



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**DIVERSIDAD DE ENDÓFITOS EN
BROMUS AULETICUS TRINUS (EX
NESS): IMPLICANCIAS ADAPTATIVAS**

Lucía Valeria MENESES MEDINA

Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

Diciembre 2020

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr. Sandra Lupo, Dr. Leticia Bao y PhD. Clara Pritsch, el 11 de diciembre de 2020. Autora: Ing Agr. Lucía Meneses. Director: PhD Federico Condón, Co-director Dr. Leopoldo Iannone.

Dedico este trabajo a mi familia...

*“La vida es una unión simbiótica y cooperativa
que permite triunfar a los que se asocian”*

Lynn Margulis

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo recibido de mis padres, que siempre de una forma u otra me ayudan a cumplir mis metas. También a Alejandro por su paciencia y contención en todo momento. A mis amigos y familia por acompañarme siempre. ¡Los quiero mucho!

A mi tutor Ing Agr. PhD Federico Condón y co tutor Dr. Leopoldo Iannone por guiarme en mi formación científica y por la buena disposición para ayudarme durante estos años.

A ANII por la beca que me otorgó y a INIA La Estanzuela por confiar en mí y permitirme realizar mi estudio de maestría en el país. En particular al personal del Laboratorio de Entomología y Fitopatología: Alicia, Mabel, Dahiana, Pablo, Silvina y Silvia quienes me ayudaron en todo este tiempo y me acompañaron en el día a día.

A Sandra Lupo por su buena predisposición para formar parte del tribunal y por sus valiosos aportes durante los seminarios.

A Ximena Cibils quien me integró a este proyecto y equipo de trabajo. Además de ayudarme y motivarme a pesar de la distancia.

A la Dra. Carolyn Young por darme la oportunidad de realizar una pasantía en su laboratorio en el Noble Research Institute, integrándome a su equipo de trabajo. Por toda su ayuda, pero por sobre todo por la calidez y calidad en el trato.

A la Dra. Nikki Charlton por enseñarme y apoyarme en todo momento durante la pasantía en Noble. A Amy por ser muy buena compañera y por tener siempre buena disposición para ayudarme. Ambas junto a sus familias se encargaron de que tenga una excelente estadía. Además de Yanina, Ana y Barbara con quienes compartí momentos muy divertidos .

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE ENDÓFITOS DEL GÉNERO <i>EPICHLOË</i> Y GRAMÍNEAS	2
1.2. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	6
1.2.1. <u>Toxicidad en el ganado</u>	6
1.2.2. <u>Actividad insecticida</u>	8
1.2.3. <u>Promoción del crecimiento y competitividad en plantas</u>	10
1.2.4. <u>Actividad antifúngica</u>	10
1.3. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENDÓFITOS	11
1.4. DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A GRAMÍNEAS DE AMÉRICA DEL SUR	12
1.5. IMPLICANCIAS AGRONÓMICAS DE <i>EPICHLOË</i>.....	15
1.6. <i>BROMUS AULETICUS</i>: ESPECIE HOSPEDERA DE <i>EPICHLOË</i>	16
1.7. LOS ÁFIDOS Y <i>EPICHLOË</i>	17
1.8. OBJETIVOS	20
2. <u>DIVERSIDAD DE LOS ENDÓFITOS DE <i>BROMUS AULETICUS</i>:</u> <u>IMPLICANCIAS EN SU ROL ANTI ÁFIDO</u>	21
2.1. RESUMEN	21
2.2. SUMMARY.....	22
2.3. INTRODUCCIÓN.....	23
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.4.1. <u>Material vegetal utilizado en los estudios</u>.....	27
2.4.2. <u>Caracterización genética</u>.....	28
2.4.3. <u>Análisis de expresión de alcaloides</u>	29

2.4.4. <u>Caracterización morfológica</u>	29
2.4.5. <u>Ensayo de Antibiosis</u>	30
2.4.5.1. <u>Análisis estadístico</u>	35
2.5. <u>RESULTADOS</u>	36
2.5.1. <u>Detección de diversidad genética de <i>Epichloë</i> en <i>Bromus auleticus</i></u> ...	36
2.5.2. <u>Caracterización química</u>	40
2.5.3. <u>Caracterización morfológica</u>	40
2.5.4. <u>Identificación de genotipos de endófitos disuasivos</u>	46
2.6. <u>DISCUSIÓN</u>	52
2.7. <u>CONCLUSIÓN</u>	58
2.8. <u>REFERENCIAS</u>	59
2.9. <u>INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA</u>	66
3. <u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GLOBALES</u>	87
4. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	89

RESUMEN

Los endófitos del género *Epichloë* (Clavicipitaceae) infectan gramíneas de zonas templadas. Estos endófitos pueden conferir ventajas adaptativas frente a estreses y herbivoría, atribuible en parte a la capacidad de producir diferentes clases de alcaloides. Debido a los beneficios que los hospederos pueden recibir de la simbiosis, los endófitos del género *Epichloë* han sido ampliamente estudiados y se consideran componentes importantes de la agricultura sostenible, existiendo pocos estudios sobre la incidencia endófito en pastos nativos del hemisferio sur. Aquí, presentamos el primer estudio a nivel nacional de caracterización de endófitos nativos asociados a 83 poblaciones de *Bromus auleticus*. El estudio de la diversidad de endófitos presentó un abordaje multifacético de: i) análisis genéticos para identificar genotipos mediante la detección por PCR multiplex de genes asociados a la biosíntesis de alcaloides y tipo de apareamiento, ii) aislar en medio axénico endófitos correspondientes a cada genotipo identificado para realizar una caracterización morfológica, iii) analizar la expresión de alcaloides (peramina, chanoclavina I y ergovalina) por HPLC, e iv) identificar a partir de los endófitos prevalentes que genotipos presentaban acción disuasiva a *Rhopalosiphum padi* mediante ensayos de antibiosis. Encontramos que el 70% de las poblaciones presentaron infección, con incidencias de 17 al 100%. Se determinó la existencia de diversidad endofítica tanto inter como intrapoblacional (9 poblaciones con dos genotipos de endófitos). En total se identificaron nueve genotipos con diferentes capacidades toxicogénicas potenciales. La caracterización química y morfológica de los genotipos permitió inferir a los linajes que les dieron origen. Estos elementos apoyan la hipótesis sobre la presencia de linajes no descritos aún en esta gramínea hospedera. El ensayo de antibiosis logró identificar la acción antiáfido para el genotipo productor de lolinas. Este endófito pasa a ser una de las opciones más atractivas a considerar como herramienta en un programa de mejoramiento de *Bromus auleticus* para obtener cultivares con buenas características agronómicas.

Palabras clave: simbiosis, diversidad genética, metabolitos secundarios, biocontrol

DIVERSITY OF ENDOPHYTES IN *BROMUS AULETICUS* TRINUS (EX NESS): ADAPTIVE IMPLICATIONS

SUMMARY

Fungal endophytes of the genus *Epichloë* (Clavicipitaceae) infect temperate grasses. These endophytes may confer their hosts adaptive advantages against stresses, such as herbivory, attributable in part to their ability to produce different classes of alkaloids. Due to the benefits that hosts receive from their symbiosis, endophytes of this genus have been extensively studied and are considered important components of sustainable agriculture. Despite that, there are few studies on endophytic incidence of native grasses in the southern hemisphere. Here, we present the first nationwide characterization study of native endophytes associated with 83 populations of *Bromus auleticus*. This study was conducted using a multifaceted approach that included: i) genetic analysis to identify genotypes by detection of genes associated with alkaloid biosynthesis and mating type, ii) morphological characterization of endophytes with different genotypes isolated in axenic medium, iii) peramine, chanoclavin I and ergovaline expression analysis by HPLC, and iv) antibiosis tests to determine deterrent action against *Rhopalosiphum padi* of prevalent endophyte genotypes. Results indicate that 70% of the tested populations were endophyte infected, with seed incidence levels of 16 to 100%. Endophyte diversity was found at both inter- and intra-population levels (8 populations presented two endophyte genotypes). Overall, nine genotypes with potentially different toxicogenic profiles were identified. Lineages that gave origin to these genotypes were inferred from the chemical and morphological characterization. These findings support the hypothesis of the existence of lineages not yet described in this host grass species. The antibiosis test showed anti-aphid action of the putative loline-producing genotype. This endophyte constitutes a promising option to be included in *Bromus auleticus* breeding programs, thus obtaining cultivars with good agronomic characteristics (e.g. resistant to aphids).

Keywords: native grass, symbionts, genetic diversity, secondary metabolites, biocontrol

1. INTRODUCCIÓN

El término endófito fue utilizado por primera vez en el siglo XIX por De Bary (1866), para definir organismos que viven dentro del tejido de una planta, y desde entonces han surgido variantes. Una de las definiciones más comúnmente utilizada en la actualidad fue propuesta por Petrini (1991) que define como endófitos a los diversos microorganismos tales como hongos y bacterias que residen dentro del tejido vegetal sano, durante al menos una parte de su ciclo de vida, sin causarle al huésped ningún síntoma aparente de enfermedad

La mayoría de las plantas en los ecosistemas naturales presentan simbiosis con hongos micorrícicos y hongos endófitos (Petrini, 1986). En lo que concierne a los hongos endófitos, estos juegan un rol importante sobre la ecología, la aptitud física y la evolución de las plantas hospederas (Brundrett, 2006) así como sobre la diversidad y estructura comunitaria de otros organismos (Omacini et al., 2001).

Existen dos grupos principales de hongos endófitos que presentan diferencias en taxonomía, rango de huésped, tipo de tejidos que colonizan, forma de transmisión, funciones ecológicas y relaciones evolutivas: los endófitos clavicipitaceos, que infectan exclusivamente pastos y los no clavicipitaceos que se asocian a plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodríguez et al., 2009).

En el grupo Clavicipitaceae (Hypocreales, Ascomycota) se incluye el género *Epichloë*, el cual es un grupo monofilético de hongos simbioses especializados en asociaciones con plantas de la subfamilia de gramíneas Poöideae (Leuchtmann et al., 2014). Este género es considerado de gran importancia por su actividad biológica vinculada a los beneficios frente a estreses bióticos y abióticos que les confieren a sus plantas huéspedes (Schardl, 2010).

1.1. ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE ENDÓFITOS DEL GÉNERO *EPICHOË* Y GRAMÍNEAS

Del género *Epichloë* se han reportado hongos endófitos en más de 80 géneros y 290 especies de gramíneas en el mundo (Press et al., 2015). Las especies asexuales *Neotyphodium* derivan de especies sexuales de *Epichloë*, y por ende se han reclasificado en el género de *Epichloë* según la similitud morfológica de los conidios y las características de las fuentes de hibridación de hongos endofíticos anamórficos (Schardl, 2010). Por consiguiente, el género *Epichloë* comprende especies sexuales haploides y asexuales que pueden ser híbridos o haploides. Estas últimas parecen haber evolucionado a partir de una sola especie mediante la pérdida del estado sexual, aunque la mayoría de las especies asexuales son híbridos interespecíficos (Moon et al., 2000, Moon et al., 2004). Estudios sugieren que dicha hibridación es un evento común y surge por fusión de células somáticas o anastomosis seguida de cariogamia (Schardl y Craven, 2003).

Las especies de *Epichloë* son típicamente específicas del huésped, y presentan una gran diversidad tanto dentro como entre especies. Crecen en forma sistémica por espacios intercelulares de los tejidos de la parte aérea, tanto de estructuras vegetativas como reproductivas (Figura 1). Las hifas colonizan por vía apoplástica alimentándose a expensas de aminoácidos y azúcares, sin dañar las células a la que subyacen, de tal manera que no provocan ninguna reacción de defensa del hospedante. (Moy et al., 2002). El crecimiento en planta se caracteriza por ser por división y extensión intercalar. Específicamente las hifas se unen a las células del huésped en crecimiento y el crecimiento acumulativo a lo largo del filamento permite que el hongo se extienda al mismo ritmo que el huésped, por lo que el crecimiento del hongo es sincronizado con el de su huésped (Christensen et al., 2008).

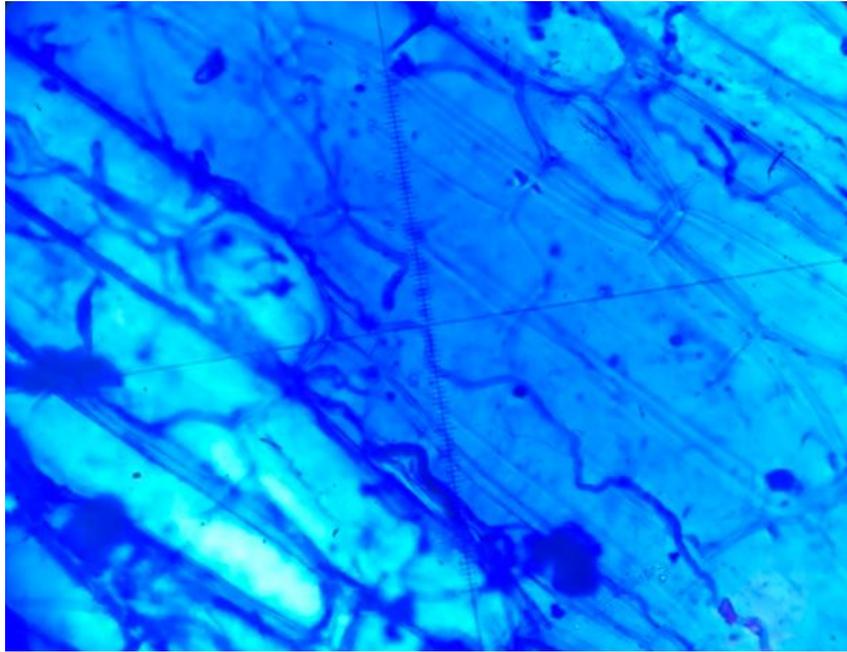


Figura 1. Hifa de endófito en parénquima foliar.

La diversidad existente dentro del género *Epichloë* permite encontrar una amplia gama de interacciones con el huésped. La interacción *Epichloë* - gramínea puede variar desde mutualismo o el mutualismo a diversos grados de antagonismo. Sus ciclos de vida pueden implicar la transmisión vertical a través de las semillas del huésped y/o transmisión horizontal de una planta a otra a través de esporas meióticas. Todo dependiendo del genotipo particular del huésped, del haplotipo del endófito, y de las condiciones ambientales en donde se da la asociación (Saikkonen et al., 2004, Saikkonen et al., 2006, Saikkonen et al., 2010; Cheplick y Faeth, 2009).

Las especies sexuales de *Epichloë* se caracterizan por tener la capacidad de producir estromas en los macollos reproductivos, impidiendo la producción normal de semilla al intervenir en la maduración de las inflorescencias (enfermedad de choke) (Schardl, 2010). Para llevar a cabo la reproducción sexual, en el estroma se producen conidios, que actúan como espermacios y que fecundaran un estroma de tipo de apareamiento opuesto, determinado por los idiomorfos *MTA* y *MTB* en el locus *MT* (Schardl et al., 2014). Esta fecundación es mediada por moscas del género *Botanophila* que se alimentan sobre el estroma y son quienes transportan los conidios de un estroma

a otro. Luego de la fecundación, en el estroma maduran ascos que contienen ascosporas, las cuales serán el inoculo inicial en nuevas plantas (transmisión horizontal) (Bultman y Leuchtman, 2003b). Esta característica les confiere un carácter patogénico, ya que afecta en mayor o menor grado la reproducción de la planta huésped. No obstante, algunas especies sexuales también pueden transmitirse verticalmente por semillas infectadas (Leuchtman et al., 2014).

Por otra parte, las especies de *Epichloë* de reproducción asexual se transmiten exclusivamente mediante la colonización asintomática en los ovarios de las flores en desarrollo y se diseminan con la semilla del huésped (transmisión vertical) (Philipson y Christey, 1986). Durante la germinación de la semilla, las hifas del hongo colonizan los meristemas, dando así plantas hijas con el mismo genotipo de endófito que la planta madre que les dio origen (Christensen et al., 2008). Se ha informado sobre el crecimiento y la producción de conidios en varios huéspedes (Oberhofer y Leuchtman, 2014, Tadych et al., 2007). Por consiguiente, las especies asexuales de *Epichloë* han cobrado importancia agronómica, debido al carácter mutualista de sus asociaciones en el cual ambos protagonistas se benefician (Clay, 1988, Müller y Krauss, 2005). Específicamente, la gramínea proporciona refugio, nutrición, reproducción y una forma de dispersión (Philipson y Christey, 1986, Schardl et al., 2004) mientras que el endófito proporciona ventajas adaptativas a la planta huésped frente a estrés abiótico y biótico, asegurándose su éxito ecológico (Scott y Schardl, 1993, Schardl et al., 2004).

Entre los beneficios para la planta debidos a la asociación con *Epichloë* se ha reportado mejor habilidad adaptativa frente a una amplia gama de condiciones ambientales, obtenida a través de un mayor crecimiento, mayor vigor de las plántulas, mayor persistencia, mejor performance bajo estrés hídrico y menor deficiencia de nutrientes comparado con plantas que no se encuentran infectadas (Malinowski y Belesky, 2000). Con respecto a la resistencia al estrés biótico, la presencia del endófito confiere resistencia a la herbivoría que esta explicada en mayor parte por la producción de metabolitos secundarios (alcaloides) tóxicos tanto para herbívoros vertebrados

como invertebrados (Clay y Schardl, 2002). Además, se asocia a resistencia a nemátodos y algunos patógenos fúngicos (Kimmons et al., 1990, Gwinn y Gavin 1992, Schardl y Phillips 1997, Johnson et al., 2003).

En este contexto, la mayoría de los endófitos se reproducen asexualmente. Esto estaría explicado por la mayor diversidad y cantidad de alcaloides que presentan en comparación a sus parientes sexuales, debido al proceso de hibridación que les da origen permitiendo apilamiento de genes para la biosíntesis de diferentes alcaloides. Por lo tanto, las especies asexuales tienen el potencial de proporcionar una mejor protección de la herbivoría. Esto resulta lógico, ya que los endófitos transmitidos por semilla dependen totalmente del éxito del linaje de los hospederos. (Leuchtman et al., 2000). No obstante, la producción de alcaloides depende de las condiciones ambientales, del genotipo del endófito y del genotipo de la planta huésped (Hesse et al., 2003; Faeth et al., 2004; Faeth et al., 2010). Por consiguiente, la gran diversidad existente tanto en tipo como en niveles de alcaloides en pastos nativos podría estar vinculada a la diversidad genética no solo de las cepas de endófito, sino que también, a la gran heterogeneidad que presentan las gramíneas nativas hospedadoras (Faeth y Sullivan, 2003), y los diversos ambientes en donde transcurren esas interacciones.

Con respecto a las especies de gramíneas que establecen asociaciones simbióticas se destacan las especies forrajeras comúnmente de zonas templadas, como *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, y también especies silvestres de los géneros *Briza*, *Bromus*, *Hordeum*, *Melica*, *Phleum* y *Poa*, entre otras (Iannone et al., 2011).

1.2. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Los endófitos fúngicos son productores de diversos metabolitos secundarios bioactivos. Actualmente, un total de 160 metabolitos secundarios se han reportado a partir de endófitos del género *Epichloë* (Song et al., 2020). En ellos se incluyen cuatro familias de alcaloides: alcaloides del ergot, indol diterpenos (Figura 2), aminopirrolizidinas saturadas (lolinas) y peramina (Figura 3). Además, se encuentran enzimas extracelulares (Correa et al., 2014) e hidrocarburos volátiles, péptidos, derivados de indol, pirimidinas, sesquiterpenoides, flavonoides, derivados de fenol y ácido fenólico, metabolitos alifáticos, esteroides, aminos y amidas, entre otros (Song et al., 2020).

1.2.1. Toxicidad en el ganado

Dentro de las cuatro familias de alcaloides capaces de ser producidas por *Epichloë*, los alcaloides del ergot (compuestos de ergovalina, ergonovina, ergina) y el lolitrem B correspondiente al grupo de los indol diterpenos, son los causantes de toxicidad en animales luego de ser consumidos (Saikkonen et al., 2013). Además de estos compuestos que son muy frecuentes en festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) y ryegrass raigrás perenne (*Lolium perenne* L.), también se destaca el compuesto paxilina, por generar acciones tóxicas en ratones. Estos compuestos interactúan con la dopamina, receptores de serotonina y noradrenalina en el sistema nervioso central y periférico afectando la motilidad, la temperatura corporal y el apetito de los animales (Bräse et al., 2009). Consecuentemente, existen dos enfermedades ampliamente reportadas en ganado en pastoreo: festucosis "fescue toxicosis" asociada a concentraciones de ergovalina en festuca (Koulman et al., 2007; Bacon et al., 1977) y tembladera "ryegrass staggers" causado por concentraciones del compuesto lolitrem B en pasturas de raigrás perenne (Fletcher y Harvey, 1981).

Dentro del genoma de *Epichloë* los genes involucrados en la biosíntesis de alcaloides del ergot (EAS) e indol diterpenos (IDT) están dispuestos en grupos o

clústeres. Es por esto que se ha observado variabilidad entre las distintas especies de *Epichloë* en cuanto a la presencia/ausencia de determinados genes o variaciones en sus secuencias, lo que determina los compuestos intermediarios y finales capaz de sintetizar por los distintos endófitos (Figura 2) (Schardl et al., 2013c).

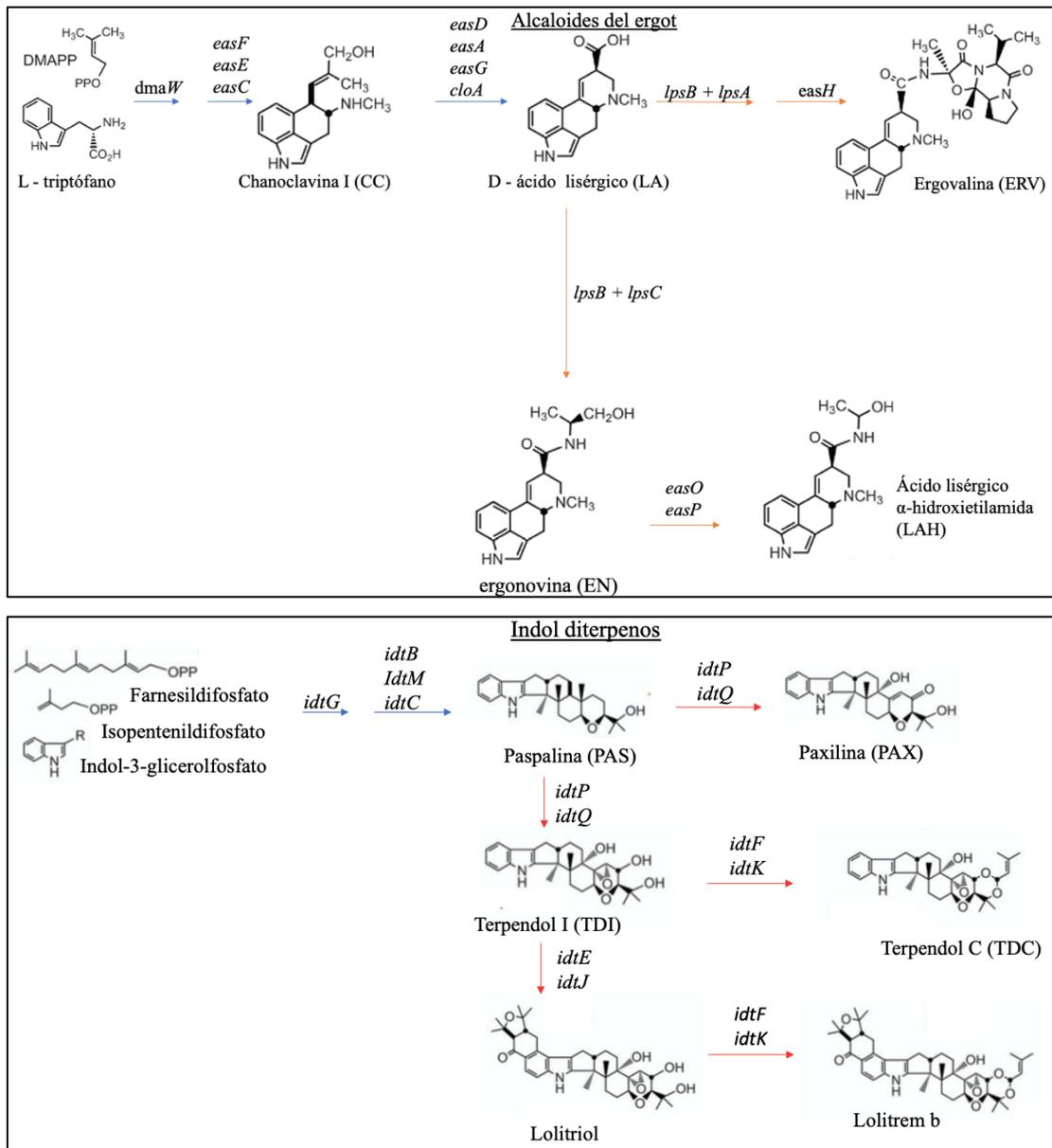


Figura 2. Esquema simplificado de las rutas de biosíntesis para alcaloides del ergot (arriba) e indol diterpenos (abajo). Adaptado de Schardl et al., (2012), Schardl et al., (2013a).

1.2.2. Actividad insecticida

Los endófitos *Epichloë* confieren resistencia contra la herbivoría tanto de forma directa mediante la producción de alcaloides, como en forma indirecta mejorando mecanismos de defensa de la planta (Bastias et al., 2017, Unsicker et al., 2009). Por ejemplo, en este último caso, la planta después de un daño de herbivoría induce cambios en los compuestos orgánicos volátiles emitidos, para atraer enemigos naturales quienes ejercerán control biológico de los insectos herbívoros (Kessler y Baldwin, 2001).

En lo que respecta a la acción de los alcaloides, la peramina y las lolinas son los grupos de alcaloides de interés agronómico ya que no presentan connotaciones negativas al ser consumidos por animales de pastoreo y presentan acción insecticida. Mientras que los alcaloides del ergot e indol diterpenos si bien presentan acción neurotóxica en insectos, manifiestan una actividad tóxica apreciable en el ganado (Schardl et al., 2013c).

Se ha logrado identificar y secuenciar los genes involucrados en la biosíntesis para las cuatro familias de alcaloides. El genoma del endófito solo requiere un único gen multifuncional (*perA*) para la biosíntesis de peramina (Tanaka et al., 2005). Es el compuesto más frecuentemente encontrado en las especies de *Epichloë*, y simplemente con la copia intacta de *perA* se obtiene la síntesis del compuesto peramina en la planta (Figura. 3) (Schardl et al., 2013c). También se ha encontrado que algunas cepas de endófitos no pueden producir el metabolito debido a una delección a gran escala en la región 3'-terminal del gen (Scott et al., 2007; Hettiarachchige et al., 2015). La peramina fue identificada a partir de la asociación de *Epichloë festucae vaer. lolii* en pasturas de raigrás perenne, la cual proporcionaba protección contra el gorgojo argentino del tallo (*Listronotus bonariensis*; Coleoptera) en Nueva Zelanda (Schardl et al., 2012). La acción disuasiva frente a este gorgojo esta reportada tanto en adultos como en larvas, a concentraciones de 0.1 y 10 $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$ respectivamente. (Rowan et al., 1990).

A diferencia de la peramina, la biosíntesis de las lolinas (LOL) está determinada por un grupo de 11 genes ubicados en el locus LOL, que se encuentran ordenados de la siguiente forma: *lolF*, *lolC*, *lolD*, *lolO*, *lolA*, *lolU*, *lolP*, *lolT*, *lolE*, *lolN* y *lolM* (Figura 3) (Spiering et al. 2005). También se ha determinado que enzimas del endófito fúngico y/o de la planta pueden participar en la diversificación química de los compuestos finales producidos en la familia de las lolinas (Pan et al., 2014).

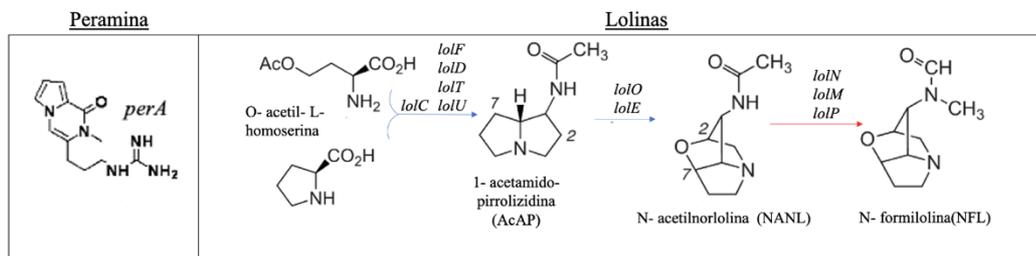


Figura 3. Esquema simplificado de las rutas de biosíntesis para peramina (izquierda) y lolinas (derecha). Adaptado de Schardl et al., (2012), Schardl et al., (2013b.)

La biosíntesis de las lolinas está asociada particularmente a endófitos híbridos y muestran un espectro de actividad contra insectos particularmente amplio, variando su especificidad dependiendo de las especies de insectos, la etapa de desarrollo y tipo de compuesto (Schardl et al., 2007). Por ejemplo, se ha demostrado que los compuestos de N-acetilololina (NAL) y la N-formilololina (NFL) presentan acción insecticida contra el escarabajo japonés (*Popillia japonica*; Coleoptera) (Potter et al., 1992), lagarta cogollera (*Spodoptera frugiperda* Lepidóptera), gorgojo del tallo argentino (*Listronotus bonariensis*; Coleoptera:) (Jensen et al., 2009), pulgón de la avena (*Rhopalosiphum padi*; Hemiptera) y pulgón verde (*Schizapis graminum*; Hemiptera) (Wilkinson et al., 2000). Muchos de los trabajos reportados adjudican la acción disuasiva contra los nemátodos a este grupo de alcaloides (Bacetty et al., 2009).

1.2.3. Promoción del crecimiento y competitividad en plantas

Diferentes estudios han revelado que los endófitos promueven un aumento en la tasa de germinación de semillas de plantas infectadas, como por ejemplo de *Lolium perenne* (Clay, 1987) y *Bromus setifolius* (Novas et al., 2003). Los efectos positivos también se asociaron a un aumento del macollaje, reproducción y crecimiento, que produce mejoras en el desarrollo de biomasa y capacidad de rebrote de las plantas infectadas (Malinowski et al., 2000).

Además, los endófitos pueden conferir también resistencia contra estreses abióticos, como déficit hídrico, heladas (Arachevaleta et al., 1989; Malinowski et al., 2000), inundación (Song et al., 2015), situaciones de déficit nutricional (Ren et al., 2007) o estrés por presencia de metales pesados (Zaurov et al., 2001; Soleimani et al., 2010). Estas mejoras en la adaptabilidad de las plantas hospederas a los diferentes factores se traduce en mejoras productivas.

1.2.4. Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los endófitos fúngicos está vinculada a la producción de péptidos y derivados del indol. En este sentido la bibliografía es consistente, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro*, en el efecto positivo que ejercen los endófitos en plantas hospederas sobre hongos patógenos, en comparación con plantas libres de simbiontes (Yue et al., 2000; Clarke et al., 2006; Tian et al., 2008). Por ejemplo, la epichlicina (Koshino et al., 1988) mostró actividad inhibitoria hacia la germinación de esporas de *Cladosporium phlei*. La ciclosporina T mostró actividad antifúngica significativa contra hongos patógenos de gramíneas, incluyendo *Curvularia lunata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium avenaceum* y *Alternaria alternata* (Araya et al., 2003). Por otra parte, el efecto sobre hongos mutualistas no es consistente. En el caso de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), los resultados varían según la planta hospedera. En asociaciones con gramíneas comerciales se ha registrado un efecto negativo de la presencia de endófitos sobre la infección o colonización por micorrizas

(Omacini et al., 2006). En cambio, cuando se utilizó como hospedante una gramínea nativa, se registró un efecto positivo (Novas et al., 2005; Novas et al., 2009).

Muchos de los efectos antifúngicos podrían estar mediados por compuestos derivados del indol según estudios realizados. El ácido indol-3-acético está asociado a una fuerte actividad inhibitoria a bajas concentraciones contra *Cryphonectria parasitica*. Además, de la actividad inhibitoria del indol 3-etanol y ácido indol-3-acético contra *Lactisaria fusiformis*, *Magnaporthe poae* y *Rhizoctonia solani* (Song et al., 2020).

1.3. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENDÓFITOS

La detección de endófitos del género *Epichloë* tanto en tejido vegetal como en semilla se realiza comúnmente mediante una variedad de métodos histoquímicos, inmunológicos y moleculares (Johnson et al., 2013). En el caso de los métodos histológicos, las hifas del endófito se pueden visualizar fácilmente en diferentes órganos de la planta (flores, macollos, hojas) utilizando tintas como por ejemplo azul de anilina o microscopia de interferencia diferencial (Card et al., 2011). La debilidad de estas técnicas es que no pueden diferenciar entre endófitos vivos de muertos y muchas veces determinar incidencia endofítica de un gran número de muestras puede ser una tarea laboriosa. Por lo tanto, otras técnicas se están implementando como alternativa: la técnica de tejido inmunoblot (TPIB) (Hahn et al., 2003) y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Doss y Welty, 1995), entre otras.

La PCR no solo se utiliza para la detección de endófitos, también es una herramienta para estudiar los perfiles genéticos de los endófitos según los genes involucrados en la biosíntesis de alcaloides. En este sentido, se cuenta con la secuencia de los loci genéticos asociados a las cuatro familias de alcaloides, lo que permite el diseño de cebadores. Adicionalmente, la PCR multiplex permite la amplificación de varias secuencias de ADN diferentes de manera simultánea. Según la presencia o ausencia de las amplificaciones se genera el perfil genético y de esta manera se logra

conocer la capacidad toxicogénica potencial y también identificar la variabilidad entre especies o cepas de una misma especie (Charlton et al., 2014). Las principales ventajas de la PCR multiplex se asocian a la obtención de información de varios loci en una sola reacción, a la creación de estrategias más eficientes cuando se trabajan con diferentes aislamientos y a la utilización de menor cantidad de reactivos.

1.4. DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LOS HONGOS ENDÓFITOS ASOCIADOS A GRAMÍNEAS DE AMÉRICA DEL SUR

Los hongos endófitos del género *Epichloë* se encuentran entre los microorganismos más comunes y diversos que infectan muchas especies de gramíneas de la familia Poaceae. Diferentes especies de gramíneas están infectadas con una o más especies de endófitos de este género (Hume et al., 2016). Un total de 45 especies de gramíneas de América del Sur están asociadas a *Epichloë*. Específicamente, en esta región los trabajos realizados corresponden a los países de Argentina y Uruguay, donde han reportado 39 taxones de hospederos y 19 genotipos de endófitos agrupados en 8 linajes diferentes. Cabe destacar, que en esta región solamente se han encontrado especies asexuales (Cabral et al., 1999, Moon et al., 2002, Gentile et al., 2005, Iannone et al., 2012b).

La especie asexual híbrida *E. tembladeraae* (Cabral & J.F White) Iannone & Schardl (generada por la hibridación de *E. festucae* x *E. typhina*) es el endófito prevalente, asociado con al menos 22 especies de gramíneas hospedadoras. Existen también otros híbridos asexuales de *E. festucae* x *E. typhina*, además de endófitos producto de las hibridaciones de *E. typhina* x *E. amarillans* o *E. festucae* x *E. aff. elymi* x *E. typhina*. No obstante, *E. typhina* subsp. *poae* es una especie asexual no híbrido que ha sido reportado en más de una especie hospedadora. Los estudios genéticos diferencian los linajes identificados y establecen que al menos tres genotipos de *E. typhina* subsp. *poae* (Tadych, KV Ambrose, FC Belanger & JF White) y dos genotipos de *E. festucae* (Leuchtm., Schardl y M.R. Siegel) estuvieron involucrados en los

eventos de hibridación que dieron origen a los endófitos sudamericanos (Iannone, 2018).

Los genotipos de endófitos antes mencionados se caracterizan por no sintetizar ergopeptinas o lolitrem B asociados a casos de toxicidad en ganado, pero si otros compuestos de la familia de los indol diterpenos y alcaloides del ergot. En su mayoría los genotipos identificados son productores de peramina y las especies *E. pampeana* y *E. cabralii* presentan en sus genotipos genes para la producción de lolinas (Iannone, 2018).

En algunas especies de gramíneas la incidencia de endófitos se asocia con características ambientales como la altitud, la abundancia de herbívoros, la comunidad de plantas, tipo de suelo o características climáticas (Schulthess y Faeth 1998, White et al. 2001, Bazely et al., 2007, Granath et al., 2007, Hamilton et al., 2009, Lembicz et al., 2011). Específicamente, los estudios sugieren que la distribución de los endófitos en gramíneas nativas depende mayoritariamente de las condiciones ambientales, en particular del tipo e intensidad del estrés (Novas et al., 2007).

En este sentido, Novas et al. (2007) muestrearon poblaciones nativas de *Bromus setifolius* de la provincia de Santa Cruz, *Phleum alpinum* y *Poa spiciformis* de Tierra del Fuego, Argentina. En dicho estudio determinaron que la incidencia de endófito en *B. setifolius* se correlacionó positivamente con la precipitación media anual, mientras que en *P. alpinum* se detectó lo contrario. Para *P. spiciformis* la incidencia se asoció con la comunidad vegetal. White et al. (2001) también estudiaron la asociación con poblaciones de *B. setifolius*, pero provenientes de la provincia de Mendoza Argentina, y concluyeron que la incidencia de endófitos se correlaciona positivamente con la presencia de hormigas.

Por otra parte, Iannone et al. (2012a) estudiaron la diversidad y distribución de endófitos en *Poa lanuginosa* y *P. bonariensis*. En este estudio identificaron que *E. tembladeraae* es el único endófito para ambas especies de gramíneas y que la incidencia está fuertemente asociada con características ecológicas y ambientales. Las

poblaciones con endófitos para ambas especies se ubicaron en aquellas regiones que presentaron niveles de estrés ambiental moderados y escasas condiciones agronómicas, como son las dunas costeras para la especie *P. lanuginosa* o ambientes con bosque xerofítico para el caso de *P. bonariensis*.

Iannone et al. (2009) y Mc Cargo et al.(2014) estudiaron la diversidad de endófitos en *Bromus auleticus*. En las poblaciones estudiadas, determinaron al menos tres endófitos asociados a esta gramínea: i) *E. tembladeraae* asociado a las poblaciones provenientes de bosques y pastizales del litoral costero de Buenos Aires y Entre Ríos; ii) *Epichloë* sp. en pastizales de Entre Ríos, Córdoba, San Luis y la costa de Buenos Aires; y iii) *E. pampeana* asociado a las poblaciones de pastizales ubicadas en la pampa húmeda.

Los resultados de estos estudios sugieren que las condiciones de estrés moderado favorecen la simbiosis, a diferencia de condiciones extremas, posiblemente debido a que el costo de la simbiosis con endófitos parece superar sus beneficios en condiciones de recursos limitados (Ahlholm et al., 2002).

1.5. IMPLICANCIAS AGRONÓMICAS DE *EPICHLOË*

La mayor capacidad competitiva en plantas asociadas a endófitos del género *Epichloë* mejoraría el desempeño de las especies forrajeras en condiciones ambientales cambiantes. En este sentido, la bibliografía reporta ampliamente mejoras en la calidad y cantidad de forraje producido, así como también los efectos de biocontrol realizados por las asociaciones simbióticas, que terminan siendo un valor agregado en las especies de gramíneas comerciales. Es decir, existe un beneficio económico y también ambiental por el uso de cultivares mejorados con endófitos, este último asociado a una reducción en el uso de agroquímicos (Kauppinen et al., 2016). Por otro lado, la identificación de cepas fúngicas productoras de alcaloides no tóxicos para mamíferos permitiría evitar las pérdidas económicas que producen a la producción ganadera (Gundel et al., 2013). El ejemplo más exitoso es el de la cepa comercial "MaxQ" (*E. coenophiala*) introducido en la variedad de *Festuca arundinacea* "Jesup". Esta cepa es considerada amigable para el ganado, pero con importante acción de control contra insectos plaga (Johnson et al., 2013). Otras cepas con diferente perfil de alcaloides han sido seleccionadas para inocular a gramíneas comerciales (Young et al., 2013, Easton et al., 2001). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la compatibilidad genética entre el endófito y el linaje del huésped cumplen un rol en los efectos sobre la aptitud física de plantas hospedadoras, la cual también dependerá del contexto ecológico ambiental (Omacini et al., 2005, Müller y Krauss, 2005, Saikkonen et al., 2006). De hecho, bajo ciertas condiciones ambientales se han observado efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas (Cheplick y Faeth, 2009).

1.6. *BROMUS AULETICUS*: ESPECIE HOSPEDERA DE *EPICHLÖË*

Bromus auleticus Trin. Ex Nees (Pooideae) es una gramínea alógama perenne invernada nativa de Argentina, sur de Brasil y Uruguay. Las poblaciones naturales de esta especie se encuentran adaptadas a un amplio rango de suelos, muchas veces vinculadas a tapices no perturbados ni pastoreados, y es considerada una especie que se encuentra en proceso de domesticación (Milot, 2001). *B. auleticus* es un constituyente invernada importante en los campos naturales, aportando forraje de calidad en este período de déficit. La calidad está asociada a una muy buena palatabilidad, digestibilidad, proteína y condiciones bromatológicas para los animales (Bustamante et al., 2012). Además, tiene muy buen comportamiento en pasturas mixtas a pesar de su lenta implantación y es favorecida por pastoreos rotativos (Llado et al., 1994).

Se considera que la especie ha sufrido erosión genética como consecuencia del laboreo continuo y principalmente el sobrepastoreo, porque al ser una especie apetecida de porte cespitoso, es vulnerable al mismo. En nuestro país, la región dedicada a la ganadería extensiva es donde existe mayor presencia y diversidad genética. Consecuentemente, *B. auleticus* ha sido objeto de colecta y caracterización morfológica como recurso fitogenético forrajero (Condón et al., 2017).

Esta gramínea establece asociaciones simbióticas con al menos tres endófitos diferentes del género *Epichloë*, según estudios realizados en Argentina: *E. tembladeraae* capaz de producir peramina y compuestos intermediarios de la familia de indol diterpenos, *E. pampeana* capaz de producir peramina y lolinas (Iannone et al., 2011, Iannone et al., 2012b) y una especie no formalmente descripta potencial productora de precursores de alcaloides del ergot (Mc Cargo, 2015). Esta especie se encontró en poblaciones de Entre Ríos y Corrientes, en pastizales de la provincia de Buenos Aires y en sierras del norte de Córdoba. La presencia de las dos especies ya descriptas mejora la tasa de crecimiento vegetativo, supervivencia y rebrote de las plantas hospederas en comparación con sus contrapartes libres de endófitos (Iannone

et al., 2012c). Se han registrado efectos positivos en la germinación de semillas de *Bromus* infectadas con estas especies (Iannone y Cabral, 2006), en la protección contra el hongo patógeno (*Ustilago bullata*) y en la asociación con micorrizas vesículo-arbusculares (Vignale et al., 2013). Cabe destacar que hasta el momento, el efecto de la interacción *Bromus auleticus* – endófito contra insectos no ha sido reportado.

La asociación *Bromus auleticus* – endófito presenta una interesante diversidad que puede brindar conocimiento sobre los procesos evolutivos de esta simbiosis. Particularmente conocer los tipos de alcaloides producidos a partir de los endófitos de estas asociaciones podría contribuir a explicar la distribución geográfico-espacial de la asociación. Además, podría ser de gran utilidad en el proceso de selección y mejoramiento de esta especie como nuevos cultivares para uso forrajero.

1.7. LOS ÁFIDOS Y *EPICHLÖE*

Los áfidos son insectos pequeños y de cuerpo blando. En el abdomen presentan un par de sifones y una cauda (Figura 4). Los sifones se insertan dorso-lateralmente entre el quinto y el sexto segmento abdominal. La cauda está dispuesta en el extremo del abdomen, varía su forma según la especie y presenta, junto a los sifones, valor sistemático (Ribeiro et al., 2014). En Uruguay la reproducción es partenogénica ya que no se encuentran huevos ni machos. Por lo tanto, las colonias que forman están comprendidas por hembras (aladas o ápteras) y ninfas nacidas vivíparamente (Bentancourt y Morelli, 2009).



Figura 4. Adulto áptero de *Rhopalosiphum padi*. Foto de David Cappaert, Bugwood.org

Los daños asociados a estos insectos son principalmente daños directos realizados durante la alimentación y en algunas especies también daños indirectos al actuar como vectores de virus importantes para las plantas (Walls et al., 2019). Se caracterizan por ciclos generacionales cortos y alta prolificidad, que les permiten rápida plasticidad de selección del genotipo más adaptado a determinados compuestos de resistencia presentes en los vegetales (Züst y Agrawal, 2016). Por estas características constituyen una de las principales limitantes en la producción tanto en cultivos como en pasturas y actualmente su control es fundamentalmente químico. Otras medidas de control más inocuas para el ambiente se convierten en una alternativa interesante de control contra insectos plaga.

Una de las asociaciones más estudiadas son las relaciones mutualistas simbióticas establecidas por gramíneas Pöoideae y los hongos endófitos del género *Epichloë*, debido a sus importantes impactos en los herbívoros (Saikkonen et al., 2006). En este aspecto la especie de áfido *Rhopalosiphum padi* ha sido utilizado en

diferentes modelos de investigación para evaluar el desempeño de los endófitos como controladores anti-áfidos. *R. padi* es un áfido generalista de cereales con distribución ubicua, y es un vector importante (junto con *Schizaphis graminum*) de muchos virus de los cereales, como el virus de enanismo amarillo en cebada “*Barley Yellow Dwarf*” (BYDV) (Walls et al., 2019). En este aspecto, se ha determinado que la alimentación de *R. padi* induce emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COV) en especies de festuca, dichos COV participan en las defensas directas e indirectas de las plantas contra el ataque de herbívoros. No obstante, los endófitos de *Epichloë* son capaces de modular las emisiones COV de forma constitutiva o inducidamente por los áfidos dependiendo de la asociación (Li T et al., 2014). Con respecto a las defensas directas de los endófitos contra áfidos, los efectos tanto disuasivos como de actividad insecticida son consistentemente asociados a las lolinas que son translocadas por el floema (Wilkinson et al., 2000). Adicionalmente, se han identificado asociaciones con endófitos (*E. coenophiala*) que producen una reducción significativa en la incidencia de BYDV en festuca (Mahmood et al., 1993).

1.8. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es estudiar la incidencia, prevalencia y diversidad de endófitos *Epichloë* de 83 poblaciones nativas de *Bromus auleticus*. Para ello, se realizó una caracterización detallada de los endófitos encontrados según los siguientes objetivos específicos:

- i) Caracterizar los endófitos de acuerdo a genotipos definidos por la presencia/ausencia de genes para la producción de alcaloides pertenecientes a las cuatro familias de alcaloides (peramina, lolinas alcaloides del ergot e indol diterpenos) y la presencia de los genes para ambos idiomorfos de tipo de apareamiento (*MTA* o *MTB*).
- ii) Caracterizar morfológicamente cada genotipo de endófito identificado.
- iii) Analizar la expresión en planta de tres compuestos diferentes: Peramina, Chanoclavina I y Ergovalina.
- iv) Identificar genotipos de endófitos con acción disuasiva, más específicamente anti-áfido utilizando la especie *Rhopalosiphum padi*.

Las hipótesis que sustentan los objetivos son:

- i) Existe una gran diversidad de endófitos en *Bromus auleticus*, que presentan diferentes capacidades toxicogénicas.
- ii) Las poblaciones de *Bromus auleticus* no presentan endófitos tóxicos para el ganado.
- iii) La asociación simbiótica otorga a las plantas huésped protección contra áfidos, definida en parte por el perfil genético de los endófitos asociado a la producción de lolinas.

2. DIVERSIDAD DE LOS ENDÓFITOS DE *BROMUS AULETICUS*: IMPLICANCIAS EN SU ROL ANTI ÁFIDO¹

2.1. RESUMEN

El género *Epichloë* está exclusivamente relacionado a gramíneas de zona con clima templado (subfamilia Pooideae). Estos endófitos fúngicos confieren beneficios a las plantas huésped atribuible en parte a la producción de al menos un compuesto de estas cuatro familias de alcaloides: peramina, lolinas (aminopirrolizidinas saturadas), indol diterpenos y alcaloides del ergot. En este trabajo por primera vez se estudió la incidencia, prevalencia y diversidad de endófitos nativos entre 83 poblaciones de *Bromus auleticus* colectadas en Uruguay. El mismo consistió en la caracterización de la diversidad genotípica mediante PCR multiplex según los genes para la biosíntesis de alcaloides y tipo de apareamiento, una caracterización morfológica de los genotipos identificados, análisis de expresión de alcaloides mediante HPLC y de los endófitos prevalentes se identificaron que genotipos presentaban acción disuasiva a *Rhopalosiphum padi* mediante ensayos de antibiosis. A raíz de dichos estudios, encontramos en las poblaciones una prevalencia del 70%, con una variabilidad en el nivel de incidencia de 0 a 100%. Se determinó diversidad endofítica tanto inter como intra-poblacional en *Bromus auleticus*, identificando un total de nueve genotipos de endófitos diferentes que se pueden agrupar en cuatro morfotipos distintos. Dos de estos morfotipos corresponderían a especies no descritas aún en *B. auleticus*. Adicionalmente, el estudio de la aptitud anti-áfido se realizó mediante un ensayo de antibiosis utilizando la especie de pulgón *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). Nuestros resultados confirman, que la presencia del genotipo de endófito putativamente productor de lolinas disminuyó de forma significativa la sobrevivencia, reproducción y desarrollo de los *R. padi*, independientemente del genotipo del huésped.

Palabras claves: simbiosis, mutualismo, antibiosis, diversidad, alcaloides.

¹ Este artículo se publicará en Mycologia

2.2. SUMMARY

The genus *Epichloë* is exclusively related to cool season grasses (subfamily Pooideae). These fungal endophytes confer benefits on host plants attributable in part to the production of at least one compound from these four alkaloid families: peramines, lolines (saturated aminopyrrolizidines), indole diterpenes, and ergot alkaloids. In this work, for the first time, the diversity of native endophytes was studied among 83 populations of *Bromus auleticus* collected in Uruguay. It consisted of the characterization of genotypic diversity by multiplex PCR according to the genes for alkaloid biosynthesis and mating type, a morphological characterization of the identified genotypes, analysis of alkaloid expression by HPLC and of the prevalent endophytes, genotypes were identified that confer protection against aphids. As a result of these studies, we found variability in the level of infection, endophytic diversity both inter and intra-population in *Bromus auleticus*, identifying a total of nine different endophyte genotypes that can be grouped into four different morphotypes. Two of these morphotypes correspond to species not yet described in *B. auleticus*. Additionally, the study of anti-aphid aptitude was carried out by means of an antibiosis test using the aphid species *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). Our results confirm that the presence of the putatively producing endophyte genotype of lolines significantly decreased the survival, reproduction and development of *R. padi*, regardless of the host genotype.

2.3. INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Epichloë* (Hipocreales, Clavicipitaceae) son endófitos asociados exclusivamente a gramíneas de zonas de clima templado (Poaceae, subfamilia Pooideae). Estos endófitos comprenden especies sexuales no híbridas y especies asexuales, éstas generalmente híbridos interespecíficos o haploides (Moon et al., 2004). Las especies de *Epichloë* son típicamente específicas del huésped, y crecen en forma sistémica por espacios intercelulares de tejido vegetal aéreo, sin dañar las células a la que subyacen. Por consiguiente, no provocan ninguna reacción de defensa por parte del hospedante (Moy et al., 2002). Las especies sexuales presentan la capacidad de producir estromas alrededor de los macollos reproductivos, suprimiendo la maduración de las inflorescencias del huésped (enfermedad de estrangulamiento), y por consiguiente afectando la producción normal de semilla (Schardl, 2010). Para completar la reproducción sexual, el estroma maduro necesitara de la fertilización de una espermátida proveniente de un estroma de tipo de apareamiento opuesto, determinado por los idiomorfos *MTA* y *MTB* del locus *MT* (Schardl et al., 2014). Luego de la fecundación, en el estroma maduran ascos que contienen ascosporas, las cuales serán el inóculo inicial en nuevas plantas (transmisión horizontal) (Bultman y Leuchtman, 2003b). No obstante, algunas especies sexuales pueden transmitirse verticalmente por semillas infectadas (Leuchtman et al., 2014). En contraste, las especies asexuales son incapaces de producir estromas en las plantas huésped, su medio de transmisión es vertical, mediante la colonización de los ovarios de flores en formación y diseminándose benignamente por la semilla del huésped; dando así plantas hijas con el mismo genotipo de endófito de la planta madre (Philipson y Christey, 1986). La mayoría de las especies de *Epichloë* son de transmisión asexual y vertical (White et al., 1996, Moon et al., 2000, Moon et al., 2002). Esto resulta lógico, ya que las especies asexuales al crecer de forma asintomática se caracterizan por una asociación mutualista en la que ambos participantes se benefician. En efecto, la selección natural será a favor de estas asociaciones, a diferencia de las establecidas con especies sexuales que tienen un carácter patogénico, por perjudicar en menor o mayor medida la reproducción de la planta huésped (Schardl et al., 2002).

Los beneficios aportados por las especies de *Epichloë* están relacionados a mejoras en la capacidad adaptativa de su planta huésped frente a estreses bióticos y abióticos (Schardl et al., 2004, Khan et al., 2015). Particularmente, en lo que respecta a los beneficios contra estreses bióticos, los endófitos confieren resistencia contra la herbivoría, atribuible en parte a la capacidad de sintetizar cuatro familias de alcaloides: peramina, lolinas, indol diterpenos y alcaloides del ergot. (Schardl et al., 2012). Peramina y lolinas se caracterizan por presentar acción disuasiva (Clay et al., 1985), mientras los alcaloides del ergot e indol diterpenos si bien tienen efectos disuasivos potentes, están asociados con efectos neurotóxicos en mamíferos; por lo tanto, no son deseables en el ámbito productivo. Subsecuentemente, la mayoría de los estudios se han enfocado en asociaciones de *Epichloë* con festuca (*Festuca arundinacea*) y raigrás perenne (*Lolium multiflorum*). Debido a que en estas dos gramíneas forrajeras se han reportado ampliamente casos de toxicidad de animales en pastoreo: festucosis o "fescue toxicosis", asociada a concentraciones de ergovalina y tembladera o "ryegrass staggers", causado por concentraciones del compuesto lolitrem B.

Actualmente, se ha logrado identificar y secuenciar los genes involucrados en la biosíntesis para las cuatro familias de alcaloides (Schardl et al., 2013). Los loci genéticos involucrados en la biosíntesis de lolina (LOL), alcaloides del ergot (EAS) e indol diterpenos (IDT/LTM) se disponen en complejos de genes (Panaccione et al., 2001, Wang et al., 2004, Spiering et al., 2005, Young et al., 2006, Fleetwood et al., 2007), que según la presencia/ausencia de genes o de variaciones en las secuencias se define la producción de alcaloides o compuestos intermediarios de las vías de biosíntesis. (Fleetwood et al., 2011). En lo que respecta a la producción de peramina es un único gen que codifica una enzima multifuncional para la producción del compuesto peramina (PER) (Tanaka et al., 2005). La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las alternativas que se ha utilizado para identificar genotipos de endófitos y poder predecir la capacidad de producción de alcaloides (Charlton et al., 2012, Young et al., 2009). De esta manera se ha logrado comprender

la variabilidad quimiotípica que presentan las diferentes especies o variación intraespecífica.

A su vez, el conocimiento de la interacción gramínea - *Epichloë* surge de la investigación realizada en asociaciones del hemisferio norte, existiendo en menor medida información sobre la diversidad y abundancia de simbiontes de especies de gramíneas del hemisferio sur. Específicamente estudios en Argentina han comenzado con la caracterización de simbiontes en *Bromus auleticus*, identificando los siguientes endófitos asociados a esta gramínea: *Epichloë tembladera* (Iannone et al., 2009), *Epichloë pampeana* (Iannone et al., 2009) y una especie no formalmente descrita que Mc Cargo (2015) determinó a partir de la identificación de genotipos asociados a un linaje diferente a los reportados y por lo tanto postuló nombrar como una especie diferente: *Epichloë platensis*. Algunas de las ventajas adaptativas de las asociaciones con las especies descritas incluyen mejoras en: poder germinativo, velocidad de crecimiento, producción de tallo, mayor resistencia a la defoliación en comparación a sus homólogos sin infección (Iannone et al., 2006, Iannone et al., 2009), resistencia al carbón *Ustilago bullata* (Iannone et al., 2013; Vignale et al., 2013) y mayor capacidad de asociarse con micorrizas HMA (Novas et al., 2005, Novas et al., 2009).

Bromus auleticus Trin ex Nees (Pooideae) es una gramínea perenne invernada, nativa de bioma campos, con una distribución natural que incluye el centro de Argentina, sur de Brasil y Uruguay. Tiene la particularidad de presentar muy buenas características forrajeras como, por ejemplo: alta productividad, palatabilidad, contenido de proteína, resistencia a sequía y adaptabilidad a un amplio rango de suelo (Bustamante et al., 2012), presentándose como buen candidato a recursos genético forrajero. De todas maneras, la mayoría de las poblaciones de esta gramínea son naturales, ya que se encuentra en proceso de domesticación (Millot, 2001). Por estos motivos, *B. auleticus* ha sido objeto de colecta y caracterización morfológica en nuestro país como recurso fitogenético forrajero, obteniendo accesiones que revelaron una gran diversidad intraespecífica y versatilidad en su comportamiento agronómico (Condón et al., 2017).

El objetivo de este estudio fue caracterizar la incidencia, prevalencia y diversidad de los endófitos asociados a las poblaciones naturales de *Bromus auleticus* en Uruguay, utilizando la mayor cobertura geográfica posible. Para lograr este objetivo general se utilizó una colección de *Bromus auleticus* que se encontraba disponible en el Banco de germoplasma de INIA La Estanzuela. La misma está constituida por poblaciones recolectadas en diferentes eco-regiones del Uruguay durante 2007-2009 (Condón et al., 2017) y otras provenientes de líneas selectas. Un total de 83 poblaciones de *B. auleticus* se utilizaron para alcanzar los siguientes objetivos específicos: 1) identificar genotipos de endófitos según los perfiles de genes basados en la biosíntesis de alcaloides y tipo de apareamiento, con posterior predicción de alcaloides potenciales a producir; 2) caracterizar morfológicamente los genotipos de *Epichloë* no identificados y confirmar mediante la técnica de PCR su correspondencia al género; 3) determinar la expresión en planta de peramina, chanoclavina y ergovalina mediante HPLC 4) evaluar el rol de los endófitos frente a la herbivoría. En lo que respecta a este último punto, se planteó un ensayo para determinar la resistencia por el mecanismo de antibiosis frente al áfido *Rhopalosiphum padi* en plantas de *B. auleticus* con y sin endófito. De este modo identificar que genotipos de endófitos afectan negativamente la biología del áfido (Painter, 1951).

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Material vegetal utilizado en los estudios

El material vegetal utilizado proviene de un total de 83 accesiones de *Bromus auleticus* de Uruguay. De estas, 73 fueron colectadas en las diferentes ecorregiones del Uruguay durante el 2007, 2008 y 2009 (Condón et al., 2017) y 10 son accesiones colectadas previamente e identificadas como líneas selectas y conservadas en el banco de germoplasma de INIA La Estanzuela desde 1997 (Cuadro S1, Figura S1). Las semillas colectadas en cada sitio provienen de al menos 100 plantas ubicadas principalmente en bordes de carreteras. Estas semillas fueron utilizadas para: i) la extracción de ADN fúngico; ii) originar un banco vivo de plantas a campo que se utilizaron luego en el análisis de producción de alcaloides y para obtener aislamientos para la caracterización morfológica; y iii) originar plantas jóvenes destinadas a el ensayo de antibiosis para la identificación de genotipos de endófitos disuasivos. A partir del punto i) se determinaron niveles de infección en semilla para cada accesión y los genotipos de endófitos presentes, los cuales se georreferenciaron usando Map tiles by CartoDB, under CC BY 3.0. Data by Open Street Map, under ODbL.

El banco vivo de plantas a campo se instaló en la estación Experimental de INIA La Estanzuela en el 2017. El mismo consistió en 26 plantas de cada una de las 83 accesiones colectadas originalmente, de las cuales se conocía su estado endofítico por análisis de inmunoblot (Hahn et al., 2003) realizado cuando las plantas tenían dos macollos, en Agresearch, Nueva Zelanda.

2.4.2. Caracterización genética

La caracterización genética de los endófitos se realizó en el "The Noble Research Institute" (Forage Improvement Division) utilizando semilla del banco de germoplasma de INIA. El ADN fúngico se extrajo a partir de 6 a 12 semillas de cada una de las 83 accesiones originales utilizando un kit MagAttract 96 DNA plant core kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. Sobre el ADN extraído se realizaron ocho reacciones de PCR multiplex usando cebadores específicos para detectar simultáneamente los genes involucrados en la biosíntesis de alcaloides para los locus PER, LOL, EAS e IDT/LTM y tipo de apareamiento definido por el locus MT, además del gen *tefA* como factor de elongación de la traducción (Cuadro S2) (Charlton et al., 2014). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 µL que contenía 6 ng de ADN fúngico; 0.2 µl de ADN polimerasa GoTaq; 5X tampón de reacción GoTaq verde que contiene MgCl₂; 0.5 uL de dNTPs (10mM) y 0.5 µL de cada cebador específico en listado en Cuadro S2. Los parámetros para todas las amplificaciones fueron: 94 ° C durante 1 minuto, luego 33 ciclos de 94 ° C durante 15 segundos, 56 ° C durante 30 segundos y 72 ° C durante 45 segundos, y por último 72 ° C durante 10 minutos. Los PCR tanto multiplex como individuales se realizaron usando los mismos parámetros en el termociclador. Finalmente, para analizar los productos de PCR, se realizaron corridas de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón Tris-Boric-EDTA 1X (TBE), y luego se visualizaron con bromuro de etidio por transiluminación UV.

2.4.3. Análisis de expresión de alcaloides

Para evaluar la expresión de alcaloides se formó un pool de material vegetal, que consistió en usar hojas liofilizadas de las plantas de cada accesión (n : 26) presentes en el banco de plantas a campo, pero solamente de las accesiones que habían presentado 100 por ciento de infección en semilla (Cuadro S3). El análisis de alcaloides se realizó en "The Noble Research Institute" (Analytical Chemistry Core Facility), utilizando 50 mg de tejido liofilizado (Pannaccione et al., 2006, Young et al., 2009) mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase inversa y se identificaron en base a los tiempos de retención estándar conocidos de chanoclavina I, ergovalina y del compuesto de peramina (Panaccione et al., 2006, Panaccione et al., 2012).

2.4.4. Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica de los endófitos, fue necesario aislar los endófitos de las plantas que presentaran cada genotipo identificado en la actividad 2.4.2. En primer lugar, se seleccionaron plantas del banco vivo que habían dado positivo en los análisis de inmunoblotting y se corroboró utilizando la técnica de histología de tejido parenquimatoso de vainas teñido con colorante azul de anilina.

Una vez que se identificaron tres plantas infectadas para cada genotipo de endófito, los macollos se cortaron en fragmentos para luego realizar una esterilización superficial, con lavados sucesivos de etanol al 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sodio al 2.5% durante 15 minutos y etanol al 50% durante 1 minuto, de esta forma eliminar cualquier tipo de contaminante (Mc Cargo et al., 2014). Luego, se sembraron cinco fragmentos de cada planta por placa con agar papa dextrosa con 100 ppm de cloranfenicol (PDAc), que fueron incubados en oscuridad a 24°C. Una vez que se visualizaron hifas de lento crecimiento y de color blanco, se repicó a una nueva placa, considerando solo un aislamiento por planta. De cada aislamiento obtenido se realizó la verificación de la correspondencia al género *Epichloë* mediante la técnica de PCR

utilizando el kit de extracción ZR Fungal/Bacterial DNA miniprep (Zymo Research, Irvine, CA) según protocolo del fabricante y con los mismos cebadores utilizados en la caracterización genética.

Para la caracterización macroscópica, cada aislamiento se repicó por duplicado, tomando un fragmento del borde de una colonia en crecimiento activo y colocándolo en placas de Petri con medio PDAc. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 24°C para determinar a los 30 días post siembra los siguientes parámetros: color de la colonia (anverso y reverso), diámetro de la colonia (promedio de cuatro mediciones: dos diámetros perpendiculares de cada réplica) y características del micelio aéreo.

Para la caracterización microscópica de cada aislamiento, se tomó un fragmento de micelio, que se sembró en placas de Petri con medio de agar-agua (2%) sin nutrientes para fomentar la producción de conidios. Posteriormente, se incubó durante 15-20 días en la oscuridad a 24°C. En este caso, se observó la disposición de conidios y células conidiógenas bajo un microscopio óptico para determinar longitud y ancho de cada uno (20 mediciones de cada uno por placa).

2.4.5. Ensayo de Antibiosis

La resistencia al estrés biótico conferida por *Epichloë* fue evaluada mediante ensayos de antibiosis utilizando el áfido *Rhopalosiphum padi*. Para dichos ensayos, se seleccionaron 12 accesiones de *Bromus auleticus* asociadas con diferentes genotipos de *Epichloë* contrastantes. Las mismas fueron seleccionadas según los resultados obtenidos en los análisis de diversidad genética, y correspondieron a los tres genotipos de *Epichloë* prevalentes en las poblaciones de *B. auleticus* de Uruguay. Cada genotipo de endófito se representó con cuatro accesiones diferentes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Genotipos de endófitos prevalentes entre las poblaciones de *Bromus auleticus* cada uno con sus respectivas variantes en la producción de alcaloides, y representados con cuatro accesiones diferentes.

Genotipos	Alcaloides predichos ξ	ID Accesoión	Departamento	Infección %
1	PER/NFL	19366	Tacuarembó	100
		19371	Salto	83,33
		19946	Maldonado	100
		19957	Flores	100
2	PER/TDI/PAX	19386	Cerro Largo	83,33
		19949	Rocha	83,33
		19961	Río Negro	100
		19976	Salto	83,3
3	PER/CC/TDI/PAX	11241	Colonia	83,3
		19378	Salto	100
		19379	Salto	100
		19384	Rocha	83,3

ξ : Peramina(PER); N-formilolona (NFL); Terpendol I (TDI); Paxilina (PAX).

Para generar las poblaciones de *R. padi* utilizadas en los ensayos de antibiosis se colectaron hembras partenogénicas en un cultivo de avena en la estación experimental de INIA La Estanzuela. La cría comenzó inoculando cada hembra en diferentes plantas de trigo susceptible, bajo condiciones controladas de temperatura e iluminación ($20\text{ C} \pm 2\text{ C}$ y 12:12 h L: O) en el laboratorio de Entomología de la misma estación. Luego se seleccionó la colonia con mejor desempeño y semanalmente se transfirieron 12 áfidos, cada uno a plantas diferentes. A las 24 hs se removían los áfidos adultos. Aproximadamente 4 semanas después, se contaba con una población numerosa y de edades sincronizadas de *R. padi* para comenzar los ensayos.

Por otro lado, semillas de las poblaciones de *B. auleticus* asociadas a los genotipos de endófitos seleccionados (Cuadro 1), se germinaron en rollos de papel mantenidos en incubadora, para luego de siete días trasplantar plántulas en macetas individuales, que contenían una mezcla 2:1:1:1 de tierra, arena, sustrato "biofer" y

vermiculita. Se seleccionaron 10 plantas por accesión, para que cada accesión estuviera representada por cinco plantas infectadas con endófitos (E+) y cinco plantas sin endófitos (E-). Mediante técnica de tinción histológica de tejidos se diagnosticó el estatus endofítico, en el estado de dos macollos, de cada una de las plantas utilizadas en el ensayo. Donde se visualizaron las hifas paralelas a la pared celular se consideraron E+, de lo contrario se consideraban plantas E- que naturalmente perdieron la asociación.

Inicialmente, se inocularon dos áfidos adultos (ápteros; generación 0) por planta, con el objetivo de obtener una ninfa neonatal para cada planta (generación 1). Los adultos fueron confinados a las hojas utilizando cápsulas de gelatina a modo de jaula (Figura 1). Las cápsulas fueron inspeccionadas diariamente, y al obtener una ninfa neonatal (fundadora), se procedió a eliminar solamente los adultos. Diariamente, para la ninfa fundadora se registró: el número de individuos muertos, el número de días de sus estados (inmaduro y reproductivo) y cantidad de ninfas producidas (generación 2) una vez alcanzado el estado adulto. La descendencia fue retirada de la cápsula utilizando pinceles, dejando atrás, dentro de la cápsula el áfido original (gen. 1). Las observaciones diarias culminaron en la muerte del áfido fundador.



Figura 1. Cápsula de confinamiento con ninfa neonata (fundadora) de *R. padi* en planta de *Bromus auleticus*.

En total se realizaron tres repeticiones (corridas) diferidas en el tiempo del ensayo de antibiosis. Cada repetición se realizó en condiciones controladas ($20\text{ C} \pm 2\text{ C}$ y $12:12\text{ h L: O}$) y se utilizaron las mismas 12 accesiones (cuatro accesiones y tres genotipos de endófito), sin reutilizar las plantas entre corridas. Por lo tanto, en cada repetición se utilizaron 120 plantas que corresponden a 10 plantas (5E+; 5E-) por accesión, con un total de 40 plantas por cada uno de los genotipos de endófito, totalizando 360 plantas en las tres repeticiones.

Finalmente, con los registros diarios se determinaron las siguientes ocho variables de crecimiento y desarrollo del áfido fundador (gen. 1) (Sánchez Chopa y Descamps, 2013):

- i) días pre-reproductivos (PreR): correspondiente a cada día en estado inmaduro desde el nacimiento.

- ii) días reproductivos (R): comienza con el nacimiento de la primera descendencia (generación 2) y finaliza con el último nacimiento.
- iii) días con nacimientos (DN): días dentro del período reproductivo en los que nacieron ninfas (generación 2). También denominado días activos del período reproductivo.
- iv) probabilidad de descendencia: proporción de ninfas fundadoras que dejaron descendencia.
- v) fecundidad (Fec): es igual al número de ninfas nacidas durante todo el período reproductivo.
- vi) tasa de natalidad del período activo (TNDN): equivalente a la relación entre el número de áfidos nacidos y los días activos del período reproductivo.
- vii) tasa de natalidad del período reproductivo (TNR): corresponde a la relación entre el número de áfidos nacidos y el total de días del período reproductivo.
- viii) longevidad (S): días desde el nacimiento hasta la muerte del áfido fundador.

2.4.5.1. Análisis estadístico

Los datos utilizados para el análisis estadístico solo incluyeron áfidos fundadores (generación 1) que alcanzaron su período reproductivo; en otras palabras los áfidos fundadores que no llegaron al estado reproductivo se excluyeron del análisis. Los datos de la descendencia, así como otras variables reproductivas y de desarrollo, se analizaron utilizando el procedimiento de modelo mixto lineal generalizado SAS (PROC GLIMMIX, SAS, 1994). En el mismo se utilizaron los efectos de corrida, genotipo del endófito, tratamiento anidado dentro de genotipo del endófito, las interacciones de corrida por genotipo y corrida por tratamiento dentro de genotipo como efectos fijos, utilizando la distribución Poisson con vínculo logarítmico. Como efectos aleatorios se utilizaron los efectos de accesión dentro de genotipo y planta dentro de accesión, y las interacciones correspondientes. Para modelar el efecto de las medidas repetidas en el tiempo se consideró el día de conteo como factor aleatorio con las plantas dentro de cada accesión identificadas como sujetos de las medidas.

Para el análisis de las variables i a iii y viii (Cuadro S4), se analizó mediante un modelo generalizado mixto, utilizando PROC GLIMMIX (SAS, 1994). En este caso los efectos fijos correspondieron a: efecto corrida, genotipo del endófito, el tratamiento anidado dentro del genotipo, las interacciones corrida por genotipo y corrida por tratamiento dentro de endófito, usando distribución de Poisson y vinculo logarítmico. Mientras que los efectos de accesión dentro de genotipo, accesión por tratamiento, accesión por tratamiento por corrida fueron categorizados como factores aleatorios. No obstante, para modelar las medidas repetidas se utilizó como efecto aleatorio al efecto accesión anidado en los genotipos del endófito, con las plantas dentro de las accesiones como sujetos de medidas.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Detección de diversidad genética de *Epichloë* en *Bromus auleticus*

A partir de las semillas de las 83 accesiones de *B. auleticus* analizadas, se determinó a una prevalencia de endófitos del género *Epichloë* del 70% (Figura 2). De las asociaciones con endófito, 32 accesiones tenían 100% de infección, y en las restantes los niveles de incidencia observados variaron de un 17 a un 83 %. Un 12% (n=9) de las accesiones presentaron dos genotipos de endófito en una misma accesión, mientras que el resto solo presentó un único genotipo de endófito asociado.

En total, se identificaron nueve genotipos según el perfil de genes asociados a la biosíntesis de alcaloides e idiomorfos de tipo de apareamiento (genotipos) (Cuadro 2). Todos los genotipos identificados amplificaron los cebadores para el locus peramina (PER) pero la variación se detectó entre los alcaloides del ergot (EAS), lolinas (LOL) y principalmente en los indol diterpenos (IDT/LTM). Con respecto al locus MT (tipo de apareamiento) todos los genotipos amplificaron para el idiomorfo *MTA* (*mtAC*), y los genotipos 1 y 7 presentaron ambos idiomorfos *MTA* y *MTB* (*mtAC* y *mtAB* respectivamente).

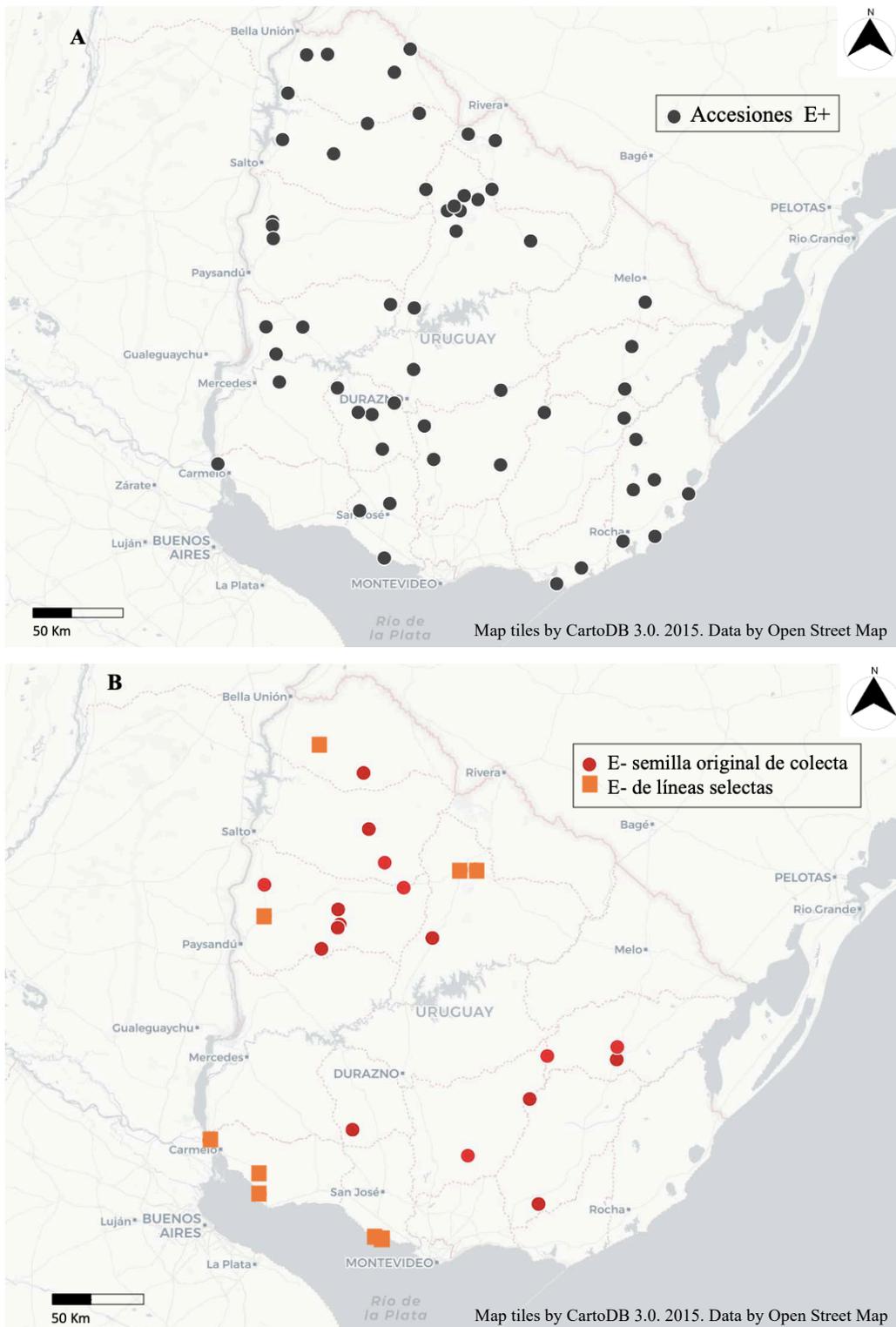


Figura 2. Origen geográfico de las accesiones E+ (panel A) y las accesiones E- (panel B) de *Bromus auleticus*.

Cuadro 2. Genotipos de endófitos *Epichloë* asociados a las poblaciones de *Bromus auleticus* identificados mediante la detección por PCR multiplex de los genes involucrados en la síntesis de alcaloides, tipo de apareamiento y *tefA* factor de elongación de la traducción.

No. Genotipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
No. Accesiones	15	24	17	3	2	3	1	1	1
<i>tefA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tipo de apareamiento	mtAC	+	+	+	+	+	+	+	+
	mtBA	+	-	-	-	-	+	-	-
Peramina	peraA 5'	+	+	+	+	+	+	+	+
	perA-T2	+	+	+	+	+	+	+	+
	perA-R	+	+	+	+	+	++	+	+
Lolinas (LOL)	lolC	+	-	-	-	-	+	-	-
	lolA	+	-	-	-	-	+	-	-
	lolO	+	-	-	-	-	-	-	-
	lolP	+	-	-	-	-	-	-	-
alcaloides del ergot (EAS)	dmaW	-	-	+	-	-	+	-	-
	easC	-	-	+	-	-	+	-	-
	easH	-	-	-	-	-	+	-	-
	easA	-	-	-	-	-	+	-	-
	cbA	-	-	-	-	-	-	-	-
	lpsB	-	-	-	-	-	+	-	-
Indol diterpenos (IDT/LTM)	idtG	-	+	+	+	+	-	-	-
	ltmQ	-	+	+	-	+	-	+	+
	ltmP	-	+	-	-	+	-	+	+
	ltmk	-	+	-	+	-	-	+	-
	ltmF	-	-	-	-	-	-	-	-
Predicciones	PER	PER	PER	PER	PER	PER	PER	PER	PER
	LOL	NFL					AcAP		
	EAS		CC				CC		
	IDT/LTM	PAX-TDI	PAX-TDI	PAS	PAX-TDI				

*+, marcador detectado; ++, dos copias determinadas en la aplicación

Los endófitos más frecuentes correspondieron a los genotipos 1, 2 y 3 los cuales se encontraron ampliamente distribuidos por todo el país. Según la variación detectada por presencia o ausencia de los genes se puede predecir que ningún genotipo de endófito tiene la capacidad de sintetizar ergovalina. El análisis de los seis genes para el locus EAS, reveló que solamente dos genotipos presentaron al menos dos genes en el perfil (Cuadro 2). Los genotipos 3 y 7 tienen los genes *dmaW* y *easC* por lo que se consideraron potenciales productores de chanoclavina I (CC) (Panaccione et al., 2001, Wang et al., 2004, Fleetwood et al., 2007, Schardl et al., 2012). Se detectó una gran diversidad dentro del locus IDT/LTM. De todas maneras, ninguno de los genotipos presentó el gen *ltmF*, por lo tanto, no son potenciales productores de lolitrem B (Young et al., 2009), mientras que si lo son de compuestos intermediarios: genotipos 2, 3, 5 son potenciales productores de terpenol I (TDI) y paxilina (PAX), mientras que el genotipo 4 y 6 del compuesto paspalina (PAS). Los genotipos 8 y 9 no presentaron el primer gen de la ruta de biosíntesis (*idtG*) por lo que no podrían producir ningún tipo de indol diterpeno. Por otra parte, para los genes de LOL, se identificaron dos genotipos diferentes. El genotipo 1 presentó todos los genes probados para este locus, inclusive *lolP*, que es elemental para la síntesis de N-formilololina (NFL) (Spiering et al., 2008), mientras que el genotipo 7 presentó *lolC* y *lolA*, que lo indicaría productor de acetamidopirrolizidina (AcAP). En lo que respecta al locus PER, todos los genotipos identificados presentaron *perA*, y el genotipo 7 se diferenció por presentar una delección en uno de los alelos detectada por el cebador *perA-R*. De todos modos, todos los genotipos serían productores de peramina.

2.5.2. Caracterización química

El estudio mediante HPLC permitió corroborar los perfiles genéticos determinando la expresión de peramina en la mayoría de las poblaciones y chanoclavina I para la población asociada a uno de los genotipos con genes necesarios para la síntesis de este compuesto intermediario: *dmaW* y *easC* (genotipo 3) (Panaccione et al., 2001, Wang et al., 2004, Fleetwood et al., 2007, Schardl et al., 2012). Adicionalmente se corroboró para la familia de los alcaloides del ergot que ninguno de los genotipos de endófitos evaluados expresaron el compuesto de ergovalina, en concordancia con los resultados genéticos (Cuadro S3).

2.5.3. Caracterización morfológica

Se obtuvieron 27 aislamientos de los nueve genotipos de endófitos, aislados desde accesiones de *B. auleticus* en medio PDA (Figura S2-S16). Se encontró diversidad morfológica entre los diferentes aislamientos, tanto entre genotipos como también dentro del mismo genotipo.

Los aislamientos presentaron colonias aterciopeladas, algodonosas o esponjosas, blancas con reverso de color amarillo a castaño y de tamaño variado (9-26 mm de diámetro a los 30 días). Asimismo, presentaron diferentes tasas de crecimiento y características microscópicas. Los conidios y células conidiógenas no presentaron grandes diferencias en tamaño (Cuadro 3), pero si se observó variabilidad en la forma y disposición de los conidios. Los resultados morfológicos junto a los resultados genéticos permitieron identificar 4 morfotipos de endófitos diferentes (Cuadro 4, Figura 3) de acuerdo a características comunes. Estos resultados son consistentes con la diversidad previamente reportada en simbiontes de *Bromus auleticus* por Iannone et al., (2009) , Cabral et al., (1999), y proporciona más información para completar la caracterización de las especies descritas y posibles nuevas especies no descritas hasta el momento (morfotipos C y D) (Cuadro 4).

Cuadro 3. Características de las colonias, células conidiógenas y conidios observados en cada genotipo de endófito presente en *Bromus auleticus*.

Genotipo	Diámetro de colonia (mm)	Célula Conidiógena (µm)			Conidios (µm)	
		Largo	Ancho basal	Ancho apical	Largo	Ancho
1	9,16 ± 0,68	20,57 ± 0,99	1,48 ± 0,05	1,12 ± 0,04	7,47 ± 0,24	2,29 ± 0,07
2	21,58 ± 6,04	21,13 ± 0,71	1,62 ± 0,07	1,17 ± 0,05	6,40 ± 0,14	2,48 ± 0,06
3	18,33 ± 4,88	18,09 ± 0,41	1,53 ± 0,06	1,13 ± 0,04	6,34 ± 0,13	2,52 ± 0,07
4	19,00 ± 3,00	21,13 ± 0,54	2,08 ± 0,08	1,66 ± 0,07	7,72 ± 0,21	2,98 ± 0,12
5	6,76 ± 0,52	23,97 ± 0,77	1,70 ± 0,06	1,34 ± 0,04	7,65 ± 0,16	2,39 ± 0,06
6	25,83 ± 1,76	25,64 ± 0,64	2,05 ± 0,05	1,57 ± 0,05	6,79 ± 0,12	2,57 ± 0,06
7	8,75 ± 0,53	21,72 ± 0,83	2,27 ± 0,07	1,83 ± 0,07	6,97 ± 0,21	2,79 ± 0,06
8	23,69 ± 1,27	30,00 ± 0,94	2,52 ± 0,11	2,05 ± 0,07	9,04 ± 0,15	3,04 ± 0,09
9	21,55 ± 1,45	20,50 ± 0,71	2,10 ± 0,06	1,71 ± 0,06	8,30 ± 0,19	3,21 ± 0,15

40x= 2µm (media ± error estándar)

Cuadro 4. Características de aspecto de las colonias, tasas de crecimiento, conidios, perfiles de alcaloides y eventos posibles de hibridación de los endófitos identificados en *Bromus auleticus*

Morfotipo	Colonia	Textura	Tasa de crecimiento (mm/d)	*Conidios	Perfiles genéticos de alcaloides	Hibridación
A	micelio blanco y reverso claro. Forma cerebroide	aterciopelada	lento (0,3)	alantoides (6,9µm)	<i>perA</i> /Lolinas + (G1)	<i>E. pampeana</i> (<i>E. typhina</i> x <i>E. festucae</i>)
B	micelo sumergido blanco con reverso castaño. Retorciendo el agar	aterciopelada	rápido (0,75-1)	alantoides (7µm)	<i>perA</i> / variabilidad genética de indol diterpenos (G2, G4, G5, G6, G8, G9)	<i>E. tembladera</i> (<i>E. typhina</i> x <i>E. festuca</i>)
C	micelio aéreo blanco, reverso castaño. Retorciendo agar en el centro	esponjosa	intermedio (0,5)	reniformes (6,47 µm)	<i>perA/dmaW/easC/ idtG-ltmQ</i> (G3)	<i>E. platensis</i> (<i>E. festucae</i> x <i>E. typhina</i> x <i>E. elyme</i>)
D	micelo blanco con reverso castaño. Colonia abultada	aterciopelada	lento (0,25)	reniformes (6,97µm)	2 <i>perA/ lolC-lolA/dmaw-easC-easH-easA-lpsB</i> (G7)	<i>Epichloë spp.</i> (<i>E. amarillans</i> x <i>E. baconii</i> x <i>E. typhina</i>)

*Promedio largo de conidios.

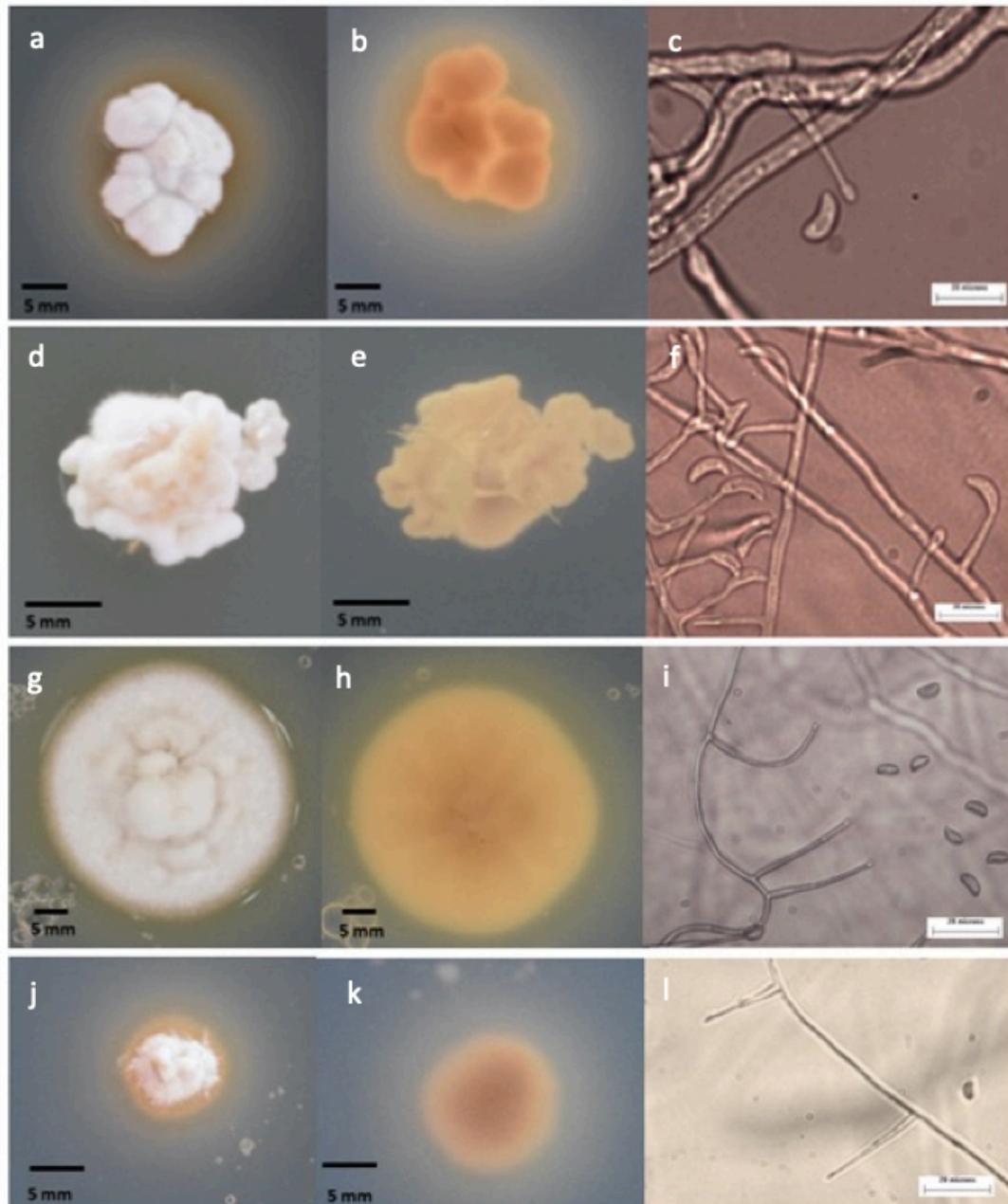


Figura 3. Colonias y morfología conidial del morfotipo A representado por la accesión 19977 (a-b-c), morfotipo B representado por la accesión 19961 (d-e-f), morfotipo C representado por la accesión 19384 (g-h-i), morfotipo D representado por la accesión 19388 (j-k-l) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

La caracterización morfológica y el perfil de genes establecidos permite caracterizar a los morfotipos de endófitos y asociarlos a diferentes a diferentes linajes. El morfotipo A se correspondió con la especie de lento crecimiento y productora de PER y NFL descrita previamente como *Epichloë pampeana* (Iannone et al., 2009). Esta especie se encontró asociada a las poblaciones del norte centro y este del país (Figura 4).

El morfotipo B se definió como *E. tembladerae* por presentar rápido crecimiento, una gran diversidad genética en la familia de los indol diterpenos y por ser el morfotipo prevalente entre las poblaciones de *Bromus*. Por ende su distribución es generalizada en todo el territorio, no presentando ambientes preferenciales (Figura 5).

El morfotipo C se asoció a *E. platensis* (Mc Cargo, 2015) el mismo se distingue por presentar crecimiento intermedio, y por ser potencial productor de PER CC, TDI y PAX. Esta especie se asoció a las poblaciones del litoral del país (Figura 6).

Por último, el morfotipo D determinado como un híbrido capaz de sintetizar PER, AcAP y CC. Este endófito fue encontrado solamente en una población de *Bromus auleticus* coexistiendo con el morfotipo B (*E. tembladerae*) (Figura 7).



Figura 4. Origen geográfico de las accesiones de *Bromus auleticus* asociadas al morfotipo A/genotipo 1.



Figura 5. Origen geográfico de las accesiones de *Bromus auleticus* asociadas al morfotipo B/genotipos 2, 4,5,6,8 y 9.

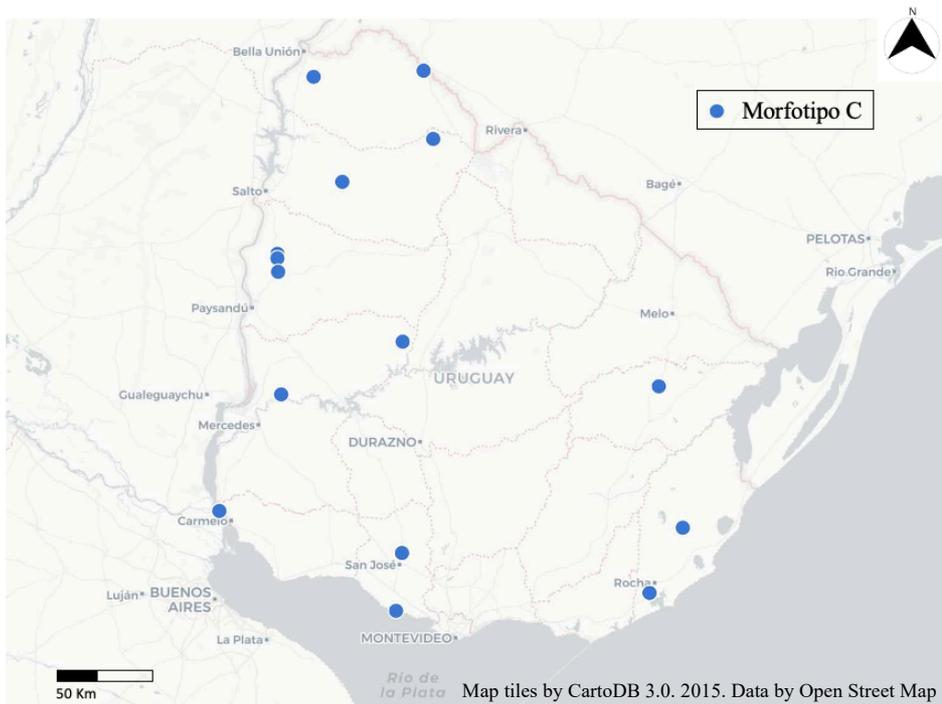


Figura 6. Origen geográfico de las accesiones de *Bromus auleticus* asociadas al morfotipo C/ genotipo 3.



Figura 7. Origen geográfico de la accesión de *Bromus auleticus* asociada al morfotipo D / genotipo 7.

2.5.4. Identificación de genotipos de endófitos disuasivos

La presencia de endófitos en plantas de *B. auleticus* afectó negativamente la biología de *R. padi* dependiendo del genotipo de endófito asociado. El efecto de las accesiones dentro de los genotipos fue considerado en los modelos estadísticos como un efecto aleatorio anidado dentro del genotipo del endófito como efecto principal, así como las interacciones asociadas con el mismo. Estos efectos no representaron componentes significativos de las varianzas estimadas (datos no presentados). La significancia de los efectos fijos considerados en el modelo: repetición, genotipo del endófito, estatus endofítico dentro del genotipo y sus interacciones se presenta en la Cuadro 5. Los resultados indicaron que si bien hubo un efecto significativo para las repeticiones del ensayo, ésta no presentó interacción significativa ni con el genotipo ni con el estatus endofítico, lo que permite analizar los datos en su análisis conjunto mediante la comparación de las medias ajustadas de las distintas variables para el factor estatus endofítico dentro de genotipo.

Cuadro 5. *p* valor observados en el análisis de los efectos fijos del modelo.

Variable*	Estatus				Repetición*	
	endofítico	Genotipo	Repetición	Rep*Genotipo	Estatus endo	
	(Genotipo)				(Genotipo)	
	<i>p</i> -valor					
Desarrollo	Prep	0,0301	0,0032	<0,001	0,6562	0,5964
	R	0,0288	0,1874	0,0422	0,1910	0,5740
	DN	0,0113	0,2824	0,0203	0,3648	0,2298
	S	0,0099	0,005	0,0018	0,1495	0,4615
Reproductivos	F	0,0038	0,4538	0,8528	0,6027	0,2389
	Descendencia	0,0155	0,5064	0,0679	0,4830	0,2790
	TNDN	0,2073	0,0819	0,2716	0,2447	0,1818
	TNR	0,6683	0,0469	0,3379	0,4496	0,2185

* Prep (días de período Pre-reproductivo), R (días de período Reproductivo), DN (Días de nacimientos), S (días de Sobrevivencia), F (Fecundidad), TNDN (Tasa de natalidad de los días con nacimientos), TNR (Tasa de natalidad del periodo reproductivo).

La presencia del genotipo 1 (Morfotipo A) de endófito tuvo un efecto negativo sobre la biología de *R. padi*. En este caso, el desarrollo y reproducción de los áfidos mantenidos en plantas E+ de *B. auleticus* se vieron afectados negativamente en comparación con los áfidos colocados en sus contrapartes E-. Por el contrario, la presencia del endófito con genotipo 2 no manifestó un efecto negativo en ninguna de las variables. Mientras que los *R. padi* en plantas E+ con genotipo 3 tenían significativamente una menor fecundidad que en las plantas E-.

Específicamente, los áfidos colocados en plantas E+ con el genotipo 1, putativamente productor de PER y NFL, presentaron menor sobrevivencia que los áfidos colocados en plantas E- de las mismas accesiones (Figura 8). Esta menor sobrevivencia, esta explicada por una reducción en los períodos pre reproductivo (Figura 9) y reproductivo (Figura 10). Es decir, la generación 1 tuvo un menor desarrollo, ya que comenzó antes su fase adulta, y a su vez esta fue menor.

Adicionalmente, también se determinó una menor capacidad reproductiva. Esto se evidenció en una menor proporción de áfidos que dejan descendencia y al mismo tiempo en una reducción en la fecundidad de estos (Figura 12-13). Los áfidos en plantas E+ con endófito de genotipo 3 a diferencia de los anteriores solamente vieron reducida su capacidad reproductiva produciendo un menor número total de nacimientos, si bien la proporción de *R padi* que dejaron descendencia no presentó diferencia entre plantas E+ y E-. Esto podría estar explicado por la reducción en los días activos durante el período reproductivo que presentaron los áfidos en plantas en E+ (Figura 11) y que no lograron compensar con la tasa de natalidad (Cuadro 6).

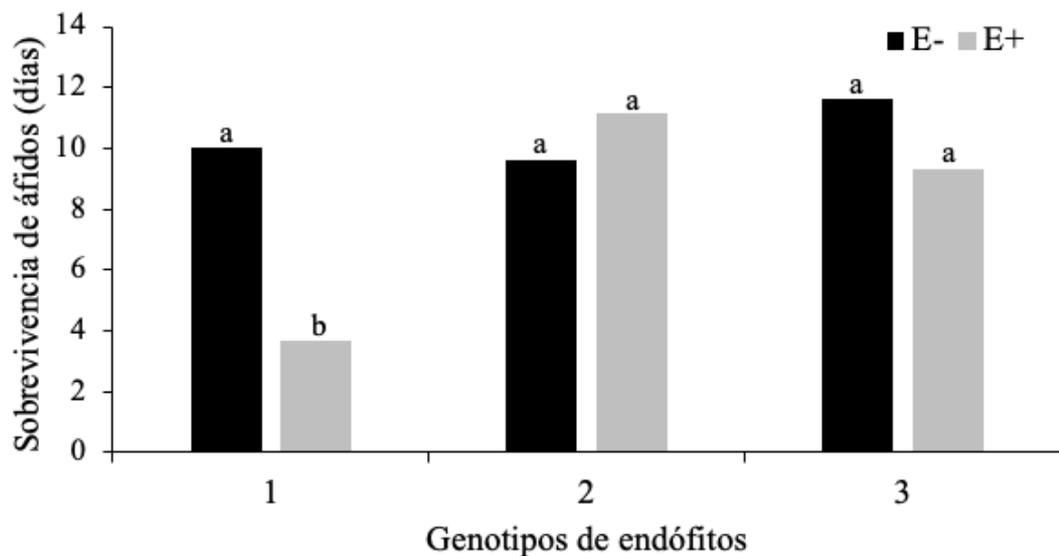


Figura 8. Sobrevivencia promedio de áfidos en plantas con endófito (E+) según genotipo, y plantas sin endófito (E-) de las mismas accesiones. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\text{Alpha}=0.05$).

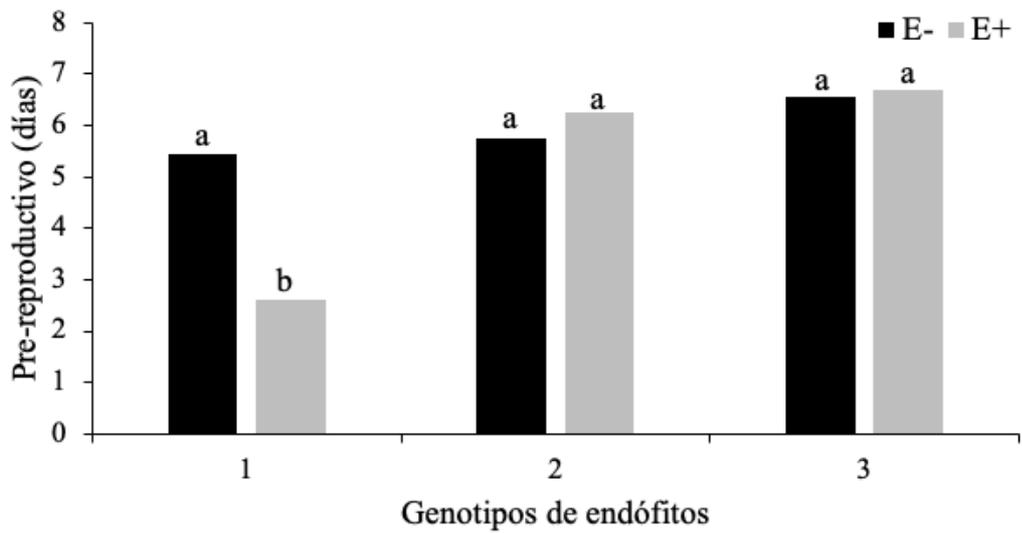


Figura 9. Días del período pre reproductivo promedio de áfidos en plantas con endófito (E+) según genotipo, y plantas sin endófito (E-) de las mismas accesiones. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Alpha=0.05).

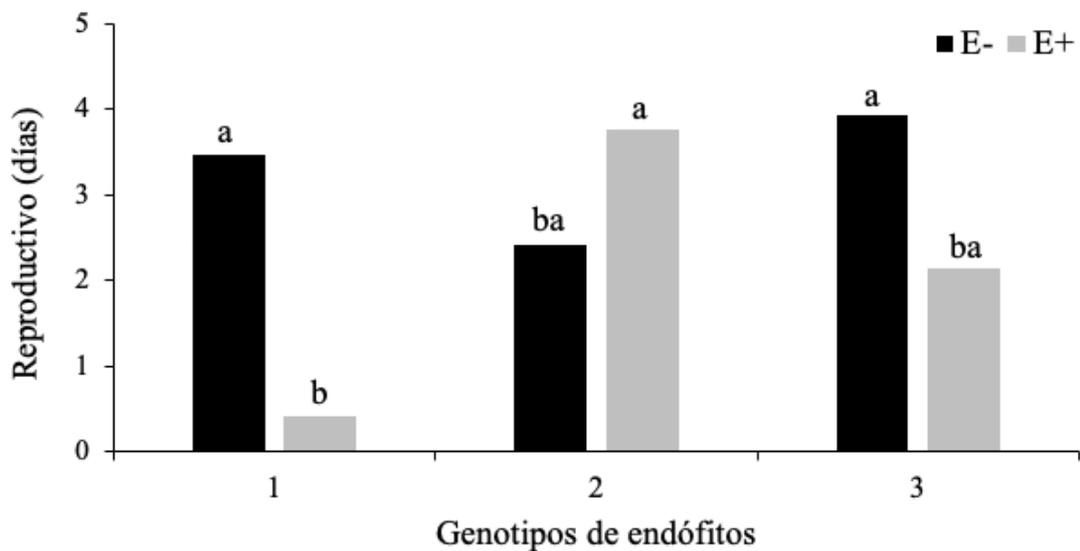


Figura 10. Días del período reproductivo promedio de áfidos en plantas con endófito (E+) según genotipo, plantas sin endófito (E-) de las mismas accesiones. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Alpha=0.05).

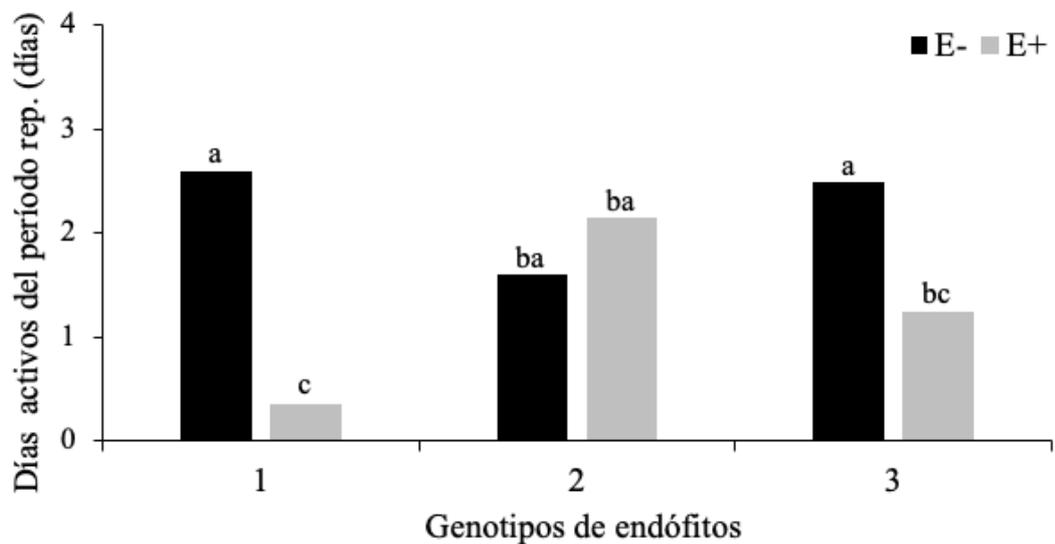


Figura 11. Días activos del período reproductivo (DN) promedio de áfidos en plantas con endófito (E+) según genotipo, y plantas sin endófito (E-) de las mismas accesiones. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Alpha=0.05).

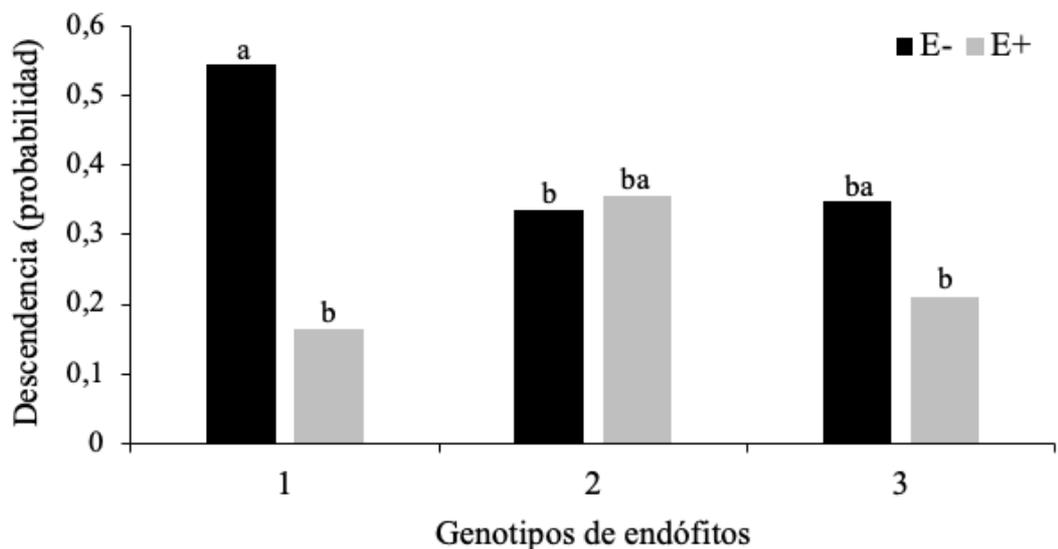


Figura 12. Probabilidad promedio de nacimiento de áfidos en plantas con endófito (E+) según genotipo, y plantas sin endófito (E-) de las mismas accesiones. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Alpha=0.05).

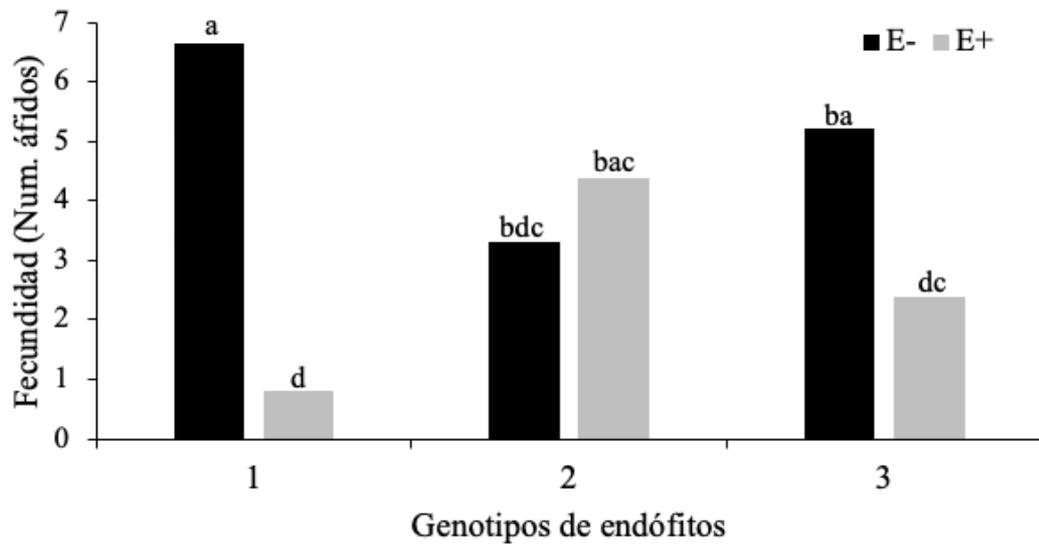


Figura 13. Fecundidad promedio de áfidos en plantas con endófito (E+) según genotipo, y plantas sin endófito (E-) de las mismas accesiones. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Alpha=0.05).

Cuadro 6. Tasa de natalidad del período reproductivo (TNR) y Tasa de natalidad de la fase activa del período reproductivo (TNDN) de *R. padi* en plantas E+ y E- según genotipo de endófito.

Genotipo	Estatus endofítico	Media TNR	Error estándar de la media	Media TNDN	Error estándar de la media
1	E-	2,1223 a	0,2767	0,9409 ba	0,2053
1	E+	2,251 a	0,4384	0,4656 b	0,1524
2	E-	1,6871 ab	0,1942	1,3422 a	0,2645
2	E+	1,3635 b	0,1799	0,979 ba	0,2073
3	E-	1,5944 ab	0,2216	0,9644 ba	0,2196
3	E+	1,5543 ab	0,2259	0,6885 ba	0,1707

2.6. DISCUSIÓN

Si bien la distribución y abundancia de endófitos *Epichloë* en *B. auleticus* se ha explorado previamente para nuestra región (Mc Cargo 2015; Iannone et al., 2009), este es el primer estudio a nivel nacional de endófitos nativos, el cual contribuye a la caracterización realizada hasta el momento en endófitos del hemisferio sur. Además, el conocimiento nacional de estas asociaciones nativas de *Bromus- Epichloë*, tiene el potencial de contribuir en la: a) explotación de nuevas estrategias biológicas para desarrollar la conservación y reintroducción de especies nativas como *Bromus auleticus* en pastizales naturales degradados, o b) desarrollo de nuevas variedades con otras potencialidades bajo condiciones de estrés biótico.

En la colección diversa de germoplasma de *B. auleticus* (Condón et al., 2017) la técnica de PCR multiplex permitió encontrar una gran diversidad genotípica de simbiontes, tanto intra como inter poblacional, logrando predecir con éxito la producción de alcaloides y tipo de apareamiento.

La incidencia endofítica en las poblaciones fue alta entre 17 - 100%, si bien se encontraron accesiones con 0% de infección. Las accesiones libres de endófito, sin considerar las que provienen de líneas selectas (provenientes de material mantenido en el banco de germoplasma, original de colectas y condiciones de conservación de semilla previa no conocida que pueden haber perdido el endófito durante el almacenamiento o durante los procesos de selección) se pueden dividir en dos grupos: el grupo del norte asociado a las ecorregiones de la cuesta basáltica y cuenca sedimentaria del oeste, mientras que el grupo del sur se asocia principalmente a las ecorregiones de sierras del este y escudo cristalino (Brazeiro et al., 2012). En este último caso, fue muy difícil encontrar poblaciones de *Bromus*, por lo tanto, se podría pensar que el ambiente de las regiones no es propicio para la gramínea y mucho menos para la asociación. Por otra parte, en el grupo del norte si se contó con un número considerado de accesiones, por lo que sugiere que las causas del patrón de distribución de las poblaciones libres de endófitos no son las mismas para ambos grupos. Se podría

pensar que las poblaciones del grupo norte presentan características genotípicas no compatibles con la asociación con endófitos (Bec et al., 2013), o también que características ambientales proporcionan un ambiente desfavorable para la asociación. De todos modos, las poblaciones naturales libres de endófitos de este estudio se encuentran relativamente próximas a poblaciones infectadas por ende será necesario un estudio más detallado para evaluar las posibles causas de este patrón de distribución.

El estudio genético permitió identificar 9 genotipos de endófitos diferentes a partir de estas poblaciones de *Bromus auleticus*. Ninguno de ellos presentó los genes necesarios para la síntesis de lolitrem B y ergovalina, vinculados a la toxicidad en mamíferos, pero si la capacidad de sintetizar otros compuestos intermediarios de los indoles y alcaloides del ergot. Entre los indol diterpenos que podrían producir algunos genotipos la paxilina es levemente tóxico para ratones, pero no parece tener efecto en el ganado (Young et al., 2009). Mientras que los genotipos 8 y 9 no amplificaron para el gen *idtG*, por ende no podrían producir ningún tipo de indol diterpenos, porque *idtG* es el primer gen de la ruta de biosíntesis. Esto podría deberse a una mutación en la zona donde se adhieren los *primers* y por eso no amplificó o simplemente no se encuentra el gen, debido a que en los *clústeres* suelen perderse los genes. En cambio, todos los genotipos son productores de peramina y en algunos casos putativamente productores de los compuestos finales N-formillolina y acetamido-pirrolizidina pertenecientes a las lolinas, ambas familias conocidas por su acción disuasiva de insectos fitófagos (Schardl et al., 2012). Esto es una característica a favor, si se pensara en estos endófitos como potenciales herramientas dentro de un plan de mejoramiento de especies forrajeras.

La caracterización genética se complementó con la caracterización morfológica y química permitiendo asociar los genotipos de endófitos en cuatro morfotipos diferentes. Los mismos presentaron consistencia con características comunes de linajes ya reportados en esta forrajera nativa, permitiendo inferir a los posibles linajes que originaron cada uno de los morfotipos establecidos. De todos modos, para

completar la caracterización será necesario realizar análisis filogenéticos que permitan comprender el origen evolutivo de estos endófitos. Igualmente, este trabajo pretende caracterizar la diversidad existente en los endófitos nativos para lograr determinar asociaciones biológicas con características adaptativas que jueguen un rol en la aptitud ecológica del huésped.

El morfotipo A sugiere que corresponde a *E. pampeana* (Iannone et al., 2009). En este caso presentó una distribución restringida al centro norte (Rivera, Tacuarembó, Salto y Durazno) y sureste del país (Flores, Florida, Lavalleja y Maldonado). El morfotipo B, en cambio está ampliamente distribuido por todo el país. El mismo comprende varios de los genotipos identificados en este trabajo, los cuales se diferencian por la variación presente en los genes para indol diterpenos. Esta variación es característica de *E. tembladeraae*, especie prevalente en *Bromus auleticus* y otras gramíneas de la región (Iannone et al., 2009, Cabral et al., 1999).

Está demostrado que *E. tembladeraae* y *E. pampeana* surgen de los ancestros *E. typhina* y *E. festucae*, pero que claramente presentan escenarios evolutivos de origen diferentes. En este sentido, nuestra hipótesis es que el evento de hibridación que originó a *E. pampeana* es más reciente del que originó *E. tembladeraae*. Esto le ha otorgado a *E. tembladeraae* tiempo para adaptarse mejor a diferentes ambientes gracias a la mayor variación en los perfiles genéticos que presenta e incluso colonizar diferentes especies hospederas posiblemente por transmisión horizontal. Mientras que los genotipos que dieron origen a *E. pampeana* fueron seleccionados a favor de determinadas condiciones ambientales por eso su incidencia presenta siempre patrones de distribución. En concordancia, estudios realizados a partir de poblaciones de *B. auleticus* nativas de Argentina *E. pampeana* se encontró solo en pastizales de la pampa húmeda mientras que *E. tembladeraae* se encontró en poblaciones de dunas, colinas y bosques costeros marítimos (Iannone et al., 2009). Por otro lado, el morfotipo C concuerda con el linaje propuesto por Mc Cargo (2015) como *E. platensis*, el cual en este caso está asociado con poblaciones del oeste, sur y este del país, más específicamente sobre el litoral (Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro, Colonia, San José y Rocha). Según los resultados filogenéticos realizados a partir de aislamientos

uruguayos en colectas previas (Iannone, 2018, Mc Cargo, 2015), procede de la hibridación de *E. festucae* x *E. typhina* x *E. elymi*. El patrón de distribución de esta especie puede ser por diferentes factores ambientales, que quedan pendiente determinar. Por último y más interesante, el morfotipo 4, se encontró en una sola accesión que también presentó *E. tembladerae*. Si bien no corresponde a una especie descrita formalmente en *Bromus*, los estudios filogenéticos realizados de aislamientos provenientes del mismo sitio de nuestra colecta sugieren según la secuenciación de *calM* que el evento de hibridación se dio entre ancestros comunes de *E. amarillans*/*E. baconni* x *E. typhina* (Iannone, 2018). Anteriormente, este linaje ha sido reportado en otras gramíneas como por ejemplo *Phleum alpinum* (Mc Cargo et al., 2014). El sitio de colecta de esta población se caracteriza por encontrarse en una región donde predominan los suelos Acrisoles lúvicos. Los mismos son suelos ácidos, muy meteorizados y con presencia de aluminio intercambiable (Brazeiro et al., 2012). Estas características pueden ser un factor de estrés que podría haber sido determinante para seleccionar a favor de este endófito propio de la zona.

Con respecto a la resistencia frente a estrés biótico, en nuestros ensayos de antibiosis identificamos como genotipo con acción anti-áfido de *R. padi* al definido como *E. pampeana* (genotipo 1, morfotipo A). Los áfidos *R. padi* mantenidos en plantas E+, asociadas específicamente con este endófito presentaron sobrevivencia reducida en comparación con los áfidos colocados en plantas E-. Específicamente, sus periodos pre-reproductivo y reproductivo tuvieron menos días de duración, y eso determinó una menor fecundidad absoluta (número de ninfas totales). Sin embargo, la tasa de natalidad no fue afectada por la presencia del endófito. Estos resultados concuerdan con los efectos estudiados para esta especie de áfido con respecto a la presencia de endófitos del género *Epichloë*. Por ejemplo, Sullivan et al. (2007) determinó el efecto negativo de la infección con *E. coenophialum* sobre la sobrevivencia de *R. padi*. Mientras Bultman y Bell (2003a) determinaron que la presencia de *Epichloë* redujo el crecimiento de las poblaciones de este áfido en plantas E+ al obtener al igual que en nuestros resultados, un menor número de áfidos nacidos en plantas E+ que en las plantas E-. En otras asociaciones, como las de plantas E+ de

P. alpinum, también se observó una supresión significativa en el crecimiento poblacional de *R. padi* en comparación con plantas E- de la misma especie. En este estudio, el efecto negativo del genotipo 1 de endófito putativamente productor de lolinas sobre la biología de *R. padi* era esperable, porque la producción de lolinas está fuertemente asociada al efecto disuasivo contra esta especie de áfido. En este sentido, Wilkinson et al. (2000) observaron que la mortalidad de áfidos (*R. padi* y *Schizaphis graminium*) era mayor en las plantas que presentaban lolinas, debido a que la mortalidad de los áfidos se correlacionó con las concentraciones de este alcaloide. Por otra parte, además de los efectos directos de las lolinas sobre la biología de los áfidos, también se podría pensar en potenciales efectos de los endófitos sobre la reducción de daños indirectos de estos insectos, como lo es la transmisión de virus (BYDV) (Lehtonen et al., 2006).

A diferencia del genotipo 1 (*E. pampeana*) los demás endófitos evaluados en el ensayo de antibiosis genotipo 2 y 3 (*E. tembladerae* y *E. platensis* respectivamente) no presentan genes para la síntesis de lolinas. Consecuentemente el efecto de la presencia de estos endófitos fue diferente. En lo que respecta a *E. tembladerae* el efecto de las plantas E+ fue neutro y el efecto de *E. platensis* se categorizó como efecto intermedio. Debido a que este endófito *E. platensis* (Morfofoto C/ genotipo 3) productor de PER, CC, PAX y TDI presentó efectos negativos en la fecundidad de *R. padi*. En este caso no se observa un efecto completamente disuasivo del endófito, pero claramente presenta otra clase de interacción que sería interesante seguir evaluando. Por lo tanto, consideramos a *E. pampeana* como el único de los endófitos evaluados que manifestó una resistencia constitutiva.

Si bien el efecto de las lolinas frente a áfidos es consistente, no hay que desestimar la variabilidad sobre preferencia de los insectos y el rendimiento que presentan las gramíneas infectadas contra los demás insectos fitófagos, asociada en muchos casos a factores ambientales que modulan las propiedades protectoras (Popay et al., 2009, Bultman y Bell, 2003a). No obstante, los efectos del endófito sobre la aptitud ecológica de plantas hospedantes depende de tres factores esenciales: la

constitución genotípica de la planta, el haplotipo del endófito, así como también del ambiente en el que se encuentren (Saikkonen et al., 2006). Teniendo en cuenta los aspectos mencionados, es sumamente interesante pensar en endófitos como un nuevo bioinsumo a implementar dentro de un manejo integrado de plagas. En el caso de los áfidos, estos insectos agravaron los daños en nuestros ambientes por el uso sistemático de insecticidas de amplio espectro (Piretroides). El empleo erróneo del control químico provocó un desbalance del sistema, al afectar también a los controladores biológicos que naturalmente controlan las poblaciones de áfidos (Ribeiro et al., 2014). Consecuentemente, en la actualidad los áfidos son un factor crítico durante las implantaciones de pasturas, etapa del cultivo más vulnerable del cultivo. Si bien el control químico sigue siendo una alternativa, esta no es una opción recomendable, por el potencial impacto sobre la biodiversidad que caracteriza a los pastos y además por no contar umbrales de daño para ninguna especie de áfido en pasturas de gramíneas, para que puedan hacer de esta, una práctica racional. Por lo tanto, las alternativas no son muchas. Los resultados logrados en este ensayo de antibiosis se obtuvieron en plantas jóvenes y apoyan la opción de control mediante endófitos durante la implantación. Esto amplía la gama de alternativas de control preventivo, y plantea muchas preguntas, por ejemplo, ¿Qué interacción tendría un cura semilla con acción insecticida con un endófito en semilla? ¿Podrían tener una interacción sinérgica? ¿Qué otros beneficios aportarían? Si bien ya existen cepas comerciales de *Epichloë* en forrajeras de material nacional, incorporar en nuestros materiales cepas nativas, las cuales ya han pasado por un proceso evolutivo y de selección a favor de determinado perfil genético en determinado ambiente las hace mucho más atractivas.

2.7. CONCLUSIÓN

Hongos endófitos del género *Epichloë* presentan diversidad entre las poblaciones de *Bromus auleticus* de Uruguay, la cual se evidencia en los niveles de incidencia así como en diferencias morfológicas, y genéticas que otorgan diferentes capacidades toxicogénicas. Dicha diversidad puede asociarse a diferentes linajes, en algunos casos ampliando la distribución regional de los endófitos ya descritos en *B. auleticus* y en otros identificando nuevos linajes de endófitos en esta gramínea. Algunos genotipos de endófitos presentan acción anti-áfido mediante el mecanismo de antibiosis, permitiendo ampliar la gama de alternativas dentro de las estrategias para la protección vegetal. Adicionalmente, estos endófitos son "amigables" con el ganado y podrían adaptarse a materiales comerciales para obtener ventajas adaptativas otorgadas por la asociación mutualista y de esta manera conseguir mejoras en la aptitud forrajera de las gramíneas.

2.8. REFERENCIAS

- Bec S, Liu J, Schardl C. 2013. Molecular and genetic basis guiding the establishment of a mutualistic relationship between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. En: Proceedings of the APS-MSA Joint Meeting, American Phytopathological Society, 13p.
- Brazeiro A, Panario D, Sotullo A, Gutierrez O, Mai P. 2012. Clasificación y delimitación de las eco-regiones de Uruguay. Informe Técnico. Convenio MGAP/PPR. Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias/Vida Silvestre/Sociedad Zoologica del Uruguay/CIEDUR, 40 p.
- Bultman T, Bell G. 2003a. Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. *Oikos*, 103: 182-190.
- Bultman T, Leuchtman A. 2003b. A test of host specialization by insect vectors as a mechanism for reproductive isolation among entomophilous fungal species. *Oikos*, 103: 681-687.
- Bustamante E, Ruiz M, Morici E, Babinec F, Pordomingo A. 2012. Accumulated biomass and nutritional quality indicators indicators in Cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trinius ex Nees). *Revista de Investigaciones Agropecuarias - INTA* 38: 3.
- Cabral D, Cafaro M, Saidman B, Lugo M, Reddy P, White Jr JF. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia*, 91(2): 315-325.
- Charlton ND, Craven KD, Afkhami ME, Hall BA, Ghimire SR, Young CA. 2014. Interspecific hybridization and bioactive alkaloid variation increases diversity in endophytic *Epichloë* species of *Bromus laevipes*. *FEMS Microbiology Ecology*, 90 (1): 276-289.

- Charlton ND, Craven KD, Mittal S, Hopkins AA, Young CA. 2012. *Epichloë canadensis*, a new interspecific epichloid hybrid symbiotic with Canada wildrye (*Elymus canadensis*). *Mycologia*, 104 (5): 1187-1199.
- Clay K, Hardy T, Hammond A. 1985. Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia*, 66: 1-5.
- Condón F, Jaurena M, Reyno R, Otaño C, Lattanzi F. 2017. Spatial analysis of genetic diversity in a comprehensive collection of the native grass *Bromus auleticus* Trinius (ex Nees) in Uruguay. *Grass and Forage Science*, 72: 723-733.
- Fleetwood D, Khan A, Johnson R, Young C, Mittal S, Wrenn R, Hesse U, Foster S, Schardl C, Scott B. 2011. Abundant degenerate miniature inverted-repeat transposable elements in genomes of epichloid fungal endophytes of grasses. *Genome Biology and Evolution* 3: 1253-1264.
- Fleetwood D, Scott B, Lane G, Tanaka A, Johnson R. 2007. A complex ergovaline gene cluster in *Epichloë* endophytes of grasses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2571-2579.
- Hahn H, Huth W, Schöberlein W, Diepenbrock W, Weber W. 2003. Detection of endophytic fungi in *Festuca* spp. by means of tissue print immunoassay. *Plant Breeding*, 122: 217-222.
- Iannone L. 2018. Evolution and ecology of *Epichloë* in South America. En: International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses (10, Salamanca, España). Proceedings.
- Iannone L, Cabral D, Schardl, Rossi M. 2009. Phylogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium* endophyte species in the grass *Bromus auleticus* from South America. *Mycologia*, 101(3): 340-351.

- Iannone L, Cabral D. 2006. Effects of the *Neotyphodium* endophyte status on plant performance of *Bromus auleticus*, a wild native grass from South America. *Symbiosis*, 41(2): 61-69.
- Khan A, Hussain J, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Lee I. 2015 Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1): 62-74.
- Lehtonen P, Helander M, Siddiqui S, Lehto K, Saikkonen K. 2006. Endophytic fungus decreases plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pratense*) *Biology Letters*, 2(4): 620-623
- Leuchtmann A, Schardl C, White Jr JF, Tadych M. 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 106 (2): 202-215.
- Mc Cargo PD. 2015. Evolución y diversidad de endofitos *Epichloë* de la forrajera nativa *Bromus auleticus*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 136 p.
- Mc Cargo PD, Iannone L, Vignale M, Schardl C, Rossi MS. 2014. Species diversity of *Epichloë* symbiotic with two grasses from southern Argentinean Patagonia. *Mycologia*, 106(2): 339-352.
- Millot J. 2001. *Bromus auleticus*: una nueva especie domesticada. En: Diálogo LVI: los recursos fitogenéticos del género *Bromus* en el cono sur. Montevideo, Uruguay, PROCISUR-IIICA, 3-5 p.
- Moon C, Craven K, Leuchtmann A, Clement SL, Schardl CL. 2004. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. *Molecular Ecology*, 13(6): 1455-1467.
- Moon C, Miles C, Järlfors U, Schardl C. 2002. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. *Mycologia*, 94(4): 694-711.

- Moon C, Scott B, Schardl C, Christensen M. 2000. Evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia*, 92(6): 1103-1118.
- Moy M, Li H, Sullivan R, White Jr JF, Belanger F. 2002. Endophytic fungal β -1, 6-glucanase expression in the infected host grass. *Plant Physiology* ,130(3): 1298-1308.
- Novas M, Iannone L, Godeas A, Cabral D. 2009. Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycological Progress*, 8 (1): 75-81.
- Novas M, Cabral D, Godeas A. 2005. Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis*, 40(1): 23-30.
- Painter R. 1951. The mechanisms of resistance. In: *Insect Resistance in Crop Plants*. New York. The McMillan, 151 p.
- Panaccione D, Ryan K, Schardl C, Florea S. 2012. Analysis and modification of ergot alkaloid profiles in fungi. *Methods in Enzymology*, 515: 267-290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394290-6.00012-4>
- Panaccione D, Cipoletti J, Sedlock A, Blemings K, Schardl C, Machado C, Seidel G. 2006. Effects of ergot alkaloids on food preference and satiety in rabbits, as assessed with gene-knockout endophytes in perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4582-4587.
- Panaccione D, Johnson R, Wang J, Young C, Damrongkool P, Scott B, Schardl C. 2001. Elimination of ergovaline from a grass *Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 12820-12825.

- Philipson M, Christey M. 1986. The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*. *New Zealand Journal of Botany*, 24(1): 125-134.
- Popay A, Tapper B, Podmore C. 2009. Endophyte infected meadow fescue and loline alkaloids affect Argentine stem weevil larvae. *New Zealand Plant Protection*, 62: 19-27.
- Ribeiro A, Silva H, Abbate S. 2014. Manejo de plagas en trigo y cebada. Ediciones universitarias, Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. Uruguay. 62p.
- Saikkonen K, Lehtonen P, Helander M, Koricheva J, Faeth S. 2006. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. *Trends in Plant Science*, 11(9): 428-433.
- Sánchez Chopa C, Descamps L. 2013. Reproducción de *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera, Aphididae) en cultivares de trigo en la región del sudoeste bonaerense de Argentina. *Acta Entomológica Chilena*, 33(12): 17-22.
- SAS Institute. 1994. SAS/STAT 9.4. Procedures Guide: Statistical Procedures. Cary, North Carolina, USA. SAS Institute.
- Schardl C, Young C, Moore N. 2014. Genomes of plant-associated Clavicipitaceae. En: Francis M. Martin (Ed.). *Advances in Botanical Research*. INRA Centre de Nancy, Centre de Nancy, Champenoux. Academic Press Inc, 70(10): 291-327.
- Schardl C, Florea S, Pan J, Nagabhyru P, Bec S, Calie P. 2013. The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4): 480-488.
- Schardl C, Young C, Faulkner J, Florea S, Pan J. 2012. Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology*, 5(3): 331-344.

- Schardl C. 2010. The epichloae, symbionts of the grass subfamily Poöideae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 97(4): 646-665.
- Schardl C, Leuchtman A, Spiering M. 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review Plant Biology*, 55: 315-340.
- Spiering M, Faulkner J, Zhang D, Machado C, Grossman R, Schardl C. 2008. Role of the *LolP* cytochrome P450 monooxygenase in loline alkaloid biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1307-1314.
- Spiering M, Moon C, Wilkinson H, Schardl C. 2005. Gene Clusters for Insecticidal Loline Alkaloids in the Grass-Endophytic Fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics*, 169(3): 1403-1414.
- Sullivan T, Rodstrom J, Vandop J, Librizzi J, Graham C, Schardl C, Bultman T. 2007. Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition. *New Phytologist*, 176: 673-679.
- Takach J, Young C. 2014. Alkaloid genotype diversity of tall fescue endophytes. *Crop Science*, 54: 667-678.
- Tanaka A, Tapper B, Popay A, Parker E, Scott B. 2005. A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology*, 57(4): 1036-1050.
- Wang J, Machado C, Panaccione D, Tsai H, Schardl C. 2004. The determinant step in ergot alkaloid biosynthesis by an endophyte of perennial ryegrass. *Fungal Genetics and Biology*, 41(2): 189-198.
- White Jr JF, Martin TI, Cabral D. 1996. Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia*, 88(2):174-178.

- Wilkinson H, Siegal M, Blankenship J, Mallory A, Busch L, Schardl C. 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 13: 1027-1033.
- Young C, Tapper B, May K, Moon C, Schardl C, Scott B. 2009. Indole-diterpene biosynthetic capability of *Epichloë* endophytes as predicted by *ltm* gene analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7): 2200-2211.

2.9. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Cuadro S1. Acciones de *Bromus auleticus* con sus respectivas identificaciones, origen geográfico y niveles de incidencia en semilla utilizadas para el estudio de endófitos de Uruguay.

ID Accesoión	Departamento	Test semilla	E+	infección %
11240	Artigas	6	0	0
11241	Colonia	6	5	83
11242	Tacuarembó	6	0	0
11243	Colonia	6	0	0
11244	Paysandú	6	0	0
11245	Colonia	6	0	0
11246	San José	6	0	0
11247	Colonia	6	0	0
18881	Tacuarembó	6	1	17
18900	Colonia	6	0	0
19366	Tacuarembó	6	6	100
19367	Tacuarembó	6	6	100
19368	Tacuarembó	6	5	83
19369	Paysandú	6	0	0
19370	Salto	6	0	0
19371	Salto	6	5	83
19372	Tacuarembó	6	0	0
19373	Tacuarembó	6	5	83
19374	Río Negro	6	6	100
19375	Paysandú	6	0	0
19376	Paysandú	6	0	0
19377	Paysandú	6	5	83
19378	Salto	6	6	100
19379	Salto	6	6	100
19380	Rivera	6	5	83
19382	Lavalleja	6	5	83
19383	Lavalleja	6	6	100
19384	Rocha	6	5	83
19385	Rocha	6	6	100
19386	Cerro Largo	6	5	83
19388	Rivera	12	12	100
19390	Paysandú	6	6	100
19391	Salto	6	0	0
19395	Salto	6	0	0
19396	Treinta y Tres	6	5	83
19397	Lavalleja	6	0	0
19399	Treinta y Tres	6	0	0

ID Accesión	Departamento	Test semilla	E+	infección %
19401	San José	6	3	50
19402	Artigas	6	0	0
19403	Paysandú	6	0	0
19404	Tacuarembó	6	6	100
19405	Florida	6	6	100
19945	Maldonado	6	5	83
19946	Maldonado	6	6	100
19947	Rocha	12	4	33
19948	Rocha	6	6	100
19949	Rocha	6	5	83
19950	Lavalleja	6	0	0
19951	Florida	6	0	0
19952	Florida	6	6	100
19953	Florida	6	5	83
19954	San José	6	6	100
19955	San José	6	6	100
19956	Flores	6	6	100
19957	Flores	6	6	100
19958	Flores	6	6	100
19959	Soriano	6	6	100
19960	Río Negro	6	6	100
19961	Río Negro	6	6	100
19962	Paysandú	6	4	67
19963	Durazno	6	6	100
19964	Artigas	6	4	67
19965	Artigas	6	6	100
19966	Treinta y Tres	6	5	83
19967	Flores	6	4	67
19969	Salto	6	6	100
19970	Salto	6	6	100
19971	Durazno	6	6	100
19972	Lavalleja	6	6	100
19974	Paysandú	6	5	83
19975	Artigas	6	1	17
19976	Salto	6	6	100
19977	Florida	6	0	0
19978	Tacuarembó	6	6	100
19979	Flores	6	0	0
19980	Artigas	6	3	50
19981	Flores	6	2	33
23496	Cerro Largo	6	5	83
2007-01	Tacuarembó	6	1	17
Parc 109	Tacuarembó	6	6	100
Parc 134	Paysandú	6	0	0
Parc 140	Treinta y Tres	6	0	0
Parc 153	Tacuarembó	6	6	100

Cuadro S2. Genes amplificados mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con sus respectivos nombres de cebadores, tamaños y secuencias.

Adaptado de Charlton et al., 2014.

Locus	Gen	Nombre cebador	Secuencia de cebador	Tamaño ADN (bp)	Multiplex
TefA	tefA	tef1-exon1d-1 tef1-exon6u-1	GGG TAA GGA CGA AAA GAC TCA CGG CAG CGA TAA TCA GGA TAG	860	1
PER	perA (mid)	per T2-F per T2-R	TCTTCAGGCATCGCAGGAAC TCGCCACCTCCAGCCTGATG	600	1
LOL	lolC (new)	lolC-3a lolC-5b	GGTCTAGTATTACGTTGCCAGGG TCTAAACTTGAGCGCAGTTCGGC	442	1
EAS	dmaW	dmaW-F4 dmaW-6R	GTGTACTTTACTGTGTTCCGGCATG GTGGAGATACACACTTAAATATGGC	282	1
LTM	idtG/ltmG	idtG-F idtG-R	GAGCTTGAGAAGCTTACGAATCC GGGCAATGGAGCGATTCTCTC	113 bp	1
MTA	matA	mtAC-F mtAC-R	CAATGGTGGTCACCTGAGAAAG CGGTCTCATTCTCCAGAGAGAGG	785	2
PER	perA (reductase)	per red F2 per red R	GAGATCAGTTCGCAGTTGTGTCAG CTAGCCTCCAGATCTTGTGAAAG	447-589	2
MTB	matB	mtBA-F mtBA-R	TCTACCGCAAGGAACGACACAATACCG GCTTTTCCAGCAAGGCTTGCTTGACTC	213	2
EAS	dmaW - alt	dmaW818(311+21)d dmaW818(1068-24)u	AACCCATCAACGGAGCAACTG GCCAAACACTGTGAAATACACCTG	758	3
EAS	lpsB	p12-R p12-F	TACCCACTGCCTCGAACTTG CCGTCTTCCCGTATAACCGAA	598	3
LTM/IDT	ltmQ	ltmQ-313 ltmQ-282	CTACCAGGACAGGCGTGACGTCC CAGAGGTTTAAACCTCTTGACGC	334	3
LOL	lolA	lolA-F1 lolA-R1	GAGACACTAGAGAAAATGGCAGCTGC GGCATCCATGGTGGCGAAGATGTG	270	3
LOL	lolO	lolO-F1 lolO-R2	GTGAACTGGCAGTAGTCCGTATG AATCCATGCCAGTGTCCGGGAATG	492-719	4
EAS	easA	easA-R easA-F	ATCTACCACAAGCTTGCGGAC GCGGTTGCATTGAGAATCGCTC	350	4
EAS	easC	easC-F2 easC-R2	CTGGAGCATATGGAGAGTTTG AATGTTCCAGGCAAACCCAGTC	278	4
IDT/LTM	ltmE	ltmE-356 ltmE-341	CCGAGTTTGTATGACCTGCTG TTCCGCTCCGAGTAGACTC	687	5
LOL	lolP	lolP-F1 lolP-R1	GTTCTAAACATCGTACTGGGC GGTAGGTCAGCATCTTGCAACG	566	5
EAS	cloA-mp	cloA-MP-F2 cloA-MP-R2	CGCACAACGCTCCATTGATGGC AAGCTCGTGCCGGGAATTAGGC	434	5
PER	perA 5' region	perA-5' F3 perA-5' R	ATGACGAGCTCGGAGCGAGTTG TCGCAGCTGCAAGTCGAGCAC	309	5
LTM/IDT	ltmF	ltmF-359 idtF-MP-R	GAATTATGTTACTCTTGGGG GTCTTCACTGAGGGAAGTC	213	5
PER	perA (Lark)	Neo-per-F Neo-per-R	CGTCGTGGTAAACGCACGCAAACG CAGTCTGCCTTGCCGACCGGGGT	652-324	6
LTM/IDT	ltmF	ltmF-359 ltmF-360	GAATTATGTTACTCTTGGGG AAGTTGGCACATAGGTCTTC	227	6
EAS	lpsB	lpsB-F1 lpsB-R1	TCGAAGGATGCAGTCCTTGC CAGACACCGCTCGTTCAAATG	701	7
LOL	lolP	lolP-F1 lolP-R1	GTTCTAAACATCGTACTGGGC GGTAGGTCAGCATCTTGCAACG	566	7
PER	perA 5' region	perA-5' F3 perA-5' R	ATGACGAGCTCGGAGCGAGTTG TCGCAGCTGCAAGTCGAGCAC	309	7
PER	perA-17bp	perA T2-F perA 17 bp	TCTTCAGGCATCGCAGGAAC GTACGGATAACCTCAAC	742	8
LTM/IDT	ltmK	ltmK-160 ltmK-161	ATATTGAATTGCTGCGTGAGGAG AGAGGCCAAGAAGCGGCCTGGACA	568	8
EAS	easH	easH-F easH-R	AGATATGGCATCGTGACCAGCC GGCATGTAGCATCAAATGGTGTC	333	8

Cuadro S3. Resultados de expresión de alcaloides mediante HPLC a los tres genotipos prevalentes en *B. auleticus* representados con accesiones con 100% de infección según datos de Blotting.

Genotipo	Accesión	Predicción	Peramina	Chanoclavina I	Ergovalina
1	19366		92	nd	nd
	19367		nd	nd	nd
	19368		nd	82	nd
	19371		42366	30	nd
	19383		nd	nd	nd
	19405		1321	nd	nd
	19946	PER/NFL/-/-	nd	nd	nd
	19957		nd	42	nd
	19963		nd	nd	nd
	19972		nd	nd	nd
	P-109		nd	nd	nd
	P-153		nd	nd	nd
	2	19373		86641	nd
19404			84643	nd	nd
19948			69314	nd	nd
19956		PER/-/-/PAX	120286	61	nd
19958		y TDI	106215	48	nd
19959			91631	nd	nd
19961			95631	35	nd
19970			12308	nd	nd
19978		9974	nd	nd	
3	11241	PER/-	76228	518068	nd
	19954	/CC/PAX y TDI	78015	630319	nd
6	19971	PER/-/-/PAS	nd	nd	nd

Cuadro S4. Código SAS utilizado por los modelos para el análisis de antibiosis realizado para identificar genotipos de endófitos disuasivos.

```
proc glimmix data=No_Acum4 pconv=1e-4;
nloptions technique=congra maxiter=1000 gconv=1e-4;/*nloptions
maxiter=100;*/covtest /cl wald;
class Run Genotype Trat Accesion Planta Day;
model Offpring = Run Genotype Trat (Genotype) Run*Genotype Run*Trat
(Genotype) / dist=Poisson link=log; random Accesion(Genotype) Accesion*Trat/
solution;random Day / subject=planta(accesion) type=cs residual; lsmeans
genotype /diff cl ilink plot lines; lsmeans Trat(genotype) / diff cl ilink plot lines;
lsmeans run / diff cl ilink plot lines; run;
```

```
title ' Dias Pre-Reproductivos';
proc glimmix data=b;
class run geno endo acc plant;
model PreRep = run geno endo(geno) run*geno run*endo(geno) / dist=Poisson
link=log DDFM=SATTERTH;
random acc(geno) / subject=plant(acc) type=cs residual;
random acc*run acc*endo acc*endo*run;
lsmeans geno / diff cl ilink plot lines;
lsmeans endo(geno) / diff cl ilink plot lines;
lsmeans run / diff cl ilink plot lines;
run;
```

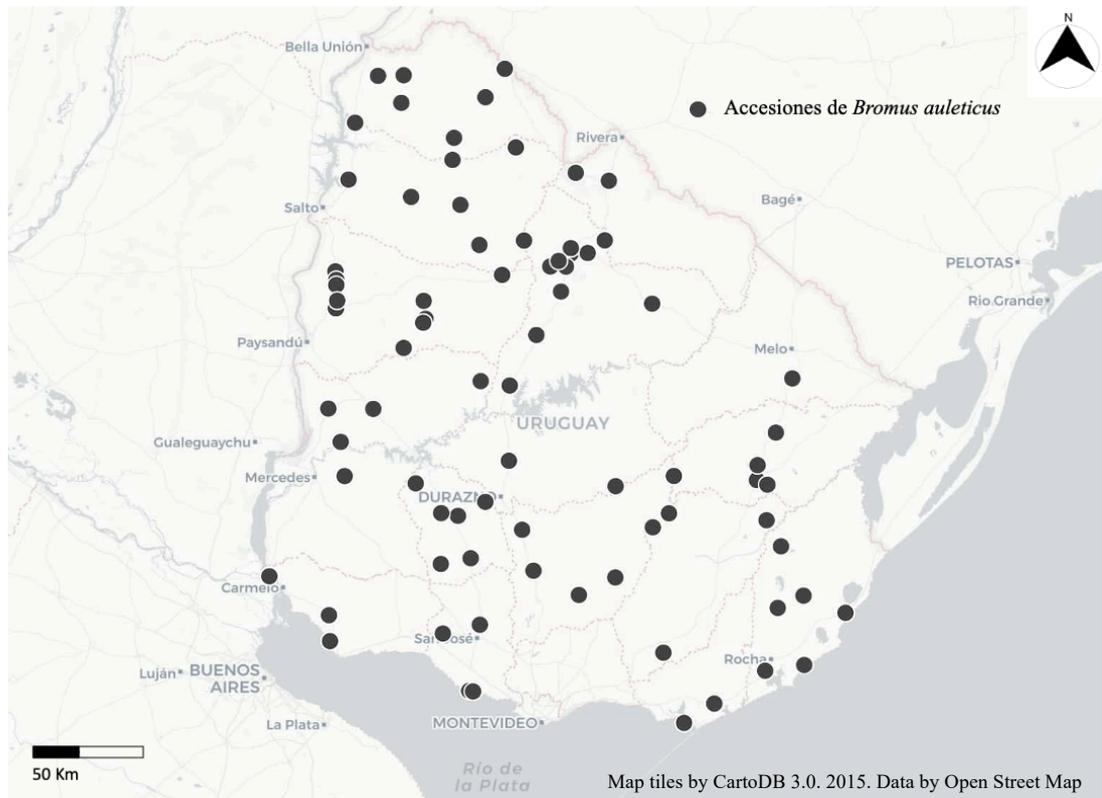


Figura S1. Mapa con origen geográfico de las 83 accesiones de *Bromus auleticus*.

Aislamientos de accesión 19946 - Genotipo 1

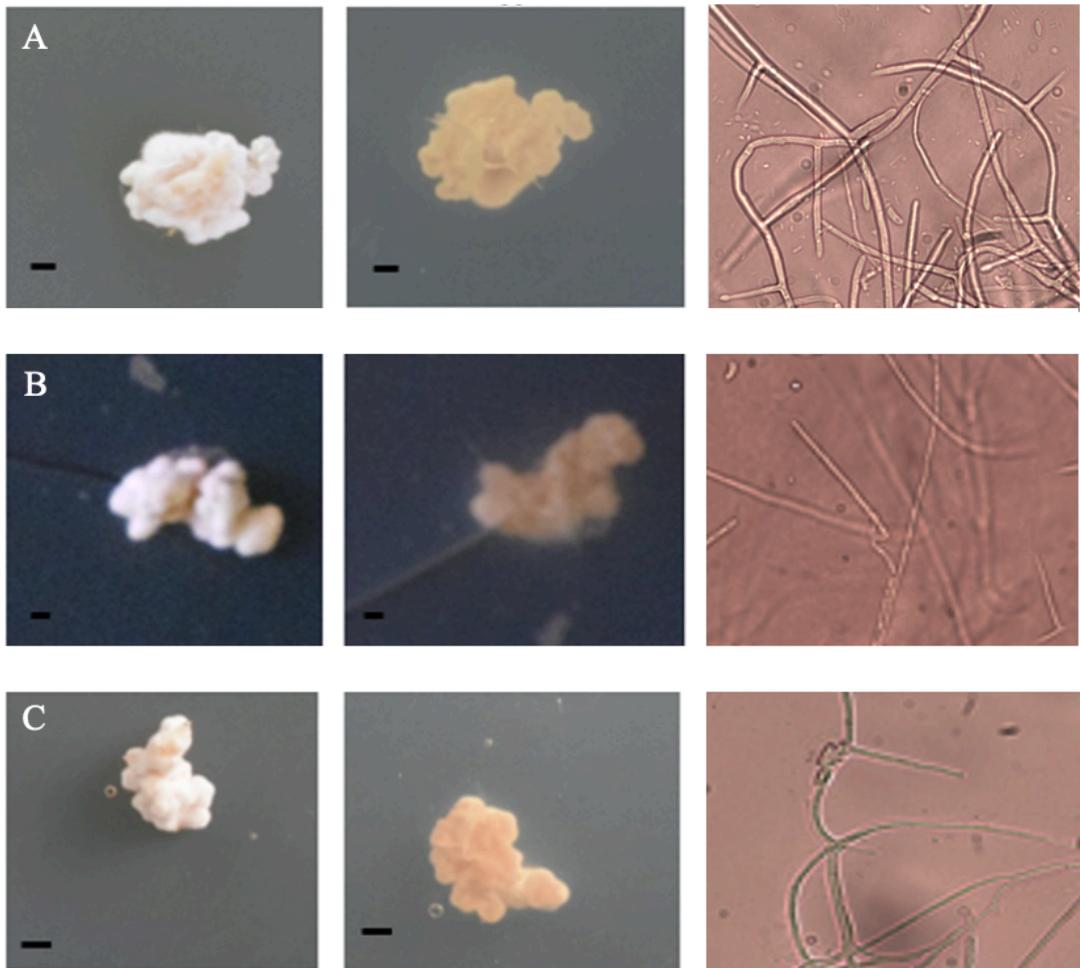


Figura S2. Colonias y morfología conical de aislamientos de endófito a partir de las plantas 1357 (A) 1359 (B) y 1361(C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conical se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19957 - Genotipo 1

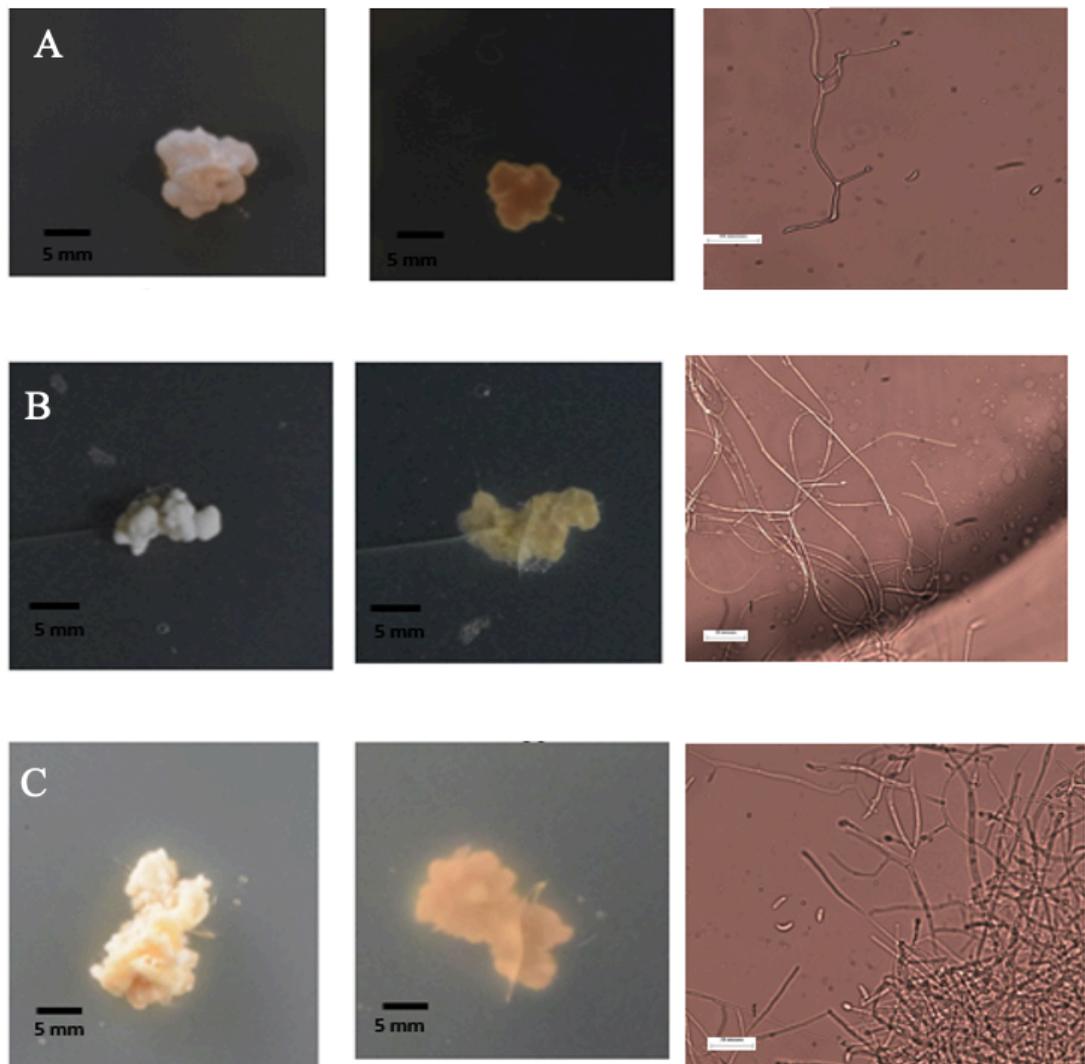


Figura S3. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 1225 (A) 1226 (B) y 1232 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19386 - Genotipo 2

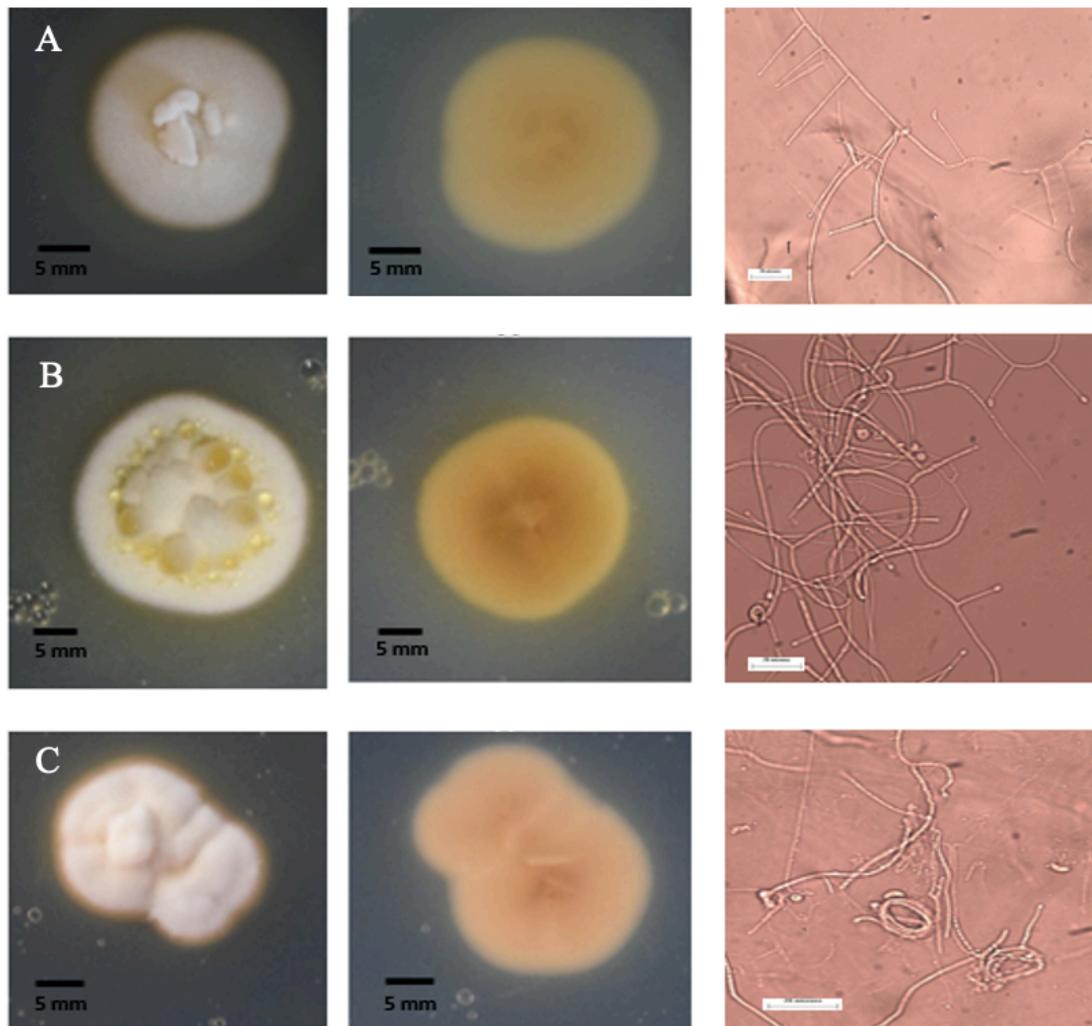


Figura S4. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 703 (A) 704 (B) y 728 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19949 - Genotipo 2

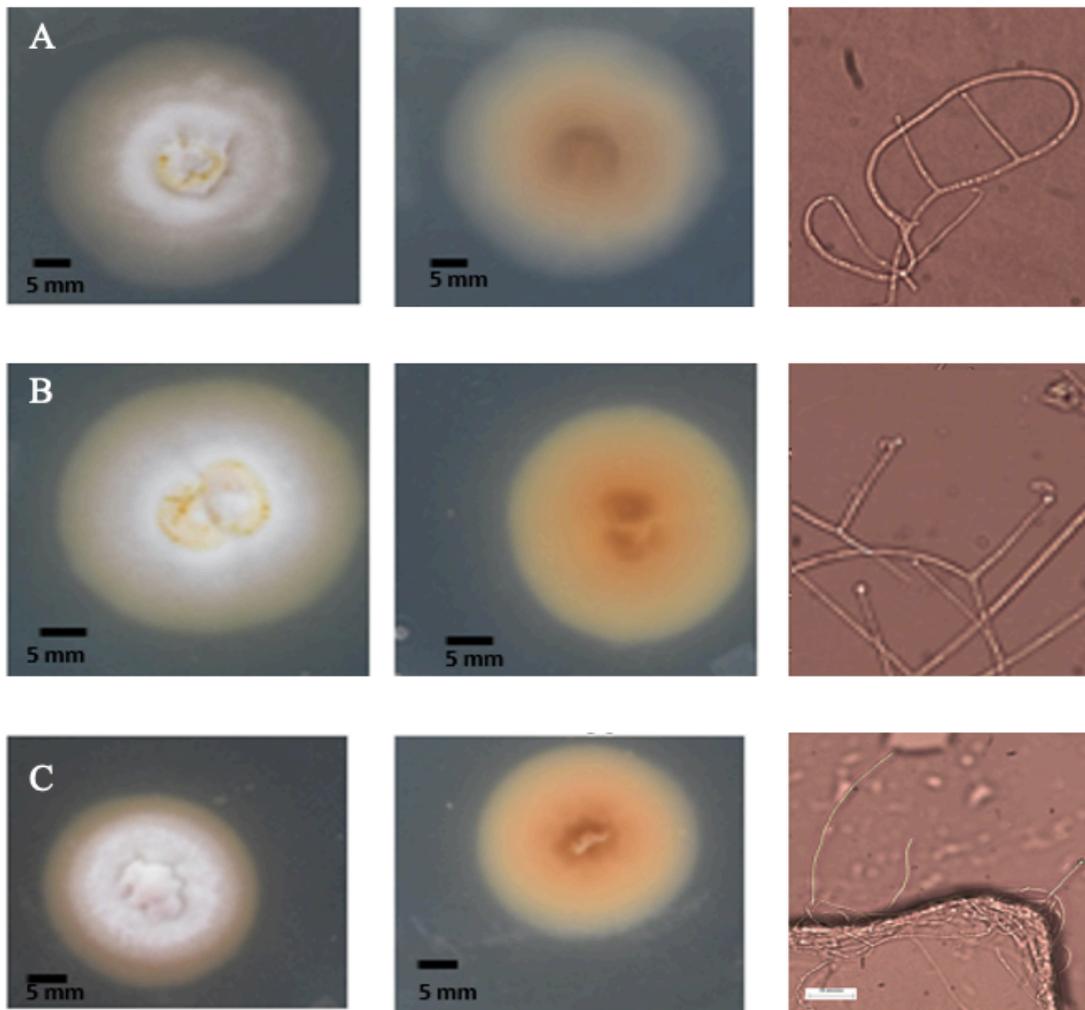


Figura S5. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 778 (A) 779 (B) y 756 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19961 - Genotipo 2

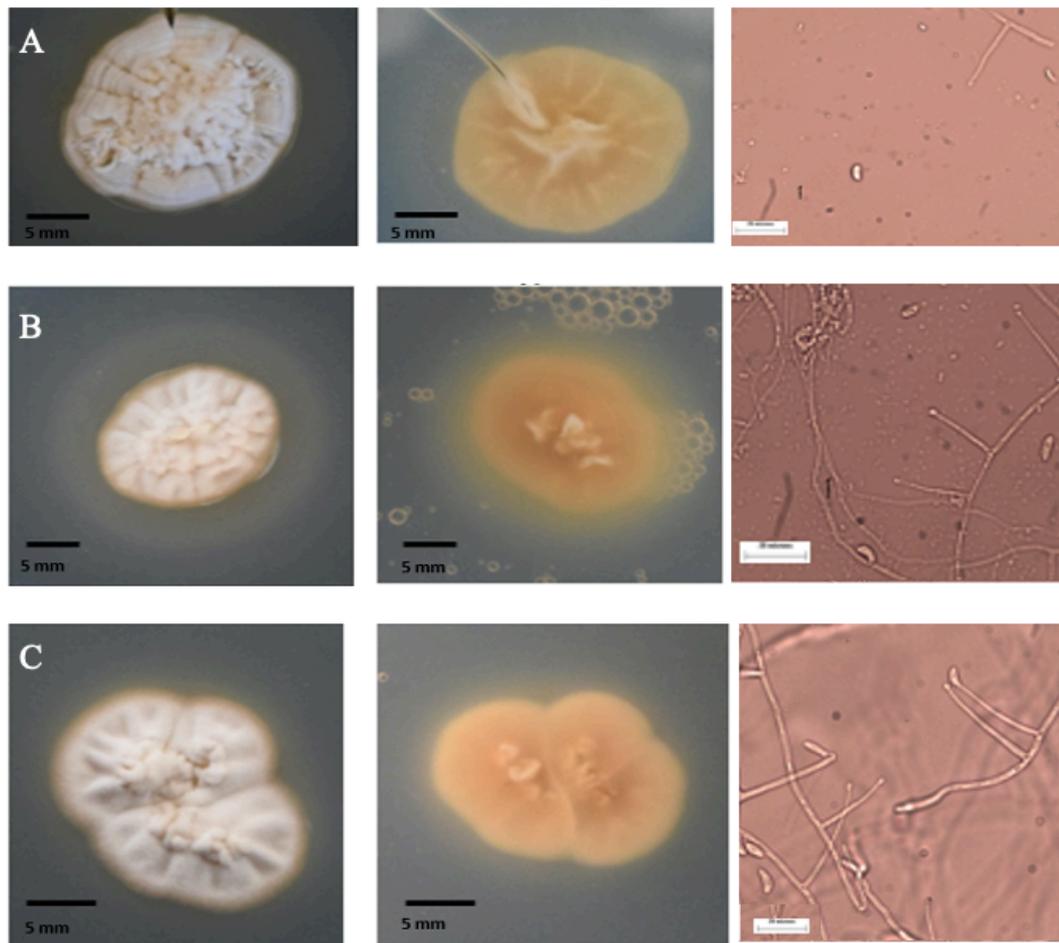


Figura S6. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 1080 (A) 1079 (B) y 1085 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19976 - Genotipo 2

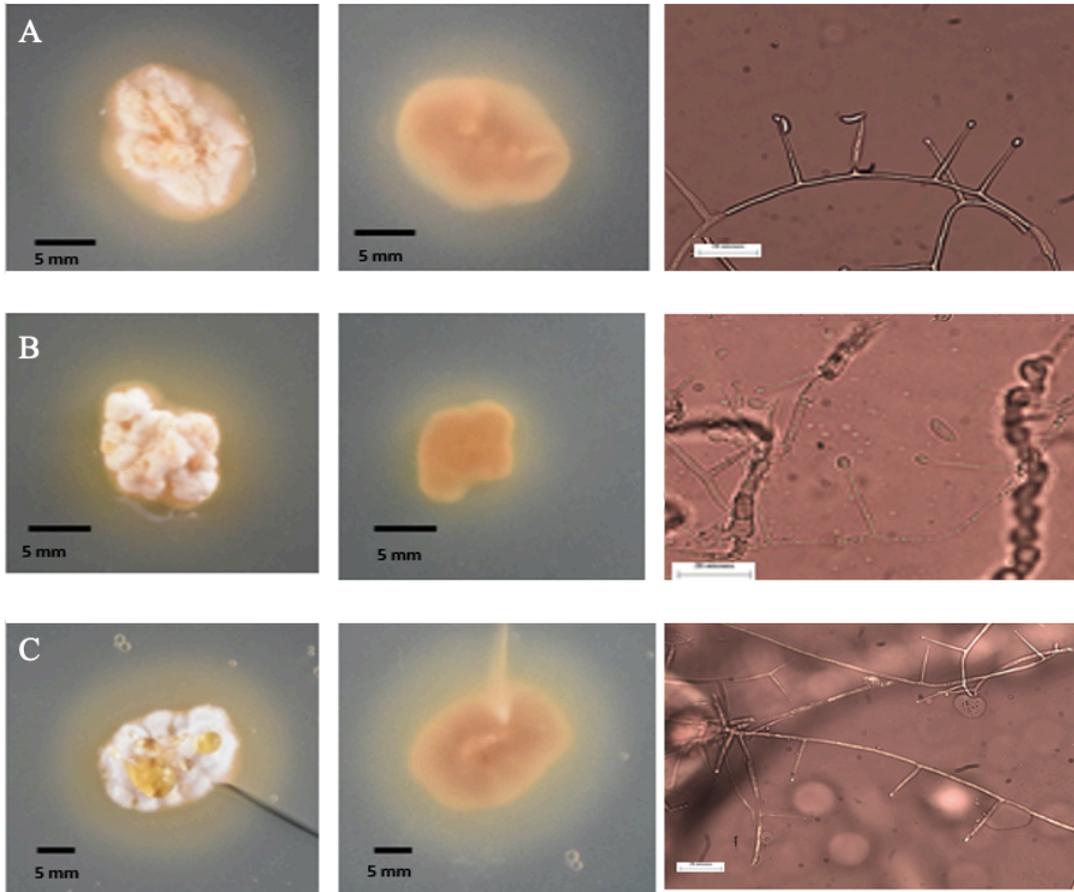


Figura S7. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 530 (A) 543 (B) y 544 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 11241 - Genotipo 3

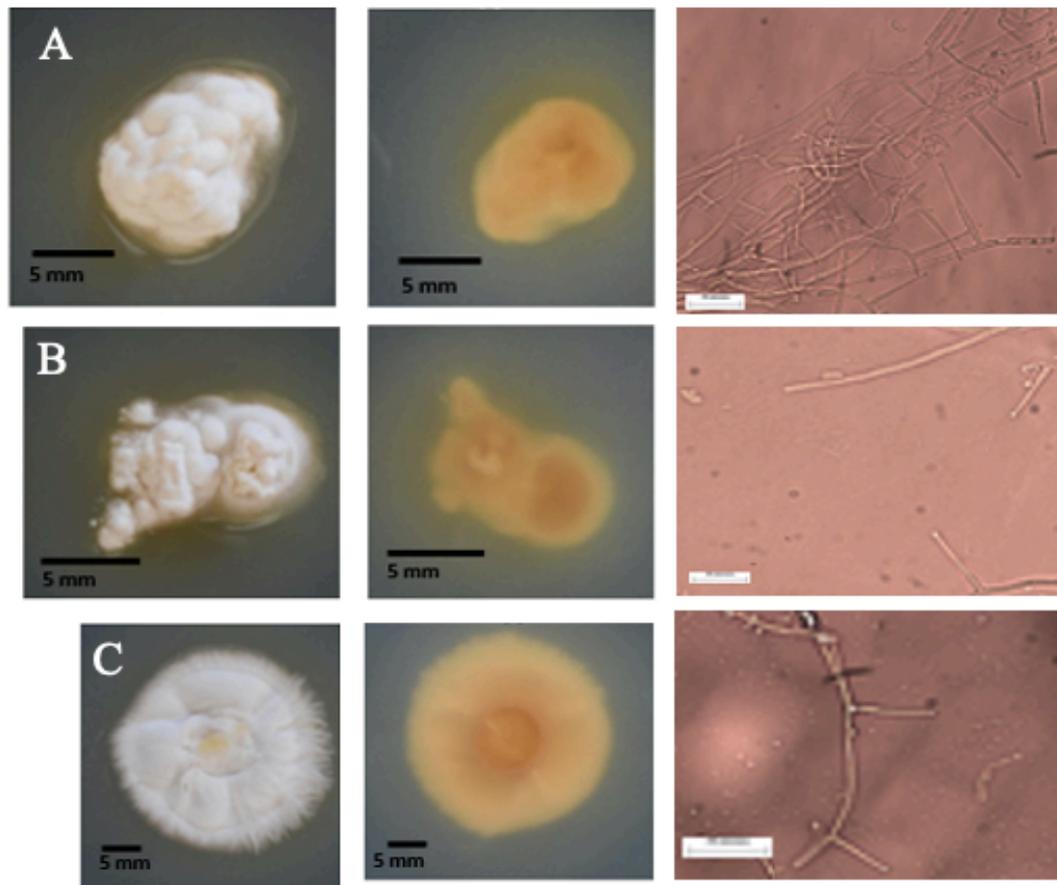


Figura S8. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 8 (A) 23 (B) y 33 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19384 - Genotipo 3

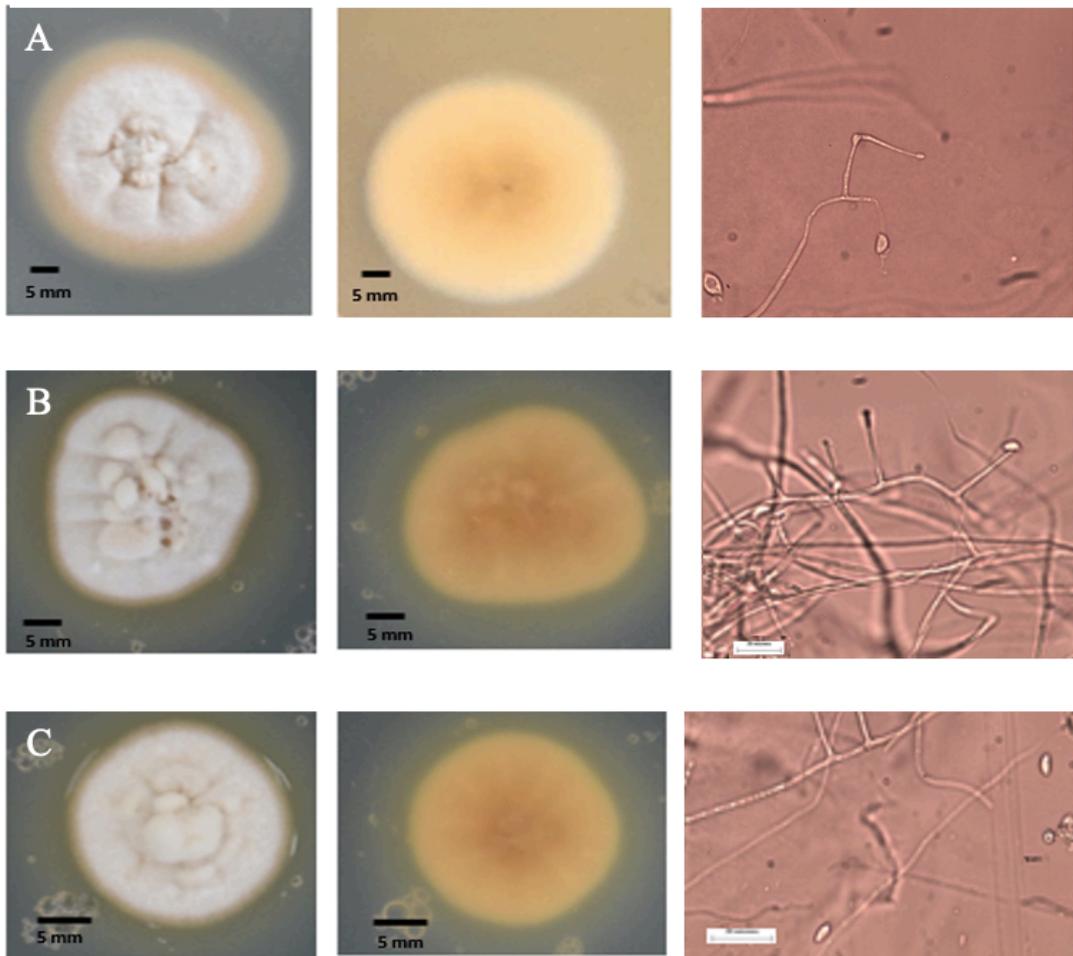


Figura S9. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 1880 (A) 1883 (B) y 1885 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19378 - Genotipo 3

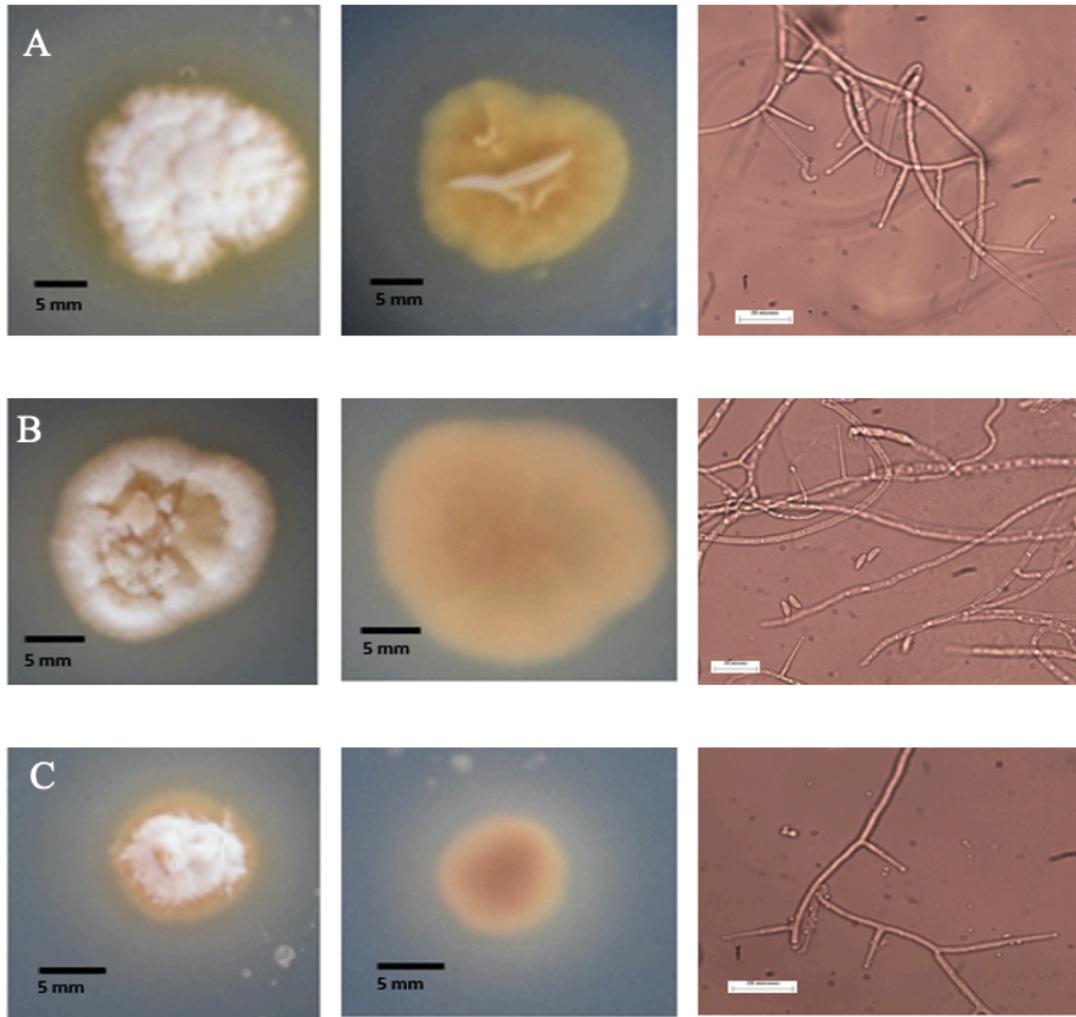


Figura S10. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 1907 (A) 1915 (B) y 1916 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19379 - Genotipo 3

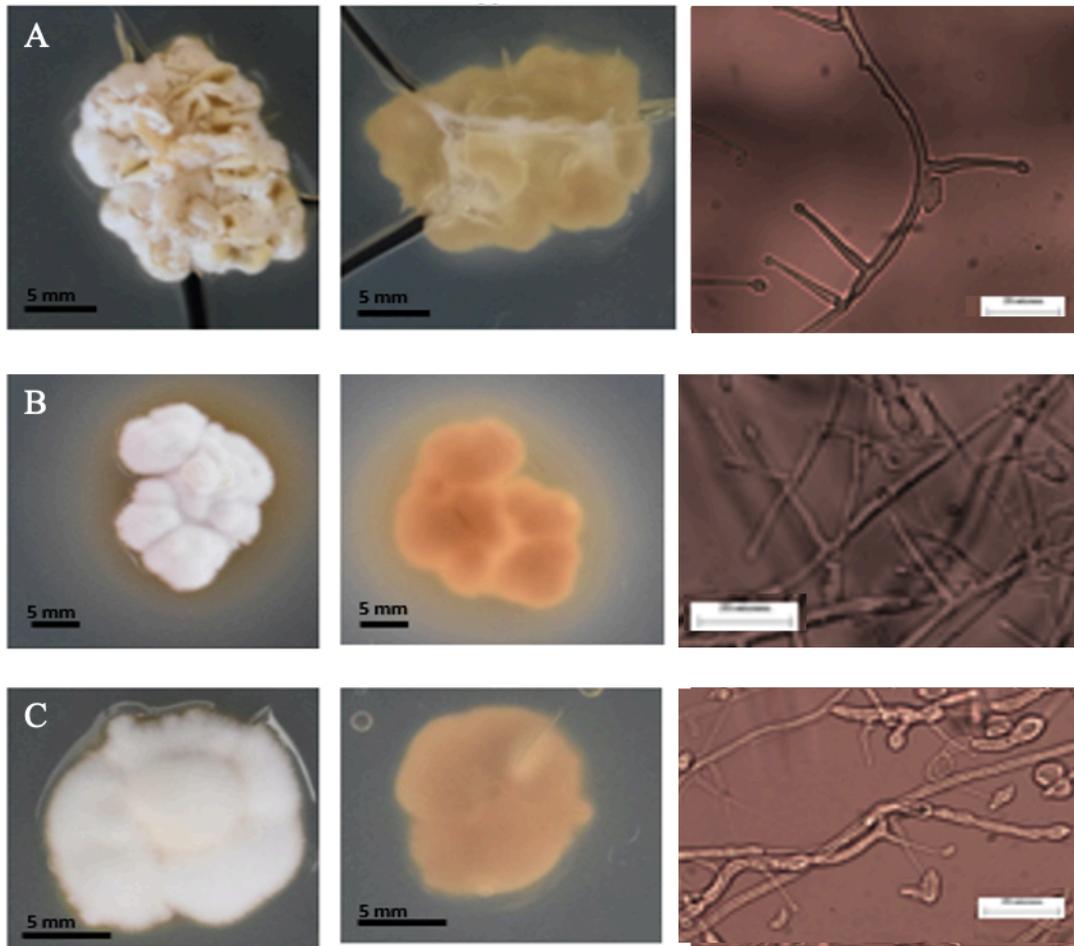
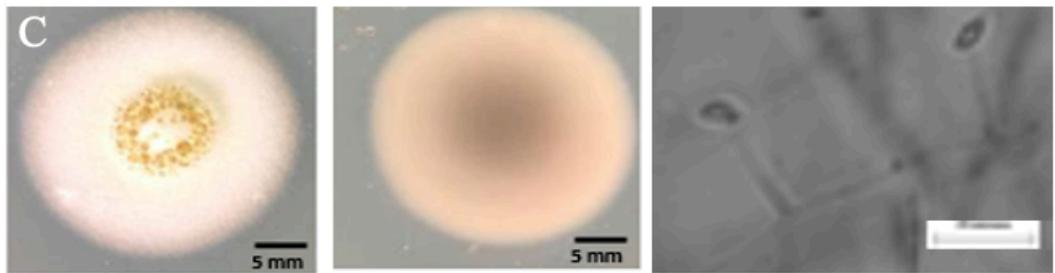
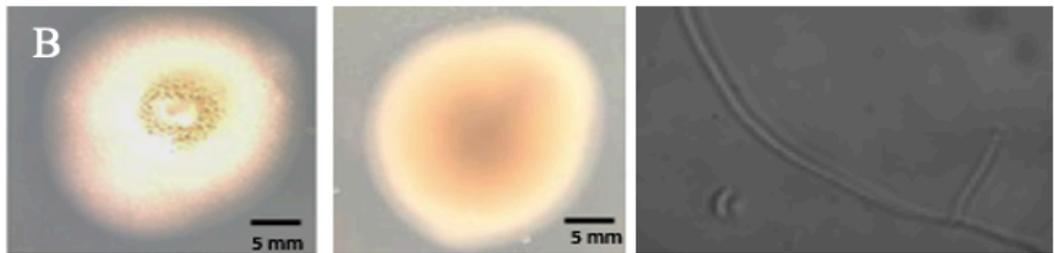
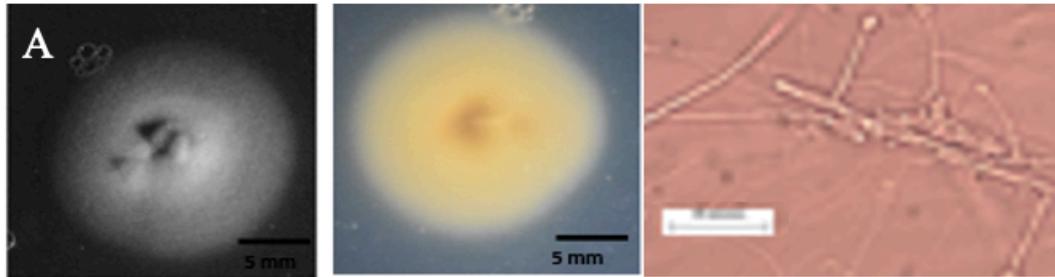


Figura S11. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 1330 (A) 1329 (B) y 1346 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2μm

Aislamientos de accesión 19947 - Genotipo 4 y 9



Aislamiento de accesión 19952 - Genotipo 2 y 4

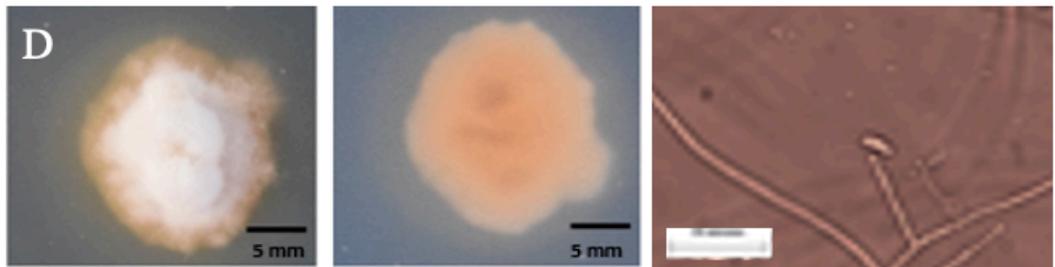


Figura S12. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 911 (A) 933 (B) 936 (C) y 943 (D) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19958 - Genotipo 5

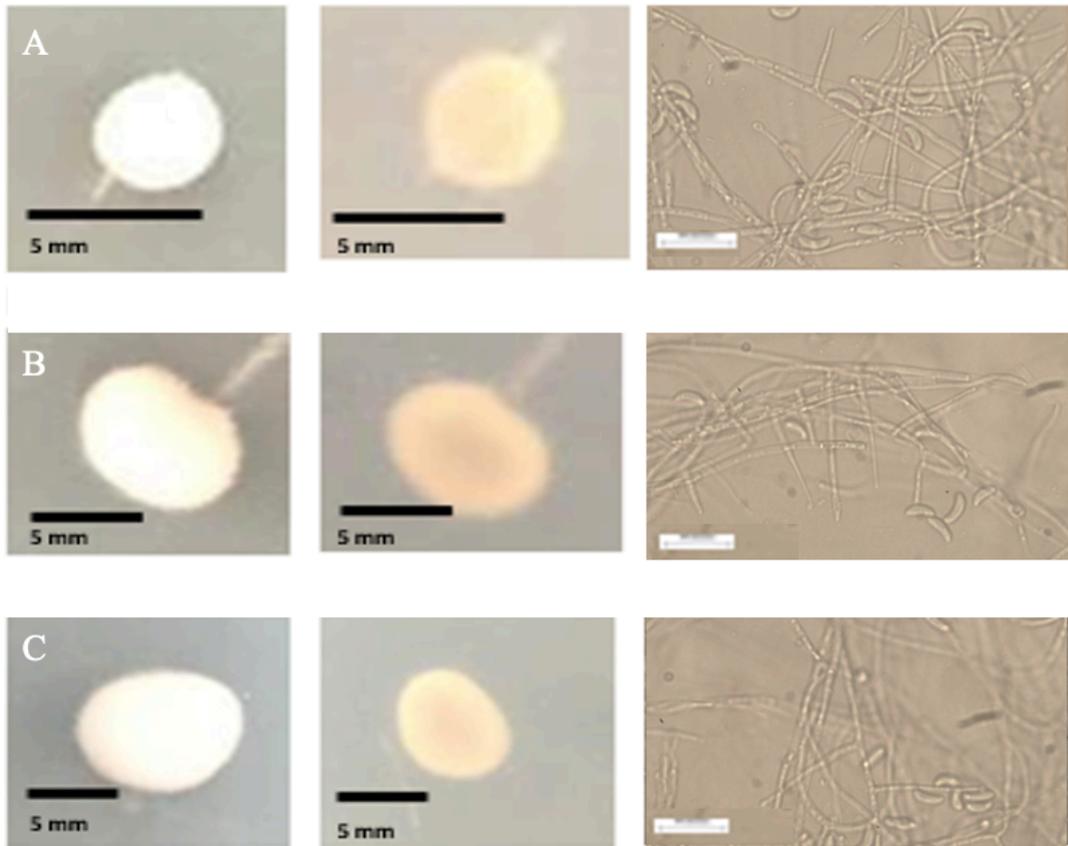


Figura S13. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 1 (A) 2 (B) y 3 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19971 - Genotipo 6

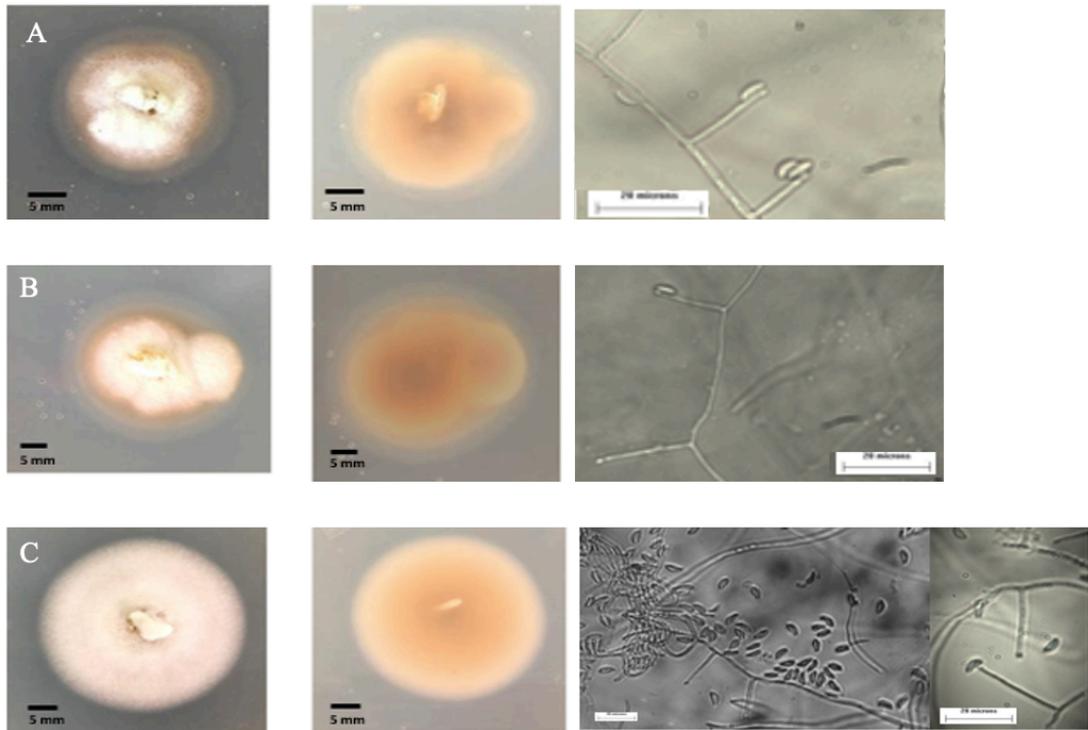


Figura S14. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 574 (A) 575 (B) y 579 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19388 - Genotipo 7

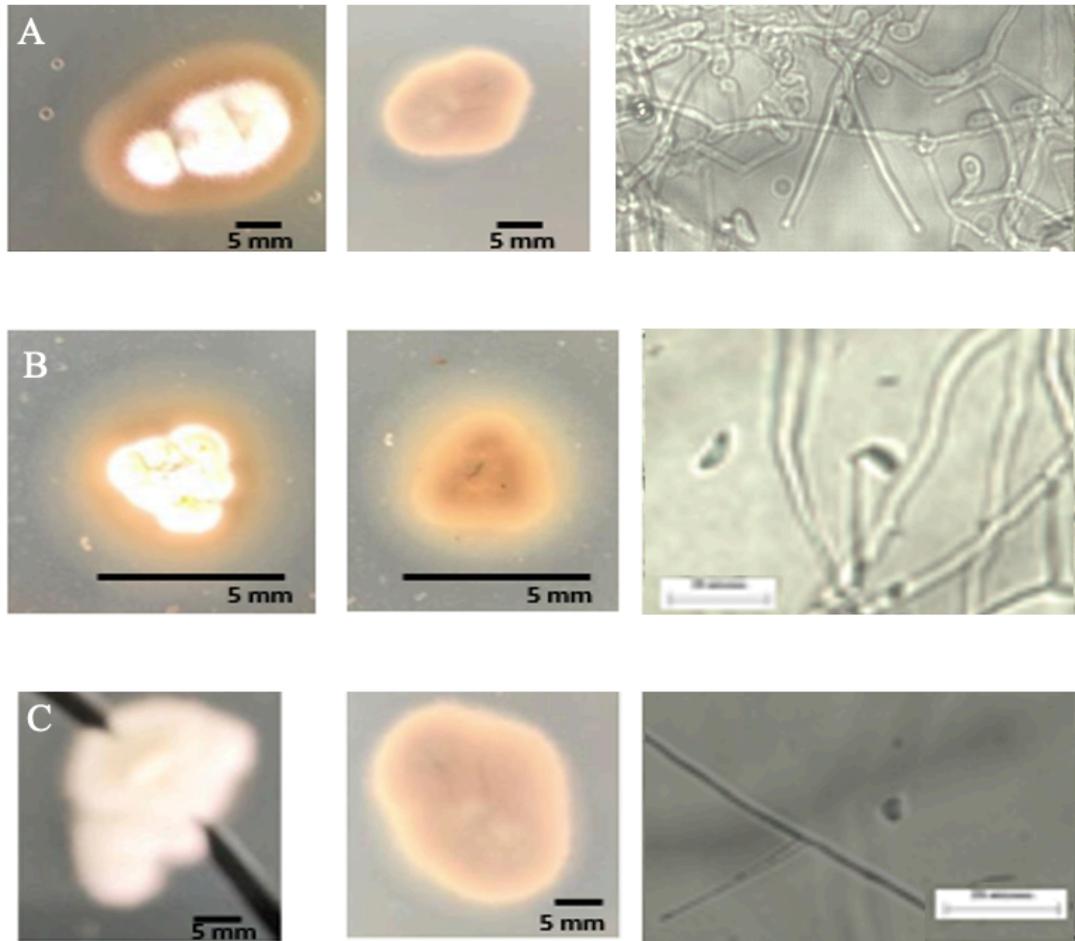


Figura S15. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 808 (A) 831 (B) y 809 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

Aislamientos de accesión 19385 - Genotipo 8

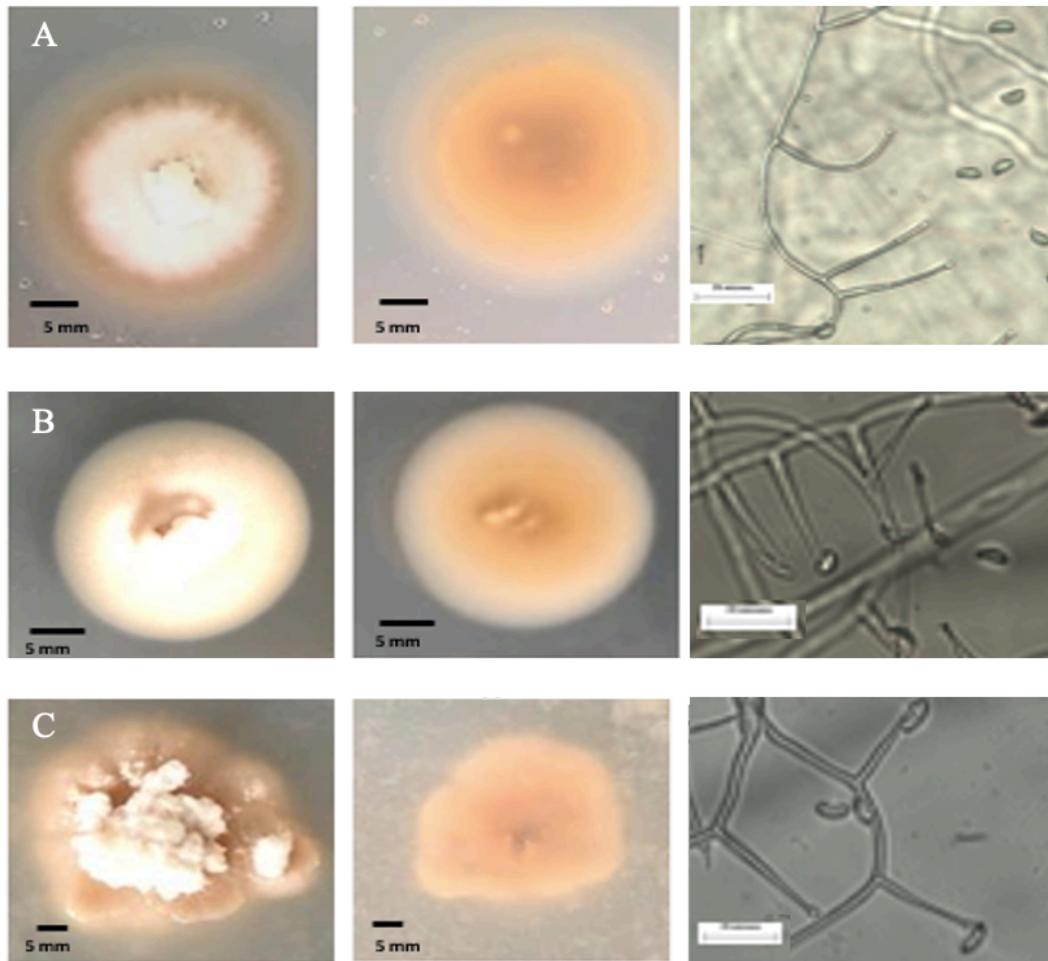


Figura S16. Colonias y morfología conidial de aislamientos de endófito a partir de las plantas 808 (A) 831 (B) y 809 (C) de *Bromus auleticus*. Las colonias son de 30 días en PDAc a 24 C. Los cultivos para la observación de la ontogenia conidial se cultivaron en agar agua. 40x= 2um

3. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GLOBALES

El estudio de la diversidad genética de endófitos utilizando la técnica de PCR multiplex permitió identificar con éxito los genotipos de endófitos presentes en las poblaciones de *B. auleticus* basados según los genes involucrados en la síntesis de alcaloides y tipo de apareamiento. Este método permite identificar de forma sólida los perfiles genéticos con características agronómicas interesantes, como por ejemplo sin capacidad tóxica para animales e independientemente de la viabilidad del endófito y/o tejido vegetal evaluado (Takach y Young, 2014).

Posteriormente, con apoyo de la caracterización morfológica y química se logró agrupar los genotipos en morfotipos y asociarlos a cuatro linajes diferentes que dieron origen a los endófitos nativos de *Bromus auleticus*: *E. pampeana* (Iannone et al., 2009), *E. tembaderae* (Cabral et al., 1999), y dos linajes diferentes en concordancia con los descriptos en otros estudios de endófitos de *B. auleticus* (Mc Cargo, 2015, Iannone, 2018). Uno producto de la hibridación de *E. festucae* x *E. typhina* x *E. elymi* nombrado como *E. platensis* y otro nuevo linaje *E. amarillans/E. baconii* x *E. typhina* no descrito aún en *Bromus auleticus*, pero sí en *Phleum alpinum* (Mc Cargo et al., 2014) y en *Hordeum comosum* de la Patagonia Argentina (Iannone et al., 2015). Los resultados de este estudio proporcionan información sobre la diversidad genotípica de endófitos presentes en poblaciones de esta gramínea forrajera y respalda la evidencia de la existencia de varias especies de endófitos.

Encontramos dos aspectos interesantes a raíz de nuestros resultados. En primer lugar, la diferenciación en la incidencia y distribución de cada endófito identificado y en segundo lugar la distinción en la capacidad toxicogénica de cada uno. Ambos puntos no son independientes, debido a que los beneficios que son atribuibles a las plantas hospederas a través de los alcaloides pueden definir la distribución y la selección a favor de determinado genotipo de endófito. En este sentido, en el país no se cuentan con plagas propias de determinadas zonas, que puedan generar presión de selección a favor por determinada asociación. Pero si factores abióticos como tipo de suelo, precipitaciones, temperatura que pueden condicionar la incidencia y distribución de determinada asociación.

Uruguay consta con un diverso germoplasma de *Bromus auleticus*, que está asociado a cepas endofíticas que enriquecen el valor *per se* de la gramínea forrajera. Ninguno de los endófitos identificados presentó la capacidad de sintetizar compuestos tóxicos a mamíferos como lolitrem B o alcaloides del ergot complejos. Solamente en la familia de los indol diterpenos se predicen como potenciales productores de paspalina, paxilina y terpendol I a *E. tembladerae* y *E. platensis* en el caso de los últimos dos. Cabe destacar que no se asocian a efectos tóxicos en el ganado (Young et al., 2009).

Desde el punto de vista de los beneficios contra la herbivoría, el genotipo 1 manifestó resistencia constitutiva contra *R. padi*. Este endófito demostró con éxito su acción anti-áfido en el ensayo de antibiosis al reducir la performance de los áfidos ubicados en las plantas infectadas en contraposición a los mantenidos en plantas sin endófito. Según la predicción de alcaloides, este endófito tiene la capacidad de producir peramina y N-formilolina como compuesto final. Es decir, que también tiene la capacidad de producir compuestos intermediarios de la ruta de biosíntesis de la familia de las lolinas. Esta familia, además se destaca por presentar un amplio espectro de acción, tanto respecto a las especies de insectos que afecta como a los estados de desarrollo de los mismos (Riedell et al., 1991). Por lo tanto, el endófito de genotipo 1 presenta muy buenas características como agente bio-controlador de insectos plaga. Constituyendo una potencial herramienta para un programa de mejoramiento de gramíneas forrajeras que busque reducir el uso de insecticidas. Por lo tanto, podría ser una línea de investigación a desarrollar para poder continuar con el estudio de los beneficios que se pueden obtener de este tipo de asociación mutualista. Por ejemplo, evaluar el efecto de los endófitos en otros insectos plagas, para identificar también genotipos con acción disuasiva en insectos masticadores, o evaluar los efectos positivos de los endófitos frente a estreses abióticos.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

- Ahlholm JU, Helander M, Lehtimäki S, Wäli P, Saikkonen K. 2002. Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos*, 99(1): 173-183.
- Arachevaleta M, Bacon CW, Hoveland CS, Radcliffe DE. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal*, 81(1): 83-90.
- Araya H, Kobayashi M, Ebina M, Nakagawa H, Nishihara E, Fujimoto Y. 2003. Identification of two 5 α ,8 α -epidioxyergosta-3 β -ols from the endophyte, *Neotyphodium lolii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 1337-1339.
- Bacetty AA, Snook ME, Glenn AE, Noe JP, Hill N, Culbreath A, Timper P, Nagabhyru P, Bacon CW. 2009. Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *Phytopathology*, 99(12): 1336-1345.
- Bacon, CW, Porter JK, Robbins JD, Luttrell ES. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology*, 34: 576-581.
- Bastias S, Martínez-Ghersa M, Ballaré C, Gundel P. 2017. *Epichloë* fungal endophytes and plant defenses: Not just alkaloids. *Trends in Plant Science*, 22(11): 939-948. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.005>
- Bazely R, Ball J, Vicari M, Tanentzap A, Bérenger M, Rakocevic T, Kok S. 2007. Broad-scale patterns in the distribution of vertically transmitted, asexual endophytes in four naturally- occurring grasses in Sweden. *Ecography*, 30: 367-374.
- Bentancourt CM, Morelli E. 2009. *Insectos de Uruguay*. Montevideo. Facultad de Agronomía-Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 658 p.

- Bräse S, Encinas A, Keck J, Nising C. 2009. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*, 109: 390-399.
- Brundrett M. 2006. Understanding the Roles of Multifunctional Mycorrhizal and Endophytic Fungi. En: Schulz BJ, Boyle CJ, Sieber TN. (eds). *Microbial Root Endophytes*. *Soil Biology*, vol 9. Berlin, Heidelberg, Springer.
- Bustamante E, Ruiz M, Morici E, Babinec F, Pordomingo A. 2012. Accumulated biomass and nutritional quality indicators in Cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trinius ex Nees). *Revista de Investigaciones Agropecuarias - INTA* 38:3.
- Cabral D, Cafaro M, Saidman B, Lugo M, Reddy P, White Jr JF. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia*, (2): 315-325.
- Card S, Rolston M, Park Z, Cox N, Hume D. 2011. Fungal endophyte detection in pasture grass seed utilising the infection layer and comparison to other detection techniques. *Seed Science and Technology* 39: 581-592
- Charlton ND, Craven K, Afkhami ME, Hall B, Ghimire S, Young CA. 2014. Interspecific hybridization and bioactive alkaloid variation increases diversity in endophytic *Epichloë* species of *Bromus laevipes*. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1): 276-289.
- Cheplick G, Faeth S. 2009. *The Ecology and Evolution of the Grass-Endophyte Symbiosis*. New York: Oxford University Press. 241 p.
- Christensen M, Bennett R, Ansari H, Koga H, Johnson R, Bryan G, Simpson W, Koolaard J, Nickless E, Voisey C. 2008. *Epichloë* endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. *Fungal Genetics and Biology*, 45(2): 84-93.

- Clarke B, White Jr J, Hurley R, Torres M, Sun S, Huff D. 2006. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease*, 90(8): 994-998.
- Clay K, Schardl C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160(4): 99-127.
- Clay K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69(1): 10-16.
- Clay K. 1987. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*, 73: 358-362 .
- Condón F, Jaurena M, Reyno R, Otaño C, Lattanzi F. 2017. Spatial analysis of genetic diversity in a comprehensive collection of the native grass *Bromus auleticus* Trinius (ex Nees) in Uruguay. *Grass and Forage Science*, 72: 723-733.
- Correa R, Rhoden S, Mota T. 2014. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 41: 1467-1478.
- De Bary A. 1866. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. En: Wilh Hafmaister (Eds.). *Physiological Botany*. Leipzig, Germany, Verlag Engelmann, 136 p.
- Doss R, Welty R. 1995. A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology* 85: 913-917.
- Easton H, Christensen M, Eerens J, Fletcher L, Hume D, Keogh R, Tapper B. 2001. Ryegrass endophyte: a New Zealand Grassland success story. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 63: 37-46.
- Faeth S, Shochat E. 2010. Inherited microbial symbionts increase herbivore abundances and alter arthropod diversity on a native grass. *Ecology*, 91(5): 1329-1343.

- Faeth S, Helander M, Saikkonen K. 2004. Asexual *Neotyphodium* endophytes in a native grass reduce competitive abilities. *Ecology Letters*, 7(4): 304-313.
- Faeth S, Sullivan T. 2003 Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *The American Naturalist*, 161: 310-325
- Fletcher L, Harvey I. 1981. An association of a lolium endophyte with ryegrass staggers. *New Zealand Veterinary Journal*, 29: 185-186.
- Gentile A, Rossi M, Cabral D, Craven K, Schardl C. 2005. Origin, divergence, and phylogeny of *Epichloë* endophytes of native Argentine grasses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(1): 196-208.
- Granath G, Vicari M, Bazely D, Ball J, Puentes A, Rakocevic T. 2007. Variation in the abundance of fungal endophytes in fescue grasses along altitudinal and grazing gradients. *Ecography*, 30: 422-430.
- Gundel P, Helander M, Casas C. 2013. *Neotyphodium* fungal endophyte in tall fescue (*Schedonorus phoenix*): a comparison of three Northern European wild populations and the cultivar Kentucky-31. *Fungal Diversity*, 60: 15-24.
- Gwinn K, Gavin A. 1992. Relationship between endophyte infestation level of tall fescue seed lots and *Rhizoctonia zae* seedling disease. *Plant Disease*, 76: 911-914.
- Hahn H, Huth W, Schöberlein W, Diepenbrock W, Weber W. 2003. Detection of endophytic fungi in *Festuca* spp. by means of tissue print immunoassay. *Plant Breeding*, 122: 217-222.
- Hamilton C, Faeth S, Dowling T. 2009. Distribution of hybrid fungal symbionts and environmental stress. *Microbial Ecology*, 58(2): 408-413.
- Hesse U, Schöberlein W, Wittenmayer L, Förster K, Warnstorff K, Diepenbrock W, Merbach W. 2003. Effects of *Neotyphodium* endophytes on growth, reproduction

and drought-stress tolerance of three *Lolium perenne* L. genotypes. *Grass and Forage Science*, 58(4): 407-415.

Hettiarachchige I, Ekanayake P, Mann R, Guthridge K, Sawbridge T, Spangenberg G, Forster J. 2015. Phylogenomics of asexual *Epichloë* fungal endophytes forming associations with perennial ryegrass. *BMC Evolutionary Biology* 15:72. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0349-6>

Hume D, Ryan G, Gibert A, Helander M, Mirlohi A, Sabzalain M. 2016. *Epichloë* Fungal Endophytes for Grassland Ecosystems. En: Lichtfouse E. (eds) *Sustainable Agriculture Reviews*. Cham, Springer, 19: 233-305.

Iannone L. 2018. Evolution and ecology of *Epichloë* in South America. En: *International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses* (10, Salamanca, España). Proceedings.

Iannone L, Irisarri J, Mc Cargo P, Pérez L, Gundel P. 2015. Occurrence of *Epichloë* fungal endophytes in the sheep-preferred grass *Hordeum comosum* from Patagonia. *Journal of Arid Environments*, 115:19-26.

Iannone L, Mc Cargo P, Giussani L, Schardl C. 2012a. Geographic distribution patterns of vertically transmitted endophytes in two native grasses in Argentina. *Symbiosis* 59(2): 99-110.

Iannone L, Novas M, Young C, De Battista J, Schardl C. 2012b. Endophytes of native grasses from South America: Biodiversity and ecology. *Fungal Ecology* 5(3): 357-363.

Iannone L, Pinget A, Nagabhyru P, Schardl C, De Battista J. 2012c. Beneficial effects of *Neotyphodium tembladerae* and *Neotyphodium pampeanum* on a wild forage grass. *Grass and Forage Science* 67(3): 382-390.

- Iannone L, White JF, Giussani L, Cabral D, Novas M. 2011. Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycological Progress*, 10(1): 9-19.
- Iannone L, Cabral D, Schardl C, Rossi M. 2009. Phylogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium* endophyte species in the grass *Bromus auleticus* from South America. *Mycologia*, 101(3): 340-351.
- Iannone L, Cabral D. 2006. Effects of the *Neotyphodium* endophyte status on plant performance of *Bromus auleticus*, a wild native grass from South America. *Symbiosis* 41(2): 61-69.
- Jensen J, Popay A, Tapper B. 2009. Argentine stem weevil adults are affected by meadow fescue endophyte and its loline alkaloids. *New Zealand Plant Protection*, 62: 12-18.
- Johnson L, de Bonth A, Briggs M. 2013. The exploitation of epichloae endophytes for agricultural benefit. *Fungal Diversity*, 60: 171-188.
- Johnson L, Johnson R, Schardl C, Panaccione D. 2003. Identification of differentially expressed genes in the mutualistic association of tall fescue with *Neotyphodium coenophialum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63(6): 305-317.
- Kauppinen M, Saikkonen K, Helander M, Pirttilä A, Wäli P. 2016. *Epichloë* grass endophytes in sustainable agriculture. *Nature Plants* 2, 15224. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.224>
- Kessler A, Baldwin I. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291: 2141-2144.
- Kimmons C, Gwinn K, Bernard E. 1990. Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Disease*, 74(10): 757-761.

- Koshino H, Terada S, Yoshihara T, Sakamura S, Shimanuki T, Sato T, Tajimi A. 1988. Three phenolic acid derivatives from stromata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*. *Phytochemistry*, 27: 1333-1338.
- Koulman A, Lane G, Christensen, M, Fraser K, Tapper B. 2007. Peramine and other fungal alkaloids are exuded in the guttation fluid of endophyte-infected grasses. *Phytochemistry* 68(3): 355-360.
- Lembicz M, Górczyńska K, Olejniczak P, Leuchtman A. 2011. Geographical distribution and effects of choke disease caused by *Epichloë typhina* in populations of the grass *Puccinellia distans* in Poland. *Sydowia*, 63: 35-48
- Leuchtman A, Schardl C, White Jr JF, Tadych M. 2014. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia*, 106(2): 202-215.
- Leuchtman A, Schmidt D, Bush L. 2000. Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *Journal of Chemical Ecology* 26(4): 1025-1036.
- Li T, Blande J, Gundel P, Helander M, Saikkonen K. 2014. *Epichloë* Endophytes Alter Inducible Indirect Defences in Host Grasses. *PLOS ONE*, 9 (6): e101331.
- Llado C, Mendy P, Vaz A. 1994. Evaluación de gramíneas invernales en mezclas forrajeras sometidas a diferente fertilización, método de siembra y manejo. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 74 p.
- Mahmood T, Gergerich R, Milus E, West C, D'Arcy J. 1993. Barley yellow dwarf viruses in wheat, endophyte-infected and endophyte-free tall fescue, and other hosts in Arkansas. *Plant Disease*, 77: 225-228.
- Malinowski D, Belesky D. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40(4): 923-940.

- Mc Cargo P. 2015. Evolución y diversidad de endofitos *Epichloë* de la forrajera nativa *Bromus auleticus* . Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 136 p.
- Mc Cargo PD, Iannone L, Vignale M, Schardl C, Rossi MS. 2014. Species diversity of *Epichloë* symbiotic with two grasses from southern Argentinean Patagonia. *Mycologia*, 106(2): 339-352.
- Millot J. 2001. *Bromus auleticus*: una nueva especie domesticada. In: Diálogo LVI: los recursos fitogenéticos del género *Bromus* en el cono sur. Montevideo, Uruguay, PROCISUR-IICA, 3-5 p.
- Moon C, Craven K, Leuchtman A, Clement S, Schardl C. 2004. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. *Molecular Ecology*, 13(6): 1455-1467.
- Moon C, Miles C, Järlfors U, Schardl C. 2002. The evolutionary origins of three new Neotyphodium endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. *Mycologia*, 94(4): 694-711.
- Moon C, Scott B, Schardl C, Christensen M. 2000. Evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia*, 92(6): 1103-1118.
- Moy M, Li H, Sullivan R, White Jr JF, Belanger F. 2002. Endophytic fungal β -1, 6-glucanase expression in the infected host grass. *Plant Physiology*, 130(3): 1298-1308.
- Müller C, Krauss J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 450-456.
- Novas M, Iannone L, Godeas A, Cabral D. 2009. Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycological Progress*, 8(1): 75-81.

- Novas M, Collantes M, Cabral D. 2007. Environmental effects on grass-endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(1): 164-173.
- Novas M, Cabral D, Godeas A. 2005. Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis*, 40(1): 23-30.
- Novas M, Gentile A, Cabral D. 2003. Comparative study of growth parameters on diaspores and seedlings between populations of *Bromus setifolius* from Patagonia, differing in *Neotyphodium* endophyte infection. *Flora*, 198: 421-426.
- Oberhofer M, Leuchtman A. 2014. Horizontal transmission, persistence and competition capabilities of *Epichloë* endophytes in *Hordelymus europaeus* grass hosts using dual endophyte inocula. *Fungal Ecology*, 11: 37-49.
- Omacini M, Eggers T, Bonkowski M, Gange A, Jones T. 2006. Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology*, 20(2): 226-232.
- Omacini M, Chaneton E, Ghersa C. 2005. A hierarchical framework for understanding the ecosystem consequences of endophyte-grass symbioses. En: Roberts CA, West CP, Spiers DE. (Eds.). *Neotyphodium* in Cool-Season Grasses. Ames Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, 6:141-162.
- Omacini M, Chaneton E, Ghersa C, Müller C. 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature*, 409: 78-81.
- Pan J, Bhardwaj M, Nagabhyru P, Grossman R, Schardl C. 2014. Enzymes from fungal and plant origin required for chemical diversification of insecticidal loline alkaloids in grass-*epichloë* symbiota. *PloS One*, 9 (12): e115590.
- Panaccione D, Johnson R, Wang J, Young C, Damrongkool P, Scott B, Schardl C. 2001. Elimination of ergovaline from a grass *Neotyphodium* endophyte

- symbiosis by genetic modification of the endophyte. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 12820-12825.
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. En: Andrews J.H., Hirano S.S. (eds) Microbial Ecology of Leaves. Springer Series in Contemporary Bioscience. New York, Springer, 179-197p.
- Petrini O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. En: Fokkema NJ and van den Heuvel J. (Eds.). Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 175-187 p.
- Philpson M, Christey M. 1986. The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*, New Zealand Journal of Botany, 24(1): 125-134. DOI: 10.1080/0028825X.1986.10409724
- Potter D, Patterson C, Redmond C. 1992. Influence of turfgrass species and tall fescue endophyte on feeding ecology of Japanese beetle and southern masked chafer grubs (Coleoptera, Scarabaeidae). Journal of Economic Entomology, 85: 900-909 p.
- Press A, Spyreas G, Gibson D, Basinger M. 2015. Endophyte Infection Levels of Native and a naturalized fescue in Illinois and England. Torrey Botanical Society, 28(1): 25-34.
- Ren A, Gao Y, Zhou F. 2007. Response of *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass to phosphorus deficiency. Plant Soil and Environment, 53: 113-119 p.
- Ribeiro A, Silva H, Abbate S. 2014. Manejo de plagas en trigo y cebada. Ediciones universitarias, Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. 62p.
- Riedell WE, Kieckhefer RE, Petroski RJ, Powell RG. 1991. Naturally occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity. Journal of Entomological Science, 26: 122–129.

- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New Phytologist*, 182(2): 314-330.
- Rowan DD, Dymock JJ, Brimble MA. 1990. Effect of fungal metabolite peramine and analogs on feeding and development of Argentine stem weevil (*Listronotus bonariensis*). *Journal of Chemical Ecology*, 16: 1683-1695.
- Saikkonen K, Gundel PE, Helander M. 2013. Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 962-968.
- Saikkonen K, Wäli PR, Helander M. 2010. Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PloSOne*, 5 (6): e11395.
- Saikkonen K, Lehtonen P, Helander M, Koricheva J, Faeth S. 2006. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. *Trends Plant Science*, 11: 428-433
- Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends Plant Science*, 9: 275-280.
- Schardl CL, Young CA, Moore N, Krom N, Dupont P-Y, Pan J, Florea S, Webb JS, Jaromczyk J, Jaromczyk JW, Cox MP, Farman ML. 2014. Genomes of plant associated Clavicipitaceae. *Advances in Botanical Research*, 70: 291-327.
- Schardl CL, Young CA, Hesse U, Amyotte SG, Andreeva K, Calie PJ, Fleetwood DJ, Haws DC, Moore N, Oeser B, Panaccione DG, Schweri KK, Voisey CR, Farman ML, Jaromczyk JW, Roe BA, O'Sullivan DM, Scott B, Tudznski P, Zhiqiang A, Arnaoudova EG, Bullock CT, Charlton ND, Chen L, Cox M. 2013a. Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *PLoS Genetics*, 9 (2): e1003323.
- Schardl CL, Young CA, Pan J, Florea S, Takach JE, Panaccione DG, Farman ML, Webb JS, Jaromczyk J, Charlton ND, Nagabhyru P, Chen L, Schi C, Leuchtman

- A. 2013b. Currencies of mutualisms: sources of alkaloid genes in vertically transmitted epichloae. *Toxins*, 5(6): 1064-1088.
- Schardl CL, Florea S, Pan J, Nagabhyru P, Bec S, Calie P. 2013c. The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(4): 480-488
- Schardl CL, Young CA, Faulkner J, Florea S, Pan J. 2012. Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology*, 5(3): 331-344
- Schardl C. 2010. The epichloae, symbionts of the grass subfamily Poöideae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 97(4): 646–665.
- Schardl CL, Grossman RB Nagabhyru P, Faulkner J, Mallik U. 2007. Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry*, 68(7): 980-996.
- Schardl CL, Leuchtman A, Spiering M. 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 315-340.
- Schardl CL, Craven K. 2003. Interspecific hybridization in plant- associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology*, 12: 2861-2873.
- Schardl CL, Phillips T.1997. Protective grass endophytes: where are they from and where are they going? *Plant Disease*, 81(5): 430-438.
- Schulthess F, Faeth S. 1998. Distribution, abundances and associations of endophytic fungal community of Arizona fescue (*Festuca arizonica*). *Mycologia*, 90: 569-578.
- Scott B, Takemoto D, Tanaka A, Young C, Bryant M, May K. 2007. Functional analysis of the *Epichloe festucae*-perennial ryegrass symbiosis. En: International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses (6th, 2006, Dunedin, New Zealand). Proceedings. Grassland Research and Practice Series, 13: 433–441

- Scott B, Schardl C. 1993. Fungal symbionts of grasses: evolutionary insights and agricultural potential. *Trends in Microbiology*, 1(5):196–200.
- Soleimani M, Hajabbasi M, Afyuni M, Mirlohi A, Borggaard O, Holm P. 2010. Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. *International Journal of Phytoremediation*, 12(6): 535-549
- Song Q, Li F, Nan Z, Coulter, JWei W. 2020. Do *Epichloë* endophytes and their grass symbiosis only produce toxic alkaloids to insects and livestock? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68:1169-1185.
- Song M, Li X, Saikkonen K, Li C, Nan Z. 2015. An asexual *Epichloë* endophyte enhances waterlogging tolerance of *Hordeum brevisubulatum*. *Fungal Ecology*, 13:44-52.
- Spiering M, Moon C, Wilkinson H, Schardl CL. 2005. Gene Clusters for Insecticidal Loline Alkaloids in the Grass-Endophytic Fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics*, 169(3): 1403-1414.
- Tadych M, Bergen M, Dugan F, White Jr J. 2007. Evaluation of the potential role of water in spread of conidia of the *Neotyphodium* endophyte of *Poa ampla*. *Mycological research*, 111(4): 466-472.
- Tanaka A, Tapper B, Popay A, Parker E, Scott B. 2005. A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology*, 57(4): 1036-1050.
- Tian P, Nan Z, Li C, Spangenberg G. 2008. Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 122(4): 593-602.

- Unsicker S, Kunert G, Gershenzon J. 2009. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4): 479-485.
- Vignale M, Astiz-Gassó M, Novas M, Iannone L. 2013. Epichloid endophytes confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus* (Trin.). *Biological Control*, 67(1):1-7.
- Walls J, Rajotte E, Rosa C. 2019. The Past, Present, and Future of Barley Yellow Dwarf Management. *Agriculture*, 9(1): 23.
- White J, Sullivan RF, Balady G, Gianfagna T, Yue Q, Meyer W, Cabral D. 2001. A fungal endosymbiont of the grass *Bromus setifolius*: distribution in some Andean populations, identification and examination of beneficial properties. *Symbiosis*, 31: 241-257.
- Wilkinson H, Siegel M, Blankenship J, Mallory A, Bush L, Schardl C. 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 13(10): 1027-1033.
- Young CA, Hume D, Mcculley R. 2013. Forages and pastures symposium: Fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: Pasture friend or foe? *Journal of Animal Science*, 91(5): 2379-2394. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5951>
- Young C, Tapper B, May K, Moon C, Schardl C, Scott B. 2009. Indole-diterpene biosynthetic capability of *Epichloë* endophytes as predicted by *ltm* gene analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7): 2200-2211.
- Young C, Felitti S, Shields K, Spangenberg G, Johnson RD, Bryan GT, Saikia S, Scott B. 2006. A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(10): 679-693.

- Yue Q, Miller C, White Jr JF, Richardson M. 2000. Isolation and characterization of Fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(10): 4687- 4692.
- Zaurov D, Bonos S, Murphy JA, Richardson M, Belanger F. 2001. Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. Crop Science, 41(6): 1981-1984.
- Züst T, Agrawal A. 2016. Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. Nature Plants 2, 15206. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.206>