas y flores. De esta manera, el endófito encuentra un medio de reproducción y dispersión a través de las semillas de la planta hospedante (i.e., transmisión vertical) (Clay y Schardl, 2002; Gundel et al., 2011). Dentro de los beneficios brindados por los endófitos sobre las plantas se encuentran la estimulación del crecimiento, tolerancia a factores de estrés y la resistencia a la herbivoría (Clay y Schardl, 2002; Decunta et al., 2021). Esta resistencia a la herbivoría sucede principalmente a través de la producción de una serie de alcaloides fúngicos con efectos tóxicos o disuasivos sobre una amplia gama de herbívoros (Clay y Schardl, 2002; Saikkonen et al., 2013; Schardl et al., 2012). Adquirir la capacidad de producir alcaloides defensivos puede ser una de las razones de la alta tasa de infección de pastos con hongos *Epichloë*, ya que los pastos no-simbióticos producen muy pocos metabolitos defensivos en comparación a otras familias vegetales (Defossez et al., 2022).

Los hongos *Epichloë* producen principalmente cuatro tipos de alcaloides. Dos son reconocidos por su toxicidad sobre animales vertebrados (i.e., la ergovalina y Lolitrem- B) y los otros dos por sus efectos sobre invertebrados (i.e., lolinas y la peramina) (Schardl et al. 2012; Saikkonen et al. 2013). El perfil de alcaloides producidos depende de la especie de endófito que, en general, se corresponde con una especie de planta (Schardl et al. 2012). La distribución de los alcaloides en la planta no es homogénea y guarda una relación positiva con la densidad de hifas en el tejido (Justus et al., 1997; Rasmussen et al., 2007; Ueno et al., 2020). La concentración de algunos de esos alcaloides también puede verse estimulada en respuesta a eventos de herbivoría y en mayor medida en órganos más valiosos para la planta (e.g., mayor inducción en hojas jóvenes que en adultas (Bultman et al., 2004; Fuchs et al., 2016; Zhang et al., 2009). Dado que la efectividad del mecanismo de protección contra los herbívoros guarda una relación directa positiva con la concentración de alcaloides (Graff et al., 2020; Wilkinson et al., 2000), los factores que afecten tanto el crecimiento del hongo como su capacidad de síntesis de alcaloides afectarán la efectividad del mutualismo defensivo (Bastías y Gundel, 2023).

A pesar de que en las raíces no se encuentran hifas de endófito (Schardl et al. 2004), sí se encuentran las lolinas, uno de los alcaloides fúngicos con mayor efectividad insecticida (Justus et al., 1997; Popay et al., 2020), y que llegarían a estos órganos por medio del floema (Popay et al., 2023; Wilkinson et al., 2000). Dado que la herbivoría radical promueve la translocación de carbono hacia la raíces, y que tanto este flujo como las lolinas se movilizan principalmente por floema, es posible pensar que ante un evento de herbivoría radical el flujo de carbono asignado a reparar los tejidos dañados conduzca a los alcaloides, aumentando su concentración en órganos dañados (Schultz et al., 2013; van Dam, 2009). A pesar de ello, los estudios que han explorado el mecanismo de resistencia conferido por los endófitos en las raíces son muy pocos (Bastias et al., 2017; Saikkonen et al., 2013) y con resultados variables (Pennell et al., 2005; Popay et al., 2020).

El vacío de conocimiento alrededor de los mecanismos de respuesta de las plantas a la herbivoría radical y cómo esta impacta sobre la herbivoría aérea es aún mayor si se considera que estas interacciones están mediadas por hongos endófitos foliares. Por ello, este proyecto se enfoca en las siguientes preguntas: ¿Cómo afecta la presencia de hongos endófitos a la interacción de la planta con herbívoros subterráneos? ¿Cómo afecta la herbivoría subterránea a la capacidad de los endófitos de conferir resistencia a herbívoros aéreos? ¿Puede la herbivoría aérea comprometer la capacidad de los endófitos de conferir resistencia a herbívoros subterráneos? ¿Pueden altas presiones de herbivoría, tanto aérea como subterránea, comprometer la estabilidad y el funcionamiento de la simbiosis?

El **objetivo general** de mi tesis es estudiar el papel de la simbiosis entre pastos y hongos endófitos sobre la interacción de la planta hospedante con herbívoros tanto aéreos como subterráneos. Puntualmente, me propongo investigar la capacidad de los hongos endófitos del género Epichloë de modular de manera simultánea la respuesta a la herbivoría subterránea y aérea de la planta. Con foco no solo en la planta sino también en el endófito, evaluaré los potenciales compromisos entre la recuperación de los tejidos dañados en las plantas atacadas por herbívoros y el mantenimiento/funcionamiento de la simbiosis. Mi **hipótesis general** es que la protección contra la herbivoría que proveen los hongos endófitos puede extenderse a tejidos en los que el hongo no se encuentra (e.g., la raíz) y que esta protección aumenta cuando existe un factor (e.g., herbívoros) que, habiendo causado daño, estimula el flujo de carbono destinado a reparar y recomponer los tejidos afectados. Sin embargo, la herbivoría genera compromisos en la planta entre asignar recursos hacia la defensa y reparación de los tejidos dañados, y la manutención del hongo endófito asociado, comprometiendo su capacidad para brindar resistencia. Estos compromisos dependen del tipo e intensidad del daño causado por los herbívoros y de los tejidos en los cuales ocurra la herbivoría.

## Objetivos específicos e hipótesis específicas

Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Determinar si un evento de daño mecánico en las raíces genera una mayor protección en las raíces de la planta hospedante a través de la translocación de alcaloides fúngicos.

2. Determinar si eventos de daño mecánico aislados (daño foliar o radical) o simultáneos (daño foliar y radical) comprometen la defensa provista por el endófito frente herbívoros subterráneos.

3. Determinar si la defensa provista por el endófito ante herbívoros aéreos disminuye luego de un evento de herbivoría subterránea.

En relación a estos objetivos, se proponen las siguientes hipótesis específicas y sus predicciones asociadas:

**Hipótesis 1:** Un evento de daño radical genera un flujo de carbono desde los tejidos aéreos destinado a reparar los tejidos dañados. Este flujo a través del floema transporta los alcaloides móviles producidos por el endófito. Esto aumenta la resistencia conferida por el endófito en las raíces frente herbívoros subterráneos.

Predicciones: Los alcaloides con efecto anti-herbivoría producidos por el hongo *E. occultans* (i.e., lolinas) serán encontrados en las raíces. Las plantas E+ previamente expuestas a daño mecánico radical tendrán una mayor concentración de alcaloides fúngicos que aquellas no dañadas. Este efecto será mayor en plantas expuestas a mayor daño. El aumento relativo de peso de las larvas de D. abderus será menor cuanto mayor haya sido el daño radical mecánico recibido por la planta. **Hipótesis 2:** La defoliación causa en la planta hospedante una reasignación de recursos a reparar y restituir los tejidos dañados comprometiendo los recursos para mantener al hongo endófito y deteriorando la resistencia mediada por los alcaloides fúngicos contra herbívoros subterráneos. El daño radical en simultáneo con la defoliación genera un mayor compromiso en la asignación de recursos e intensifica el deterioro en la manutención del endófito y en la resistencia que provee. Predicciones: Ante eventos de defoliación, las plantas E+ mostrarán un menor nivel de defensa en la raíz (menor nivel de alcaloides) que las plantas E+ que no fueron dañadas. Las hojas tendrán una menor densidad de hifas y por tanto, habrá menor producción de alcaloides. El desempeño de las larvas del suelo será mayor en plantas con daño foliar que en aquellas sin daño. Ante eventos de daño aéreo y radical simultáneos, estos efectos serán mas agudos: las plantas con daño foliar y radical serán las que tengan menor cantidad de alcaloides, menor concentración de hifas y en las cuales el desempeño de las larvas será el máximo.

**Hipótesis 3**: El daño radical causado por la herbivoría desencadena en la planta una reasignación de carbono destinado a recomponer el tejido dañado, aumentando el flujo de los alcaloides hacia las raíces y comprometiendo la capacidad del endófito de defender los tejidos foliares frente a ataques de herbívoros aéreos.

Predicciones: Bajo ataque de larvas de *D. abderus* o daño mecánico de raíz, las plantas E+ mostrarán menor concentración de alcaloides y mayor desempeño de larvas de *Spodoptera frugiperda* en tejidos aéreos que en plantas E+ sin daño radical. La relación C:N en las raices será menor en plantas con daño radical que en aquellas que no fueron dañadas.

## Estructura de la tesis

Esta tesis consta de 5 capítulos. Este primer Capítulo describió el estado del conocimiento actual en la materia y planteó las preguntas y objetivos. El Capítulo 2 corresponde al objetivo específico 1. El capítulo presenta un meta-análisis donde se estudian patrones generales del rol de los hongos *Epichloë* en la defensa de las plantas frente a herbívoros subterráneos, e incluye un análisis de la acumulación de alcaloides fúngicos en raíces. El Capítulo 3 corresponde a los objetivos específicos 1 y 2. El capítulo presenta resultados de dos experimentos con herbívoros subterráneos junto con simulación de herbivoría aérea y subterránea. Se estudia el efecto de la herbivoría sobre la acumulación de alcaloides en raíces y el posible compromiso entre defender las raíces y los tejidos aéreos. El Capítulo 4 corresponde al objetivo específico número 3. El capítulo estudia el sistema en presencia de herbívoros reales, tanto aéreos como subterráneos, y examina que cambios en los tejidos radicales, tanto en la concentración de alcaloides fúngicos como en las relaciones de concentraciones de nutrientes. Por ultimo, el Capítulo 5 incluye una discusión y conclusiones generales de los resultados obtenidos.

Bale, Jeffery S., Gregory J. Masters, Ian D. Hodkinson, Caroline Awmack, T. Martijn Bezemer, Valerie K. Brown, Jennifer Butterfield, et al. 2002. “Herbivory in Global Climate Change Research: Direct Effects of Rising Temperature on Insect Herbivores.” *Global Change Biology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2002.00451.x>.