

Tesis Doctoral

Interacción de los endofitos fúngicos de gramíneas con el hospedante, las micorrizas y el medio ambiente en la Patagonia Austral

Novas, María Victoria

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Novas, María Victoria. (2003). Interacción de los endofitos fúngicos de gramíneas con el hospedante, las micorrizas y el medio ambiente en la Patagonia Austral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3692_Novas

Cita tipo Chicago:

Novas, María Victoria. "Interacción de los endofitos fúngicos de gramíneas con el hospedante, las micorrizas y el medio ambiente en la Patagonia Austral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3692_Novas

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

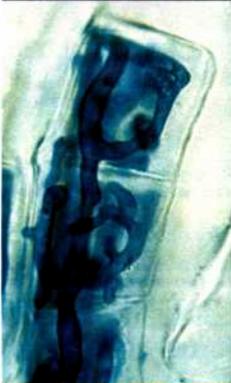


UBA

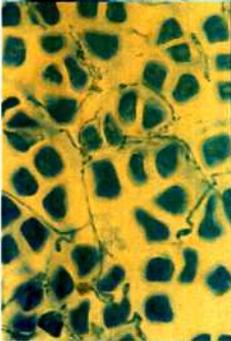
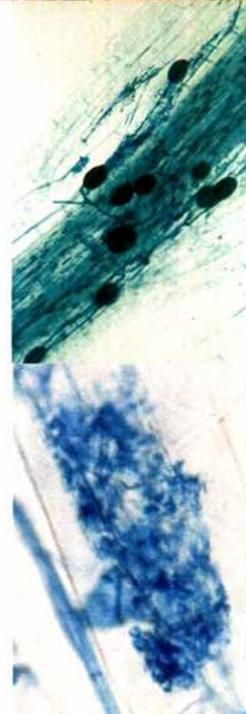
Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales

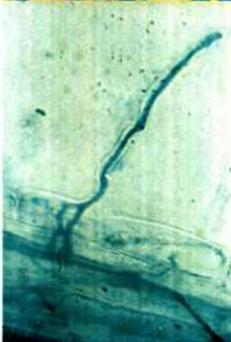


**“Interacción de los endofitos
fúngicos de gramíneas con el
hospedante, las micorrizas y el
medio ambiente en la
Patagonia Austral”**



Lic. María Victoria Novas

Director: Dr. Daniel Cabral
Directora: Dra. Alicia Godeas



Tesis presentada para optar al título
de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires

2003



#3692

AGRADECIMIENTOS

A mi director Daniel Cabral por haber depositado toda su confianza en mi para la realización de este trabajo así como por haberme dado la posibilidad de conocer nuestra entrañable Patagona austral

A mi directora Alicia Godeas por su apoyo, estímulo permanente y por compartir sus experiencias de vida.

A Marta Collantes por haber sido una inmejorable compañera de viaje, por su apoyo incondicional y su inagotable disposición para ayudarme.

A mis compañeros de laboratorio, Agus, Belén, Cora, Leo y Vicky, por su compañía permanente, su gran apoyo y por muchos riegos de macetas!!!! Los quiero mucho!!!!

A mis grandes amigas del 5, Ceci y Andre, por sus consejos, los ratos de terapia y el estímulo permanente para seguir adelante.

A Silvia por sus grandes consejos, su preocupación por ayudarme a resolver dificultades técnicas de urgencia y especialmente en esta última etapa por su paciencia en la atención que le robé de Daniel.

A Ale, Laura, Susana y Bernardo por su ayuda y compañía.

A las chicas del 12, Nadia, Vivi y Ale por su aliento.

A mi gran amiga Ale Ribichich por sus enormes consejos, su gran apoyo moral y por esta linda amistad que fuimos construyendo de a poco.

A Sandra Durman por compartir día a día la construcción de nuestras tesis y hacer que las dificultades parezcan más livianas.

A Mercedes y a Bruna.

A mis papas y mi hermano por su apoyo incondicional y por ser una familia sensacional.

A mi Lucas por aguantar mi cansancio y por ser el tesoro que todo lo vale. Con tu llegada descubrí que existe un amor infinito que no tiene barreras y que es delicioso.

A vos, Mike, por la tonelada de paciencia y tu infinito apoyo. Gracias por apoyarme en mi carrera y brindarme la oportunidad de hacer algo que disfruto tanto como es investigar. Te amo.

RESUMEN

"INTERACCIÓN DE LOS ENDOFITOS FÚNGICOS DE GRAMÍNEAS CON EL HOSPEDANTE, LAS MICORRIZAS Y EL MEDIO AMBIENTE".

En los últimos años se dirigió la atención al estudio de los endofitos de pastos (*Neotyphodium*) dada su importancia económica. Esta asociación se considera como simbiótico-mutualista. Algunos endofitos pueden producir alcaloides, en consecuencia, los pastos infectados (E +) resultan tóxicos para el ganado, pero también proveen beneficios, como mayor resistencia al estrés hídrico, mayor biomasa, resistencia a plagas y patógenos etc. que no se registran en los no infectados (E -).

Por primera vez se trabajó con la relación incidencia de endofitos/gramíneas nativas en la Patagonia. Esta asociación se correlaciona con a las características de los hospedantes, sus requerimientos y las condiciones ambientales

Se estudió la distribución e incidencia del género *Neotyphodium* en poblaciones nativas de gramíneas de la Patagonia austral y su correlación con características climáticas del lugar.

Se muestrearon poblaciones de *B. setifolius* de la provincia de Santa Cruz a través de una transecta SE-NO. La incidencia se asoció positivamente con las precipitaciones anuales. En Tierra del Fuego se muestrearon poblaciones de *Phleum commutatum* y *Poa rigidifolia*. La incidencia en *Ph. commutatum* se asocia negativamente con las precipitaciones. En *P. rigidifolia* y en *Ph. commutatum* se detectó una estrecha asociación entre la incidencia y las comunidades vegetales.

Se compararon parámetros de crecimiento en cariopses y plántulas entre poblaciones de *B. setifolius* que diferían en el estatus de infección endofítica, a través de ensayos. Las variables estudiadas mostraron valores significativamente mayores en las plantas E+.

En el mismo sistema se estudió la interacción de los endofitos y las micorrizas arbusculares . El porcentaje de micorrización de raíces tomadas de poblaciones naturales difirieron en la infección con endofitos, fue mayor en las E+. Experimentalmente se estudió la presencia/ausencia de endofitos, presencia/ausencia de micorrizas y tipo de suelo sobre la respuesta del hospedante. El porcentaje de micorrización fue significativamente mayor en las plantas E+. La respuesta del hospedante fue afectada por la presencia de endofitos y micorrizas con un efecto positivo de los endofitos sobre el desarrollo *B. setifolius* y una interacción positiva con las micorrizas arbusculares.

La distribución e incidencia de la colonización por endofitos estaría determinada por uno o más factores bióticos y abióticos. Cuando algunas de las condiciones del medio es extrema, el endofito deja de ser beneficioso para el hospedante y la relación se perdería evolutivamente. En oposición a lo postulado hasta el momento, en *B. setifolius*, la colonización por endofitos y hongos MA no es excluyente, sino que se favorecería.

INTRODUCCIÓN

Simbiosis endofítica

Endofito es el término genérico que se aplica a cualquier organismo que vive en el interior de los tejidos o células de una planta. Se han generado numerosas discusiones semánticas sobre su uso ya que se utiliza, en muchos casos, implicando una relación simbiótica que puede ser mutualista, patogénica o neutra por lo que el uso de otros términos podría ser mejor (Wennstrom, 1994).

Existe una gran variedad de organismos heterótrofos que viven en el interior de las plantas, por lo menos en una parte de su ciclo de vida, y que no producen síntomas de enfermedad en el hospedante. La mayor atención se ha focalizado en los endofitos fúngicos que se desarrollan en las raíces, y que reciben el nombre de hongos micorrícicos. Sin embargo, desde hace aproximadamente 25 años ha crecido el interés por los endofitos fúngicos asintomáticos que se desarrollan en hojas, tallos y en los órganos reproductivos de los hospedantes, a los cuales se los conoce en la literatura como endofitos. Sin embargo, poco es lo que se sabe hasta el presente sobre la distribución y diversidad de los endofitos en diferentes especies y en distintas comunidades vegetales, fuera de uno ejemplos bien estudiados.

Endofitos de pastos

Presentan características diferenciales en relación a los endofitos del resto de las plantas. Podrían constituir un clado monofilético dentro de la familia Clavicipitaceae (Clavicipitales, Ascomycota) (Kuldau *et al.*, 1997), pero aún contando con datos muy recientes esto no está resuelto (Clay & Schardl, 2002). Los endofitos clavicipitaceos incluyen colonizadores de pastos que pueden establecer relaciones que van de patogénicas a mutualistas y de epífitos a endofitos con sus hospedantes. Tres de las cuatro tribus, que componen la familia, infectan sólo a pastos o juncos, mientras que la cuarta, Cordycipieae (género *Cordyceps*) agrupa patógenos de insectos o de otros hongos (Kuldau *et al.*, 1997). La tribu Clavicipieae parasita un amplio rango de pastos donde coloniza el ovario, reemplazando las semillas por esclerocios. Estos son patógenos que producen alcaloides tóxicos del tipo ergot (Groger, 1972). La tribu Balansieae es la más diversa y está constituida por varios géneros que forman infecciones sistémicas en los hospedantes que también producen alcaloides (Bush *et al.*, 1997). Dentro de ésta tribu, el género *Epichloë* presenta formas

asexuales (especies del género *Neotyphodium*) que se han diversificado, principalmente en asociación con pastos de clima templado de la subfamilia Pooideae (Schardl, 1996).

El género *Neotyphodium*

Morgan-Jones & Gams (1982) basándose en caracteres de cultivo *in vitro*, incluyeron al anamorfo de *Epichloë typhina* (*Sphacelia typhina*) y al endofito asexual de *Festuca arundinacea* (*Acremonium coenophialum*) en la nueva sección albo-lanosa del género *Acremonium* Link. Glenn *et al.* (1996), basándose en el estudio filogenético molecular de la secuencia del 18 S rADN, propusieron al nuevo género *Neotyphodium* Glenn, Bacon & Hanlin, para las ubicar a las formas anamórficas de los endofitos relacionados con *Epichloë*.

Los hongos del género *Neotyphodium* se caracterizan por presentar un crecimiento intercelular y sistémico dentro del hospedante (White, 1987; White & Cole, 1985). Nunca se observan signos externos de colonización o síntoma de alguna enfermedad. Se asocian a pastos de la subfamilia Pooideae de la familia Poaceae (Gramineae).

Las asociaciones más estudiadas son las de *F. arundinacea*-endofito y *Lolium perenne*-endofito, consideradas modelos de simbiosis mutualista. Una vez establecida la asociación, el hongo y el pasto no se vuelven a separar, por lo que se los describe como mutualistas obligados (Bacon & Hill, 1996).

Para establecer las especies dentro del género *Neotyphodium* se han utilizado como criterios los caracteres micromorfológicos y de cultivo, además de la especie hospedante. Este último es de gran importancia, dado el ciclo de reproducción asexual por transmisión vertical del endofito. Muchos autores consideran al hospedante como un rasgo primordial en sus determinaciones, debido a que la forma de propagación por vía materna, originaría líneas individuales de endofitos, que al estar aislados dentro de la planta, estarían sometidos a procesos de especiación como consecuencia del aislamiento entre cepas (Christensen *et al.*, 1993). Por otra parte, existen hospedantes que tienen más de un endofito (Schardl *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1994) y endofitos que se encuentran en más de un hospedante (Cabral *et al.*, 1999). Los criterios morfológicos son dudosos al tratar de definir una especie, ya que se superponen unos con otros. Morgan-Jones *et al.* (1990) sugieren que la morfología de la colonia es un carácter inconsistente pues la apariencia y la tasa de crecimiento varían considerablemente con la temperatura y el medio de cultivo. En la actualidad, los avances en las técnicas bioquímicas y moleculares han permitido el uso de nuevas herramientas para estudios de biología evolutiva y sistemática. El estudio de proteínas y ADN incrementa la cantidad de

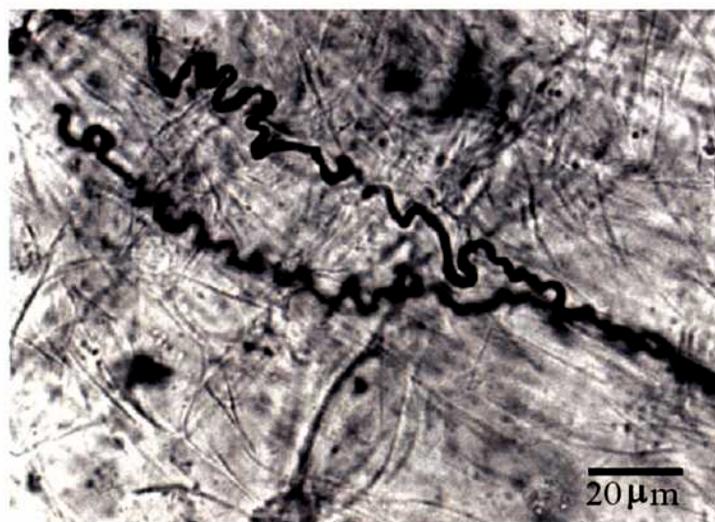
caracteres disponibles para la taxonomía y abre la posibilidad de realizar estudios poblacionales y establecer relaciones filogenéticas. No obstante, estos caracteres deben ser cotejados con los micro y macromorfológicos a los efectos de obtener resultados valederos.

Crecimiento dentro de los hospedantes

El crecimiento de los endofitos clavicipitaceos en pastos presenta varias características distintivas. Es sistémico a lo largo de todos los tejidos aéreos de sus hospedantes. Las hifas, muy poco ramificadas crecen en forma paralela al eje mayor de las células del parénquima en los espacios intercelulares donde subsisten gracias a los azúcares y aminoácidos que son liberados al apoplasto (Fig. 1). Las infecciones son perennes, de tal manera que las plantas permanecen colonizadas a lo largo de toda su vida. Ocasionalmente puede observarse la pérdida de colonización en segmentos particulares o en las semillas que se almacenan durante varios años y a altas temperaturas. Durante la floración del hospedante, el endofito puede crecer y colonizar óvulos y posteriormente semillas o proliferar formando un cuerpo fructífero, en las formas sexuales. La evidencia molecular sugiere que la mayoría de los hospedantes están colonizados por un solo tipo de genotipo fúngico (Kover *et al.*, 1997, Meijer & Leuchtman, 1999). Ocasionalmente pueden ocurrir infecciones múltiples las que aumentarían las probabilidades de hibridación fúngica (Schardl, *et al* 1994, Tsai *et al.*, 1994).

Los pastos colonizados por endofitos no muestran ninguna señal de defensa, aunque presentan una intensa proliferación de tejido fúngico a lo largo de toda la planta. Los endofitos no producen haustorios y por lo tanto no causan daño directo a las células del hospedante (Clay & Schardl, 2002).

Fig. 1: Colonización de *Neotyphodium* en cañas de *Phleum commutatum*.



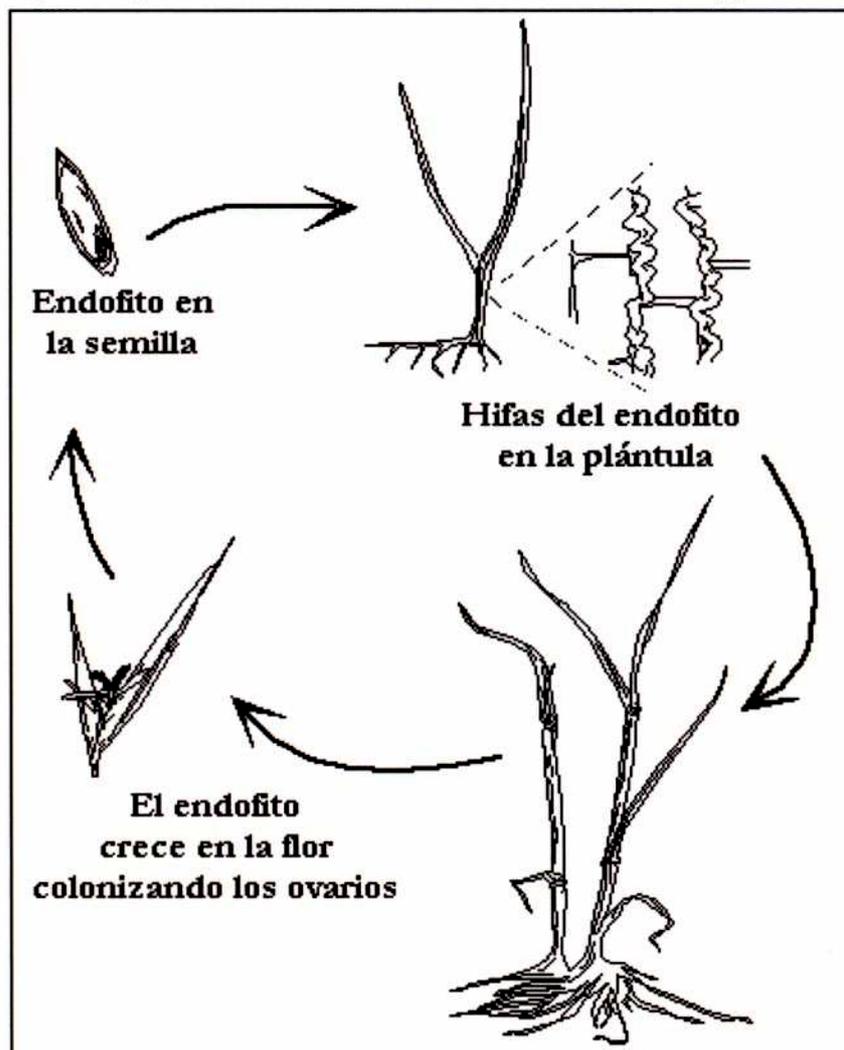
Ciclo de vida y Reproducción

El ciclo de vida generalizado de un endofito, involucra un crecimiento perenne y sistémico dentro de la planta a lo largo de todo el año. Los eventos que tienen lugar durante la floración dependen del tipo de ciclo de vida que caracteriza al endofito (Tabla 1). En el Tipo I, teleomórfico, la dispersión del hongo se lleva a cabo a través de ascosporas (origen meiótico) y se producen cuerpos fructíferos estromáticos que inhiben o abortan el desarrollo de las semillas, esta enfermedad se denomina "choke disease" (White, 1988). Esta estrategia no difiere demasiado de la de otros patógenos de plantas. Estos hongos son heterotálicos y requieren de la transferencia de núcleos entre diferentes grupos de compatibilidad sexual ("mating types") para una reproducción exitosa, esta transferencia está mediada por moscas del género *Botanophyla* cuyas larvas se alimentan del estroma (Bultman & White, 1988). En el otro extremo del espectro reproductivo se encuentra el ciclo de vida anamórfico asintomático (Tipo III), en el que el hongo permanece en el interior del hospedante. Aquí no se producen ascosporas por lo que no existe ningún mecanismo regular de recombinación genética del hongo. De esta manera, los linajes de un único genotipo fúngico se transmiten verticalmente a través de las semillas como consecuencia del crecimiento hifal dentro de los óvulos en desarrollo (Freeman, 1904) (Fig. 2). La tasa de transmisión vertical es muy eficiente alcanzando el 100% (Clay & Scharld, 2002).

La reproducción de los endofitos de pastos de clima templado puede ser extremadamente plástica, donde en una misma planta se desarrollan estromas e inflorescencias simultáneamente. Esto se conoce como Tipo II. Scharld *et al.* (1997) denominaron a estos hongos en estado mixto como "simbiontes pleiotróficos" porque son sistémicos, transmitidos verticalmente a través de semillas y horizontalmente por esporas. Este tipo de asociación ha generado un interés particular dado que probablemente refleje una estrategia evolutiva mixta y una vía por la cual patógenos transmitidos por contagio (horizontalmente) se transformaron en simbiontes transmitidos verticalmente (Clay & Scharld, 2002). El rango total de variabilidad reproductiva se observa en las especies de *Epichloë* y en sus derivadas especies del género *Neotyphodium* donde ocurre la transmisión vertical.

Tabla 1: Comparación de características entre los distintos ciclos de vida (Tipos I, II y III).

	Tipo I - Sintomático	Tipo II - Mixto	Tipo III - Asintomático
Hongo			
Reproducción	Sexual	Ambas	Clonal
Transmisión	Horizontal	Ambas	Vertical
Propágulo	Ascosporas	Ambas	Semillas
Hospedante			
Reproducción	Estéril/Clonal	Parcialmente estéril	Sexual
Interacción	Patogénico	Intermedia	Mutualista
Frecuencia de infección	Baja/Moderado	Intermedia	Alta
Taxonomía	Todos los pastos	C3 pastos pooides	C3 pastos pooides

Fig. 2: Esquema del ciclo de vida de los endofitos *Neotyphodium*.

Modificado de Schardl & Wilkinson (2000).

Alcaloides

La mayoría de los endofitos del tipo *Neotyphodium* son productores de alcaloides. Los pastos constituyen un grupo taxonómico que desarrollan pocos metabolitos defensivos. Sin embargo, cuando están colonizados por estos endofitos resultan tóxicos para el ganado. Sumado a esto, la presencia de los endofitos también acarrea otros beneficios importantes para las plantas (Clay, 1989, 1994; Porter, 1994). Los alcaloides producen diversas toxicosis en el ganado (festucosis o pie de festuca, tembladera, huecú, "rygrass stagger"), cuando éste los consume durante largos períodos (Bacon *et al.*, 1977; Latch, 1993).

Se conoce la producción de varias clases de alcaloides del tipo ergot, similares a los que produce *Claviceps* (Groger, 1972). Otros alcaloides son las aminopirrilizidinas (lolinas), los indolediterpenoides (lolitremos) y las pyrrolopirazinas (peraminas). Se ha registrado que las peraminas están presentes en la mayoría de las pastos colonizados, seguidas por los alcaloides de tipo ergot (50%), las lolinas (35%) y las peraminas (10%) (Siegel *et al.*, 1990). Ya se han publicado numerosas y detalladas revisiones sobre los alcaloides de los endofitos (Bush *et al.*, 1997; Porter, 1994; Siegel & Bush, 1997).

Los alcaloides del ergot han sido encontrados en una amplia variedad de pastos colonizados por endofitos pero la composición química específica y la concentración varían con relación a la combinación simbiótica. Las lolinas, si bien se encuentran menos distribuidas entre los pastos que el ergot, son encontradas generalmente en mayores concentraciones que otros alcaloides (Siegel & Bush, 1997).

Las ergopeptinas (un grupo de alcaloides del ergot) causan diversos síntomas: fiebre, falta de apetito, reducción de la fertilidad y en la lactancia, necrosis de tejidos grasos, vasoconstricción, abortos prematuros, gangrena y finalmente la muerte, dependiendo de la cantidad consumida y de las condiciones ambientales. Los lolitremos, principalmente producidas por *Neotyphodium lolii* (endofito de *Lolium perenne*), son neurotoxinas responsables de los temblores experimentados por aquellos animales que pastorean en campos sembrados con dicho pasto (Scharidl, 1996).

Las cuatro clases de alcaloides se obtienen de cultivos fúngicos puros (Blankenship *et al.*, 2001; Porter, 1994) pero están ausentes de pastos no colonizados, lo que claramente demuestra su origen fúngico.

El genotipo de la planta, el tipo de tejido, la estación del año y otros factores abióticos pueden influir en la concentración de alcaloides del hospedante (Clay & Scharidl, 2002).

Alcaloides y herbívoros

Durante los pasados 25 años, se focalizó una intensa investigación sobre la interacción entre plantas y endofitos. El descubrimiento de la correlación existente entre el síndrome de toxicidad del ganado y su alimentación permitió conocer la interacción entre pastos y endofitos (Bacon *et al.*, 1977; Latch, 1993). Los primeros estudios se realizaron en *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne* y posteriormente se sumaron otros ejemplos de pastos colonizados (Cabral *et al.*, 1999; Miles *et al.*, 1998).

Los efectos químicos no están limitados al ganado. Herbívoros salvajes como ratones campestres y conejos son afectados negativamente por ingerir *Festuca* infectada con endofitos (Fortier *et al.*, 2000; Giuliano *et al.*, 1994). También se han registrado casos de toxicosis en gansos y en otras aves (Conover, 1998; Conover & Messmer, 1996; Madej & Clay, 1991).

Además, muchos insectos herbívoros son sensibles a los mencionados alcaloides (Brem & Leuchtman, 2001; Clay *et al.*, 1985; Latch, 1993; Rowan *et al.*, 1986). La respuesta es heterogénea y generalmente está asociada la constitución del alcaloide particular del pasto.

En la Tabla 2 se muestra el perfil de alcaloides de especies de *Neotyphodium*.

Tabla 2: Perfil de alcaloides de especies de *Neotyphodium*.

Especies de <i>Neotyphodium</i>	Alcaloides					Vertebrados	Insectos	Bibliografía
	EV	OE	LA	LO	PM			
<i>N. aoteroae</i>	-	-	+++	-	n	n	n	Miles <i>et al.</i> , 1998; Panaccione <i>et al.</i> , 2001
<i>N. coenophialum</i>	++	++	+++	-	+++	n	n	Cheplick & Clay, 1988; Clay, 1990b; Siegel <i>et al.</i> , 1990; Christensen <i>et al.</i> , 1993; Craven <i>et al.</i> , 2001
<i>N. inebrians</i>	-	+++	n	-	n	+	n	Miles <i>et al.</i> , 1996
<i>N. lolii</i>	++	++	-	++	+++	+	+	Siegel <i>et al.</i> , 1990; Christensen <i>et al.</i> , 1993; Schardl <i>et al.</i> , 1994
<i>N. melicicola</i>	n	n	n	-	n	+	n	Moon <i>et al.</i> , 2002
<i>N. occultans</i>	-	-	+++	n	n	n	n	Tepaske <i>et al.</i> , 1993; Moon <i>et al.</i> , 2000
<i>N. siegelii</i>	-	-	+++	-	-	n	n	Craven <i>et al.</i> , 2001
<i>N. tembladeraae</i>	n	n	n	n	+++	+	n	Cabral <i>et al.</i> , 1999; Moon <i>et al.</i> , 2002
<i>N. uncinatum</i>	-	-	+++	-	-	+	-	Leuchtman <i>et al.</i> , 2000; Craven <i>et al.</i> , 2001
<i>N. sp. LpTG-2</i>	+++	+++	-	-	+++	+	+	Christensen <i>et al.</i> , 1993; Schardl <i>et al.</i> , 1994
<i>N. sp. FaTG-2</i>	+++	n	-	+	-	n	-	Christensen <i>et al.</i> , 1993; Schardl <i>et al.</i> , 1994
<i>N. sp. FaTG-3</i>	-	n	+++	-	+++	n	+	Christensen <i>et al.</i> , 1993; Schardl <i>et al.</i> , 1994

EV= Ergovalina, OE= Otros alcaloides del ergot, LA= Lolinas, Lo= Lolitremos, PM = Peramidas. - = no detectada en ninguna cepa, + = detectado en algunas cepas, ++ = detectado en la mayoría de cepas, +++ = detectado en todas las cepas, n = no estudiado. Modificada de Clay & Schardl (2002).

Otros efectos de los endofitos sobre sus hospedantes

Se le ha prestado mucha atención a la producción de alcaloides y su rol como compuestos de defensa en la interacción pastos-endofitos. Sin embargo, esta colonización con endofitos puede proveer otros beneficios a sus hospedantes, produzcan o no alcaloides.

Una de ellas es la protección contra patógenos. Se han registrado varios casos donde las poblaciones colonizadas con endofitos son más resistentes al ataque de patógenos, entre ellos podemos mencionar: *Festuca arundinacea* es más resistente al tizón de plántulas causado por *Rhizoctonia* y a la roya de la corona causada por *Puccinia coronata* (Ford & Kirkpatrick, 1989; Gwinn & Gavin, 1992), plantas de *Panicum agrostoides* colonizadas con endofitos presentan bajos niveles de colonización frente a *Alternaria triticina* (Clay *et al.* 1989) y plantas de *Phleum pratense* son más resistente a *Cladosporium phlei* (Shimanuki, 1987). También se ha registrado la inhibición de patógenos de plantas en cultivos puros de endofitos (Siegel & Latch, 1991; Stovall & Clay, 1991).

La resistencia al estrés hídrico es otro beneficio bien ilustrado en *F. arundinacea* y *L. perenne* (Arechevaleta *et al.*, 1989; Bouton *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1997; Malinowski *et al.*, 1997a). West (1994) consideró que la mayor tolerancia al estrés hídrico podría deberse a una alteración en el comportamiento de los estomas y en el ajuste osmótico, lo que genera un mejor mantenimiento de la turgencia. Por otro lado, Siegel & Bush (1997) sugieren que la acumulación de lolinas podría afectar el potencial osmótico y de esa manera incrementar la resistencia a la sequía. También se ha detectado el incremento de la tolerancia, de los hospedantes, a otros factores ambientales como el calor (Marks & Clay, 1996), la escasa luz (Bier, 1995) y la baja fertilidad del suelo (Malinowski & Belesky, 2000).

Se observó que las plantas colonizadas incrementaban su crecimiento de forma independiente al estrés biótico o abiótico (Clay *et al.*, 1989; Malinowski *et al.*, 1997b; Rice *et al.*, 1990).

La colonización con endofitos puede causar cambios morfológicos en varias especies de hospedantes dando como resultado un aumento en el crecimiento clonal. Estos cambios pueden ser una adaptación en los casos en que la producción de semillas es limitada o cuando el establecimiento de las semillas es raro (Clay & Schardl, 2002).

Los mecanismos responsables de dichos cambios pueden incluir alteraciones bioquímicas y hormonales de los hospedantes. En plantas de *Festuca* colonizadas se han registrado aumentos de la tasa de fotosintética (Marks & Clay, 1996; Richardson *et al.*, 1993). La tasa fotosintética puede reflejar diferencias en la relación del agua y el comportamiento de

estomas o cambios en la fotorrespiración (Marks & Clay, 1996). Los endofitos de *Festuca* y de otros pastos producen auxinas (De Battista *et al.*, 1990; Porter *et al.*, 1985), que pueden influir en caracteres morfológicos y fisiológicos de las plantas.

Los endofitos deben obtener todos sus nutrientes, incluyendo los precursores de los metabolitos secundarios, de su planta hospedante. En una relación mutualista la colonización con endofitos implica un costo que debe ser superado mediante los beneficios que la interacción otorga al hospedante.

Antecedentes del estudio de los endofitos en Argentina

La existencia de gramíneas tóxicas para el ganado se conoce desde la época de la colonia. Sin embargo, su relación con la presencia de un hongo, recién fue registrada a principios del siglo XX. Rivas & Zanolli (1909) publicaron un trabajo en el que establecieron las posibles causas de una enfermedad del NO de Argentina: La Tembladera. Dichos autores identificaron erróneamente al endofito presente en *Festuca hieronymi* Heckel como perteneciente al género *Endoconidium* Prill. & Delacr., al que denominaron *Endoconidium tembladerae* sin describirlo en forma válida. De esta manera, estos autores fueron los primeros en el mundo en relacionar este tipo de enfermedades con un endofito fúngico, pero su descubrimiento tuvo poca difusión y permaneció ignorado hasta su descubrimiento por Bacon *et al.* (1977).

Los endofitos de gramíneas autóctonas son estudiados desde mediados de los '80 en el Laboratorio de Micología de la FCEyN-Universidad de Buenos Aires, donde se inició el reconocimiento e identificación sistematizado de estas interacciones y de los organismos que las forman.

Bertoni (1989) presentó como su Tesis de Doctorado el relevamiento de los sistemas simbióticos presentes en *Festuca* spp. nativas (Bertoni *et al.*, 1993). Cabral & Bertoni (1991) y Cabral & Lugo (1993) aislaron y caracterizaron los endofitos de *Festuca argentina*, *Festuca hieronymi* y *Poa huecu*, tres plantas tóxicas para el ganado. Estudios morfológicos, de isoenzimas y moleculares, permitieron postular que las tres gramíneas comparten un mismo tipo de endofito de características particulares, que conforman un nuevo taxón *N. tembladerae* (Cabral *et al.*, 1999).

Se identificó el compuesto tóxico de *Poa huecu* como de naturaleza glicopeptídica, probablemente un metabolito de origen endofítico (Pomilio *et al.*, 1989). En otras dos plantas tóxicas para el ganado, *F. argentina* y *F. hieronymi*, se obtuvieron resultados similares

(Casabuono, 1994; Martone, 1992). No obstante en *Bromus setifolius* se identificaron alcaloides (ergovalina y peramina), que parecen tener efecto sobre insectos herbívoros (White *et al.*, 2001).

También se han registrado numerosas asociaciones en diferentes gramíneas no tóxicas, en la mayor parte del territorio nacional, como *P. rigidifolia* Steud., *F. magellanica* Lam. y de *Melica stukertii* Hack., entre otras (Cabral & Lugo, 1994; White *et al.*, 1996). Actualmente se cuenta con un total de 33 registros de hospedantes colonizados y de 11 hospedantes donde se logró aislar al endofito (Cabral, 2002; Cabral & Lugo, 1994; Cabral *et al.*, 1996; Cabral *et al.*, 1999; Lugo *et al.*, 1998).

White *et al.* (1996) descubren en *Poa rigidifolia*, la formación de conidios en el filoplano. Esto apoya la posibilidad que las formas anamórficas puedan también transmitirse horizontalmente.

Todos los organismos aislados presentan características micromorfológicas y de cultivo que permiten incluirlos en el género *Neotyphodium*. Nunca, hasta el presente se registró la presencia de estromas pertenecientes a formas teleomórficas tanto en especies nativas como en las introducidas. Por lo tanto, se puede considerar que en la Argentina, sólo existirían asociaciones del Tipo III.

Iannone (2002) estudió la distribución y ubicación de poblaciones naturales de *Bromus auleticus* y determinó su asociación a endofitos fúngicos en distintas provincias de Argentina. Además, estudió en forma comparativa características de crecimiento del hospedante en poblaciones con distintos niveles de incidencia. Las diferencias observadas y la ausencia de poblaciones naturales no asociadas a endofitos indicarían un mayor valor adaptativo en las plantas pertenecientes a poblaciones colonizadas.

Gentile *et al.* (2003) reportaron el origen evolutivo de endofitos *Neotyphodium* aislados de diversas poblaciones de 10 pastos nativos de Argentina, y los compararon con especies tanto sexuales como algunas asexuales de hospedantes nativos de otros continentes. Las relaciones fueron estimadas por análisis filogenéticos basados en secuencias de la porción variable de los genes de β -tubulina (*tub2*) y el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*). Los análisis revelaron que la mayoría de los endofitos son híbridos inter-específicos para ambos genes, derivados de dos especies de *Epichloë*: *E. festucae* y *E. typhina*. Además de los organismos híbridos, se encontraron endofitos en algunas plantas de *Bromus setifolius* que resultaron ser no híbridos; es decir, contaron solamente con una copia de cada gen. Los resultados indican

que la hibridación inter-específica podría ser un mecanismo importante y común en la generación de variabilidad genética en endofitos *Neotyphodium* de Argentina.

Distribución e incidencia de los endofitos en gramíneas de la Patagonia

El estudio de la incidencia, distribución y características de la asociación de endofitos en poblaciones naturales es sorprendentemente escaso. No obstante, el reconocimiento de la función que cumplen en las comunidades y ecosistemas, así como la caracterización de los sistemas simbióticos, y el estudio de la interacción con otros sistemas simbióticos, es uno de los caminos que permiten identificar endofitos o cepas para eventuales usos tecnológicos.

Los primeros registros, en la Patagonia, de gramíneas asociadas a endofitos reconocen como hospedantes a *Bromus setifolius*, *Festuca argentina*, *F. magellanica*, *Phleum commutatum*, *Poa poecila* y *P. rigidifolia*.

Bromus setifolius, en Santa Cruz, y *Phleum commutatum*, en Tierra del Fuego, presentan una amplia distribución, que abarca distintas regiones ecológicas caracterizadas por un marcado gradiente de precipitaciones. La presencia de *Poa rigidifolia* tanto en pastizales como en murtillares, si bien está más restringida a la estepa, la convierte en un modelo interesante para estudiar el rol de los endofitos en condiciones de bajo pH y muy escasos nutrientes.

La presencia de gramíneas asociadas a endofitos (E+) ampliamente distribuidas en la zona patagónica y andina, ninguna de las cuales presentan registros de toxicidad para el ganado, hacen suponer que el beneficio de la interacción para las plantas hospedantes se relaciona con factores diferentes al control del ganado, autóctono o introducido.

Simbiosis micorrícica

La simbiosis micorrícica está formada por la asociación de hongos micorrícicos y las raíces de las plantas. Existen varios tipos de micorrizas clasificadas en base del simbionte fúngico: Micorrizas arbusculares, Ectomicorrizas, Micorrizas Ericoides y Micorrizas de Orquídeas (Smith & Read, 1997).

Las micorrizas arbusculares son una de las asociaciones más comunes en la naturaleza, con más del 60% de las plantas vasculares del mundo participando de ella (Smith & Read, 1997). Son considerados simbiontes obligados y no se conocen casos de hongos micorrícicos arbusculares (MA) de vida libre. Se encuentran habitualmente en la rizósfera en todos los ambientes donde crezca algún vegetal susceptible de ser colonizado.

Durante las décadas pasadas se ha observado que los hongos MA confieren varios beneficios a las plantas, sugiriendo que este tipo de simbiosis tendría una elevada importancia ecológica. Los beneficios incluyen una mayor adquisición de fósforo, protección de las raíces contra patógenos y una mejor captación del agua (Hodge *et al.*, 2001; Newsham *et al.*, 1995).

Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA)

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares se encuentran dentro de la clase Zygomycetes, orden Glomales. Se reconocen cinco familias: Paraglomaceae, Archeosporaceae, Glomaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae (Morton & Benny, 1990; Morton & Redecker, 2001)

Los caracteres taxonómicos más relevantes para la clasificación de este grupo son la morfología de las esporas y la morfología de su pared. El proceso de germinación de las esporas es también un carácter que algunos autores han tomado en cuenta. Durante los últimos años se han sumado caracteres moleculares, a partir de los cuales se han sugerido nuevos géneros y se han reubicado las especies.

Anatomía y morfología de las micorrizas arbusculares

La colonización de raíces por hongos MA produce cambios citológicos y anatómicos que no son visibles a simple vista como ocurre en otros tipos de micorrizas.

La colonización se produce en las células de la rizodermis al comenzar la colonización, y principalmente en el parénquima cortical al desarrollarse completamente la colonización. Nunca hay colonización de las células de la endodermis o del cilindro vascular. Tampoco se ha observado la presencia de estructuras fúngicas en los ápices meristemáticos de las raíces micorrizadas.

Se distinguen dos fases bien determinadas: una fase que se desarrolla extrarradicalmente y otra fase intrarradical.

Micelio extrarradical

Una vez establecida la simbiosis, se desarrolla una red de micelio extrarradical, que puede alcanzar diferente desarrollo dependiendo de la especie fúngica, la planta hospedante, el tipo de suelo y las condiciones del medio.

Las hifas principales pueden proliferar progresivamente hasta dar ramificaciones de octavo orden o más. Estas últimas, de paredes cada vez más delgadas están adaptadas para explorar poros del suelo y proliferar en micrositios donde ocurre la mineralización de nutrientes (Hepper & Jakobsen, 1983). Cuando la hifa externa se encuentra en la proximidad de una raíz puede formar una ramificación similar a un abanico, que da como resultado la formación de varios apresorios. Este patrón de colonización puede variar. (Gianinazzi-Pearson, *et al.* 1989). La hifa puede penetrar la raíz a través de la pared de un pelo radical o de una célula epidérmica, o a través de la laminilla media de las células epidérmicas.

Esporas y esporocarpos

Las esporas de resistencia se forman a partir de las hifas externas, en forma terminal o intercalar dependiendo de la especie. Pueden ser solitarias o agrupadas en esporocarpos. La producción de esporas tiene lugar al finalizar el ciclo reproductivo de la planta hospedante, aunque existen grandes diferencias entre distintas especies de hongos MA, los hospedantes micorrizados y las condiciones ambientales en general.

Vesículas

Las vesículas son estructuras con paredes gruesas que pueden tener forma variable. Contienen una alta proporción de lípidos y numerosos núcleos. Se forman directamente a partir del ensanchamiento de una hifa y pueden ser terminales o intercalares y formarse dentro o fuera de las células de la corteza (Abbot, 1982). Se las considera como estructuras de reserva, pero aún se desconoce bien su fisiología, particularmente en lo que respecta a la movilización de sus reservas y a la funcionalidad como una forma de propágulo. Están ausentes en la familia Gigasporaceae.

Arbúsculos

La hifa intercelular penetra las células de las capas internas del parénquima cortical dando lugar a un sistema de hifas denominado arbúsculo. Cuando la hifa penetra la pared de la célula para formar el tronco del arbúsculo, la membrana plasmática celular se invagina y crece acompañando el desarrollo del mismo. La membrana plasmática acompaña el crecimiento del arbúsculo. De esta manera el hongo nunca penetra dentro del citoplasma de las células y restringe su crecimiento al apoplasto de las células corticales.

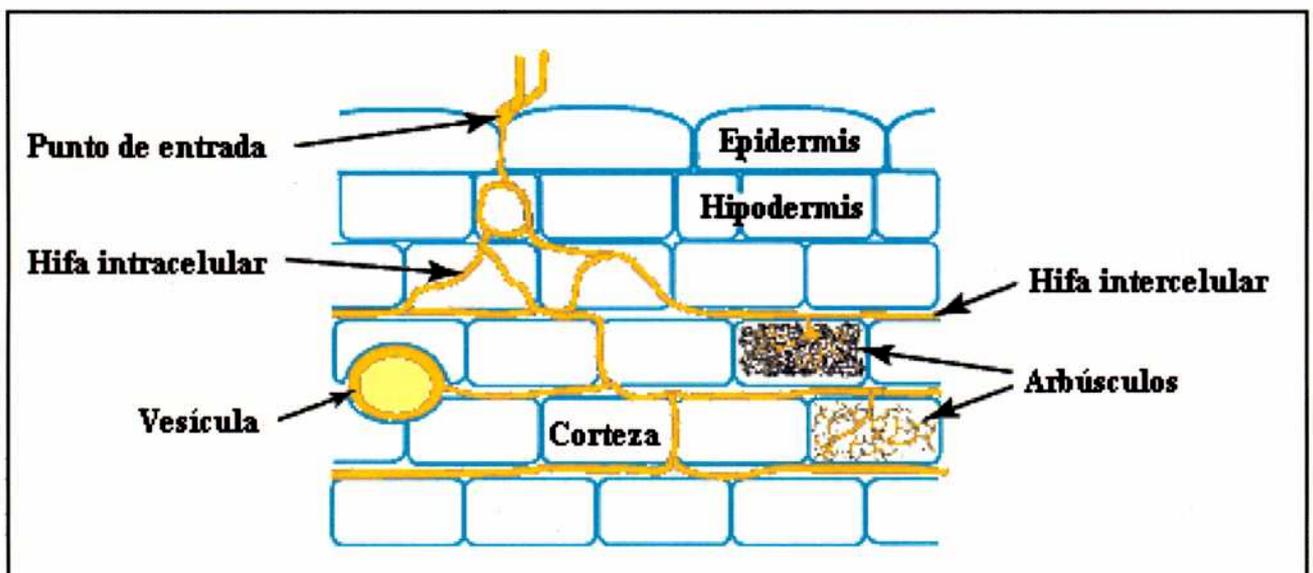
La hifa del hongo se ramifica profusamente en forma dicotómica y con paredes cada vez más delgadas que presentan una estructura amorfa donde desaparece la organización fibrilar de la quitina.

La longevidad del arbusculo varía principalmente de acuerdo a la planta hospedante. Cuando finaliza su funcionalidad se desintegra progresivamente a partir de las ramificaciones menores hasta desaparecer totalmente. Una vez que el arbusculo deja de ser funcional, las células vegetales recuperan sus funciones normales y pueden llegar a hospedar nuevamente a otro arbusculo.

Establecimiento y desarrollo de la colonización

Luego de la germinación, el hongo debe encontrarse con un hospedante adecuado dentro de los 8 a 20 días (Giovannetti & Sbrana, 2001). La hifa penetra la epidermis de la raíz y crece intercelularmente en la corteza. En algunas células de la corteza, el hongo penetra la pared e invagina la membrana celular, formando una zona interfacial delimitada por las dos membranas citoplasmáticas, el arbusculo (Fig. 3). Los movimientos bidireccionales de sustancias como el fosfato y los carbohidratos entre la planta y el hongo ocurren principalmente en esta interfase y es un requisito para el desarrollo de la simbiosis mutualista (Smith & Read, 1997). Las hifas también crecen hacia el exterior de la raíz poniéndose en contacto con el suelo, donde pueden adquirir nutrientes, forman esporas y colonizan nuevas raíces.

Fig. 3: Esquema de la colonización de una raíz por hongos MA.

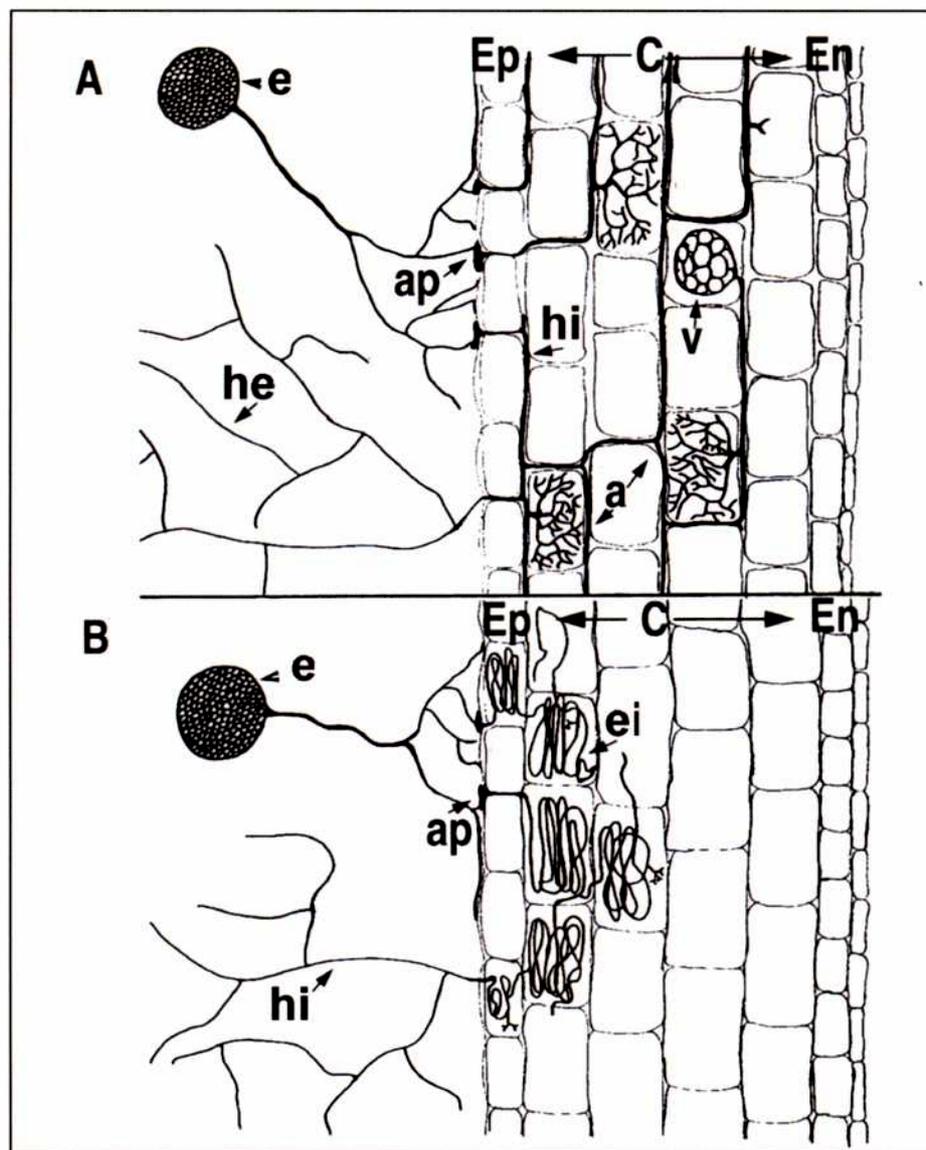


Tipos de morfologías

Las primeras ilustraciones y descripciones del micelio interno de las micorrizas y su interacción con las células del hospedante fueron realizadas por Gallaud (1905). Sus observaciones indican que los hongos MA pueden desarrollar alguna de dos tipos de morfologías dependiendo de la especie de la planta. La morfología más difundida en las descripciones se conoce como "*Arum*". En este tipo de asociación, las hifas del hongo crecen rápidamente en la corteza del hospedante de forma intercelular. Pequeñas ramificaciones laterales pueden penetrar las paredes de las células corticales y desarrollar arbuscúlos. Se pueden formar enrulamientos de las hifas (coils), particularmente en las células hipodérmicas, pero no son una estructura indispensable del micelio intrarradical (Fig. 4).

En el tipo "*Paris*", la colonización se caracteriza por un extenso desarrollo de hifas enruladas intracelularmente, que se dirigen de célula en célula. Los arbuscúlos se desarrollan directamente sobre los enrulamientos y si es que hay algo de crecimiento intercelular, éste es muy escaso (Fig. 4). En consecuencia, este tipo de desarrollo es más lento que el tipo *Arum*. Se conoce poco hasta la fecha sobre el tipo de adquisición de nutrientes por parte de las plantas o el rol que juegan los enrulamientos en la transferencia de minerales cuando entablan el tipo de asociación *Paris*. Se cree que este tipo de morfología es menos difundido que el *Arum*. Sin embargo se ha observado que los géneros *Centaurium*, *Gentiana* y *Liriodendron*, dependen de éste tipo de simbiosis para presentar un crecimiento satisfactorio (Smith & Read, 1997).

Fig. 4: Tipos de morfologías de los hongos MA. A. Morfología *Arum*. B. Morfología *Paris*.



Ep: epidermis, En: endodermis, C: corteza, e: espora, he: hifa externa, ap: apesorio, hi: hifa intercelular, a: arbusculos, ei: enrulamientos intracelulares.
Modificada de Barker et al., 1998.

Antecedentes del estudio de los hongos MA en la estepa patagónica

Las condiciones climáticas y edáficas características de la Patagonia Austral someten a las gramíneas que viven en los pastizales a un permanente estrés hídrico y nutricional. Una de las estrategias que les permite sobrevivir a las plantas en ambientes desfavorables es la asociación con hongos MA (Brown & Bledsoe, 1996; Tinker, 1978). Ya se han realizado trabajos en los que se registró colonización micorrícica en gramíneas de la Patagonia (Mendoza *et al.*, 2002; Ripoll, 1999). Ripoll (1999) estudió los factores que regulan asociación entre hongos MA y gramíneas, en particular, las diferencias en el grado de colonización entre distintas especies de gramíneas y entre las gramíneas que crecen en distintos parches. Fontela *et al.*, (2001) estudiaron el estatus micorrícico de las especies vegetales del NO de la Patagonia y lo compararon con las comunidades representativas de la estepa y de las vegas. Mendoza *et al.* (2002) estudiaron la relación entre las poblaciones de hongos MA y las propiedades del suelo y de las plantas hospedantes (*Festuca gracillima*, *Deschampsia flexuosa* y *Poa rigidifolia*). Sin embargo, no existen registros del estudio de la interacción entre hongos MA y endofitos del género *Neotyphodium* en la Patagonia.

Interacción entre endofitos y micorrizas

Hasta la fecha, se han realizado pocos trabajos sobre la posible interacción entre los simbiontes de las partes subterráneas y aéreas de las plantas. La mayoría de los pastos forman asociaciones con hongos MA, por lo que las interacciones con endofitos clavicipitaceos podrían ser comunes.

Se ha predicho que los endofitos podrían limitar el crecimiento de los hongos MA, al restringirles el acceso a los carbohidratos. Por otro lado, el crecimiento del endofito no se vería demasiado afectado por la colonización con MA, debido a que el endofito obtiene los productos de la planta antes de que éstos sean trascolados desde las hojas (Clay, 1992)

Estudios preliminares sugieren que la colonización endofítica en *F. arundinacea* inhibe la colonización por parte de hongos MA. Chu-Chou *et al.* (1992) y Guo *et al.* (1992) observaron que las tasas reproductivas y la extensión de la colonización de *Glomus* spp. fueron significativamente menores en plantas colonizadas que en plantas no colonizadas con endofitos del género *Neotyphodium*. Guo *et al.* (1992) sugieren que el efecto negativo

observado sobre los hongos MA podrían ser consecuencia de la producción de alcaloides por parte del endofito.

Otro antecedente del estudio de la interacción entre endofitos del tipo *Neotyphodium* y hongos MA es el realizado por Barker (1987). Aquí se observó que plantas no micorrizadas pero colonizadas con endofitos fueron más resistentes a una peste de insectos en comparación a plantas sin endofitos. Sin embargo, cuando las plantas estaban micorrizadas, no se registró el efecto disuasivo del endofito contra los insectos.

La Patagonia Austral

La región de la Patagonia elegida para este estudio está ubicada al sur del paralelo 49 y comprende el sur de la provincia de Santa Cruz y la provincia de Tierra del Fuego. Esta franja incluye los bosques subandinos y las mesetas, planicies y serranías comprendidas entre los Andes y el Océano Atlántico.

El clima

Precipitaciones

La mayoría de la región Patagónica se encuentra dominada por masas de aire provenientes del Océano Pacífico. Los vientos procedentes del oeste son fuertes y constantes a lo largo de todo la región. El patrón de precipitaciones está determinado por los movimientos estacionales de los sistemas de alta y baja presión y por las corrientes marinas. Durante el invierno el sistema de baja presión es más intenso. Esto, combinado con el desplazamiento ecuatorial del sistema de alta presión del Pacífico y con temperaturas oceánicas mayores que las continentales da como resultado un incremento de las precipitaciones en esta estación. El sur de la provincia de Santa Cruz y la provincia de Tierra del Fuego también son afectadas por masas de aire provenientes del Océano Atlántico. Esta influencia produce una distribución más estacional de las precipitaciones (Paruelo *et al.*, 1998).

La cordillera de los Andes juega un papel determinante en el clima de la Patagonia. La distribución N-S de las montañas crea una barrera para las masas de aire húmedo provenientes de Océano Pacífico. La mayoría de las precipitaciones ocurren del lado chileno y por esto el aire se vuelve más cálido y seco a medida que desciende por el lado argentino de los Andes (Paruelo *et al.*, 1998).

Las precipitaciones son máximas en la zona andina, donde llegan a superar los 2000 mm. En la parte central de la Patagonia extrandina la precipitación anual alcanza los 125 mm en el centro-oeste y los 500 mm en la parte occidental (León *et al.*, 1998).

Temperatura

El clima de esta amplia región es templado frío (Paruelo *et al.* 1998). Una característica del patrón de temperaturas es la distribución NO-SE de las isothermas, determinado principalmente por los Andes. Las temperaturas medias oscilan entre 0°C y 12°C.

Vientos y humedad

Los fuertes vientos del oeste se caracterizan, no sólo por su persistencia durante todo el año, sino también por su intensidad. Los valores anuales de la velocidad del viento varían entre 15 y 22 kmh⁻¹ en el centro-oeste de la región (Paruelo *et al.*, 1998).

Los vientos del oeste y el viento polar se caracterizan por su bajo contenido de humedad. Los valores de la presión de vapor para la región varían entre 8 a 12 hPa en enero y entre 4 a 7 hPa en Julio. Una leve influencia oceánica puede observarse en el este de la Patagonia. La humedad relativa presenta una variación estacional opuesta a la de la temperatura, con una mayor humedad en invierno que en el verano (Paruelo *et al.*, 1998).

Unidades de vegetación

La disminución de las precipitaciones desde el oeste determina un gradiente de tipos de vegetación: bosque, estepa gramínea, estepa arbustivo-gramínea, estepa arbustiva y erial (Soriano, 1956).

Zona andina: el bioma boscoso subantártico ocupa una franja relativamente angosta y presenta como componentes arbóreos predominantes los bosques de lenga (*Nothofagus pumilio*) y de ñire (*N. antarctica*). En Tierra del Fuego parte de los bosques incluyen asociaciones con guindo (*N. betuloides*).

Zona extrandina: en la mayor parte de esta región, la vegetación muestra caracteres adaptativos a condiciones de aridez. Los tipos de vegetación más representativas son las estepas arbustivo-gramíneas de mediana altura (nanofanerófitos de 20 a 80 cm), y densidad (1 arbusto cada 6 m²) y las caracterizadas por arbustos enanos (camefitas pulvinadas de 5 a 20 cm) en cojín con escasos pastos y muy baja cobertura total (eriales). Otros tipos de vegetación importantes son las estepas gramíneas, con hasta 70% de cobertura, y los matorrales altos de 60 a 200 cm de altura dominados por arbustos.

La vega de ciperáceas y gramíneas es un tipo de vegetación muy frecuente en la Patagonia, aunque muy poco importante por su superficie relativa. Está asociado a los valles y las vertientes con agua permanente (León *et al.*, 1998).

Áreas ecológicas de Santa Cruz y Tierra del Fuego

Desde el punto de vista regional se pueden agrupar territorios de Santa Cruz y de Tierra del Fuego en áreas ecológicas, que comparten una combinación particular de suelos clima y vegetación. La clasificación de ecosistemas ya cuenta con numerosos trabajos (Anchorena, 1978; Borelli *et al.*, 1987; Cabrera, 1953; Cuadra & Oliva, 1994; Soriano, 1956). La clasificación tenida en cuenta en el presente trabajo es la presentada por Oliva *et al.* (2001). Las áreas que se reconocen son: Complejo andino, Estepa arbustiva del Golfo San Jorge, Estepa magallánica húmeda, Estepa magallánica seca, Matorral de mata negra, Meseta Central, Pastizal Subandino, Sierras y mesetas occidentales, Complejo andino fueguino, Estepa magallánica fueguina, y Ecotono fueguino. A continuación se detallan las características más importantes de las áreas que fueron analizadas con posterioridad en el presente estudio. La ubicación de las áreas ecológicas se brinda en la Fig. 5.

Santa Cruz

◆ Estepa magallánica seca

Es un extenso pastizal de coirón fueguino (*Festuca gracillima*). La cobertura vegetal oscila entre el 50-70 %. Puede presentar algunos arbustos aislados de *Berberis heterophylla* (calafate) o *Junellia tridens* (mata negra). El paisaje es plano o levemente ondulado, dominado por mesetas planas, que no tienen un drenaje bien definido hacia el mar y que pueden alcanzar alturas de 300 m.s.n.m.

Suelos:

Se caracteriza por presentar una capa superior de arena fina con materia orgánica. En profundidad las texturas cambian a franco arcillosas y arcillosa. El pH varía de levemente ácido a moderadamente alcalino.

Clima:

La lluvia presenta un máximo estival, aunque se distribuye a lo largo de todo el año. En el límite con la región del Matorral de mata negra (*Berberis heterophylla*) el promedio de lluvias es de 170 mm, mientras que hacia el sudeste varía entre 200 y 300 mm.

Vegetación:

En la estepa, *Festuca gracillima* es dominante con coberturas de hasta un 50-60%. *F. pallescens* ocupa cañadones, bajos y márgenes de laguna. La comunidad vegetal de gramíneas bajas es más diversa: *Poa dusenii*, *Bromus setifolius*, *Rytidosperma virescens* y *Hordeum comosum*. Los gramínoideos del género *Carex* son importantes como forraje. Entre los subarbustos *Nardophyllum bryoides* y *Nassauvia ulicina* dominan los sitios más degradados. Otros arbustos enanos importantes son *Nassauvia fueguina*, *Perezia recurvata*, y *Ephedra frustillata*. Se pueden observar también, arbustos aislados de *Berberis buxifolia* o *Junellia tridens*.

◆ Estepa magallánica húmeda

Es una estepa gramínea de coirón fueguino, que se ubica en los extremos SO y oriental de Santa Cruz y en el norte de Tierra del Fuego. Se asemeja a la Estepa magallánica seca pero incluye arbustos grisáceos de mata negra fueguina (*Chilotrachelium diffusum*) y extensas áreas dominadas por arbustos rojizos, rastreros de murtila (*Empetrum rubrum*). El paisaje es suavemente ondulado, desarrollado sobre terrazas, o plano. Existen extensos mallines en valles fluviales y cañadones.

Clima:

Debido a que la porción austral de la Cordillera es más baja, el ambiente es subhúmedo con características oceánicas. Las precipitaciones oscilan entre los 200 y 400 mm, distribuidas durante todo el año en forma de tormentas cortas, frecuentes y poco intensas, que presentan un máximo estival.

Suelos:

Muestran un horizonte A de textura franco-arenosa, con elevado contenido de materia orgánica (5-10%). Pueden ser ácidos (pH 4 a 6) o neutros. Los horizontes C son arenogrillosos o bien capas arcillo-areno-grillosas compactas. La textura gruesa y la escasa estructura favorecen el lavado, por lo que son suelos pobres en bases.

Vegetación:

Domina *F. gracillima*, acompañado por las gramíneas *Agropyron fuegianum*, *Deschampsia flexuosa* y *Rytidosperma virescens* y gramínoideas del género *Carex*. Entre los arbustos se destaca *Chilotríchium diffusum* y en menor medida *Berberis buxifolia*. Se pueden observar extensas estepas subarbuscivas dominadas por *Empetrum rubrum*, que presentan *Baccharis nivalis*, *Nassauvia fueguina*, *Azorella fuegiana*, *N. abbreviata* y *Perezia recurvata*. Son comunes las vegas conformadas por *Hordeum pubiflorum* y *H. halofilum*.

◆ Matorral de mata negra

Es una estepa arbustiva de unos 70 cm de altura, dominada en un 60-70 % por la mata negra (*Junellia tridens*), en forma continua o formando mosaicos de estepa gramínea de *Festuca pallescens* y coirón amargo. Ocupa mesetas y terrazas que llegan desde el nivel del mar hasta los 900 m.s.n.m. al norte del río Santa Cruz y entre éste y el río Coyle.

Clima:

Es frío de meseta y costero. Las lluvias anuales oscilan entre los 150 y 200 mm y presentan un máximo invernal.

Suelos:

Son de textura arenosa y buen drenaje por presentar abundantes rodados.

Vegetación:

Junellia tridens es absolutamente dominante y puede cubrir el 70 % del suelo, sin embargo también puede encontrarse a la mata negra torcida (*Nardophyllum obtusifolium*) y el calafate (*Berberis heterophylla*). Hay arbustos enanos como *Nassauvia glomerulosa*, *N. ulicina*, *Satureja darwinii*, *N. darwinii* y *Ephedra frustillata*. *Festuca pallescens* es dominante en el estrato de las gramíneas hacia el norte y en las inmediaciones del río Coyle es reemplazado por *F. gracillima*. También se puede encontrar *Stipa speciosa* y *S. chrysophylla*. En el estrato de gramíneas bajas se encuentran *Poa dusenii*, *Stipa ibari*, *S. neaei*, *Festuca pyrogea* y *Rytidosperma virescens*.

◆ Pastizal subandino

Es una estepa gramínea dominada por *Festuca pallescens*. Forma una estrecha franja discontinua entre las regiones de la meseta central, Sierras y mesetas occidentales y Matorral de mata negra por el este y Complejo andino por el oeste. Si bien la altura es una característica muy variable (300-2000 m), los niveles más frecuentes son entre 300-500m.s.n.m.

Clima:

Las precipitaciones presentan un gradiente de 200 mm anuales en el este y de 300-400 mm en el oeste. Las lluvias se distribuyen en forma pareja a lo largo de todo el año.

Suelos:

Los suelos son arenosos o franco-arenosos, enriquecidos a veces con cenizas volcánicas. Tiene un elevado contenido de materia orgánica y no muestran problemas de alcalinidad o salinidad. Estos suelos pueden considerarse entre los más ricos de la Patagonia.

Vegetación:

La vegetación dominante es *Festuca pallescens* y suele estar acompañada por *F. argentina*. También se encuentran *Stipa chrysophylla* y *Poa dusenii*. Entre los arbustos se destacan *Mulinum spinosum*, *Berberis buxifolia*, *Junellia tridens*, *Senecio filaginoides* y *Nardophyllum obtusifolium*.

◆ Complejo andino

Ambiente que se presenta como un mosaico de bosques subantárticos de *Nothofagus* en laderas y valles con praderas y semidesiertos de altura por encima de la línea de los bosques. No constituye un franja continua dado que se interrumpe en gran parte por intrusiones del Pastizal subandino y de la Meseta central.

Clima:

Es frío húmedo. Las precipitaciones tienen un fuerte gradiente este-oeste de 300 a más de 1000 mm anuales.

Suelos: En su mayoría de textura franco-arenosa. El pH puede ser ligeramente ácido y puede contener ceniza volcánica.

Vegetación: En las áreas más secas, de transición hacia los pastizales subandinos, domina el bosque bajo de ñire. En sitios más húmedos prevalece la lenga. Entre los arbustos se destacan *Embothrium coccineum* (notro), *Pernettya mucronata* (chaura), *Escallonia rubra* y *Fuchsia magellanica*. Los claros en el bosque, valles y costas lacustres se cubren de densas praderas de *Poa pratensis*, *Deschampsia* sp. y *Agrostis* sp.

Tierra del Fuego**◆ Estepa magallánica fueguina**

Unidad de vegetación que se localiza en el norte de Tierra del Fuego y que es equivalente a la Estepa magallánica húmeda en su porción continental. Es una estepa

graminosa de *Festuca gracillima* con áreas dominadas por *Chiliodrion diffusum* y otras con *Empetrum rubrum*. Existen también praderas de pastos cortos que se alternan con los coironales en forma de mosaico. El paisaje es ondulado, pero también hay áreas planas. Los mallines se desarrollan en forma dendrítica y ocupan un 5-10 % de la superficie.

Clima:

Es semiárido, con precipitaciones de entre 270-400 mm, distribuidas todo el año. Las nevadas son frecuentes aunque de menor intensidad y persistencia con relación a las demás áreas ecológicas de Tierra del Fuego.

Suelos:

Los suelos presentan un horizonte A de textura franco-arenosa, con 5-10 % de materia orgánica. Se pueden encontrar suelos oligotróficos, ácidos con baja saturación de bases como Ca^{++} y altos contenidos de aluminio, suelos eutróficos con $pH > 6$, elevadas concentraciones de bases y bajos niveles de aluminio, y suelos mesotróficos. Los horizontes C son areno-gravillosos o bien con capas arcillo-areno-gravillosas compactas.

Vegetación:

El paisaje está dominada por *Festuca gracillima* con una cobertura de hasta 70%, acompañado por *Poa rigidifolia*, *Deschampsia flexuosa*, *Rytidosperma virescens* y gramínoides del género *Carex*, con una cobertura vegetal total superior al 90%. Las áreas muy impactadas por la hacienda son dominadas por *Poa pratensis*, una gramínea introducida que se beneficia con la compactación (Posse *et al.*, 2000).

Las laderas de exposición sur presentan matorrales de *Chiliodrion diffusum* con *Berberis buxifolia* y *Ribes magellanicum*, con un estrato bajo de *Festuca gracillima* y *Azorella trifurcata*. En los suelos ácidos existen murtillares de *Empetrum rubrum* asociados con *Baccharis magellanica*, *Nassauvia fuegiana*, *Azorella fuegiana*, *Nassauvia abbreviata* y *Perezia recurvata*. Las vegas (mallines) están dominadas por gramínoides como *Juncus* o *Carex*, gramíneas como *Poa pratensis* y plantas rastreras como *Caltha sagittata*.

◆ **Ecotono fueguino:**

Esta unidad representa una transición entre la Estepa magallánica y el complejo Andino. Aquí no se observa un límite abrupto entre bosque y pastizal, como ocurre en la Patagonia continental.

Clima:

Es subhúmedo oceánico, con precipitaciones entre 400 y 500 mm, a lo largo de todo el año. Las nevadas son frecuentes y persistentes a lo largo del período invernal.

Suelos:

Los suelos desarrollados en paisajes colinados son profundos, con materia orgánica entre 6 a 12 %, no presentan alcalinidad ni salinidad y en general están bien drenados. Las texturas son francas o franco-arenosas. En los paisajes aterrizados de los ríos Ewan y Fuego se encuentran suelos mal drenados pero con alta concentración de materia orgánica (12 %), con una profundidad de 35 cm y textura franca. Los suelos de las vegas son profundos, de naturaleza turbosa, con alta materia orgánica (36 %), ácidos y con baja saturación de bases. La textura en profundidad es franco arcillosa, con drenaje malo y rasgos de hidromorfismo muy definidos.

Vegetación:

Los bosques están dominados por *Nothofagus antarctica*. Los árboles no superan los 6 m de altura y tiene troncos torcidos y ramosos. Se pueden encontrar arbustos como *Berberis buxifolia*, *Chilotrimum diffusum* y *Ribes magellanicum*. Dado que estos bosque son abiertos, se ha generado un estrato herbáceo dominado por gramíneas como *Poa pratensis*, *Phleum* sp., *Agropyron magellanicum*, *Hordeum* sp., *Trisetum* sp. En las vegas dominan las ciperáceas del género *Carex*. En las zonas inundadas se desarrollan turberas de *Sphagnum*.

◆ Complejo andino fueguino

Los cordones montañosos toman una dirección NO-SE y no sobrepasan los 1500 m. En ésta área se encuentran los principales cuerpos de agua dulce de Tierra del Fuego (Yehuín, Chepelmut, Escondido y Fagnano).

Clima:

Húmedo, con 540 mm de precipitación en Ushuaia. La influencia marítima en la zona del Canal de Beagle y en las costas del Atlántico modera la temperatura.

Suelos

Gran parte de la región tiene substratos de rocas ígneas que se degradan lentamente y dan lugar a suelos, pobres en nutrientes, ácidos y saturados en agua. Estos suelos soportan vegetación de tundra o turbera. A mayores alturas el congelamiento genera fracturas en las rocas y acumulaciones de materiales gruesos.

Vegetación:

Se presenta como un mosaico de bosques de *Nothofagus pumilio*, *N. antarctica* y *N. betuloides* en laderas y valles y semidesiertos de altura y desiertos de roca cubiertos por hielos eternos. La región incluye extensas áreas de turberas, lagunas y zonas bajas que acumulan materia orgánica no descompuesta de musgos.

Fig. 5: Mapa de áreas ecológicas de Santa Cruz y Tierra del Fuego.

Tomado de Oliva *et al.* (2001)

OBJETIVOS

Mediante el estudio de poblaciones naturales y ensayos controlados en vivero y laboratorio, determinar los posibles beneficios que la simbiosis gramínea-endofito puede aportar a hospedantes nativos de Argentina. Se analizaron los siguientes aspectos:

- Distribución e incidencia de endofitos en poblaciones de *B. setifolius*, *Ph. commutatum* y *P. rigidifolia* en la provincia en la Patagonia Austral y correlacionarlas con las características bióticas y abióticas de los sitios de muestreo.
- Aislamiento y caracterización de cepas de endofitos de las poblaciones identificadas de los tres hospedantes.
- Comparar, en *B. setifolius*, características de los cariopses y parámetros de crecimiento del hospedante en relación a la infección endofítica.
- Analizar la relación entre la colonización por hongos micorrícicos y la endofítica en *B. setifolius*. Establecer su efecto sobre parámetros de crecimiento del hospedante.

HIPOTESIS

- La asociación con endofitos de gramíneas nativas de la Patagonia se basa en el beneficio que le confieren al hospedante para superar condiciones adversas. El porcentaje de colonización se correlaciona con las características bióticas y abióticas del sitio donde se desarrolla la población hospedante.

- Tanto en condiciones de campo como en ensayos de laboratorio, la colonización de un hospedante por endofitos disminuye la colonización por hongos MA.

CAPÍTULO 1

**Incidencia de la colonización de endofitos del género
Neotyphodium en gramíneas nativas de la Patagonia**

PARTE A
INCIDENCIA DE ENDOFITOS DEL GÉNERO *Neotyphodium* EN
POBLACIONES NATIVAS DE *Bromus setifolius*

ANTECEDENTES

La colonización por endofitos ya ha sido registrada en poblaciones de *Bromus setifolius* de la provincia de Mendoza (White *et al.*, 2001) e identificados como pertenecientes al género *Neotyphodium*. Estos autores muestrearon 13 poblaciones en el camino que va desde la ruta 40 hasta Las Leñas y que representa aproximadamente 70 km. Dicha colonización fue correlacionada positivamente con la presencia de hormigas (*Acromyrmex* sp.) lo que fue corroborado mediante ensayos de alimentación en los que insectos (*Spodoptera frugiperda* - oruga militar tardía) prefirieron las plantas libres de endofitos.

B. setifolius presenta una amplia distribución en la provincia de Santa Cruz y relevamientos preliminares (Cabral, com. per.) indicarían que algunas poblaciones se encuentran colonizadas por endofitos. Por otra parte, las características bióticas y abióticas de la Patagonia son substancialmente diferentes a la de Mendoza y la distribución mucho más amplia.

OBJETIVOS

Aislar e identificar el/los endofitos de *B. setifolius* en diversas poblaciones de la provincia de Santa Cruz.

Realizar un muestreo para analizar la distribución y la incidencia de la colonización del/los endofitos en poblaciones nativas de *Bromus setifolius* de la provincia de Santa Cruz.

Correlacionar la posible distribución e incidencia con factores bióticos y abióticos.

HIPÓTESIS

El endofito de *B. setifolius* es del tipo *Neotyphodium*, como el registrado previamente en Mendoza.

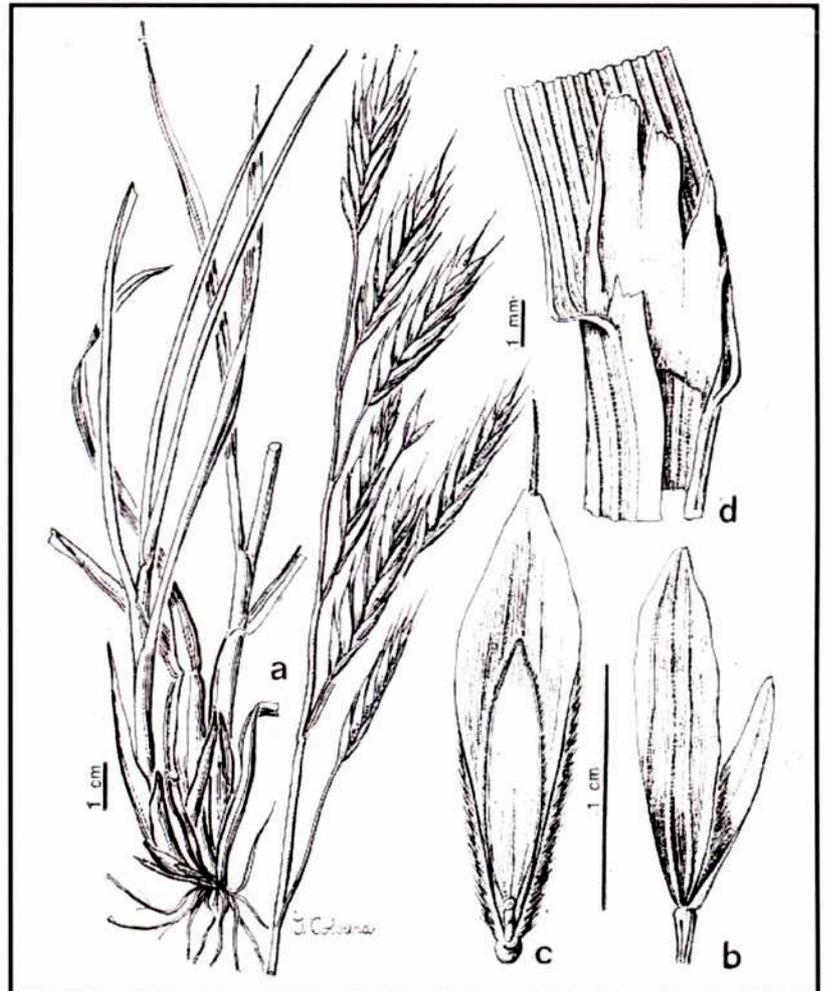
La distribución e incidencia de los endofitos se correlacionan con uno o varios de los siguientes factores: clima, geografía y características edáficas, así como con la vegetación asociada y/o la presencia de insectos herbívoros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie estudiada

Bromus setifolius

Fig. 6: *Bromus setifolius*: a. planta (parte basal e inflorescencia); b. glumas; c. antecio; d. lígula. Tomado de Nicora (1978).



El género *Bromus* L. pertenece a la tribu Poaceae, subfamilia Pooideae, e incluye alrededor de 150 especies distribuidas principalmente en las regiones templadas del mundo (Gutiérrez & Pensiero, 1998).

B. setifolius es una planta perenne, densamente cespitosa, con cañas erguidas, de 5-40 cm de alto; nudos 1-3, glabros; vainas abiertas sólo en la región superior, de 2-8 cm long., pubescentes; lígula membranácea, finamente lacerada en el ápice. Láminas lineales, convolutas o planas, de 3,5-10(-18) cm long. por 0,1-0,4 cm lat., normalmente pubescentes. Inflorescencia en panoja contraída, con ramas cortas, rectas, las inferiores de 1-5cm long. Glumas desiguales, glabras, mayores o iguales a la mitad del largo de la lemma inferior, con el ápice agudo o redondeado Fig. 6 (Nicora, 1978).

En los materiales estudiados se han observado variaciones morfológicas que dificultan una clara delimitación entre sus variedades. No obstante se ha creído conveniente seguir la delimitación propuesta por Cámara Hernández (1978) y Matthei (1986).

Relevamiento de poblaciones de *Bromus setifolius*

Para este estudio se realizaron tres campañas a la provincia de Santa Cruz en los años 1998, 1999 y 2001. Se tomaron muestras de 36 poblaciones de *Bromus setifolius* a lo largo de una transecta SE-NO de aproximadamente 800 km al sur de la provincia, abarcando la región que se encuentra entre Cabo Vírgenes y El Chaltén. De cada población se tomaron 20 escapos florales, uno por planta, se registró la altitud, la latitud y la longitud así como el tipo de vegetación. La detección microscópica de endofitos se realizó en la zona de muestreo, lo que permitió regresar a las poblaciones con endofitos para tomar plantas completas y cariopses, para el aislamiento en el laboratorio y para obtener plántulas que se utilizarán en los ensayos de laboratorio y vivero.

Detección de endofitos

La detección de endofitos del género *Neotyphodium* se realizó mediante técnicas histológicas clásicas en cañas y cariopses (Clark *et al.*, 1983) (Anexo 1-1). En cada escapo floral (caña) se realizó una incisión en sentido paralelo al eje mayor del vástago y con bisturí se procedió, mediante el raspado de la zona expuesta, a la obtención de tejido parenquimático. Este se montó en portaobjetos para su tinción con azul de anilina. De ser necesaria una hidratación previa del material se utilizó NaOH (5%). En cariopses se realizó un ablandamiento con NaOH durante 10-18 hs (5 %), lavado, tinción, aplastado y observación microscópica de las hifas asociadas con la capa de aleurona. Para la observación bajo microscopio óptico se utilizó un aumento de 100X.

Aislamiento y caracterización de el/los endofitos

1- Aislamiento (Anexo 1-2): a partir de plantas transportadas vivas al laboratorio y/o de cariopses. Las cañas se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm de largo. Tanto los fragmentos de caña como los cariopses se esterilizaron superficialmente mediante lavados consecutivos en etanol 50% durante 5 minutos, luego en hipoclorito de sodio 50% entre 2

a 5 minutos y finalmente en etanol 70 % 1 minuto. Los trozos y cariopses se sembraron en medio agarizado Agar Papa Glucosa (APG).

El micelio desarrollado fue transferido a tubos en pico de flauta y se almacenó en heladera a 5°C. A cada una de las cepas se le asignó un número identificador interno (DC: Colección particular del Dr. Daniel Cabral). Algunas cepas seleccionadas fueron incorporadas a la colección de cultivos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (BAFC cult).

- 2- Observación y registro de características macro y microscópicas a partir de cultivos en medio sólido. La identidad de los aislamientos fue confirmada por observaciones de las características macro y microscópicas de los cultivos de las cepas aisladas. Estas características consistieron en la morfología y color de la colonia, tipo de fiálides, tipo y tamaño de los conidios. Además se realizaron observaciones del material con microscopía de fluorescencia utilizando calcoflúor 0,01 % (Latch *et al.*, 1984; Morgan-Jones & Gams, 1982; White & Morgan-Jones, 1987).

Caracterización de las poblaciones muestreadas

Altitud, latitud y longitud

Se registró la altitud, latitud y longitud, para cada población, utilizando un GPS (Global Positioning System). Las coordenadas geográficas fueron codificadas para su posterior análisis, de manera de poder ser ingresadas en una matriz. Para la latitud se tomó como criterio que 30' equivalen a una unidad y para la longitud se consideró a cada grado como una unidad.

Latitud

49°- 49° 30'= 1	51°1-51° 30'=5
49° 30'- 50°= 2	51° 30'- 52°= 6
50°- 50° 30'= 3	52°-52° 30'= 7
50° 30'- 51°= 4	52° 30'- 53°= 8

Longitud

68°- 69°= 1	71°- 72°= 4
69°- 70°= 2	72°- 73°= 5
70°- 71°= 3	

Caracterización climática

Para la información sobre las características climáticas de los sitios correspondientes a las distintas poblaciones muestreadas, las variables elegidas fueron: promedio anual y estacional de la temperatura y las precipitaciones. Se consideraron las precipitaciones del trimestre más frío y del trimestre más cálido del año (De Fina, 1992). La bibliografía utilizada aporta datos climáticos de numerosos puntos de la provincia, muchos de los cuales coincidieron con las poblaciones del presente estudio. Cuando no se encontraron datos exactos para los sitios se eligió la referencia más cercana.

Caracterización de la comunidad vegetal y de relevamiento de insectos

En cada población se muestreó una superficie de 100 m², donde se registraron, bajo la dirección de la Ing. Marta Collantes, las especies vegetales predominantes y su cobertura relativa, así como la de suelo desnudo. La abundancia y cobertura total fue estimada con la escala de Braun-Blanquet modificada por Westhoff & van der Maarel (1978).

En cada población se registró la presencia significativa de insectos, como hormigueros, en el mismo cuadrante usado para la determinación de la comunidad vegetal.

Caracterización edáfica

Durante la campaña realizada en 1999 se tomaron muestras de suelo, en 11 de las poblaciones, de manera que fueran representativas de las diferencias edáficas más significativas. Fueron analizadas en el Laboratorio de Química Geológica y Edafológica - CONICET. El análisis incluyó pH (relación suelo-agua 1 en 2.5) (Peech, 1965), Conductividad eléctrica (Bower & Wilcox, 1965), % de carbono total (Richter & Wistinghausen, 1981), % nitrógeno total (Brenner & Mulavaney, 1982), fósforo disponible, capacidad de intercambio catiónico (CIC), Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ y K⁺ intercambiables y clasificación textural. En la 3^o campaña, se añadieron muestras de suelo de 13 poblaciones de las que se obtuvo el pH (Anexo 1-3). En ambos casos las muestras compuestas provinieron de suelo tomado en los primeros 10 cm en 5 lugares, elegidos al azar, de cada población.

Análisis estadístico

Para analizar el clima *versus* incidencia de endofitos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), que incluyó todos los datos climáticos y de coordenadas obtenidos de las 36 poblaciones.

Este método permite la estructuración de un conjunto de datos multivariados, obtenidos de una población, cuya distribución de probabilidades no necesita ser conocida. Sin embargo, si puede suponerse que la población muestreada tiene distribución multinormal, podrá estudiarse la significancia estadística y será posible utilizar la muestra para efectuar pruebas de hipótesis. Los objetivos más importantes de éste método son generar nuevas variables que puedan expresar la información contenida en el conjunto original de los datos y reducir la dimensionalidad del problema que se está estudiando. Las nuevas variables generadas se denominan *componentes principales*. El programa utilizado pertenece al sistema PC_ORD de análisis multivariado (McCune, 1991).

La matriz realizada con los datos climáticos, los datos de altitud y las coordenadas quedó conformada por 36 especies y 8 poblaciones (Tabla 3). Dado que se utilizaron variables expresadas en diferentes unidades, se realizó una estandarización de los datos con el fin de acercarse a la distribución normal en cada variable y de normalizar el promedio de las mismas. La técnica de estandarización más utilizada consiste en expresar los valores de la matriz básica de datos en unidades de desviación estándar (Crisci & López Armengol, 1983; Matteucci & Colma, 1982).

El cálculo mencionado se expresa:

$$x_{ij} \text{ estandarizado} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i} \quad (1)$$

La matriz básica resultante de ésta transformación fue utilizada para realizar el ACP.

Dado que se contó con datos de pH de sólo 24 de las 36 poblaciones estudiadas, se realizó un ACP con los datos climáticos y de pH sólo con éstas 24 poblaciones. Los datos utilizados también fueron estandarizados, siguiendo la ecuación (1)

Los datos químicos de los suelos, de 10 de las poblaciones, se analizaron mediante un ACP de manera independiente al resto de los datos.

Para realizar la caracterización vegetal de las poblaciones se organizó una matriz de 28 censos y 98 especies que fue clasificada mediante el Indicador de análisis de dos factores (TSA) usando el programa Twinspan (Hill, 1979).

Tabla N° 3: Datos climáticos, de altitud y pH de los sitios de muestreo de *Bromus setifolius*.

Sitios	Alt	Tmc	Tmf	Pan	Ptc	Ptf	Lat	Lon	pH
S05	41	10,6	1,8	257	85	51	7	1	5,72
S07	83	11,3	1,1	240	77	52	6	2	6,15
S08	150	9,9	1,2	240	71	44	7	2	
S10	153	12,3	1,1	178	50	39	5	3	5,9
S11	800	12,1	0,9	103	20,5	26	3	4	6
S16	240	12	2,1	681	135	241	3	5	6
S18	226	11,7	2,5	380	54	143	3	5	6,2
S22	222	12,6	1,5	192	41	50	3	5	6,1
S23	210	12,15	1,6	436,5	88	132	3	5	*
S24	240	12	2,1	681	135	241	3	5	*
S26	180	13,4	2,1	107	25	27	2	5	*
S27	275	13,2	2,5	435	85	125	2	5	*
S28	417	13	3	729	143	225	1	5	*
S29	800	12,2	2,4	784	153	241	1	5	*
S32	420	12,2	2,4	784	153	241	1	5	*
S33	235	13	1,8	118	24	29	2	5	*
S35	90	12,2	1	231	70	51	6	2	5,87
S37	400	11,2	0,2	174	45	40	4	4	5,9
S39	76	11,4	1,3	261	85	54	6	2	5,92
S40	59	12,6	1,5	319	106	64	7	1	6,37
S41	142	12,1	1	170	45	39	5	3	*
S42	209	12,6	1,5	192	41	50	3	5	6,3
S43	220	12,9	1,6	101	22	24	3	4	6,8
S45	521	10,9	-0,2	138	32	32	4	4	6,7
S46	40	12,1	1,2	249	79	54	6	2	6,58
S47	162	9,9	1,2	240	71	44	7	2	6,36
S48	26	11,9	1,1	223	66	50	6	2	6,47
S49	55	11,3	0,9	207	58	48	6	3	6,37
S50	138	10,8	1	216	42	48	6	3	6,03
S52	342	10,6	0,1	302	77	68	5	4	6,58
S53	333	11,1	0,5	248	67	52	4	4	6,27
S54	358	11,1	0,5	248	67	52	4	4	6,12
S55	426	11	0,1	151	37	34	4	4	7,23
S56	701	11,4	0,2	104	20	27	4	4	*
S57	256	11,9	0,7	176	48	39	4	3	*
S58	151	12,2	1	183	50	41	6	3	5,98

* = Datos de pH faltantes.

Abreviaturas usadas para las variables:

Alt = Altitud

Tmc = Temperatura media en °C en el mes más cálido (enero)

Tmf = temperatura media en °C en el mes mas frío (julio)

Pan = Precipitación media anual (mm)

Ptc = Precipitación media en el trimestre más cálido (D. E. E).

Ptf = Precipitación media en el trimestre más frío (J. J. A).

Lat = Latitud

Lon = Longitud

RESULTADOS

Relevamiento de poblaciones de *Bromus setifolius*

La ubicación y características de los sitios de muestreo de las 36 poblaciones se muestran en la Tabla 4. Las poblaciones se localizaron a lo largo de una transecta SE-NO que presentó como sitios extremos a la población 40 (52° 19' 15" S; 68° 32' 44" O) y a la 32 (49° 15' 19" S; 72° 53' 08" O).

Se observó la presencia de endofitos en 14 de las 36 poblaciones analizadas. El porcentaje de colonización de las poblaciones varió de 0% a 100% (Tabla 4).

Detección de endofitos

Los endofitos de *B. setifolius* se caracterizan por presentar, en el parénquima de cañas y vainas, hifas de 2 µm de diámetro, sin ramificaciones, generalmente lineales aunque a veces convolutas. Intercelulares y, por lo general, paralelas al eje mayor de las células del hospedante (Fig. 7). En los cariopses se detectaron hifas en la capa de aleurona, con crecimiento profuso, ondulado y ramificado (Fig. 7).

Aislamiento, caracterización e identificación de cepas

Se observó el desarrollo de micelio desde el interior de fragmentos de cañas o de semillas a partir de los 20 días de incubación en APG. Cuando de una misma planta se obtuvo más de un aislamiento, a menos que éstos presentaran distintas características micro y macroscópicas, se los consideró como una misma cepa.

Se aislaron 16 cepas de 8 poblaciones. En la Tabla 5 se encuentran las características particulares del sustrato usado para el aislamiento y del sitio al que corresponde.

Todas las cepas se caracterizan por presentar colonias de crecimiento lento, alcanzando entre 2,5-3,7 cm a los 30 días en agar papa glucosa (APG) a 23 °C. Las colonias son blancas a crémeas, de aspecto algodonoso a subafieltrado, bordes irregulares constituidos por hifas sumergidas formando una franja translúcida. Reverso de la colonia por lo general con el centro castaño claro a levemente amarillo aclarándose hacia los bordes.

Tabla N° 4: Ubicación, incidencia y características de la vegetación en los 36 sitios donde se muestrearon las poblaciones estudiadas de *Bromus setifolius*.

Sitio	Coordenadas	Localidad ^a	Especies dominantes de la comunidad	E+(%)
5	52° 10' 58" S 68° 59' 51" W	Estancia El Cóndor	<i>Berberis buxifolia</i> (Calafate), <i>Empetrum rubrum</i> (murtilla), <i>F. magellanica</i> y otros pastos.	100
7	51° 52' 05" S 69° 25' 02" W	Estancia 3 de enero	Estepa de <i>F. magellanica</i> <i>P. rigidifolia</i> , <i>Stipa</i> sp.	0
8	52° 04' 33" S 69° 34' 49" W	Monte Aymond	Estepa de <i>F. pallescens</i> <i>P. rigidifolia</i> , <i>Stipa</i> sp.	0
10	51° 07' 43" S 70° 33' 24" W	Estancia María Inés	Estepa de <i>Stipa</i> sp., <i>F. magellanica</i> , <i>F. pallescens</i> , <i>P. rig.</i> y <i>Junellia tridens</i>	0
11	50° 20' 59" S 71° 31' 00" W	Promedio entre Ea. Las Torcazas y Paso Río Bote	<i>Senecio</i> , <i>Hordeum</i> sp., <i>P. rigidifolia</i>	43
16	50° 24' 18" S 72° 44' 33" W	Puerto Bandera	<i>Mulinum spinosum</i> (Neneo), y gramíneas como <i>Bromus</i> spp.(2) y <i>Stipa</i>	100
18	50° 29' 28" S 72° 41' 54" W	Chacra Los Patos	Neneo, pastizal	72
22	50° 20' 15" S 72° 18' 07" W	Calafate	<i>Stipa</i> sp., <i>Senecio</i> , neneo y calafate	33
23	50° 20' 15" S 72° 18' 07" W	Promedio entre sitios 22 y 24	Calafate y peinecillo	10
24	50° 19' 45" S 72° 33' 28" W	Puerto Bandera	Neneo y <i>F. pallescens</i>	95
26	49° 59' 17" S 72° 05' 44" W	Estancia La Asunción	Pastura de <i>Stipa</i> pocos Calafates y <i>A. seriphoides</i>	0
27	49° 35' 31" S 72° 15' 47" W	Estancia Viedma	Pastizal	50
28	49° 22' 13" S 72° 49' 01" W	Estancia San José	Neneo y coirones de <i>F. pallescens</i> . Esporádicos calafates	70
29	*	Cerro Fritz Roy	Bosque de lenga (<i>Nothofagus pumilio</i>)	0
32	49° 15' 19" S 72° 53' 08" W	Cerro Fritz Roy	Neneo	100
33	49° 48' 34" S 72° 03' 04" W	lago Viedma	Pastizal de <i>Stipa</i> con <i>Berberis buxifolia</i>	5
35	51° 37' 10" S 69° 41' 42" W	Güer Aike	<i>Acaena</i> spp., <i>Azorella</i> , <i>Baccharis</i> y <i>Berberis buxifolia</i>	10
37	50° 47' 49" S 71° 08' 10" W	Estancia El Librún	Matorral de <i>Junellia tridens</i>	0
39	51° 52' 15" S 69° 13' 53" W	Estancia Fraile del Cóndor	Pastizal de <i>F. pallescens</i> y <i>P. rig.</i>	0
40	52° 19' 15" S 68° 32' 44" W	Cabo Vírgenes	Pastizal de <i>F. pallescens</i> <i>P. rig.</i> , <i>Stipa</i> y <i>Hordeum</i>	45

41	51° 16' 52" S 70° 24' 42" W	Estancia las Vegas	Pastizal de <i>F. pallescens</i> <i>Hordeum pubescens</i> y <i>Hordeum</i> sp	0
42	50° 19' 57" S 72° 21' 47" W	Calafate	Pastizal de <i>F. pallescens</i> , <i>P. rig</i> ., <i>Hordeum</i> sp., <i>Bromus</i> sp. Y <i>Senecio</i>	0
43	50° 18' 37" S 71° 51' 04" W	Charles Fhur	Pastizal de <i>Stipa</i> (90%), <i>Hordeum</i> sp., <i>Senecio</i> .	0
45	50° 37' 12" S 72° 22' 15" W	Hotel El Cerrito	Pastizal mixto, coirones de <i>F. pallescens</i> , <i>Stipa</i> , <i>Empetrum rubrum</i> , <i>P. rig</i> ., <i>Berberis buxifolia</i> aislada, <i>Bromus</i> sp., <i>Hordeum</i>	0
46	51° 43' 55" S 69° 19' 01" W	Chimen Aike	Pastizal de <i>Stipa</i>	0
47	52° 07' 27" S 69° 31' 03" W	Monte Aymond	Pastizal húmedo de <i>F. gracillima</i> y <i>P. rig</i> .	0
48	51° 41' 54" S 69° 44' 01" W	Estancia Palermo Aike	Plantas grandes en coirones. Ladera sur Pastizal de <i>F. gracillima</i> con cojines de <i>Junellia</i>	0
49	51° 43' 55" S 70° 05' 15" W	Estancia 1° de Mayo	Pastizal de <i>Poa</i> con <i>Festuca gacillima</i>	0
50	51° 52' 23" S 70° 30' 02" W	Bella Vista	Pastizal elevado de <i>Poa</i> y cojines.	0
52	51° 07' 39" S 71° 54' 31" W	Estancia Fuentes del Coyle	Pastizal de <i>P. rig</i> . y coirones de <i>F. gracillima</i>	80
53	50° 56' 40" S 71° 41' 18" W	Estancia Tapí Aike	Cojines de <i>Nasaubia</i> y algunas plantas de <i>Berberis</i> al costado del camino. <i>Baccharis</i> , <i>F. pallescens</i> y <i>Stipa</i> .	0
54	50° 55' 51" S 71° 39' 47" W	Estancia Tapí Aike	Pastizal de <i>F. pallescens</i> con cojines de neneo. Sobre una ladera.	20
55	50° 46' 57" S 71° 26' 31" W	Estancia del Tero	Matorral de <i>Junellia tridens</i> (mata negra)	0
56	50° 27' 43" S 71° 27' 57" W	Estancia Las Torcazas	Pastizal de <i>P. rig</i> . Y <i>F. pallescens</i> .	0
57	50° 59' 21" S 70° 58' 55" W	Estancia El Fabre	Cojines de <i>Nasaubia</i> con <i>Stipa</i> y <i>Berberis</i> aislado.	0
58	51° 32' 02" S 70° 03' 54" W	Estancia La Regalona	Pastizal de <i>F. gracillima</i> con <i>Armenia maritima</i> , <i>Cerastium arvense</i> .	0

⁴ Los datos climáticos de las poblaciones carentes de sensores fueron calculados como el promedio de los obtenidos a partir de las localidades más cercanas. * Dato faltante.

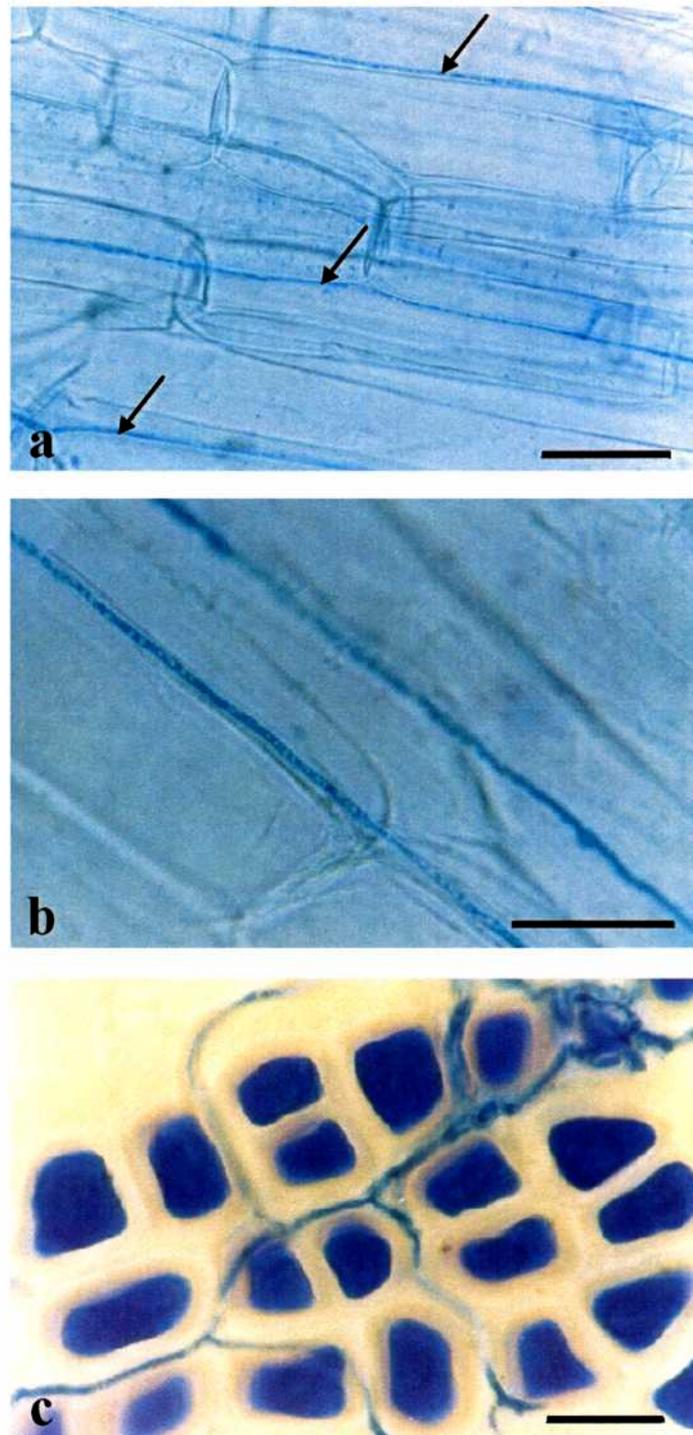


Fig. 7: Detección de endofitos en cañas y semillas de *Bromus setifolius*.
 a y b- hifas creciendo en forma paralela al eje mayor de las células de cañas.
 c- hifas entre las células de la capa de aleurona de las semillas.
 Escala de barras: a= 50µm , b= 40µm, c= 60µm.

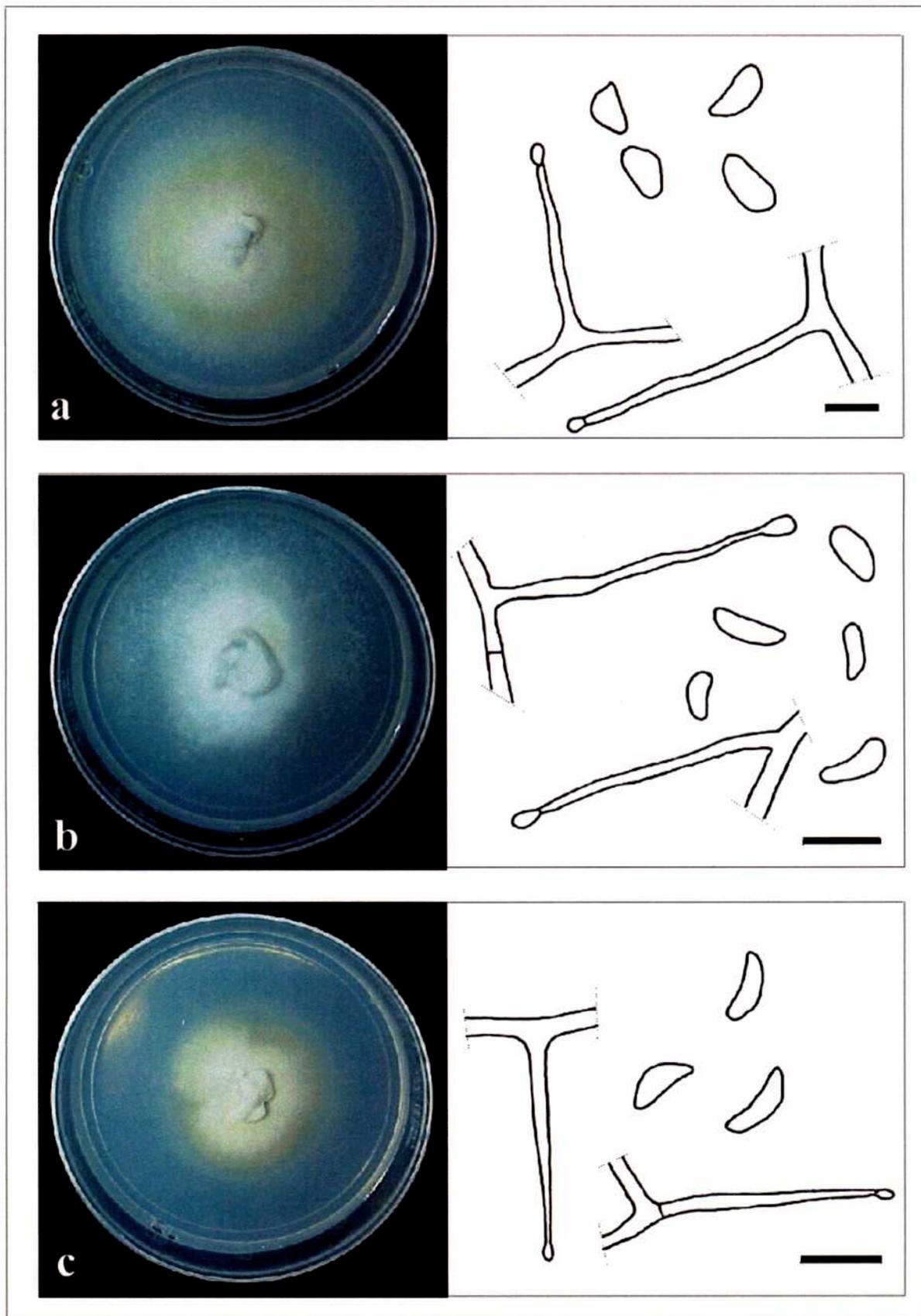
Tabla 5: Características de las cepas aisladas de *Bromus setifolius*.

Cepa nº	BAFC cult	Sustrato	Población
2365		caña	16
2366	719	caña	16
2367		caña	18
2368	816	caña	18
2369	617	caña	24
2370	420	caña	24
2371		caña	24
2372		caña	32
2373		caña	32
2374		caña	28
2375		caña	28
2411		cariopse	35
2412		cariopse	35
2413	508	cariopse	5
2414	532	cariopse	16
2446		cariopse	40

Las cepas 2368, 2369, 2370, 2371, 2373 y 2446 resultaron estériles (no desarrollaron fiálides ni conidios) por lo que fueron caracterizadas únicamente por la morfología de la colonia. Las cepas restantes presentaron células conidiógenas (fialídicas?) de 25-57 μm de longitud, rectas a sinuosas, 1-3 μm de ancho en la base, adelgazándose hacia el ápice. Perpendiculares a la hifa sustentora, generalmente con tabique basal o ausente, también se han observado tabiques en la zona media. Los conidios de 2,5-4,1 μm x 6-8,6 μm pueden presentar formas variables: ovales, ovoides, levemente lunados a reniformes, raramente subglobosos elipsoides. En la Fig. 8 se pueden observar las características de la colonia y microscópicas de tres cepas tomadas al azar entre las analizadas. Dado que las diferencias observadas entre las cepas no fueron significativas no pudieron ser organizadas en grupos.

Las características analizadas indican que las cepas pertenecen al género *Neotyphodium*. Si bien un grupo de cepas resultaron estériles, las semejanzas en las características del tipo de crecimiento y de la colonia nos permiten asumir que se trata de organismos del mismo género que los anteriores. Los aislamientos, sin embargo, no se identificaron a nivel de especie o distintos genotipos, dado que la identidad taxonómica de los hongos *Neotyphodium* todavía se encuentra en discusión (Cabral *et al.*, 1999; White, 1997). Sería prematuro asignar dichos aislamientos a especies sin un estudio más exhaustivo que incluya, entre otros, análisis de secuencia de rADN (Scharld *et al.*, 1991). En nuestro laboratorio, se están llevando a cabo este tipo de estudios, incluyendo cepas de más de 10 spp. de gramíneas (Gentile, no publicado).

Fig 8: Características de la colonia y microscópicas de cepas de *Neotyphodium* aisladas de *Bromus setifolius*. a- 2366, b- 2372, c- 2375.



Escalas de barra: a- 5 μ m, b y c- 10 μ m.

Correlación entre la incidencia de endofitos y factores abióticos

Los tres primeros componentes del ACP realizado con las datos de clima absorbieron el 92,61 % de la varianza total (Tabla 6). La distribución de las poblaciones en el espacio según los componentes I y II se muestra en la Fig. 9.

El componente I, que absorbió el 53,46 % de la varianza, está asociado positivamente con la precipitación media anual (Pan) y con la precipitación media del trimestre más frío (Ptf). Esto indica que el componente I refleja la variación en la precipitación entre las poblaciones.

En la Fig. 9 se observan las poblaciones con mayor tasa de precipitaciones (16, 24, 28, 29 y 32) en su extremo positivo. En la Fig. 10, donde se muestra la distribución geográfica de las poblaciones, se puede observar que éstas mismas poblaciones se encuentran en el área de Complejo andino, donde las precipitaciones son las más elevadas.

El componente II, que explica un 24,31 % adicional de la varianza, presenta una asociación positiva para altitud y para longitud y presenta una negativa para latitud. En consecuencia, el eje refleja la distribución espacial de las poblaciones. En la Fig. 9 se observa la disposición de las poblaciones 5 y 40 en su extremo negativo y las poblaciones 11 y 56 en el positivo.

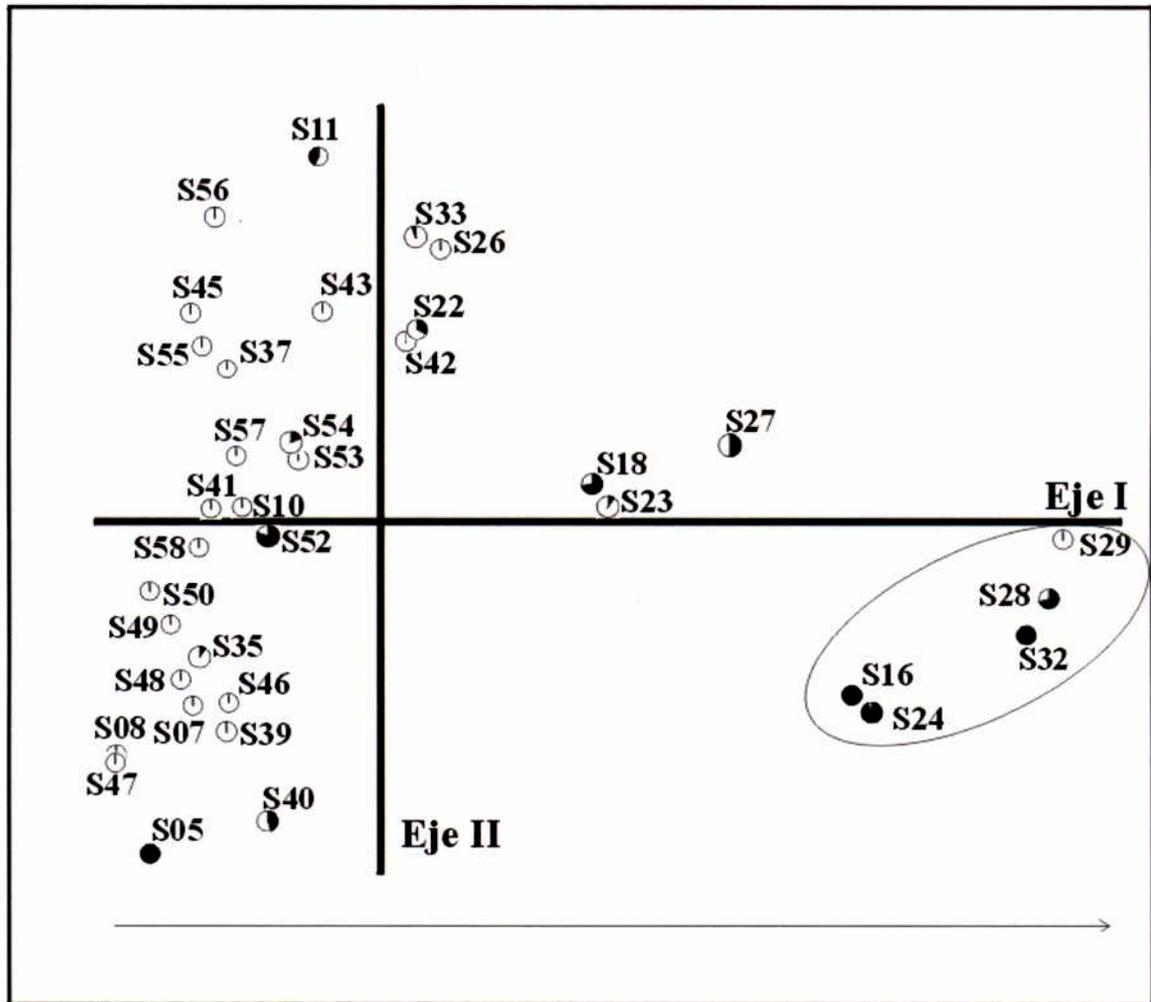
El componente III, no graficado, que absorbió 14,84 % de la varianza, se asoció positivamente con altitud y negativamente con la temperatura media del mes más caluroso (enero) (Tmc) y con la temperatura media del mes más frío (julio) (Tmf).

Las poblaciones muestreadas con mayor tasa de precipitación se localizaron en los extremos de la transecta, por un lado las poblaciones 5 y 40 y por el otro las 16, 24, 28, 29 y 32. Estos dos grupos difieren entre sí en los valores de latitud, longitud y altitud lo que genera que en el gráfico 9, las poblaciones 5 y 40 no se encuentren en el extremo positivo del eje I, sino que en ellas pesa más el componente II.

Tabla 6: Análisis de Componentes Principales basado en los datos climáticos estandarizados. Se muestran las contribuciones de las variables a los tres primeros componentes, la varianza explicada por cada componente, a qué porcentaje de la varianza total corresponde y la varianza acumulada. Los códigos de las variables están definidos en la Tabla 1.-

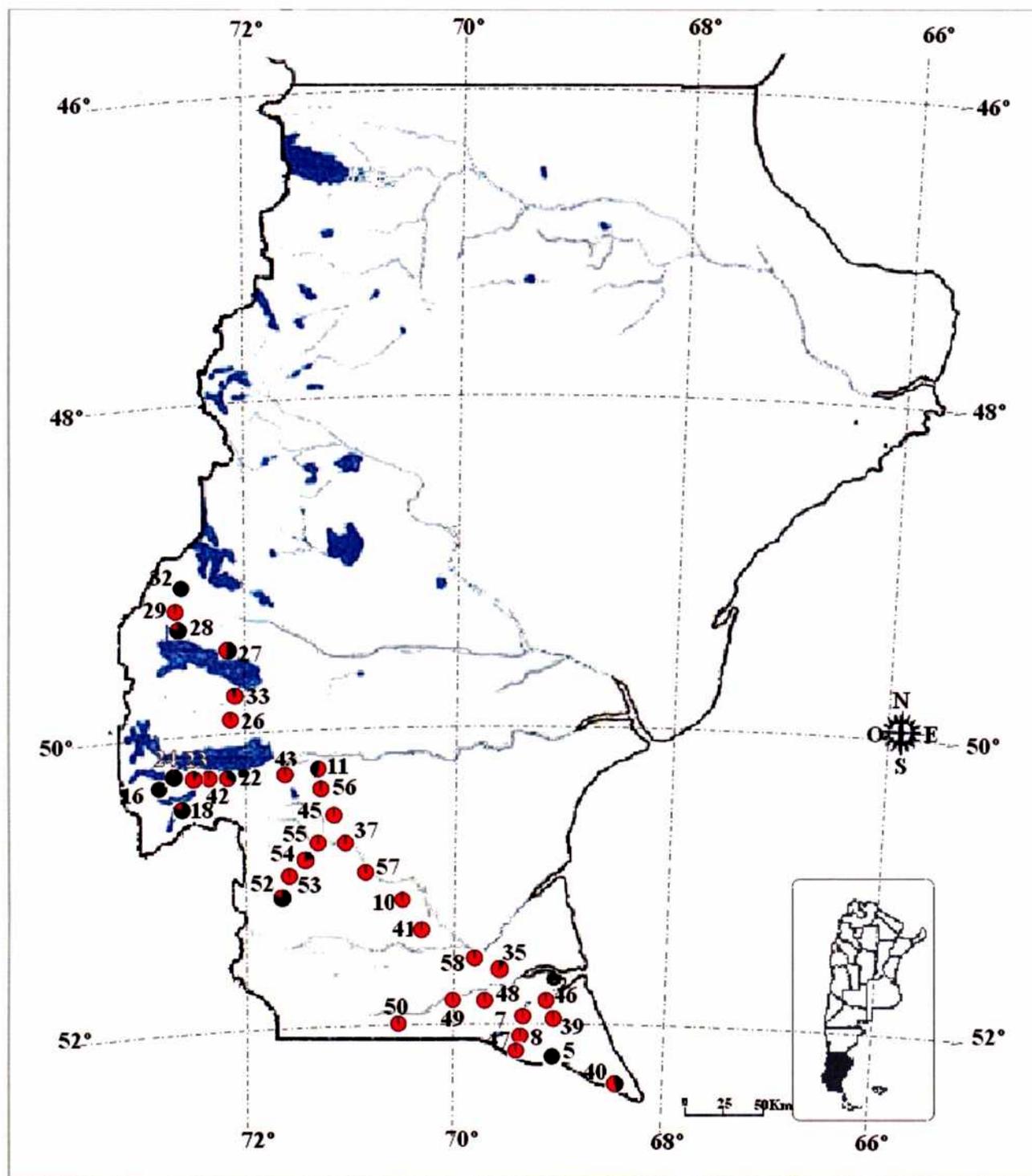
Variables	Componentes		
	I	II	III
Alt	0,1870	0,4243	0,5787
Tmc	0,2336	0,2402	-0,6431
Tmf	0,3542	-0,1659	-0,4167
Pan	0,4335	-0,2994	0,1699
Ptc	0,3492	-0,4680	0,1628
Ptf	0,4512	-0,2242	0,1405
Lat	-0,3956	-0,4203	0,0340
Lon	0,3393	0,4462	0,0338
Varianza	147,16	66,92	40,84
% varianza	53,462	24,309	14,836
v. acumulada	53,462	77,771	92,608

Fig. 9: Distribución de las poblaciones de *B. setifolius* en el espacio de los dos primeros componentes derivados del análisis de Componentes Principales de los datos de clima, altitud y coordenadas. Los números indicados corresponden a los usados para identificar a las poblaciones. La porción en negro dentro de cada círculo muestra el porcentaje de colonización de plantas con endofitos en cada población.



La flecha indica el sentido del incremento de las precipitaciones. La elipse de línea continua agrupa a las poblaciones con mayor tasa de precipitaciones.

Fig. 10: Mapa de la provincia de Santa Cruz indicando los sitios de muestreo correspondientes a las poblaciones de *Bromus setifolius*. La porción negra dentro de cada círculo corresponde al porcentaje de colonización con endofitos de dicha población.



Para estudiar la asociación entre los datos de clima y la incidencia de endofitos, se realizó una validación externa entre las coordenadas de los sitios/poblaciones y los datos de incidencia. Esta se estimó mediante el coeficiente de correlación de Pearson ($r= 0,57$) indicando la existencia de una relación positiva y significativa ($P= 0,001$). La proporción de la varianza en los datos de incidencia explicada por la matriz de clima es igual a $r^2= 0,3249$. Esto indica que el 30% de la varianza observada en los datos de incidencia puede ser explicada por los datos obtenidos de clima, altitud y coordenadas de las poblaciones. Este porcentaje es importante considerando la gran extensión de la transecta utilizada, donde ningún factor está controlado y teniendo en cuenta que las poblaciones están asociadas a distintas comunidades vegetales.

Se estudió la correlación de las variables que más contribuyeron a los primeros componentes con la incidencia. La correlación entre los valores de incidencia y Ptf fue de $r=0,6548$ ($r^2= 0,42$). La Ptc presento un $r= 0,586$ ($r^2= 0,343$). La correlación con Pan fue de $r= 0,634$ ($r^2= 0,402$). De estos resultados se desprende que las precipitaciones, en particular Ptf y Pan, son las variables que más se correlacionan con la incidencia de endofitos. Dado que la correlación es positiva, a mayor tasa de precipitación se espera encontrar mayor incidencia de endofitos. Esto coincide con lo observado en el mapa de la provincia, donde las poblaciones con mayores porcentajes de colonización se encuentran en las zonas más húmedas, como las adyacencias de los bosques de *Nothofagus* en la precordillera andina y en Cabo Vírgenes, donde es evidente la influencia marítima. Una excepción es el sitio 20 que corresponde a un bosque de *Nothofagus*. En este caso las precipitaciones son elevadas pero la frecuencia de endofitos es cero, sin embargo otros factores, relacionados con la comunidad vegetal, deben ser los responsables de la ausencia de los endofitos.

Influencia del pH en la distribución de las poblaciones

Los datos de pH que se obtuvieron, 24 de las 36 poblaciones, fueron analizados junto con los de clima usando un PCA. Los tres primeros componentes, absorbieron el 82,35 % de la varianza total (Tabla 7). La contribución de la variable pH a los tres primeros componentes fue muy baja, lo que nos indica que explica muy poco de la variabilidad observada.

Caracterización de las comunidades vegetales

Los 28 censos clasificados, con el Twinspan, según sus especies vegetales se organizaron en 5 tipos de comunidades, las que coinciden con las áreas ecológicas

reconocidas por Oliva *et al.* (2001). A continuación se muestran los sitios correspondientes a cada comunidad y entre paréntesis se detalla la incidencia de endofitos en cada población:

Matorral de mata negra (*Junellia tridens*): 10 (0%), 37 (0%), 41 (0%), 43 (0%), 45 (0%), 46 (0%), 53 (0%), 55 (0%), 56 (0%), 57 (0%).

Pastizal Subandino: 11 (43%), 22 (33%), 42 (0%), 54 (20%).

Estepa magallánica seca: 7 (0%), 8 (0%), 35 (10%), 39 (0%), 47 (0%), 48 (0%), 49 (0%), 50 (0%), 52 (80%), 58 (0%).

Estepa magallánica húmeda: 5 (100%), 40 (45%).

Complejo Andino. 16 (100%), 18 (72%).

Las poblaciones correspondientes al Matorral de mata negra y a la Estepa magallánica seca muestran están prácticamente libres de endofitos o con porcentajes cercanos al cero. La única población con una alta incidencia fue la 52 que presenta una tasa de precipitación mayor que las restantes.

Las poblaciones correspondientes al Pastizal Subandino presentan porcentajes de incidencia intermedios. Las poblaciones correspondientes a la estepa magallánica húmeda como al Complejo Andino presentan porcentajes de incidencia cercanos a 100 %.

De estos resultados se desprende que existe una correlación entre la incidencia de endofitos y las comunidades vegetales.

En las Fig. 11 y 12 se muestran algunas de las comunidades analizadas en el presente trabajo.

Observación de la presencia de insectos

No se habiéndose observado la presencia de insectos en los muestreos realizados, no se realizó ningún relevamiento sistematizado de los mismos.

Tabla 7: Análisis de Componentes Principales basado en los datos climáticos y de pH estandarizados de *B. setifolius*. Se muestran las contribuciones de las variables a los tres primeros componentes, la varianza explicada por cada componente, a qué porcentaje de la varianza total corresponde y la varianza acumulada. Los códigos están definidos en la Tabla 1. En negrita se destacan las variables que más aportan a cada componente.

Variables	Componentes		
	I	II	III
Alt	0,3803	0,1619	-0,3562
Tmc	0,0533	0,5019	0,7224
Tmf	-0,336	0,2616	0,2692
Pan	-0,4261	0,266	-0,2938
Ptc	-0,4861	0,0124	-0,1453
ptf	-0,3423	0,3848	-0,2861
Lat	-0,2737	-0,4833	0,1365
Lon	0,2533	0,4478	-0,2661
pH	0,2558	0,0196	-0,006
Varianza	78,71	66,67	39,09
% varianza	35,14	29,766	17,451
v. acumulada	35,139	64,905	82,356

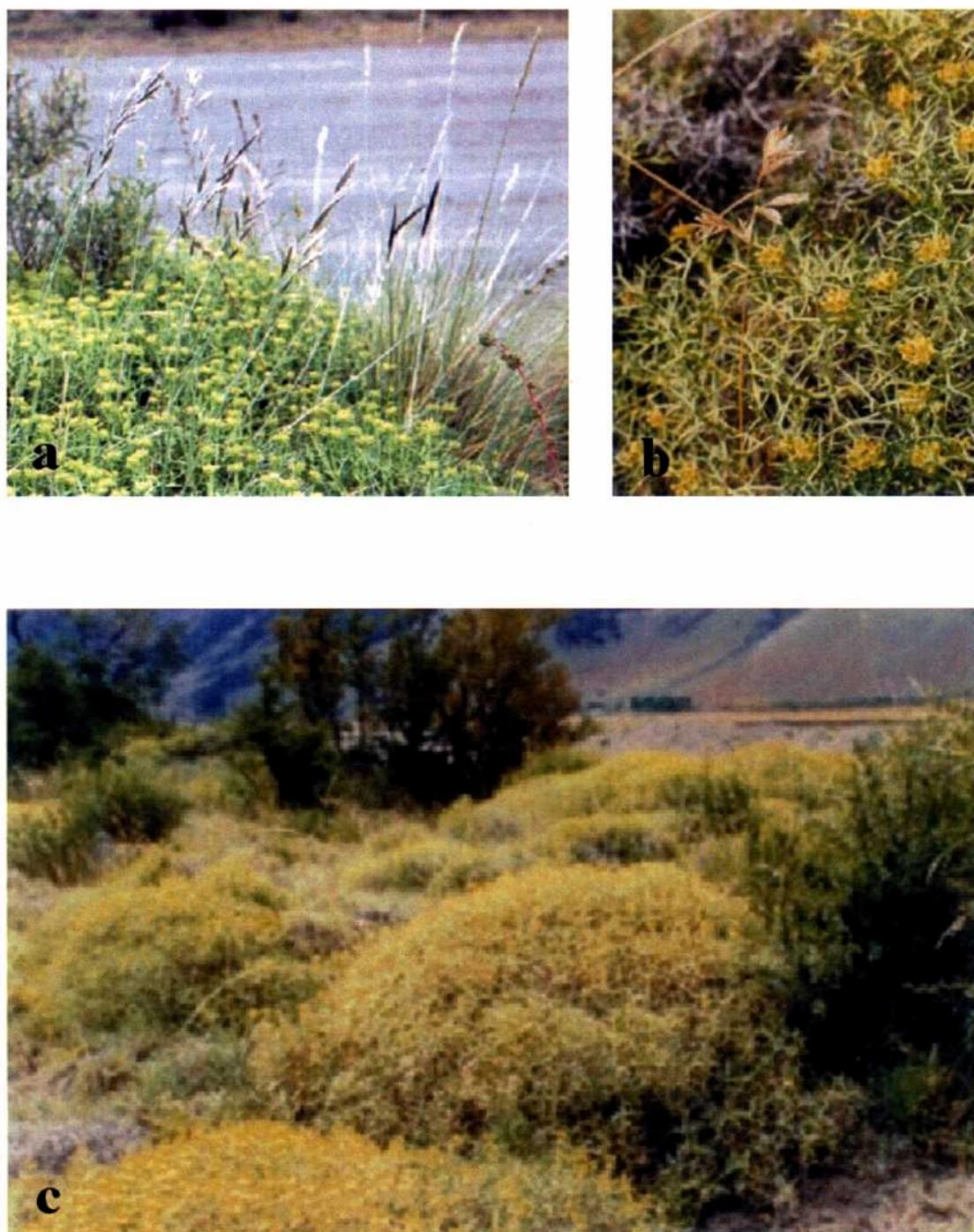


Fig. 11: Comunidad vegetal característica del límite entre el Complejo andino y los pastizales subandinos. a y b- Arbustos de *Mulinum spinosum* (neneo) de los que sobresalen plantas de *Bromus setifolius*. c- comunidad compuesta por neneo, *Berberis buxifolia* (calafate), y coirones de *Festuca pallescens*.

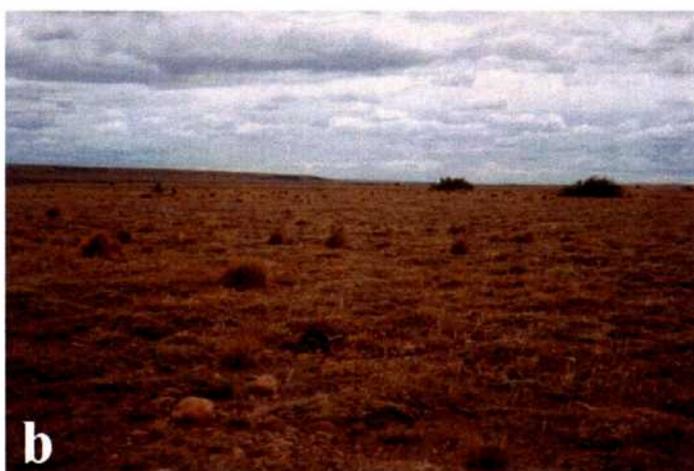
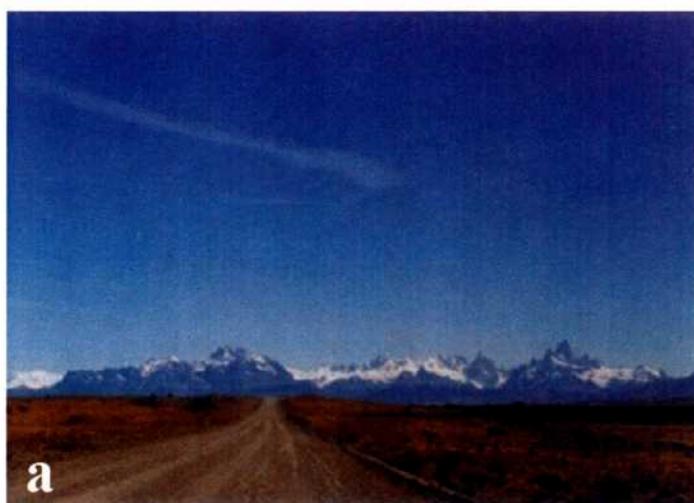


Fig. 12: Áreas ecológicas de la provincia de Santa Cruz. a y b -Estepa magallánica seca. a- sitio 10. b- sitio 57, muy degradado por el pastoreo. c- Matorral de mata negra (*Junellia tridens*) -sitio 45-.

Características químicas de los suelos

Considerando la evidencia que sugiere que las plantas colonizadas por endofitos presentan un gran desarrollo de su biomasa en condiciones ilimitadas de nutrientes, pero que, bajo condiciones de déficit de los mismos, el desarrollo de su biomasa es menor en comparación a las plantas libres de los mismos, se decidió estudiar las características químicas del suelo. Esto posiblemente se deba a una competencia entre los simbiontes (Cheplick *et al.*, 1989). Este tipo de análisis sólo se ha realizado en condiciones experimentales y nunca ha sido corroborado en condiciones naturales.

Los resultados del análisis químico del suelo se presentan en la Tabla 8. El pH no varía notablemente entre los distintos sitios de muestreo, encontrándose en un rango de 5,9-6,8, como se observó en el análisis del pH asociado a los datos de clima. La mayor concentración de carbono y de nitrógeno se observa en los sitios 16 y 18. Las más bajas concentraciones de carbono se encuentran en los sitios 5 y 43, y las menores concentraciones de nitrógeno se observan en los sitios 5 y 22. Esto indicaría la falta de relación entre el C y la incidencia de endofitos dado que sitios con 100 % de colonización como el 5 y el 16 presentan valores extremos de C.

La relación C/N, importante indicador de la fertilidad del suelo, es similar en todos los sitios, presentando un rango de 11,41-15,96. La clasificación textural también es similar entre los sitios, predominando la franco arenosa.

Asociación entre características edáficas e incidencia de endofitos

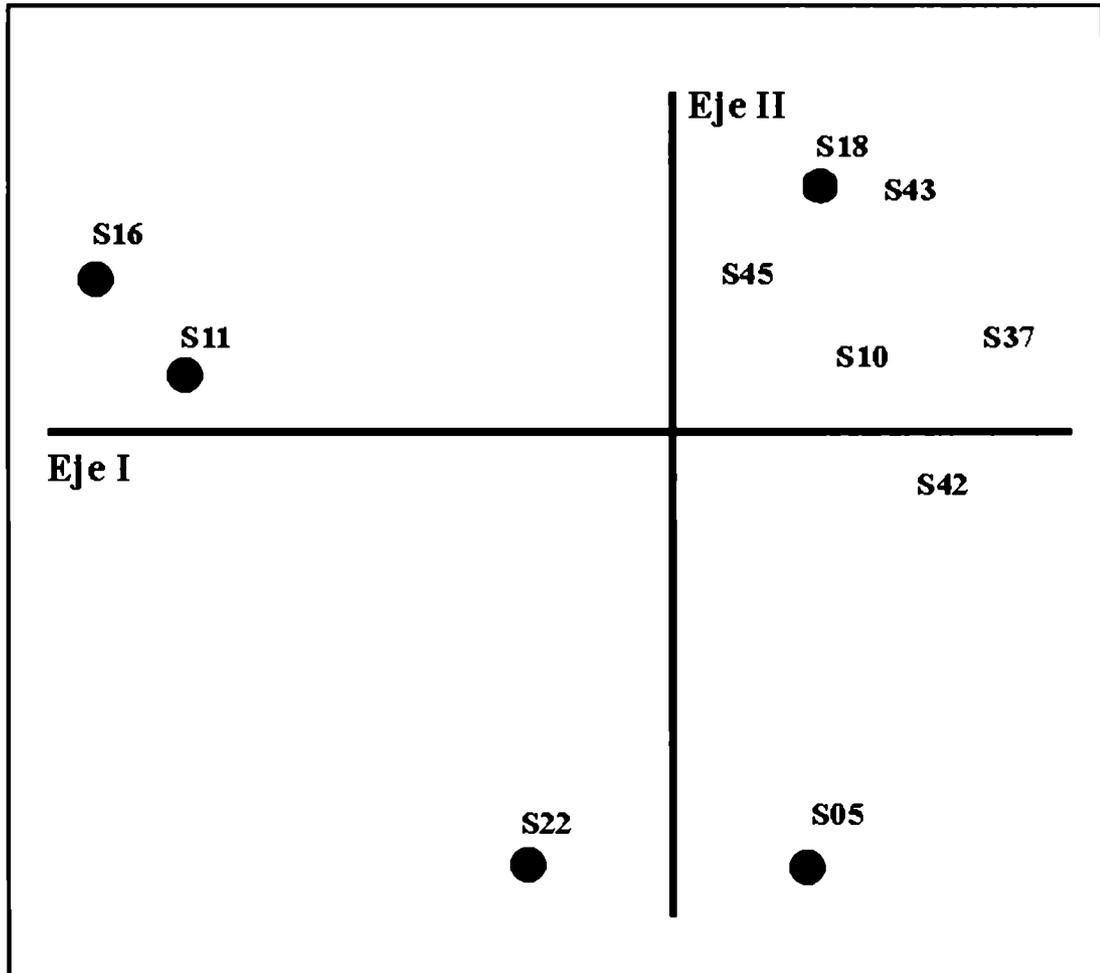
El análisis de componentes principales presentó una asociación alta positiva del P con el eje I. Se observa un gradiente de fertilidad asociado al eje II, correlacionado positivamente con el CIC, P y Ca. El coeficiente de Pearson obtenido, $r = 0,513$, indica que no existen suficientes evidencias para correlacionar los datos de suelo con la incidencia de endofitos. En la Fig. 13 se puede observar como las poblaciones colonizadas se encuentran en posiciones distantes unas de otras sin seguir un determinado patrón.

Tabla 8 Análisis químico del suelo de 10 poblaciones de Santa Cruz

SITIO	pH 1:2.5 H ₂ O	pH 1:2.5 KCl	C.E. Extracción	% C _t W. Black	% N _t Kjeldahl	C/N	P Ky 8L ppm	CIC Ac NHA pH7 cmol _c g ⁻¹	Ca ²⁺ Ac NHA pH7 cmol _c g ⁻¹	Mg ²⁺ Ac NHA pH7 cmol _c g ⁻¹	Na ⁺ Ac NHA pH7 cmol _c g ⁻¹	K ⁺ Ac NHA pH7 cmol _c g ⁻¹	CLASIFICACIÓN TEXTURAL
5				0,58	0,046	12,6	20,7	3,5	2,7	0,5	0,06	0,3	
10	5,9	4	0,19	1,98	0,148	13,38	28,4	13,5	8,3	3,3	0,06	0,9	Frasco arcilloso arenoso Frasco arenoso
11	6	5,4	0,19	2,34	0,178	13,14	11,6	20,9	15,6	3,7	0,1	0,5	Frasco arcilloso arenoso
16	6	5,5	**	6,52	0,525	12,42	10,9	24	16,8	2,7	0,05	2	Frasco arenoso
18	6,2	5,8	0,37	2,59	0,214	12,1	30,9	19,3	9,6	1,5	0,03	1,7	Frasco arenoso
22	6,1	5,7	0,14	1,05	0,092	11,41	12,8	7,1	3,8	1,8	0,07	0,4	Arenoso franco-arenoso
37	5,9	5,3	0,16	1,9	0,119	15,96	32,4	12,3	7,1	2,4	0,03	0,8	Frasco arenoso
42	6,3	5,7	0,21	1,34	0,096	13,95	28,3	10,7	6,7	2	0,03	1,1	Frasco arenoso
43	6,8	5,9	0,28	0,9	0,078	11,54	32,4	16,1	11,3	2,8	0,1	1,6	Frasco arenoso
45	6,7	5,9	0,3	1,5	0,105	14,28	26,5	17	10	5	0,1	0,8	Frasco arenoso

** Poca muestra

Fig.13: Distribución de las poblaciones de *B. setifolius* en el espacio de los dos primeros componentes derivados del Análisis de Componentes Principales de los datos de suelo. Los círculos negros corresponden a las poblaciones colonizadas por endofitos y los blancos a las poblaciones libres de ellos.



DISCUSION

White *et al.* (2001), consideran que el porcentaje de colonización por endofitos de las poblaciones de *B. setifolius* de Mendoza, en una transecta E-O en la Cordillera de los Andes, está relacionada con la presencia/ ausencia de insectos herbívoros. En nuestro caso no hemos registrado hormigas ni otros insectos en suficiente proporción como para considerar que puedan incidir sobre la distribución de la asociación. Por otra parte, White *et al.* (2001), no registraron los parámetros climáticos, y es posible que si se realizara dicha investigación, se reconocería una correlación similar a la encontrada en el presente estudio.

En varios trabajos se ha propuesto que uno de los beneficios que los endofitos le otorgan a sus hospedantes es el incremento de la resistencia al estrés hídrico (Arechavaleta *et al.*, 1989; Bouton *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1997; Malinowski *et al.*, 1997a). Sin embargo, prácticamente son nulos los conocimientos sobre la influencia del endofito en pastos nativos.

En el presente estudio, se observó que la distribución de las poblaciones E+ de *B. setifolius* se correlaciona positivamente con las precipitaciones. Las poblaciones localizadas en los lugares más secos no registraron colonización por endofitos. En tanto, aquellas localizadas en los lugares más húmedos presentaron un porcentaje de colonización superior al 70%. Apoyando lo señalado anteriormente, en las poblaciones con precipitaciones intermedias también se presentaron frecuencias intermedias de colonización.

En principio parecería que, en este caso, los endofitos no estarían involucrados en aumentar la resistencia del hospedante al estrés hídrico. Sin embargo, no consideramos que estos resultados se contraponen a lo postulado hasta el momento, sino que los rangos de precipitaciones que caracterizan a esta región son extremos comparados con los de otros trabajos. Es probable que en la estepa Patagónica, las precipitaciones sean tan bajas, que los beneficios que los endofitos le otorgan a la planta no sean suficientes para que éstas toleren los costos de la asociación. La productividad de la vegetación en ambientes áridos y semiáridos depende de la disponibilidad de agua (Noy-Meir, 1973). Dado que la vegetación es baja, la radiación fotosintética no es limitante (Oliva *et al.*, 2001). Los suelos son en general pobres, pero la restricción que ejerce la falta de agua es tan importante que aún en sitios con grandes diferencias en fertilidad no se manifiesta una gran diferencia en productividad (Oliva *et al.*, 2001). Además, las tasas de evaporación directa de la superficie del suelo pueden ser altas cuando los días son largos, la radiación y el viento fuertes y la humedad relativamente baja (Oliva *et al.*, 2001). Las poblaciones libres de endofitos presentan precipitaciones anuales

que ubican a estos ecosistemas en la categoría de áridos (60-100 mm) y semiáridos (150-250 mm) en la clasificación de Noy-Meir (1973) (Burgos, 1985; de Fina, 1968). Por lo tanto se produciría una presión de selección donde desaparecen las plantas colonizadas.

Estos resultados se suman a la creciente evidencia que la interacción depende, en muchas circunstancias, de las condiciones ambientales (Ahlhmond *et al.*, 2002; Faeth & Fagan, 2002; Marks & Clay, 1996; Saikkonen *et al.*, 1998; Siegel, 1993; West, 1994).

CONCLUSIONES PARCIALES

El endofito aislado de plantas de *B. setifolius* de la provincia de Santa Cruz pertenece al género *Neotyphodium*.

La incidencia de endofitos se correlaciona positivamente con la tasa de precipitación, y con las comunidades vegetales. Su distribución, en ambientes con condiciones extremas, como la Patagonia, se basa en la relación costo/beneficio de la asociación.

No se encontraron suficientes evidencias para correlacionar la incidencia con las características edáficas de las poblaciones muestreadas, ni con insectos herbívoros.

PARTE B

INCIDENCIA DE ENDOFITOS DEL GÉNERO *Neotyphodium* EN POBLACIONES NATIVAS DE *Phleum commutatum* DE LA PROVINCIA DE TIERRA DEL FUEGO

ANTECEDENTES

En Tierra del Fuego *Phleum commutatum* se distribuye tanto en la zona de estepa como en la boscosa. Relevamientos preliminares (Cabral, com. per.) indicarían que *Ph. commutatum* se encuentra altamente colonizada por endofitos en la zona de estepa y esta colonización es escasa o nula en la boscosa.

OBJETIVOS

Aislar e identificar el/los endofitos de *Ph. Commutatum* en diversas poblaciones.

Realizar un muestreo para analizar la distribución e incidencia de endofitos en poblaciones nativas de *Ph. commutatum* asociadas a diferentes comunidades vegetales: bosques del sur hasta los matorrales y pastizales del norte.

Analizar la correlación entre la incidencia y características climáticas y geográficas de las poblaciones analizadas en función de la comunidad vegetal.

HIPÓTESIS

El endofito de *Ph. commutatum* es del tipo *Neotyphodium*.

La distribución e incidencia de endofitos en poblaciones de *Ph. commutatum* se correlacionan positivamente con las comunidades de la estepa y negativamente con las boscosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

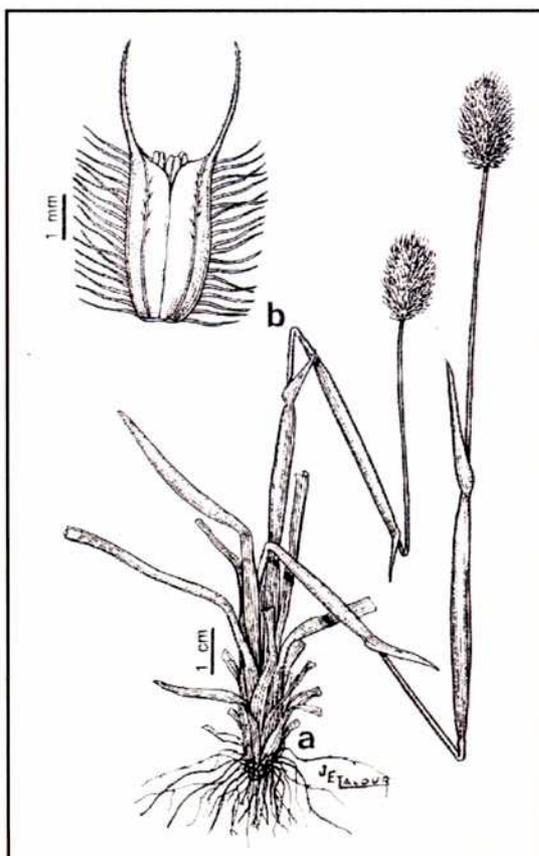
Especie estudiada

Phleum commutatum

Especie cosmopolita de amplia distribución geográfica en áreas discontinuas en el hemisferio norte y sur. Es común en suelos húmedos y mallines a lo largo de la cordillera andina, desde Mendoza hasta Tierra del Fuego.

Perenne, con tallos rastreros a menudo engrosados y cañas más o menos erectas de altura variable, en general de 10-20 cm, vainas lisas, lígula corta, truncada de 1,5-2 mm; láminas planas, glabras con los bordes escabrosos, anchas, de 5-10 cm x 3-6 mm, las superiores más cortas; panoja de 1,5-5 x 5-10 mm de ancho, oblonga, cilíndrica, gruesa, verdosa pero más frecuentemente violácea, acompañada a veces por una bráctea foliar insertada en su base; espiguillas de 5-8 mm incluyendo la arista, comprimidas; glumas subiguales aquilladas, 3-nervias, el ápice truncado oblicuamente y terminado en una arista recta o curvada (Fig. 14) (Nicora, 1978).

Fig. 14: *Phleum commutatum* Gaudin: a, planta; b, espiguilla.



Relevamiento de poblaciones

Durante las tres campañas realizadas se muestrearon 31 poblaciones de *Phleum commutatum* asociadas a diferentes comunidades vegetales. En cada población se tomaron 20 plantas para su posterior estudio y se registró la altitud, las coordenadas y la flora.

Las poblaciones se localizaron a lo largo de una transecta SO-NE que presentó como sitios extremos las poblaciones 9 (Parque Nacional de Tierra del Fuego - 54° 40' S; 68° 29' O) en el sur y 11 (Cabo Santo Domingo - 53° 11' S; 67° 50' O) en el norte. La distribución de las poblaciones se muestra en la Fig. 15.

Detección, aislamiento y caracterización de endofitos

Se realizaron siguiendo la misma metodología que en la Parte A (ver Anexo 1-1).

Caracterización de las poblaciones muestreadas

Altitud, latitud y longitud

Se registró la altitud, latitud y longitud, para cada población, utilizando un GPS. Las coordenadas geográficas fueron codificadas para su posterior análisis, de manera de poder ser ingresadas en una matriz. Para ambos se tomó como criterio que 30' equivalen a una unidad.

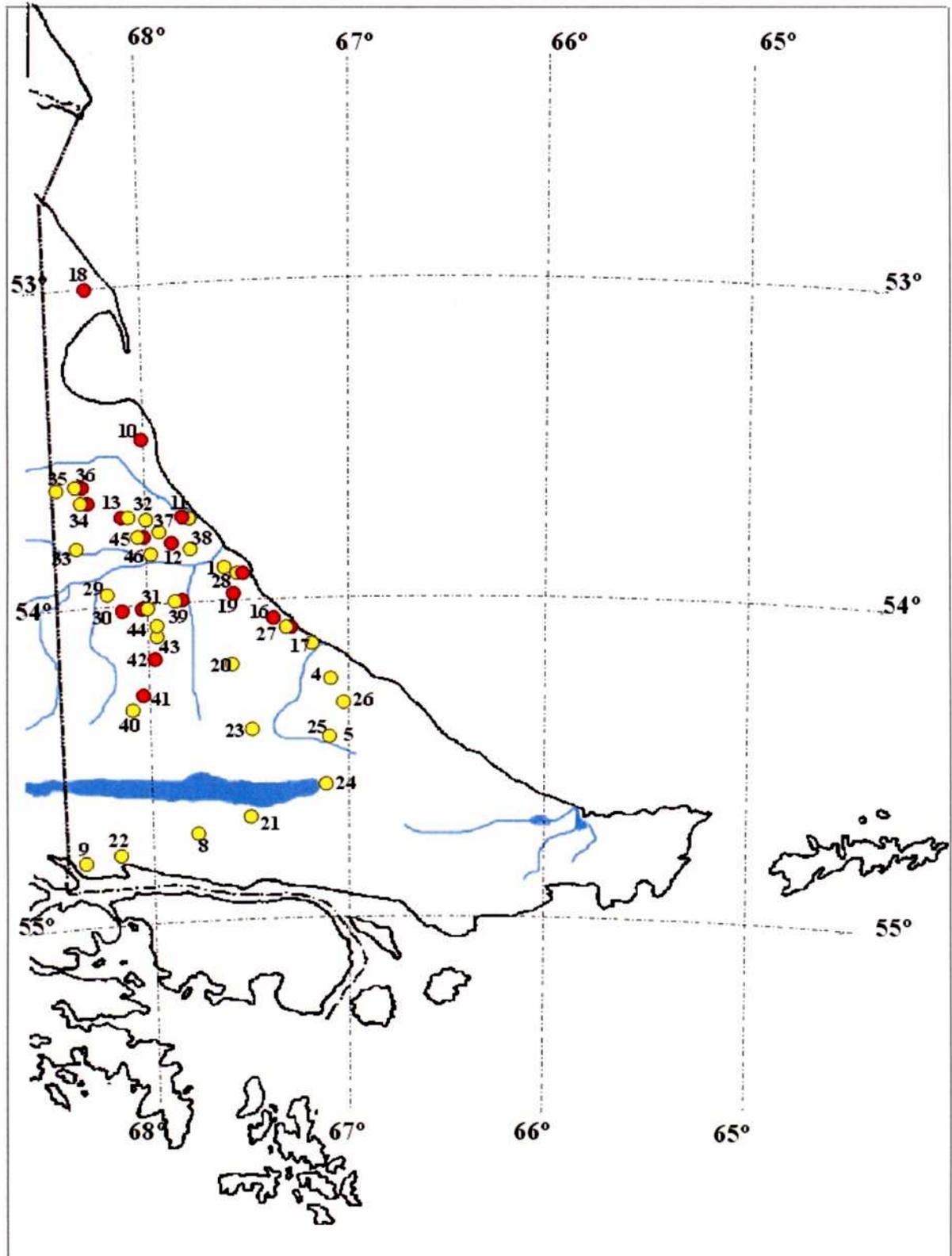
Latitud

53°- 53° 30'= 1	54°-54° 30'=3
53° 30'- 54°= 2	54° 30'- 55°= 4

Longitud

67°- 67° 30'= 1	68°- 68° 30'= 3
67° 30'- 68°= 2	

Fig. 15: Mapa de la provincia de Tierra del Fuego indicando los sitios de muestreo correspondientes a las poblaciones de *Phleum commutatum* y *Poa rigidifolia*. Los círculos en amarillo corresponden a *Ph. commutatum* y los rojos a *P. rigidifolia*.



Caracterización climática

Para la información sobre las características climáticas se procedió de la misma manera que en la Parte A.

Caracterización de las comunidades asociadas

Se identificaron 5 tipos de comunidades:

- Pastizales: Presentan suelos eutróficos con valores de pH entre 6,13-6,33, de C/N bajas (10,21-12,8) y una alta proporción de bases saturadas (82,85-93,13). Pueden reconocerse distintos tipos de pastizales diferenciándose principalmente por la presencia o ausencia de especies xerófilas (Collantes *et al.*, 1998). Entre las gramíneas más abundantes se encuentra *F. gracillima*, *P. pratensis* y *P. rigidifolia*.

- Bosques de Ñire (*Nothofagus antarctica*): Se lo observa en contacto o en mosaico con los pastizales de *F. gracillima*, o en contacto con el bosque de lenga (*Nothofagus pumilio*). En los pastizales se presenta como un bosque bajo, de 5-6 m, luminoso, de troncos retorcidos. El estrato arbustivo es rico en *Chilotrimum diffusum* y *Berberis buxifolia*, y el herbáceo, generalmente denso, presenta *Poa patagonica*, *P. pratensis*, *B. catharticus*, *Gallium aparine*, *G. fuegianum* y *Taraxacum officinale*. En contacto con el bosque de lenga, las condiciones cambian al existir mayores precipitaciones, aumentando el tamaño de los árboles (Correa, 1998).

- Bosques de Lenga (*N. pumilio*): Son bosques que se distribuyen en las cordilleras de Tierra del Fuego desde los 35° de lat. S y entre el nivel del mar y los 500 m.s.m. Son árboles caducifolios de 18-20 m de altura, que pueden conformar bosques de alta densidad. En general es un bosque pobre en especies, sin lianas, con escasa epífitas. En Tierra del Fuego se puede encontrar *Hamadryas magellanica*, *Luzula antarctica* o *Bolax gummifera*. Dadas las condiciones climáticas en las que se desarrolla, las tasas de crecimiento son bajas. Los suelos ácidos y de baja saturación de bases generan problemas nutritivos que son superados asociándose con hongos micorrícicos y poniendo así a su alcance el N, K y P (Correa, 1998).

- **Vegas:** Praderas de gramíneas, juncáceas y ciperáceas en suelos húmedos. Esta vegetación aparece en lugares, dónde por algún motivo, las plantas disponen de agua fuera de la normal (lluvia o deshielos) ya sea en forma permanente o temporaria. El suelo presenta acumulación de materia orgánica como consecuencia de la falta de oxigenación, exceso de anhídrido carbónico, las bajas temperaturas, baja acidez y la permanente acumulación de restos vegetales en el horizonte superior. Las diferencias en la disponibilidad de agua, las modificaciones de los suelos por influencia de la deposición hídrica o eólica, la mayor o menor salinidad, etc., determinan que distintas vegas se transformen en un complejo de praderas (Correa, 1998).

- **Matorrales de mata negra (*Chiliorichum diffusum*):** Comunidad caracterizada por presentar la capa superior más densa y alta (77 cm) de *Ch. diffusum* que la de matorral con *Empetrum*. Coirones de *Festuca gracillima* pueden estar conformando una capa intermedia en las zonas más abiertas, pero más frecuentemente éstas están ocupadas por el arbusto *Azorella trifurcata* (Gaertner) Hooker f., plantas herbáceas no gramíneas y graminoides. Los suelos presentan una baja relación de C/N (10,07) y el contenido de Ca⁺⁺ es relativamente alto (17,97) (Collantes *et al.*, 1998).

Análisis estadístico

Para estudiar la asociación entre caracteres climáticos y la incidencia de endofitos en *Ph. commutatum* se realizó un ACP que incluyó los datos de clima, de altitud y las coordenadas de las poblaciones. La matriz realizada quedó conformada por 31 sitios (poblaciones) y 8 variables (Tabla 9). Los datos fueron estandarizados según la fórmula (1-parte A). El análisis de ACP evidenció la presencia de una población outlier (población 8). Esta población se encuentra en el paso Garibaldi y presenta en algunas de las variables estudiadas valores que difieren considerablemente de las del resto de las poblaciones, entre los que se pueden mencionar la altitud, las precipitaciones y las temperaturas. Se realizó, entonces, un nuevo ACP descartando a la población 8.

Tabla N° 9: datos climáticos y de altitud de las poblaciones de *Phleum commutatum*.

Sitio	Alt	Tmc	Tmf	Pan	Ptc	Ptf	Lat	Lon
S04	40	9,2	0,6	405	127	85	3	1
S05	140	8,6	0,4	447	138	100	3	1
S08	700	5,5	-1,7	672	180	170	3	2
S09	25	9,2	2,1	585	150	150	4	3
S11	10	9,8	0,4	357	117	63	1	2
S13	18	9,8	0,4	376	117	75	1	3
S17	20	9,4	0,7	401	125	84	2	1
S20	80	9,1	0,4	445	131	108	3	2
S21	80	8,8	1,2	520	150	125	3	1
S22	21	9,2	1,8	547	144	138	4	3
S23	140	8,7	0,4	485	140	118	3	2
S24	80	8,8	1,1	479	145	107	3	1
S25	140	8,6	0,4	447	138	100	3	1
S26	80	8,95	0,55	413	130	85,5	3	1
S27	10	9,5	0,5	398	120	83	2	1
S28	20	9,7	0,2	380	116	80	2	2
S29	100	9,4	0,5	434	121	115	2	3
S31	56	9,5	0,5	418	120	103	2	2
S32	47	9,8	0,4	376	117	75	2	3
S33	84	9,2	0,2	411	121	103	2	3
S34	175	9,3	0,2	394	120	92	2	3
S35	145	9	-0,2	388	121	92	2	4
S36	213	9	-0,2	388	121	92	2	4
S37	100	9,8	0,3	379	115	78,5	2	3
S38	75	9,8	0,2	382	115	82	2	2
S39	82	9,4	0,2	4,9	120	94	2	2
S40	135	9,1	0,4	489	134	133	3	3
S43	136	9,1	0	428	124	105	3	2
S44	83	9,1	0	428	124	105	3	2
S45	25	9,8	0,2	382	115	82	2	3
S46	25	9,8	0,2	382	115	82	2	2

Las abreviaturas se encuentran en la Tabla N° 3

RESULTADOS

Relevamiento de poblaciones

Se registró la presencia de endofitos en 28 de las 31 poblaciones analizadas (Tabla 10). En la Fig. 16 se muestran algunas de las comunidades muestreadas: bosque de ñire, matorral de mata negra (*Chiliotrichum diffusum*) y vega.

Detección, aislamiento y caracterización de cepas

La detección y el aislamiento de endofitos coinciden con las características generales observadas en los endofitos de *B. setifolius* (Capítulo I Parte A).

Se aislaron 7 cepas de 3 poblaciones. En la Tabla 11 se encuentran las características particulares del sustrato usado para el aislamiento y del sitio al que corresponde.

Todas las cepas se caracterizan por presentar colonias de crecimiento lento, alcanzando 3 cm de diámetro a los 30 días en APG a 23 °C. Las colonias son blancas tiza, algodonosas a subafieltradas, de borde irregular presentando hifas sumergidas de aspecto traslúcido o plumoso. Reverso de la colonia con centro castaño a castaño claro y borde beige a amarillo, a veces traslúcido. Células conidiógenas (fialídicas?) de 14-40 µm de longitud, rectas a sinuosas, 2-3 µm de ancho en la base, adelgazándose hacia el ápice. Perpendiculares a la hifa sustentora, generalmente con tabique basal o ausente, también se han observado tabiques en la zona media. Los conidios de 2,8-3,6 µm x 6,1-8,5 µm pueden presentar formas variables, ovals, ovoides, levemente lunados a reniformes, raramente alantoides. En la Fig. 17 se pueden observar las características de la colonia y microscópicas de dos cepas tomadas al azar entre las analizadas. Dado que las diferencias observadas entre las cepas no fueron significativas, consideramos que pertenecen a la misma entidad taxonómica.

Las características micro y macroscópicas y de cultivo indican que las cepas pertenecen al género *Neotyphodium*.

Tabla N° 10: Características generales de las poblaciones estudiadas de *Phleum commutatum*.
 Coordenadas, localidad, comunidad vegetal y porcentaje de incidencia.

Sitio	Coordenadas	Localidad ^a	Comunidad	E+ (%)
5	54° 23' 02" S 67° 14' 56" W	Ea. Margarita	Bosque de Lengua	35
8	54° 29' S 67° 42' W	Paso Garibaldi	Bosque de Lengua	50
9	54° 40' S 68° 29' W	Lapataia	Bosque de Lengua	35
21	54° 09' 28" S 67° 27' 38" W	Puesto Kosobo	Bosque de Lengua	0
22	54° 37' 10" S 67° 27' 39" W	Ushuaia	Bosque de Lengua	0
24	54° 21' 44" S 67° 32' 34" W	Hotel Kaiken	Bosque de Lengua	15
25	54° 24' 17" S 67° 14' 11" W	Ea. Margarita	Bosque de Lengua	30
4	54° 07' 44" S 67° 16' 02" W	Ea. La Catalana	Bosque de Ñire	75
17	53° 57' 15" S 67° 20' 41" W	Puesto Entre Ríos	Bosque de Ñire	100
20	53° 54' 17" S 67° 41' 21" W	Ea. Buenos Aires	Bosque de Ñire	50
23	54° 21' 45" S 67° 32' 34" W	Ea. Rivadavia	Bosque de Ñire	50
26	54° 13' 55" S 67° 12' 13" W	Promedio entre Ea. La Tepi y Ea. Las Hijas	Bosque de Ñire	50
29	53° 55' 26" S 68° 20' 31" W	Ea. Aurelia	Bosque de ñire	55
43	54° 02' 10" S 67° 58' 52" W	Puesto Herminita	Bosque de ñire	28
37	53° 43' 51" S 68° 04' 34" W	Promedio entre Ea. Margarita y Ea. Los Flamencos (sección Miranda)	Matorral	20
38	53° 47' 29" S 67° 54' 08" W	Ea. María Behety (Puesto el Tropezón)	Matorral	80
39	53° 54' 32" S 68° 05' 41" W	Sección Cauchicol	Matorral	70
45	53° 44' 54" S 68° 10' 26" W	Ea. María Behety	Matorral	30
11	53° 11' 67° 50'	Ea. La Violeta (Cabo Domingo)	Pastizal	85
13	53° 11' 15" S 68° 08' 50" W	Ea. Los Flamencos (Clausuras)	Pastizal	64

27	53° 59' 19" S 67° 25' 59" W	Ea. Viamonte	Pastizal	55
28	53° 52' 01" S 67° 42' 39" W	Ea. José Menéndez	Pastizal	60
31	53° 56' S 68° 02' W	Promedio entre la sección Cauchicol y Ea. Despedida	Pastizal	10
34	53° 40' 51" S 68° 28' 20" W	Ea. San Julio	Pastizal	0
36	53° 39' 27" S 68° 30' 21" W	Ea. El Salvador	Pastizal	65
46	53° 47' 31" S 67° 53' 48" W	Ea. María Behety	Pastizal	65
32	53° 45' 15" S 68° 28' 21" W	Ea. Los Flamencos	Vega	60
33	53° 45' 01" S 68° 28' 21" W	Promedio entre Ea. Aurelia y Ea. El Salvador	Vega	45
35	53° 39' 39" S 68° 33' 11" W	Ea. El Salvador	Vega	25
40	54° 10' 16" S 68° 05' 41" W	Ea. Sarmiento	Vega	20
44	54° 01' 05" S 67° 59' 32" W	Puesto Herminita	Vega	85

^a Los datos climáticos de las poblaciones carentes de sensores fueron calculados como el promedio de los obtenidos a partir de las localidades más cercanas.

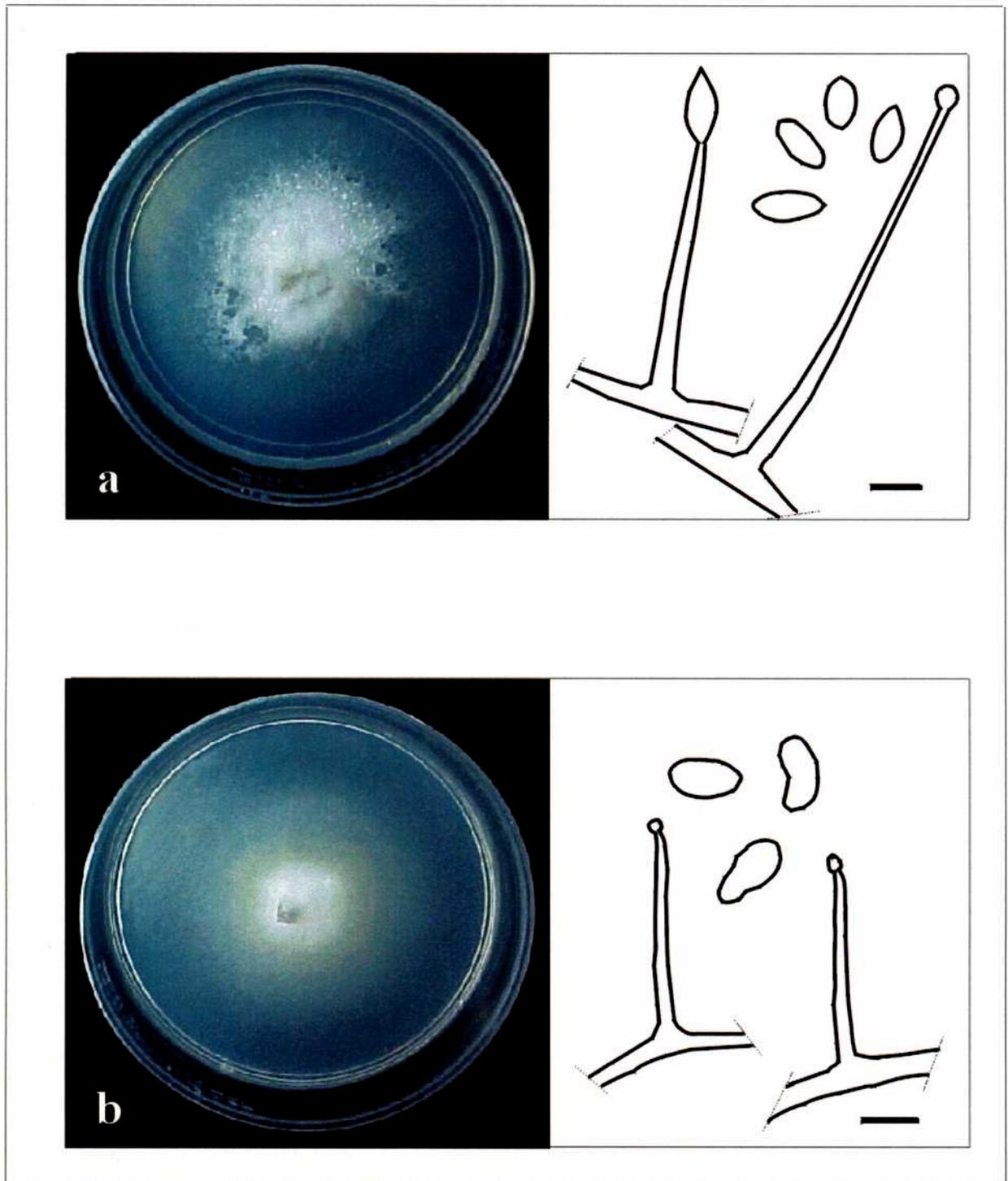
Tabla 11: Características de las cepas de *Phleum commutatum*.

Cepa nº	BAFC cult	Sustrato	Población
2293	654	caña	11
2294	680	caña	8
2297	682	caña	11
2344		caña	13
2346	755	caña	13
2348		caña	13
2350		caña	13



Fig.16: Comunidades vegetales en las que se muestreó *Phleum commutatum*. a- Bosque de fiere cercano a la Ea. La Hermifita - sitio 43-. b- Matorral de mata negra fueguina (*Chilliotrichum diffusum*)- sitio 1-. c- Vega a orillas del río Moneta- sitio 33-..

Fig. 17: Características de las colonias y microscópicas de cepas de *Neotyphodium* aisladas de *Phleum commutatum*. a- 2246, b- 2294.



Escala de barras: a y b = 5 μ m.

Asociación de la incidencia de endofitos con factores bióticos y abióticos

Como resultado del ACP se obtuvo que los tres primeros componentes, absorbieron el 93,3 % de la varianza total (Tabla 12).

El 1° componente, que absorbió el 54,98 % de la varianza, está asociado negativamente con Ptc y con la latitud. Esto indica que el componente I refleja la variación en la precipitación entre las poblaciones, lo que concuerda con la transecta realizada, cuya orientación es S-N. El componente II, que explica un 23,02 % adicional de la varianza, presenta una asociación alta negativa para altitud y asociaciones positivas con las dos variables de temperatura utilizadas. En consecuencia, el eje refleja el descenso de la temperatura a medida que la altitud aumenta. El componente III, no graficado, que absorbió 15,29 % de la varianza, se asoció positivamente con longitud.

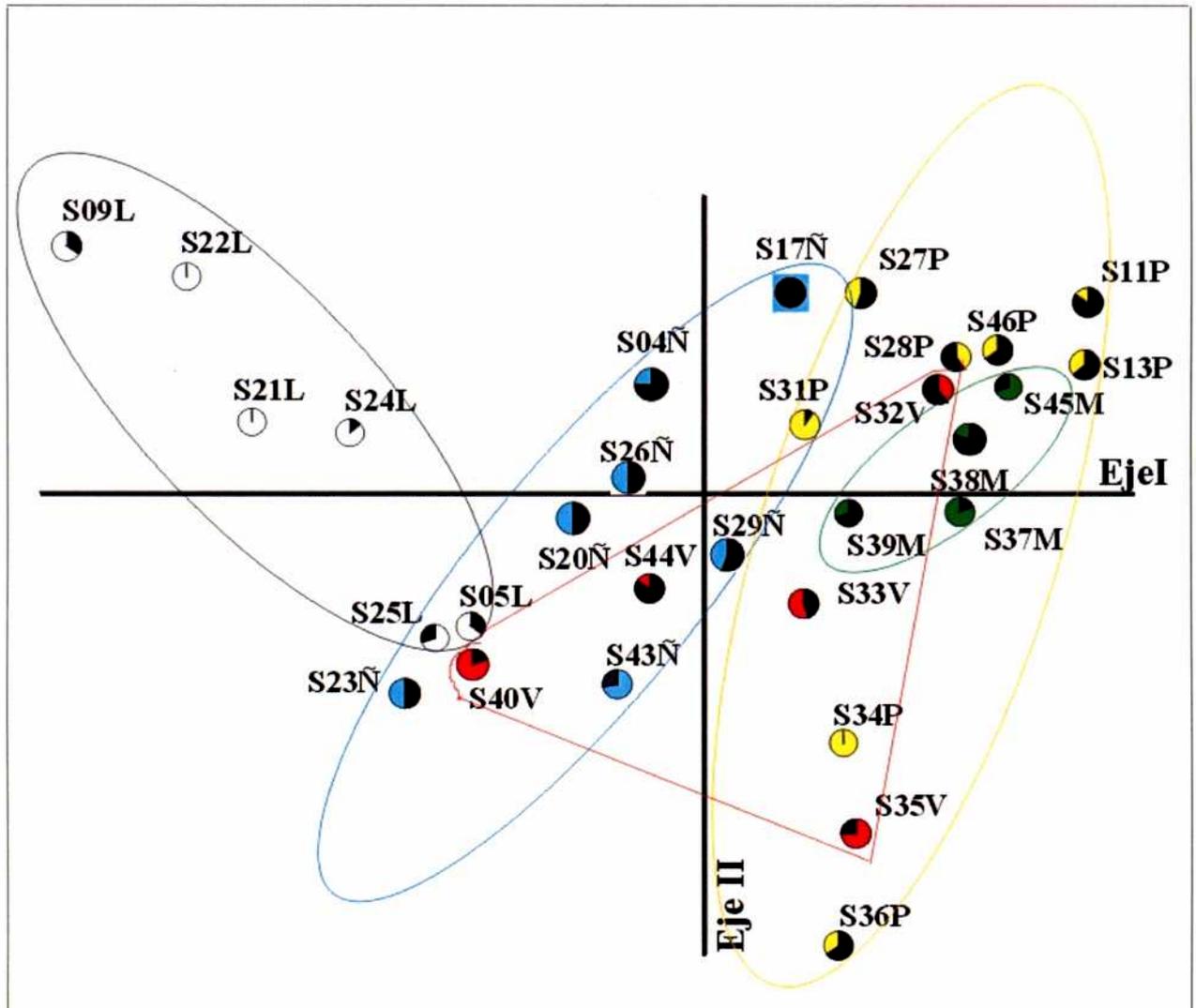
Para correlacionar los datos de clima con la incidencia se realizó una validación externa entre las coordenadas de los sitios/poblaciones y los datos de incidencia. Esta se midió a través del coeficiente de correlación de Pearson. La correlación $r = 0,476$ indica la existencia de una relación positiva y significativa ($P = 0,01$). La proporción de la varianza en los datos de incidencia explicada por la matriz de clima es igual a $r^2 = 0,24$. Esto indica que el 24,7 % de la varianza observada en los datos de incidencia puede ser explicada por los datos obtenidos de clima, altitud y coordenadas de las poblaciones. Como se explicó en el caso de *B. setifolius*, dado el sistema analizado, esto expresa que un importante porcentaje de la varianza encontrada en la incidencia de endofitos puede ser explicada por datos de clima y/o geográficos.

En la Fig. 18 se muestra la distribución de las poblaciones de *Ph. commutatum*, con su porcentaje de colonización, ordenadas a lo largo del eje I. Se distingue que los sitios correspondientes al bosque de lenga, con los menores porcentaje de colonización, se encuentran separados del resto, coincidiendo con los sitios con las mayores precipitaciones. A continuación, aparecen las poblaciones correspondientes al bosque de ñire, vegas, matorrales y finalmente pastizales. Esta distribución coincide con una disminución progresiva de las precipitaciones acompañado de un aumento del porcentaje de colonización.

Tabla 12: Análisis de Componentes Principales basado en los datos climáticos estandarizados de *Ph. commutatum* excluyendo al sitio 8. Se muestran las contribuciones de las variables a los tres primeros componentes, la varianza explicada por cada componente, a qué porcentaje de la varianza total corresponde y la acumulación de la varianza explicada. Los códigos de las variables están definidos en la Tabla 3.

Variables	Componentes		
	I	II	III
Alt	-0,0863	-0,7377	-0,0337
Tmc	0,3758	0,3824	0,3261
Tmf	-0,3565	0,4708	0,2232
Pan	-0,2779	0,0517	0,1297
Ptc	-0,4826	0,0384	-0,0707
Ptf	-0,4371	-0,0659	0,3497
Lat	-0,4545	-0,0017	-0,0034
Lon	0,1284	-0,2818	0,8358
Varianza	117,16	49,06	32,59
% varianza	54,98	23,023	15,296
v. acumulada	54,98	78,004	93,3

Fig. 18: Distribución de las poblaciones de *Ph.commutatum* en el espacio de los dos primeros componentes derivados del Análisis de Componentes Principales de los datos de clima, altitud y coordenadas. La porción en negro dentro de cada círculo indica el porcentaje de colonización con endofitos de cada población.



Cada color corresponde a una comunidad vegetal: blanco = bosque de lenga, celeste = bosque de ñire, rojo = vega, amarillo = pastizal, verde = matorral. Cada población está identificada como el sitio de muestreo y la inicial de la comunidad vegetal: L= bosque de lenga, Ñ= bosque de ñire, V= vega, P= pastizal, M=matorral.

DISCUSION

El porcentaje de colonización con endofitos se correlacionó negativamente con las precipitaciones. Las comunidades que se encuentran en las zonas más xéricas, pastizales, vegas, matorrales de *Chiliodrimum* y bosques de ñire, presentaron porcentajes mayores de colonización. Por otro lado, las poblaciones muestreadas en los bosque de lenga, zonas más húmedas, presentaron porcentaje bajos de colonización.

Ya se ha mencionado que la resistencia al estrés hídrico es uno de los potenciales beneficios que los endofitos pueden otorgarle a sus hospedantes. En este caso, donde los rangos de precipitaciones son mayores que los presentes en la estepa de Santa Cruz (el pastizal con menor registro de precipitaciones anuales presenta un valor de 357 mm) probablemente el agua no juegue un papel tan limitante en la producción vegetal. Por otra parte, los valores de evapotranspiración potencial son menores que los presentes en la estepa xérica (Oliva *et al.*, 2001). Es por esto que los endofitos podrían estar participando en reducir el estrés hídrico de sus hospedantes cuando se encuentran en zonas relativamente xéricas y que la asociación desaparezca en las más húmedas.

Otro factor que podría estar asociado a la presencia/ausencia de endofitos es la luz. Este factor únicamente puede tener influencia en los bosques de lenga, como consecuencia de la altura de los árboles y su densidad. De hecho, es una comunidad pobre en especies y con una tasa de crecimiento baja. Por otro lado, se ha registrado que la acidificación del suelo, en Tierra del Fuego, progresa hacia el sur, probablemente como consecuencia del alto drenaje y una descomposición más lenta de la materia orgánica, dado que las precipitaciones aumentan y las temperaturas decrecen (Collantes *et al.*, 1999; Godeas *et al.*, 1993). Esto se suma a la baja concentración de nitrógeno, que como es discutido en el Cap.1 Parte A, genera un menor desarrollo de plantas asociadas a endofitos (Cheplick *et al.*, 1989).

Estas condiciones pueden representar un ambiente poco favorable para gramíneas como *Phleum*. Esto sumado a que por la disponibilidad de agua, el endofito no participaría en la resistencia al estrés hídrico, se sugiere que en este sistema, la presencia de endofitos puede representar más una carga que una ventaja para su hospedante. Podría considerarse que evolutivamente las poblaciones de *Ph. commutatum* asociadas a bosques de lenga tienden a perder la asociación con los endofitos.

Para demostrar estas hipótesis deberíamos ampliar el muestreo y realizar un estudio exhaustivo de las características del suelo en cada uno de los sitios, junto con un estudio fisiológico de los requerimientos del hospedante.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los endofitos aislados de plantas de *Phleum commutatum* de la provincia de Tierra del Fuego pertenecen al género *Neotyphodium*.

La incidencia de los endofitos en las poblaciones de *Ph. commutatum* se correlaciona negativamente con la tasa de precipitación. Postulamos que podría ser consecuencia del beneficio sobre el estrés hídrico en zonas con aridez no extrema. Por otra parte, la disminución de la luz y el N disponible en los bosques incidiría sobre el costo/ beneficio de la asociación.

No se encontró evidencia suficiente para correlacionar la incidencia con las comunidades vegetales.

PARTE C

**INCIDENCIA DE ENDOFITOS DEL GÉNERO *Neotyphodium* EN
POBLACIONES NATIVAS DE *Poa rigidifolia* DE LA PROVINCIA DE
TIERRA DEL FUEGO**

ANTECEDENTES

En Tierra del Fuego *Poa rigidifolia* es una de las pocas gramíneas presente en potreros sobrepastoreados dominados por *Empetrum rubrum* (murtilla) característicos por su infertilidad. Relevamientos preliminares (Cabral, com. per.) indicarían que *P. rigidifolia* posee un mayor porcentaje de colonización en los murtillares.

OBJETIVOS

Aislar e identificar el/los endofitos de *P. rigidifolia* en diversas poblaciones.

Realizar un muestreo para analizar la distribución e incidencia de endofitos en poblaciones nativas de *P. rigidifolia* comparando pasturas con manejo adecuado o sin animales y potreros sobrepastoreados dominados por murtilla.

HIPÓTESIS

El endofito de *P. rigidifolia* es del tipo *Neotyphodium*.

La distribución e incidencia de endofitos en poblaciones de *P. rigidifolia* se correlacionan positivamente con los murtillares confiriendo ventajas adaptativas a sus hospedantes en un ambiente hostil.

MATERIALES Y MÉTODOS

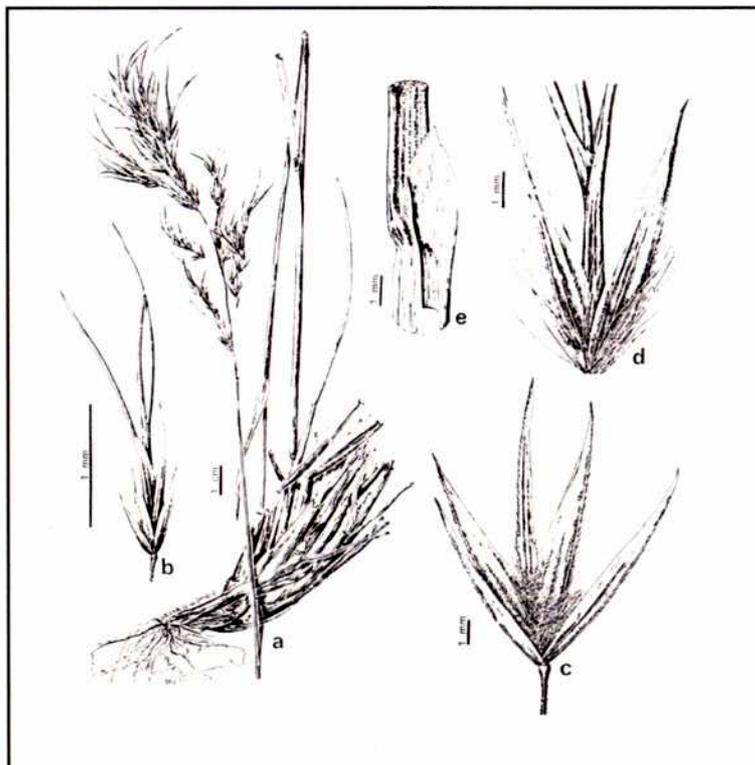
Especie estudiada

Poa rigidifolia

Se la encuentra en zonas próximas al Estrecho de Magallanes, Tierra del Fuego e islas Malvinas.

Dioicopoa cespitosa de 12-60 cm de altura, con cañas gráciles a menudo radicantes en su base; vainas lisas; lígula alargada, aguda, membranácea, de 3-6 (8) mm, a menudo carinada, escabrosa en la cara abaxial; láminas conduplicadas, filiformes, de 1,5-2,5 mm de ancho (desplegadas); panojas de 5-10 cm, lobadas, bastantes densas, a menudo incluidas entre las hojas, con ramitas cortas, de 2-3 cm, arrimadas al eje y escabrosas, glumas aquilladas subiguales, linear-lanceoladas, casi tan largas como los antecios vecinos; antecios lanceolados; lemma aquillada, la carina y los nervios marginales pilosos en su mitad; pálea menor que su lemma, biaquillada, el ápice truncado o bilobulado y las carinas escabrosas en la parte superior (Fig. 19) (Nicora, 1978).

Fig 19: *P. rigidifolia* Steudel: a, planta; b, espiguilla virescente; c, espiguilla no virescente; d, antecio; e, lígula.



Relevamiento de poblaciones

Durante las tres campañas realizadas se muestrearon 17 poblaciones de *Poa rigidifolia* en comunidades de la zona de estepa en el centro y norte de la provincia de Tierra del Fuego. Las poblaciones se localizaron en la zona norte y central de Tierra del Fuego tanto en la Estepa magallánica fueguina como en el Ecotono fueguino. Presentó como sitios extremos las poblaciones 41 (54° 08' 42" S; 68° 05' 06" O) en el sur y 18 (Cullen) (53° 00' 59" S; 67° 20' 47" O) en el norte. Se muestra la distribución de las poblaciones en la Fig. 15 (Cap. 1 Parte B).

En cada población se tomaron 20 plantas para su posterior estudio y se registró la altitud, las coordenadas y la flora.

Detección, aislamiento y caracterización de endofitos

Se realizaron siguiendo la misma metodología que en la Parte A (ver Anexo 1-1).

Cuantificación de endofitos en *Poa rigidifolia*

En la 2ª campaña, teniendo en cuenta las diferencias en presencia/ausencia observadas entre pastizales y murtillares de *P. rigidifolia*, se decidió analizar las diferencias cuantitativas de la colonización de endofitos entre estas comunidades. Se registró el nº de hifas/vaina en 2 poblaciones correspondientes a murtillares (10 y 12) y 2 correspondientes a pastizales (11 y 13).

La metodología empleada consistió en cortar la caña en trozos, luego cortarla longitudinalmente y realizar la extracción de fragmentos de epidermis (peeling) de aproximadamente 1cm de largo de la caña. Se tiñó con azul de anilina y se cuantificó el número hifas, en una recorrida completa del ancho del fragmento, a microscopio. Se analizaron 20 plantas por población.

Caracterización de las poblaciones muestreadas

Altitud, latitud y longitud

Se registró la altitud, latitud y longitud, para cada población, utilizando un GPS. Las coordenadas geográficas fueron codificadas siguiendo el criterio expuesto en la Parte B.

Caracterización climática

Para la información sobre las características climáticas se procedió de la misma manera que en la Parte A.

Caracterización de las comunidades asociadas

Para el estudio de la incidencia de endofitos de *P. rigidifolia* se establecieron las siguientes comunidades:

- Pastizales: Se consideraron aquellos con las mismas características que las descritas en *Ph. commutatum* (Parte B).
 - Murtillares extremos: Comunidad vegetal caracterizada por arbustos postrados donde domina *Empetrum*. Si presentes, los coirones de *Festuca gracillima* y los arbustos de *Chiliodrimum*, son muy escasos. El suelo desnudo puede superar el 30 %. Es una comunidad florística muy pobre y de baja diversidad. Es notable la presencia de muchos líquenes. Los suelos son altamente infértiles, con un alto contenido de materia orgánica pobremente descompuesta (Alto C/N), una baja saturación de bases (38,18), bajo pH (5,37) y bajo contenido de Ca^{++} (5,85) (Collantes *et al.*, 1998).
 - Murtillares intermedios: Murtillares con una cobertura intermedia de *Empetrum*. Se pueden distinguir dos tipos: a- **Matorral de *Chiliodrimum* con *Empetrum***, matorral achaparrado de 60 cm de alto. Se encuentran presentes *Galium aparine* L., *G. fuegianum* Hooker f., *Osmorhiza chilensis* Hooker & Arn. y gramíneas como *Elymus agropyroides* C. Presl. y *Agropyron fuegianum* (Speg.). Entre los parches de arbustos se encuentra *Empetrum* y gramíneas. Los parámetros del suelo indican una fertilidad intermedia (pH= 5,8, Ca^{++} = 7,37, C/N= 11,6, % bases saturadas = 57,33). b- **Pastizal de *Festuca-Empetrum***, comunidad conformada por una capa de coirones de *Festuca* (30 cm) y una capa
-

más baja de arbustos enanos (*Empetrum*), graminoides (*Deschampsia flexuosa*, *Hierochloë pusilla* Hackel, *Poa rigidifolia*, *P. poecila* Philippi) y arbustos típicamente acidófilos (*Gentianella magellanica* (Gaudich.) Fabris ex D.M. Moore, *Senecio magellanicus* Hooker & Arn., *Primula magellanica* Lehm., *Ranunculus peduncularis* Sm., *Geum magellanicum* Comm. Ex Pers., *Perezia pilifera* (D. Don) Hooker & Arn.). Los arbustos de *Chilotrimum* pueden formar una capa abierta más alta. Los parámetros de diversidad y de suelo son similares a la comunidad de matorral de *Chilotrimum* con *Empetrum* (Collantes *et al.*, 1998).

Análisis estadístico

Considerando el número de poblaciones de *P. rigidifolia*, se realizó un análisis de la varianza agrupando a las poblaciones en las comunidades determinadas teniendo en cuenta las características de la vegetación. El test utilizado fue un Kruskal Wallis.

Para el análisis de la cuantificación de endofitos en cañas de *P. rigidifolia* tomadas de pastizales y murtillares, se realizó un análisis de la varianza mediante un ANOVA de un factor.

RESULTADOS

Relevamiento de poblaciones

Se observó la presencia de endofitos en todas las poblaciones analizadas. El porcentaje de colonización de las poblaciones varió de 40% a 100% (Tabla 13). Se pueden observar las características de algunas de las comunidades analizadas en la Fig. 20.

Detección, aislamiento y caracterización de endofitos

La detección y el aislamiento de endofitos coincidió con las características generales observadas en los endofitos de *B. setifolius*.

Se aislaron 6 cepas de 4 poblaciones. En la Tabla 14 se encuentran las características particulares del sustrato usado para el aislamiento y del sitio al que corresponde.

Todas las cepas se caracterizan por presentar colonias de crecimiento lento, alcanzando 3-3,5 cm de diámetro a los 30 días en APG a 23 °C. Las colonias son blancas níveas, algodonosas o presentando en el centro pliegues con aspecto cerebroide, levuriforme y húmedo seguido por micelio subafieltrado. Borde irregular con hifas sumergidas de aspecto traslúcido. Reverso de la colonia con centro beige a castaño aclarándose hacia los bordes. Células conidiógenas (fialídicas?) de 14-31 μm de longitud, rectas a sinuosas, 2-3 μm de ancho en la base, adelgazándose hacia el ápice. Perpendiculares a la hifa sustentora, generalmente con tabique basal o ausente, también se han observado tabiques en la zona media. Los conidios de 3,2-3,9 μm x 5,9-7,5 μm pueden presentar formas variables, obovoides, ovales, ovoides, lemoniformes y reniformes. En la Fig. 21 se muestran las características de la colonia y microscópicas de dos cepas tomadas al azar entre las estudiadas. Dado que las diferencias observadas entre las cepas no fueron significativas consideramos que pertenecen a la misma entidad taxonómica.

Las características micro y macroscópicas de cultivo indican que las cepas pertenecen al género *Neotyphodium*.

Tabla N° 13: Ubicación, incidencia y características de la vegetación en los 17 sitios donde se muestrearon las poblaciones de *Poa rigidifolia*.

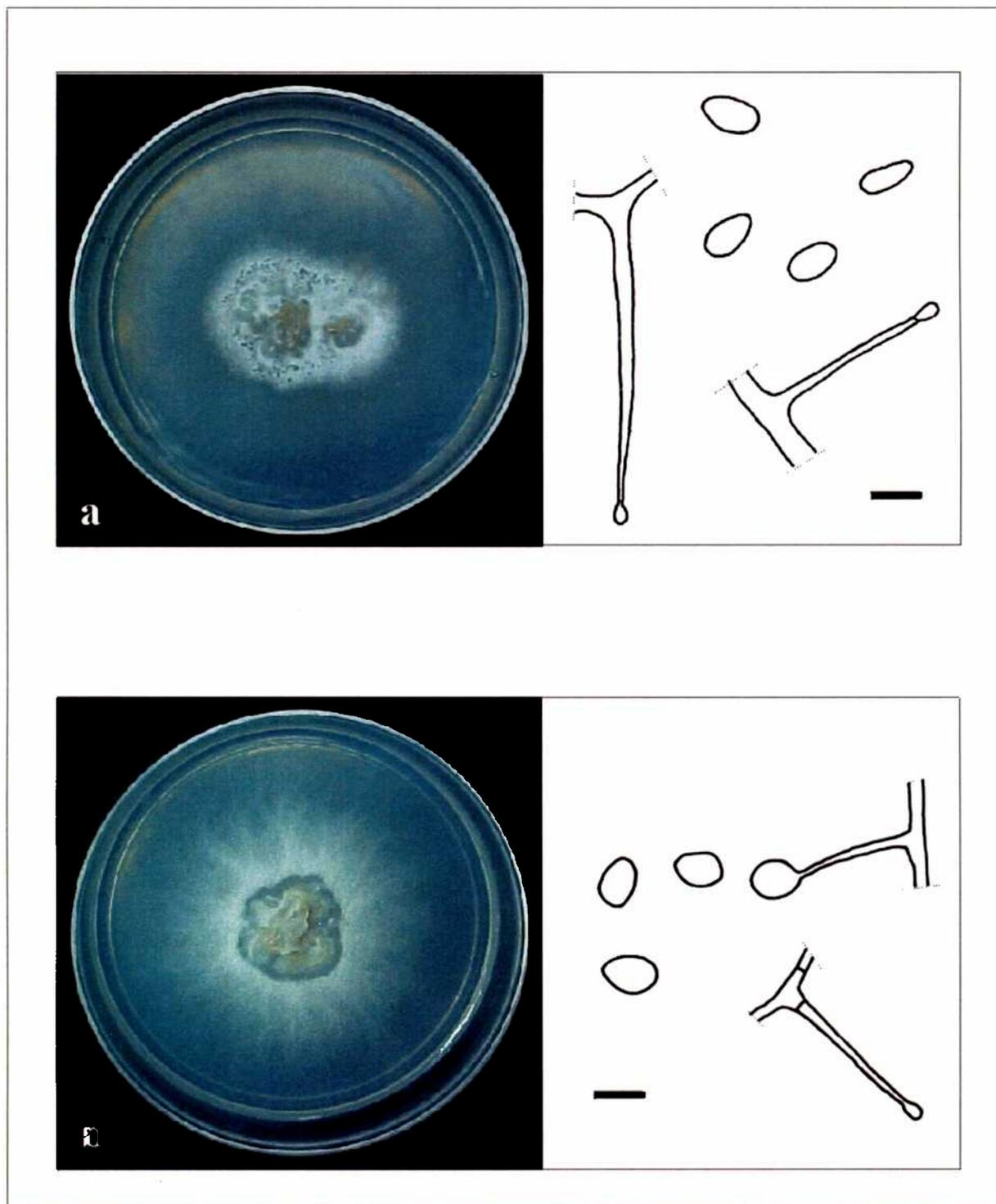
Sitio	Coordenadas	Localidad ^a	Comunidad	E+ (%)
12	53° 54' 04" S 67° 57' 05" W	Ea. María Behety	Murtillar extremo	62,5
16	53° 46' 55" S 67° 41' 39" W	Punta María	Murtillar extremo	55
18	53° 00' 59" S 67° 20' 47" W	Ea. Cullen (sección baños)	Murtillar extremo	40
30	53° 56' 53" S 68° 09' 49" W	Ea. Despedida	Murtillar extremo	50
10	53° 27' 39" S 68° 08' 49" W	Ea. Sara	Murtillar intermedio	80
19	54° 00' 59" S 67° 20' 47" W	Puesto del Rincón (Cabo Peñas)	Murtillar intermedio	70
39	53° 54' 32" S 67° 57' 13" W	Sección Cauchicol	Murtillar intermedio	90
41	54° 08' 42" S 68° 05' 06" W	Ea. Guazú- Cue	Murtillar intermedio	70
42	54° 03' 42" S 67° 58' 55" W	Ea. El Rodeo	Murtillar intermedio	85
11	53° 11' S 67° 50' W	Ea. La Violeta (Cabo Domingo)	Pastizal	100
13	53° 41' 15" S 68° 08' 50" W	Ea. Los Flamencos (Clausuras)	Pastizal	85
27	53° 59' 19" S 67° 25' 59" W	Ea. Viamonte	Pastizal	85
28	53° 52' 01" S 67° 42' 39" W	Ea. José Menéndez	Pastizal	100
31	53° 56' S 68° 02' W	Promedio entre la sección Cauchicol y Ea. Despedida	Pastizal	80
34	53° 40' 51" S 68° 28' 20" W	Ea. San Julio	Pastizal	55
36	53° 39' 27" S 68° 30' 21" W	Ea. El Salvador	Pastizal	80
45	53° 44' 54" S 68° 10' 26" W	Ea. María Behety	Pastizal	45

^a Los datos climáticos de las poblaciones carentes de sensores fueron calculados como el promedio de los obtenidos a partir de las localidades más cercanas.



Fig. 20: Comunidades vegetales donde se muestreó *Poa rigidifolia*. a y b- Murtillar. a- Aspecto de un murtillar con incidencia intermedia de *Empetrum rubrum* -Ea. Guazú Cue-. b- Planta de *P. rigidifolia* sobresaliendo entre arbustos de la comunidad. c- Pastizal de *P. rigidifolia* -sitio 13-.

Fig. 21: Características de la colonia y microscópicas de cepas de *Neotyphodium* aisladas de *Poa rigidifolia*. a- 2354, b- 2325.



Escala de barras: a y b = 5 µm.

Tabla 14: Características de las cepas aisladas de *Poa rigidifolia*.

Cepa n°	BAFC cult	Sustrato	Población
2285	668	caña	Paso Garibaldi
2287	642	caña	Yehuín
2290	684	caña	Ea. Buenos Aires
2325	57	caña	Paso Garibaldi
2354	345	caña	12
2357		caña	12

Cuantificación de endofitos

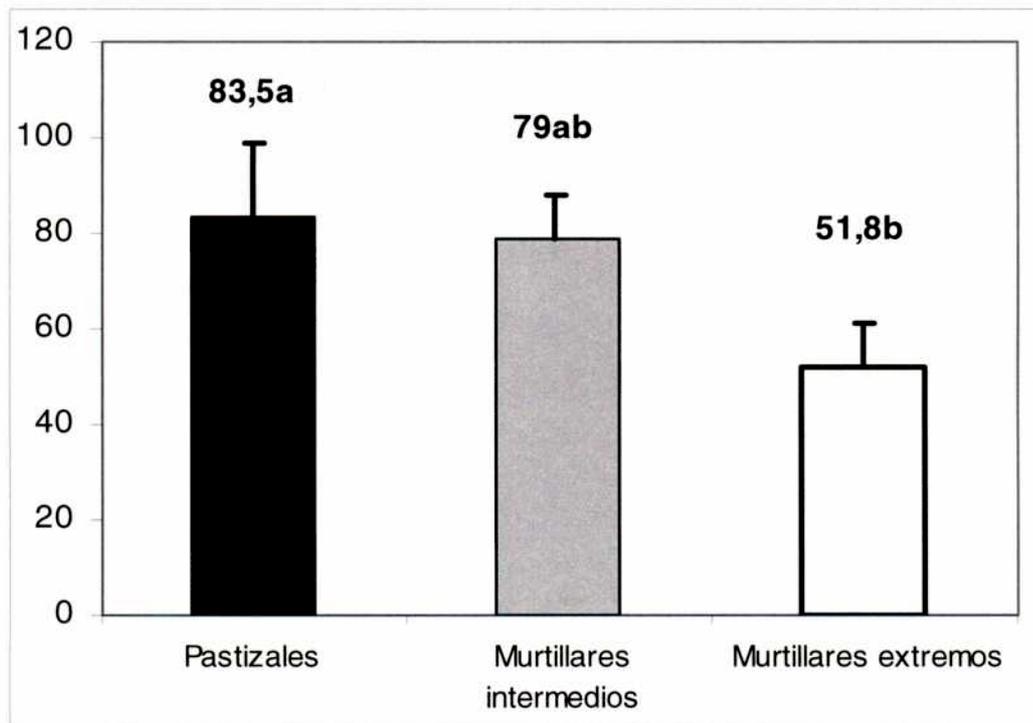
El tratamiento estadístico de la cuantificación mediante el análisis de la varianza, del número de hifas/vaina entre plantas colonizadas entre los dos tipos de comunidades mostró que las diferencias no eran significativas ($F= 2,04$; $P= 0,1182$). Teniendo en cuenta que la cuantificación de endofitos, en este caso, no aporta información útil, se decidió considerar solo el porcentaje de plantas colonizadas para el resto de los análisis.

Caracterización de las poblaciones muestreadas

Del análisis de la varianza realizado entre las poblaciones se desprende que las diferencias observadas en la incidencia de los endofitos entre los distintos tipos de comunidades vegetales son significativas ($F=7,7981$; $P= 0,0203$). A través de la comparación de medias se observa la que se formación dos grupos dentro de los cuales no existen diferencias significativas. Un grupo quedó conformado por los pastizales y los murtillares intermedios y el 2° por los murtillares intermedios y los murtillares extremos (Fig. 22).

Los resultados indican que la presencia de los endofitos en *P. rigidifolia* se correlaciona negativamente con la cobertura de *Empetrum rubrum*. Es por esto que la incidencia va aumentando de los murtillares extremos hacia los intermedios, alcanzando, en promedio, los valores máximos en los pastizales.

Fig. 22: Promedio de la incidencia de endofitos fúngicos en los pastizales, los murtillares intermedios y los extremos. Las barras con distintas letras presentan diferencias significativas. Se brinda la desviación estándar.



DISCUSION

La colonización con endofitos de *P. rigidifolia* está fuertemente correlacionada con la comunidad vegetal donde se encuentra la población en estudio.

Se muestrearon tres tipos de comunidades: murtillares extremos, murtillares intermedios y pastizales. En un margen se encuentran los murtillares extremos, comunidades donde existe una alta dominancia de *Empetrum rubrum*, y en el otro los pastizales donde su presencia es rara o no existe. Los resultados obtenidos muestran que a mayor cobertura de murtilla, menor porcentaje de endofitos.

Existe una estrecha relación entre la presencia y cobertura de murtilla y el nivel de nutrientes del suelo (Cingolani *et al.*, 1998; Collantes *et al.*, 1989). Los suelos con saturación de bases menores que 50% y pH menor que 5,8 como en los murtillares (Collantes *et al.*, 1989) tienen suficiente aluminio intercambiable como para afectar el crecimiento de las plantas (Collantes *et al.*, 1989). La mayoría de los pastos y hierbas prefieren los suelos ricos en bases como los suelos de los pastizales de *Festuca-Poa* y los matorrales de *Chilotrimum* con porcentajes de saturación de bases entre 75-90 % y pH 6-6,7 (Collantes *et al.*, 1989).

Estudios previos han demostrado que las plantas colonizadas por endofitos en experiencias bajo condiciones controladas exhiben un aumento del crecimiento, donde la humedad y los nutrientes del suelo fueron suplementados en abundancia (Clay, 1987b; Latch *et al.*, 1985; Stovall & Clay, 1988). En estas condiciones experimentales, que no fueron limitantes para el crecimiento de la planta, el costo potencial de albergar a los endofitos no fue tan evidente. Sin embargo, plántulas de *F. arundinacea* cultivadas en distintos niveles de nutrientes, mostraron mayor biomasa de las E+, en relación a las E-, cuando la concentración de nutrientes era alta y una menor biomasa cuando los nutrientes eran escasos (Cheplick *et al.*, 1989).

El fundamento del crecimiento reducido en bajas concentraciones de nutrientes es desconocido. Pero puede implicar la competencia entre el hospedante y los endofitos por un limitado suplemento de fotosintatos o nutrientes. Algunos trabajos sobre la fisiología comparada de carbohidratos de gramíneas colonizadas por endofitos clavicipitaceos, concluyen que el endofito utiliza una importante proporción de los fotosintatos del hospedante y rápidamente los convierte en manitol y trehalosa (Smith, Bacon & Luttrell, 1985; Trhower & Lewis, 1973).

Los bajos porcentajes de colonización con endofitos en plantas de *P. rigidifolia* en los murtillares reflejaría el balance entre las ventajas de la colonización y el costo metabólico de albergar a los endofitos.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los endofitos aislados de plantas de *Poa rigidifolia* de la provincia de Tierra del Fuego pertenecen al género *Neotyphodium*.

La incidencia de endofitos en plantas de *P. rigidifolia* se correlaciona con las comunidades vegetales. A mayor porcentaje de murtilla, menor incidencia de endofitos.

Esta correlación se explica por el bajo nivel de nutrientes en los murtillares. La competencia de ambos integrantes de la simbiosis por los nutrientes sería una presión para la pérdida de la asociación.

DISCUSIÓN CAPÍTULO 1

Este trabajo constituye el primer aporte al conocimiento de la distribución de las gramíneas colonizadas por endofitos en ambientes naturales, y de los factores que la determinan. Este conocimiento nos permite seleccionar los hospedantes según las características requeridas para cada situación y para conocer cuáles son los extremos aceptables para un buen funcionamiento de la asociación.

En una de las gramíneas estudiadas, *Poa rigidifolia*, se registraron todas las poblaciones colonizadas por endofitos. Las dos especies restantes, *Bromus setifolius* y *Phleum commutatum*, presentaron poblaciones que variaron de 0 a 100 % de colonización. Esto se contrapone a lo postulado por Clay (1996) quien predijo que las plantas de una determinada especie no asociadas a endofitos, deberían ser raras en poblaciones nativas, dado el incremento en el valor adaptativo provisto por los endofitos al hospedante.

Una explicación para la ocurrencia natural de plantas libres de endofitos *Neotyphodium* es que las ventajas adaptativas de albergar al endofito varían a través del tiempo y del espacio en poblaciones de gramíneas (Ravel *et al.*, 1997). La frecuencia relativa de las plantas colonizadas se irán incrementando con el tiempo sólo si los beneficios superan los costos impuestos por el hongo.

Los resultados obtenidos en diferentes trabajos apoyan la idea que las interacciones endofito-hospedante pueden incrementar el crecimiento del hospedante si los recursos son los adecuados para mantenerlos a ambos (Ahlhmond, *et al.*, 2002; Bacon, 1994; Breen, 1994; Cheplick, 1989; Clay, 1990; Elmi & West, 1995; Hill, 1994; Marks *et al.*, 1991; West, 1994). La mayoría de los trabajos previos que postulan la naturaleza mutualista de la asociación provienen de modelos agronómicos, donde los recursos, particularmente los nutrientes y el contenido de agua del suelo, son altos comparados con condiciones naturales (Ahlhmond, *et al.*, 2002).

La estimación de los costos y beneficios de los endofitos es complicada dado que la importancia de la colonización, sobre el valor adaptativo del hospedante, podría variar durante el ciclo de vida del mismo. En *Festuca pratensis* la colonización incrementa el éxito del establecimiento de las plántulas en los primeros estadios pero luego este efecto positivo desaparece observándose la interacción como neutral o inclusive antagonista en términos de crecimiento vegetativo y reproducción (Ahlhmond, *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en las tres especies estudiadas sugieren que los endofitos están asociados cuando las condiciones ambientales no son extremas para el desarrollo del hospedante. Cuando las condiciones son desfavorables las poblaciones presentan una escasa colonización por endofitos o están totalmente libres de ellos, con lo que consideramos que en estas condiciones la simbiosis endofito-gramínea tiende a perderse evolutivamente.

CAPÍTULO 2

Comparación de la biología de cariopses y de plántulas entre poblaciones nativas de *Bromus setifolius* de la provincia de Santa Cruz que difieren en el estatus de colonización por endofitos

ANTECEDENTES

Los endofitos del tipo *Neotyphodium* pueden conferir ventajas adaptativas a sus hospedantes incrementando su biomasa, el número de macollos y el de semillas entre otros caracteres (Clay, 1987; Hill *et al.*, 1990; Latch *et al.* 1985; West, 1994). Sin embargo, prácticamente es nulo el conocimiento de su influencia en gramíneas nativas. La mayoría de los estudios conocidos, se llevaron a cabo con plantas cultivadas , particularmente con *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne*.

OBJETIVO

Comparar el peso de los cariopses y distintas variables indicadoras del crecimiento de las plántulas entre poblaciones de *Bromus setifolius* que difirieran en la colonización por endofitos, bajo las mismas condiciones ambientales.

HIPÓTESIS

Las plántulas colonizadas por endofitos presentarán ventajas adaptativas frente a las plantas libres de endofitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Las poblaciones utilizadas para los diferentes ensayos fueron 7 (P10, P16, P22, P32, P35, P40 y P42), indicadas en la Tabla 4 del Capítulo 1 Parte A, de las que ya se había determinado el porcentaje de colonización y de las que se contaba con un número suficiente de cariopses. Las poblaciones P16 y P32 presentaban 100% de colonización, P10 y P42 % de colonización y las poblaciones P22, P35 y P40 con porcentajes intermedios siendo éstos 33 %, 10 % y 45 % respectivamente.

Para comparar parámetros de crecimiento entre poblaciones E+ y E-, se realizaron dos ensayos independientes. Los mismos se llevaron a cabo en una cámara de cultivos bajo condiciones controladas en la FCEyN, UBA. De las 7 poblaciones mencionadas se eligieron las que presentaran las diferencias más grandes en los porcentajes de colonización. En el 1° ensayo se utilizaron las poblaciones P16 (E+) y P42 (E-) y en el 2° se utilizaron las P10 (E-) y la P32 (E+). La metodología empleada en ambos ensayos fue idéntica, sin embargo, dado que los dos ensayos no se realizaron simultáneamente, los resultados obtenidos, a excepción del peso de los cariopses, no pueden ser analizados juntos por métodos estadísticos. De todos modos, los resultados de los análisis serán comparados cualitativamente. Las variables estudiadas fueron: peso de los cariopses (incluyendo palea y lemma, pero por comodidad sólo se hace referencia al cariopse), emergencia de las plántulas, largo de la hoja bandera, peso seco del vástago y mortalidad.

Peso de los cariopses

Se tomaron al azar 200 cariopses de cada una de las 7 poblaciones y fueron pesados individualmente en una balanza electrónica (0,1 mg).

Emergencia

Para comparar la tasa de emergencia se tomaron al azar 100 cariopses, entre los que habían sido pesados, de cada una de las 4 poblaciones usadas en los ensayos de crecimiento. Para cada población se utilizaron 4 bandejas (18 x 25 cm) rellenas con vermiculita, en cada una de las cuales se sembraron 25 cariopses. Las bandejas fueron mantenidas en una cámara de cultivo con un ciclo de luz y temperatura diaria (14/10 hs luz/oscuridad, 29/26°C) y la

vermiculita se mantuvo permanentemente húmeda. El número de plántulas emergidas se registró diariamente desde la fecha de siembra.

Estudios de crecimiento

Las plántulas obtenidas en el estudio de emergencia fueron utilizadas para realizar comparaciones de crecimiento entre las poblaciones y para medir la tasa de mortalidad de cada una.

Por población se utilizaron 60 plántulas, cada una de las cuales fue transplantada a una maceta de 25 cm³ que contenía una mezcla de suelo estéril con perlita (1:1). Las macetas fueron colocadas en grupos de 20 sobre bandejas. Las bandejas se distribuyeron al azar en la cámara de crecimiento y se rotaron de lugar semanalmente para evitar efectos de borde. Se mantuvo la tierra permanentemente húmeda. No fue necesario utilizar fertilizantes ni insecticidas. Las plantas muertas no fueron reemplazadas.

El largo de la hoja bandera y el peso seco de las plántulas fue registrado a las 6, 10 y 14 semanas. En cada una de las fechas mencionadas se tomaron al azar 4 plantas por bandeja para analizar los caracteres de crecimiento. Las cosechas se realizaron cortando cada una de las 12 plantas a la altura de la corona. Para medir el peso seco, las plantas se secaron en estufa a 80°C durante 48 hs.

Tasa de mortalidad

Se registró el número de plantas muertas durante el período en que transcurrió cada ensayo para cada población.

Medidas de colonización

Una vez que concluyeron los ensayos se tomaron a azar plántulas obtenidas de cada uno para verificar el porcentaje de colonización de cada población. Se presentaron dificultades para discernir sobre la presencia de endofitos fúngicos en plántulas en estado seco. Para lograr este propósito se rehidrataron las cañas de plántulas tomadas al azar y se continuó con el procedimiento habitual de tinción.

Análisis estadístico

Para estudiar las diferencias de varianza entre el peso de los cariopses de las 7 poblaciones se realizó un ANOVA de un factor. En este caso se pueden comparar los

resultados de las 7 poblaciones juntas porque se realizó al mismo tiempo. La comparación de medias se realizó utilizando el test de Scheffé.

Para estudiar la razón entre el número de plantas emergidas y el número de plantas sembradas para cada población se usaron tests de χ^2 corregidos por continuidad (Siegel & Castellan, 1988) (Anexo 2-4). Para estudiar las distribuciones de emergencia acumulada se usó el test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras.

El análisis de la varianza de los parámetros de crecimiento, largo de hoja y peso seco, se realizó usando un ANOVA de dos factores cruzados de efectos fijos. Las medias fueron comparadas utilizando el método de la Mínima Diferencia Significativa (LSD). Los porcentajes de mortalidad fueron analizados mediante χ^2 corregidos por continuidad.

RESULTADOS

Peso de los cariopses

El peso promedio de los cariopses fue de 10 mg, 5,5 mg, 9,9 mg, 5,2 mg, 6,7 mg, 6,6 mg y 6,4 mg para las poblaciones P16, P42, P32, P10, P22, P35 y P40 respectivamente. En la Fig. 23 se muestran los resultados en las diferentes poblaciones según un orden creciente del peso de los cariopses. El peso promedio de los cariopses de las poblaciones P16 (E+) y P32 (E+) fue aproximadamente el doble de P42 (E-) y P10 (E-). Las diferencias en el peso entre las poblaciones fueron significativas ($F= 1223,94$; $P < 0,0001$). La comparación de medias utilizando el test de Scheffé revela la formación de 3 grupos dentro de los cuales las diferencias no son significativas. Uno de los grupos quedó conformado por P16 (E+) y P32 (E+), otro por P42 (E-) y P10 (E-) y el tercero por P22 (E+/E-), P35 (E+/E-) y P40 (E+/E-).

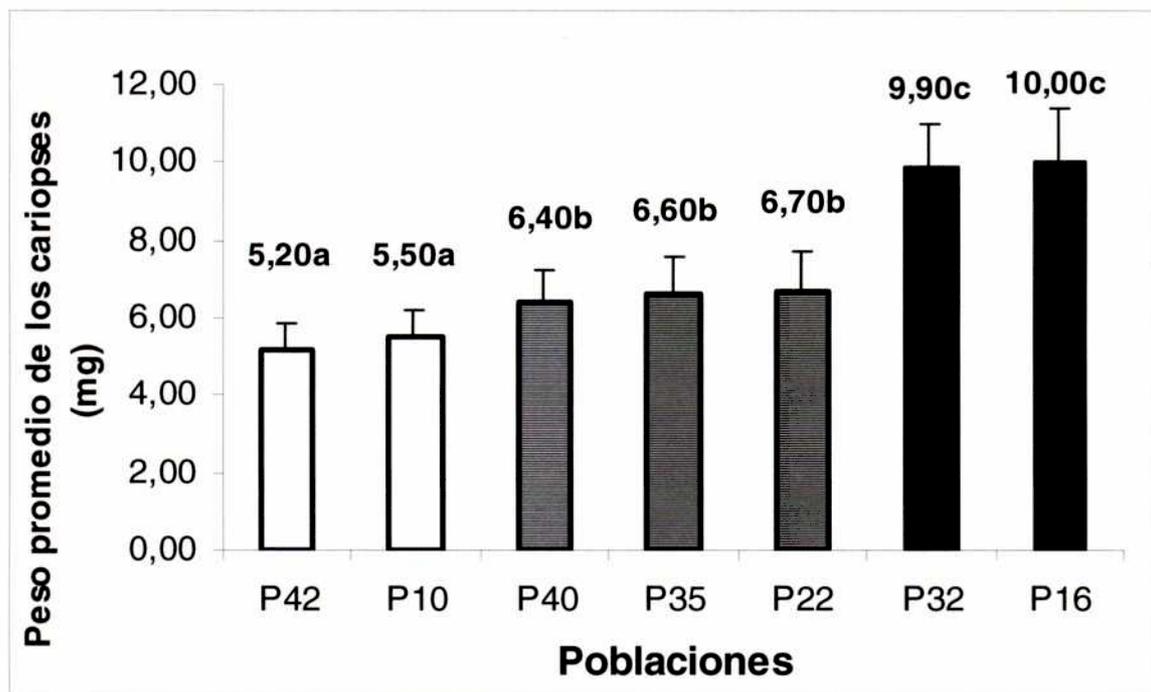
Emergencia de las plántulas

Las plántulas comenzaron a emerger alrededor del quinto día posterior a la siembra, pero la mayoría comenzó en el séptimo día en las cuatro poblaciones (Fig. 24). Luego la tasa de emergencia comienza a decaer. Se observa que si bien la forma de las curvas no es tan diferente entre las poblaciones dentro de cada ensayo, la emergencia de las poblaciones E+ es más rápida y con un número mayor de cariopses por día.

En el 1° ensayo, los porcentajes de emergencia fueron de 87% y 62% para las poblaciones P16 y P42 respectivamente, siendo diferencias significativas ($\chi_c^2 = 13,08$; $\chi^2_{1, 0,05} = 3,84$). En el 2° ensayo, las diferencias también fueron significativas ($\chi_c^2 = 6,44$; $\chi^2_{1, 0,05} = 3,84$) (Tabla 15).

La comparación de las funciones de la emergencia acumulada dio como resultado diferencias significativas entre las poblaciones P16 y P42 ($D_m = 0,270$; $D_{84, 64} = 0,224$) y diferencias no significativas entre las poblaciones P32 y P10 ($D_m = 0,227$, $D_{75,57} = 0,239$). Ver gráficos de frecuencia acumulada de cariopses (Fig. 25).

Fig. 23: Peso promedio de los cariopses de las 7 poblaciones estudiadas, se indica sobre las barras en orden creciente. Las barras blancas corresponden a las poblaciones con 0% de colonización, las rayadas a las poblaciones con % intermedios y las negras a las poblaciones con 100 % de colonización. Se muestran las desviaciones estándares.



Las barras con distintas letras difieren significativamente.

Fig. 24: Emergencia de las plántulas en los dos ensayos. a. 1º ensayo - P16 y P42.
 b 2º ensayo - P32 y P10.

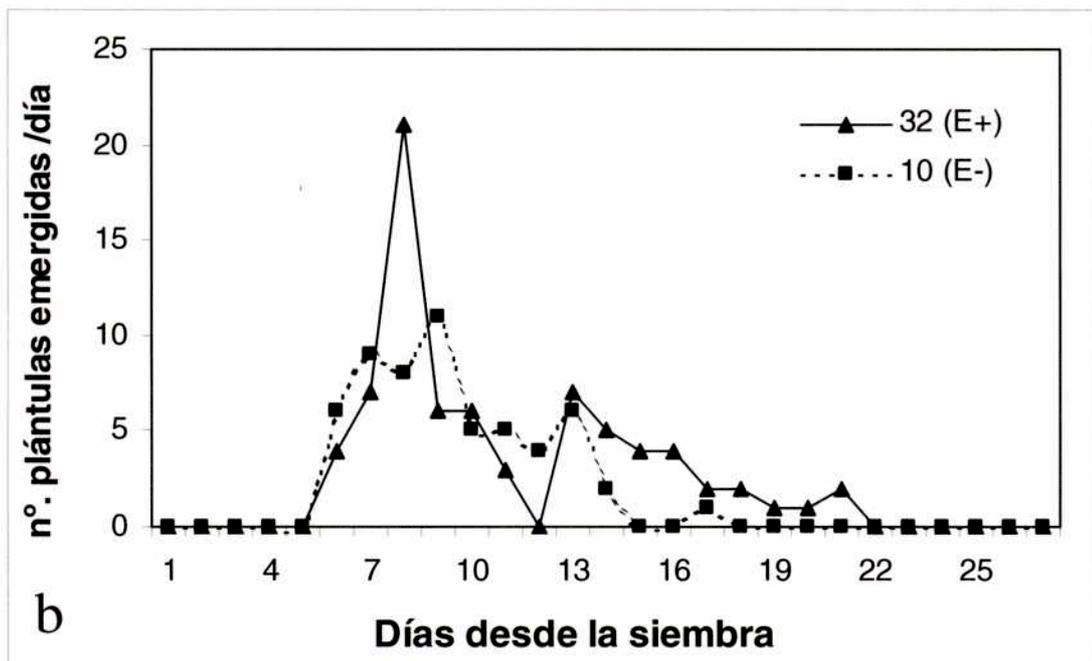
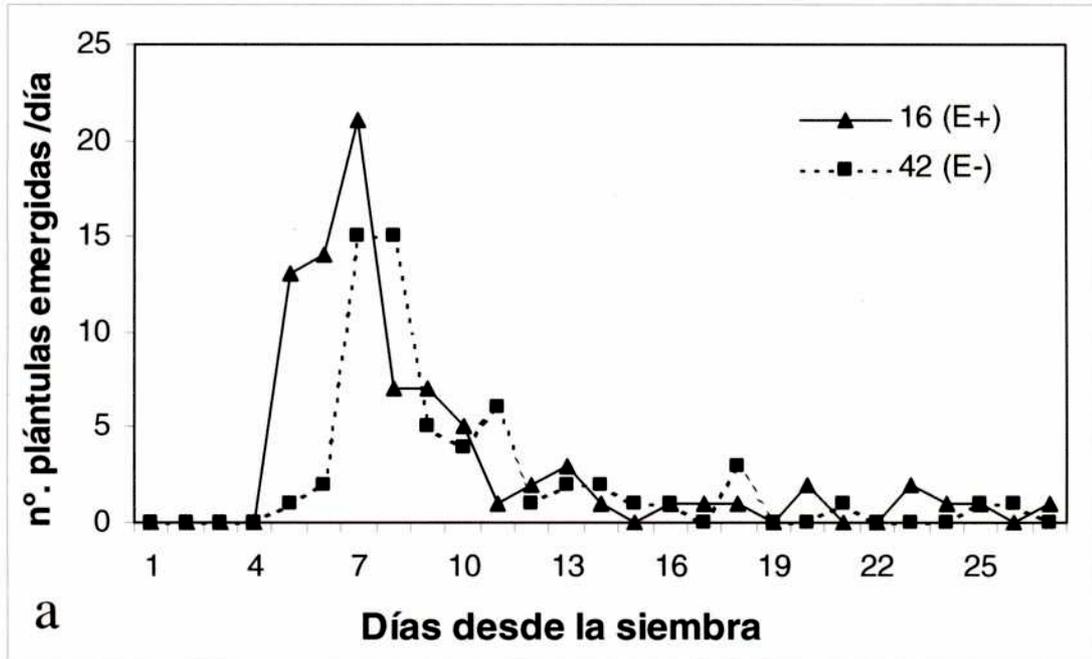


Fig. 25: Emergencia acumulada de las plántulas de dos poblaciones de *Bromus setifolius*. a. 1° ensayo - P16 y P42. b. 2° ensayo - P32 y P10.

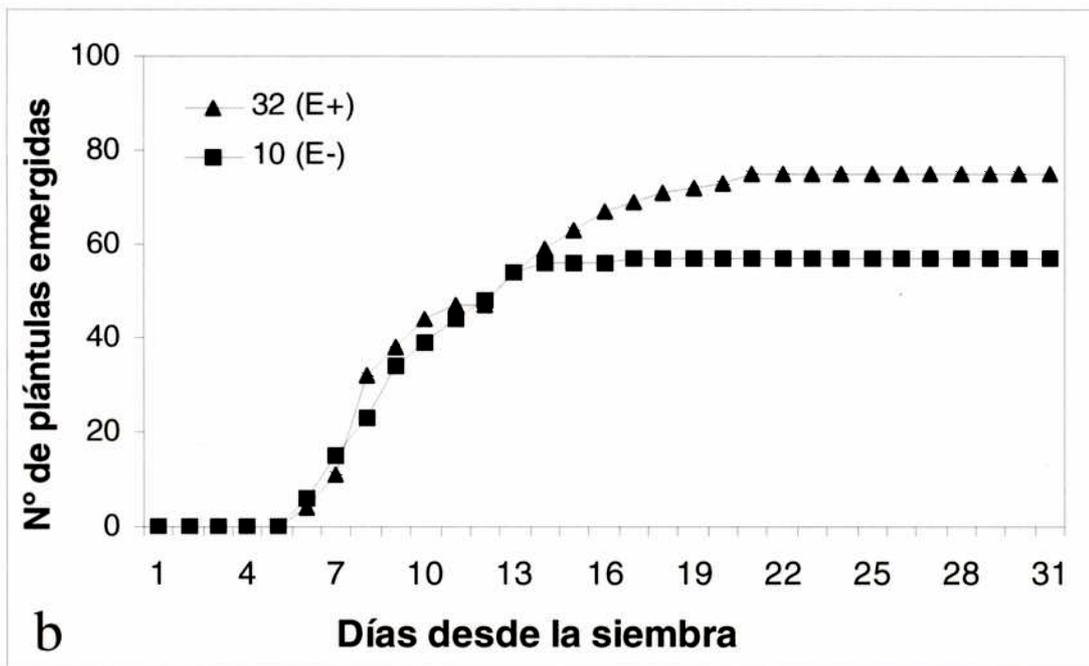
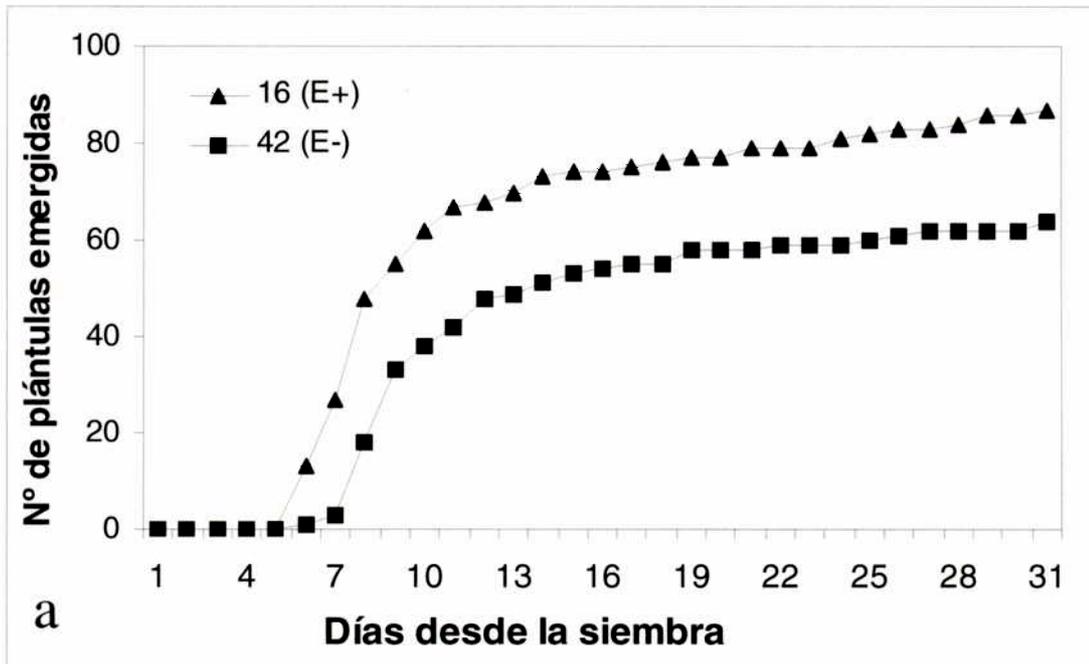


Tabla 15: Porcentajes de emergencia y mortalidad de las plántulas de las poblaciones P16 (E+) y P42 (E-) en el 1° ensayo y de las poblaciones P32 (E+) y P10 (E-) en el 2° ensayo.

	Porcentaje de emergencia	Porcentaje de mortalidad
1° ensayo		
Plantas colonizadas (P1)	87% a	2% a
Plantas no colonizadas(P2)	62% b	38,7% b
2° ensayo		
Plantas colonizadas (P3)	75% a	24% a
Plantas no colonizadas (P4)	57% b	17% a

Los valores seguidos de distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$)

Largo y peso seco

Tanto para el estudio del largo de la hoja bandera como para el peso seco se probaron los supuestos de normalidad y homocedacia. Ante la falta de cumplimiento de los supuestos se realizó una transformación logarítmica. Se presentan los análisis obtenidos a partir de los datos originales dado que los resultados a partir del análisis estadístico de éstos no difirieron de los transformados.

Primer ensayo

Las plántulas de la población P16 desarrollaron hojas más largas que las de la población P42 ($F= 395,91$; $P<0,0001$) (Fig. 26). Las diferencias fueron significativas para los tres tiempos de cosecha ($F= 41,56$; $P<0,0001$) (Tabla 16). La mayor diferencia proporcional (55,2 %) fue la registrada en la semana 14, presentando un largo promedio de 42,43 cm la P16 y 18,58 cm la P42. No hubo interacción entre los efectos principales (población y tiempo) para esta variable.

Con respecto al peso seco, se registraron diferencias significativas tanto por el efecto de la población ($F= 124,85$; $P<0,0001$) como por el del tiempo ($F=83,51$; $P<0,0001$). En este caso se registró interacción entre los efectos principales ($F= 38,16$; $P<0,0001$). La diferencia más importante también se reconoció en la semana 14, momento en el cual las plántulas E+ pesaron, en promedio, 81,7 % más que las E-.

Segundo ensayo

El largo de las hojas fue significativamente mayor en las plántulas de la población P32 que en las de la población P10 ($F= 223,49$; $P<0,0001$) en todos los tiempos de cosecha ($F= 88,52$; $P<0,0001$) (Tabla 11). Las hojas de las plántulas E+ fueron 33,3%, 45,18% y 58,6% más largas que las E- en las semanas 6, 10 y 14 respectivamente (Tabla 17). Se observó la existencia de interacción significativa entre el tiempo de cosecha y las poblaciones ($F= 32,25$; $P<0,0001$).

El peso de las plántulas E+ fue mayor al de las E- en todos los tiempos de cosecha, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en esta variable como consecuencia del efecto de las poblaciones ($F= 1,08$; $P= 0,3023$). Sí se detectaron diferencias significativas de peso entre los tres tiempos de cosecha ($F= 79,95$; $P<0,0001$). Para esta variable no se detectó interacción entre los dos efectos principales ($F= 0,53$; $P= 0,594$).

Tasa de mortalidad

En el 1° ensayo, la población P16 presentó una tasa de mortalidad significativamente menor a la presentada por la P42, 2,3% y 38,7% respectivamente ($\chi_c^2=38,206$, $\chi^2_{1,0.05}=3,841$). La tasa de mortalidad en el 2° ensayo fue de 24% y de 17% para las poblaciones P32 y P10 respectivamente ($\chi_c^2= 1,104$; $\chi^2_{1,0.05}=3,841$). Esta diferencia no fue significativa.

Corroboración de porcentajes de colonización

Se corroboró el mantenimiento de los porcentajes originales de colonización por endofitos del género *Neotyphodium* en las plántulas utilizadas en los ensayos.

Fig. 26: Comparación de las diferencias de crecimiento entre plantas E+ y plantas E- de *Bromus setifolius* cultivadas bajo las mismas condiciones. a- Plántulas de 4 semanas. b- Plántulas de 10 semanas.

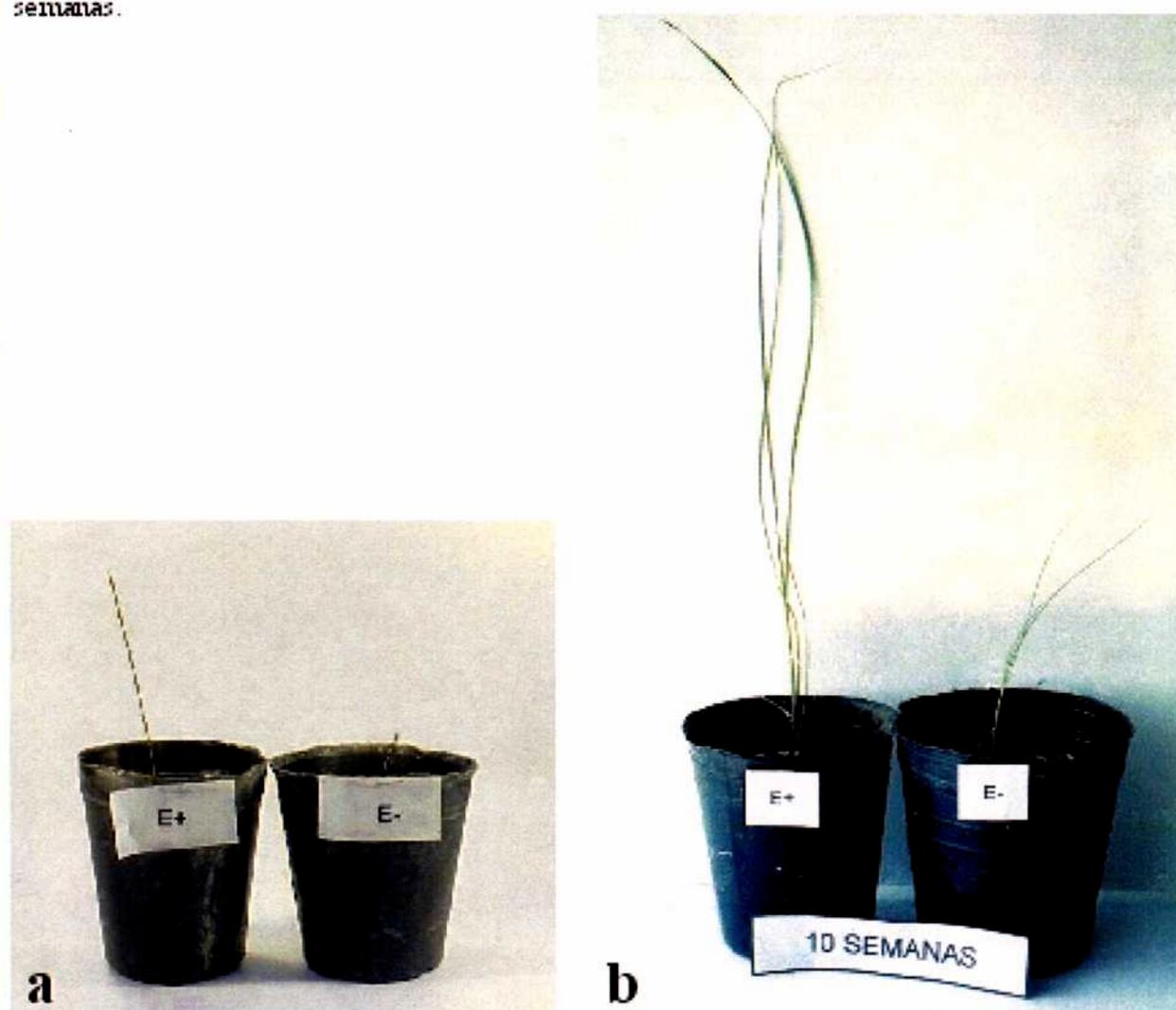


Tabla 16: Análisis de la varianza de 2 factores cruzados para tiempo de cosecha y estatus de colonización en plántulas de *B. setifolius* de P16 (E+) y P42 (E-) en el 1° ensayo y P32 (E+) y P10 (E-) en el 2° ensayo.

Variable	1° Ensayo			2° Ensayo		
	Tiempo de cosecha	Colonización	TC x I	Tiempo de cosecha	Colonización	TC x I
Largo de las hojas	*	*	NS	*	*	*
Peso seco	*	*	*	*	NS	NS

TC x I: Interacción entre las variables tiempo de cosecha y colonización. NS: no significativo; * :significativo $P < 0,0001$

Tabla 17: Largo de la hoja bandera y peso seco de plántulas de poblaciones de *Bromus setifolius* colonizadas y no colonizadas: P16 (E+) y P42 (E-) en el 1° ensayo y P32 (E+) y P10 (E-) en el 2° ensayo.

	SEMANA 6		SEMANA 10		SEMANA 14	
	Largo de las hojas	Peso seco	Largo de las hojas	Peso seco	Largo de las hojas	Peso seco
1° ensayo						
P16 (E+)	27,77 a	28,1 a	33,42 a	79,2 a	41,43 a	258,2 a
P42 (E-)	8,93 b	4,3 b	12,27 b	8,7 b	18,58 b	47,1 b
2° ensayo						
P32 (E+)	21,07 a	18,2 a	37,7 a	80,3 a	53,06 a	367,6 a
P10 (E-)	14,06 b	11,1 a	20,67 b	73,4 a	21,97 b	31,1 a

Dentro de una columna y ensayo, los valores seguidos de letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Largo en cm y peso en mg.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, encontramos diferencias significativas en parámetros de crecimiento entre poblaciones de *B. setifolius* de la provincia de Santa Cruz, que diferían en la colonización por endofitos. Estos resultados corroboran lo encontrado por otros autores que han sugerido que los endofitos tienden a incrementar la biomasa aérea, el número de macollos y la producción de cariopses en *F. arundinacea* (Clay, 1987; Hill *et al.*, 1990; West, 1994) y en *L. perenne* (Clay, 1987; Latch *et al.* 1985).

Dado que se trabajó con poblaciones y no con clones, las potenciales diferencias genotípicas entre ellas podrían tener cierto grado de influencia en los resultados presentados. Las poblaciones utilizadas en el 1° ensayo, donde se observan las mayores diferencias, se encuentran distanciadas por unos pocos km. y no existen barreras geográficas que puedan impedir el flujo génico entre ellas. Ya se ha probado que si bien la polinización por viento ocurre en las cercanías de la fuente de polen, la dispersión y fertilización cruzada pueden extenderse, aunque a niveles bajos, a través de grandes distancias (Levitt & Kerster, 1974). Por otra parte, la diversidad hallada en poblaciones nativas reflejará el rango genotípico total de cada población y consideramos que la variabilidad genética no puede oscurecer las diferencias entre las poblaciones dada la presencia de los endofitos.

No se conocen muchos trabajos en los que hayan comparado el peso de cariopses entre poblaciones E+ y E-. Clay (1987) no encontró diferencias significativas en el peso de cariopses de plantas E+ y E- de *F. arundinacea* y *L. perenne*. En nuestro trabajo, el peso de los cariopses difirió significativamente entre las poblaciones, con diferentes porcentajes de colonización por endofitos. La comparación de medias señaló que los resultados se asocian positivamente con el mencionado porcentaje. Lo más interesante surge del análisis de las poblaciones con porcentajes de cariopses entre 0 % y 100% que mostraron también pesos intermedios. Además, dichas poblaciones fueron muestreadas en sitios con características ecológicas similares a las de las poblaciones E-, con lo que se podría descartar la influencia del factor ecológico sobre los resultados.

La capacidad de una planta de colonizar está, en parte, relacionada con la cantidad de reserva inicial que se encuentre almacenada en sus cariopses. Cariopses grandes tendrán una ventaja adaptativa en condiciones de competencia (Werker, 1997). Por otro lado, en cariopses dispersados por el viento, los más livianos son los que presentan ventajas. Los cariopses de las poblaciones E+ fueron los más pesados. Sin embargo, considerando la existencia de fuertes

vientos, característicos de la Patagonia, el mayor peso no tendría demasiada influencia en la dispersión pero aumentaría la expectativa de supervivencia en las condiciones extremas de la región. Estos resultados difieren totalmente con los observados en las poblaciones de *B. auleticus* recolectadas de distintos campos de la región pampeana (Ianonne, 2003). En dicho estudio, las poblaciones E- presentaron los cariopses de mayor peso, sin embargo, las tasas de emergencia y la biomasa fueron mayores en las poblaciones E+, al igual que en el presente trabajo. Dado que en la región pampeana no se registran vientos con la misma intensidad que en la Patagonia, cariopses más livianos presentarían una ventaja adaptativa frente a los pesados. La menor acumulación de nutrientes no es un problema importante en La Pampa Húmeda, donde las condiciones son favorables para la germinación

El porcentaje de emergencia difirió significativamente entre las poblaciones E+ y E- en ambos ensayos. Este resultado concuerda con lo observado por Clay (1990a) quién afirmó que los cariopses de *F. arundinacea* y de *L. perenne* colonizados por endofitos germinan más rápido y en mayor proporción que los no colonizados. Una de las ventajas de la presencia del endofito en este hospedante parecería ser el incremento del valor adaptativo, favoreciendo la reproducción.

Analizando las variables de crecimiento de las plántulas, en el 1° ensayo, las E+ desarrollaron hojas más largas y una mayor biomasa que las E- en los tres tiempos de cosecha. En otros trabajos también se ha observado incremento en el crecimiento de plantas colonizadas independientemente del estrés biótico o abiótico (Clay 1987, 1988; Groppe *et al.*, 1999; Latch *et al.*, 1985; Malinowski *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 1990).

Muchos de estos estudios se realizaron bajo condiciones ambientales controladas de temperatura y humedad donde los nutrientes fueron suplementados en abundancia (Clay, 1987; Groppe *et al.*, 1999; Latch *et al.*, 1985; Stovall & Clay, 1988). Se ha observado que el efecto del endofito puede interactuar con la concentración de nutrientes. Arachevaleta *et al.* (1989) no reconocieron ningún efecto del endofito sobre la biomasa de los vástagos de *F. arundinacea* creciendo a bajas concentraciones de nitrógeno, sin embargo, la biomasa se incrementó, en comparación con las plantas no colonizadas a medida que se aumentó el nivel de nitrógeno. Los mismos resultados fueron obtenidos por Cheplick *et al.* (1989) en *F. arundinacea* y en *L. perenne* cuando usaron bajas concentraciones de nutrientes. Se postula que el crecimiento relativo de plantas E+ y plantas E- bajo distintos tratamientos de nutrientes reflejaría el balance entre las ventajas de la colonización y el costo metabólico que sufre el hospedante (Cheplick *et al.*, 1989). En nuestros ensayos, no se aplicó ningún fertilizante con lo que se puede destacar la obtención de resultados positivos sin suplementar con nitrógeno.

La tasa de mortalidad también difirió significativamente en este ensayo, mostrando un mejor desenvolvimiento de las plantas E+.

En el 2° ensayo, los resultados no fueron tan claros como en el 1°. Las diferencias en el peso seco y en la tasa de mortalidad, aunque mostraron la misma tendencia que en el 1° ensayo, no resultaron tan evidentes. Sin embargo, fueron significativas las diferencias observadas en el largo de la hojas bandera. Se ha sugerido que la presencia de los endofitos favorece la competencia del hospedante (Kelley & Clay, 1987) y un aumento del largo de la hoja, con un mayor acceso a la luz, podría representar una ventaja frente a condiciones de competencia.

Existen diversos factores que pueden ser responsables de la variación encontrada entre los ensayos. Análisis moleculares recientes revelan la existencia de diversidad genotípica de los endofitos de diferentes poblaciones de *B. setifolius* de la provincia de Santa Cruz (Gentile *et al.* comunicación personal) por lo que podríamos esperar una respuesta diversa entre las poblaciones estudiadas. Asimismo, los endofitos podrían llegar a influir sobre parámetros diferentes a los analizados en el presente estudio. Saikkonen *et al.* (1999) sugieren que los endofitos pueden proteger a sus hospedantes o incrementar su valor adaptativo de diferentes maneras, dependiendo de la población en cuestión, de la diversidad endofítica y/o de las condiciones ambientales del sitio donde tiene lugar la asociación.

En la actualidad, la investigación de este tipo de simbiosis está orientada hacia la prevención de la toxicosis del ganado y hacia la obtención de forraje de mejor calidad, con mayor resistencia a factores bióticos y abióticos (Clement *et al.*, 2001; Johnson-Cicalese *et al.*, 2000). La alta variabilidad entre distintas asociaciones de hospedantes-endofitos con respecto al crecimiento y resistencia a las sequías, sugiere la posibilidad de selección genética, a través de cruzamientos, para una expresión óptima de dichas características.

Sin embargo, no todos los pastos colonizados con endofitos son tóxicos para el ganado (Bertoni *et al.*, 1993; Lugo *et al.*, 1998). En Texas, la producción de forraje de *L. perenne* se incrementó en un 10% cuando las plantas estaban colonizadas con endofitos del tipo *Neotyphodium* sin que se hubiese registrado ningún caso de intoxicación (Nelson *et al.*, 1995). Los endofitos de poblaciones nativas de *F. arundinacea* y de *L. perenne* (Christensen *et al.*, 1993) así como de *F. arizonica* (Faeth *et al.*, 2002) y de otras gramíneas también nativas (Leuchtman *et al.*, 2000) presentan perfiles de alcaloides muy variables y son potencialmente útiles para la producción del forraje si proveen beneficios comparables a los pastos comerciales.

Consideramos que no todas las simbiosis propuestas entre *Neotyphodium* y los pastos pueden ser explicadas a través de la toxicidad hacia el ganado. Hasta el presente no contamos con ningún registro de toxicosis en mamíferos causada por el consumo de plantas de *B. setifolius* de la provincia de Santa Cruz. Por lo tanto, creemos que si los endofitos asociados a *B. setifolius* producen alcaloides, lo hacen en muy baja concentración, de tal manera que no tienen ningún efecto sobre mamíferos, o producen únicamente el perfil de metabolitos que afecta a insectos. De hecho, experimentos sobre la alimentación de la oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*) con plantas de *B. setifolius* provenientes de poblaciones E+ y E-, indican esta posibilidad y apoyan la hipótesis que postula que la defensa de los hospedantes contra herbívoros es la base de la asociación mutualista entre pastos y endofitos (White *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES PARCIALES

Las plantas de *B. setifolius* colonizadas por endofitos (E+) presentan ventajas adaptativas frente a las plantas libres de endofitos (E-) en iguales condiciones de crecimiento.

El peso de los cariopses se asoció positivamente con el porcentaje de colonización.

Los cariopses de las plantas E+ emergen con mayor rapidez y en mayor proporción que los de las E-.

CAPÍTULO 3

**Estudio de la interacción entre endofitos y
micorrizas en plantas de *Bromus setifolius* de
Santa Cruz**

ANTECEDENTES

Las plantas de desiertos y zonas áridas enfrentan condiciones ambientales estresantes que les imponen obstáculos significativos para su supervivencia y reproducción. Además, de la muy baja disponibilidad de agua, los nutrientes minerales son un factor limitante del crecimiento. Los estudios realizados en plantas de zonas áridas o semiáridas indican que las asociaciones con hongos MA estarían ampliamente distribuidas. Considerando la existencia de poblaciones E+ y E- de *B. setifolius* en santa Cruz se propone el estudio de la interacción entre las simbiosis.

OBJETIVOS

Estudiar la colonización de endofitos y micorrizas en distintas poblaciones de *Bromus setifolius*.

Analizar la respuesta del hospedante, mediante parámetros de crecimiento, a la interacción de los dos simbiontes fúngicos.

HIPÓTESIS

Las plantas colonizadas por endofitos presentarán menor porcentaje de colonización por hongos MA.

Las plantas colonizadas únicamente por endofitos presentarán un mayor desarrollo sobre las plantas colonizadas por ambos simbiontes fúngicos.

MATERIALES Y METODOS

Raíces recolectadas en el campo

Con los objetivos de estimar el porcentaje de micorrización de plantas de *B. setifolius* provenientes de poblaciones que difirieran en el porcentaje de colonización con endofitos en el campo y entre plantas E+ y E- de poblaciones mixtas, se extrajeron las raíces de 10 plantas por población. En total se trabajó con 6 poblaciones diferentes.

Las poblaciones corresponden a algunas de las que ya se habían estudiado en el análisis de la incidencia de los endofitos. Las mismas son: P7, P10, P11, P16, P18, y P40. Las poblaciones P7, P10, P11 y P40 se caracterizan por la presencia de gramíneas algo dispersas entre sí y con una alta proporción de suelo desnudo, en las poblaciones P16 y P18, en cambio, las plantas de *B. setifolius* crecen en asociación con *Mulinum spinosum* (arbusto) y otras plantas herbáceas.

Las raíces fueron cuidadosamente lavadas y cortadas en fragmentos similares de alrededor de 1cm. Luego, fueron conservadas en FAA (Formol- Acido acético- Alcohol), para su posterior tinción y observación en el laboratorio.

Para realizar la tinción, las raíces fueron lavadas con agua de la canilla con el objeto de eliminar el FAA y se siguió la metodología propuesta por Phillips & Hayman (1970) (Anexo 1-5). A través de éste método, se vacía de contenido citoplasmático a todas las células y luego con azul de Trypan se tiñen las paredes de las hifas de los hongos, lo que permite observar las estructuras fúngicas que se desarrollan dentro de la corteza radicular.

El porcentaje de raíz micorrizada se determinó utilizando el método de slide propuesto por Giovannetti & Mosse (1980). Para cada planta se tomaron al azar 50 fragmentos de raíz de aproximadamente 1 cm cada uno. Estos segmentos se observaron al microscopio óptico y se determinó el porcentaje micorrizado del largo total (Anexo 1-6).

El criterio usado para la identificación de hongos micorrícicos fue la presencia de estructuras exclusivas de éste tipo de asociación como los arbusculos y las vesículas. También se tuvieron en cuenta características del micelio interno como el diámetro y morfología de las hifas. El criterio de clasificación morfológica de la colonización se basó en similitudes con las morfologías *Paris* y *Arum*.

La comparación del porcentaje de colonización entre las distintas poblaciones y entre las plantas E+ Y E- de las poblaciones mixtas (P18 y P40) se realizó a través de análisis de la varianza de un factor y se realizaron comparaciones a posteriori con el método de LSD. Los

supuestos de normalidad y homocedacia fueron analizados y no fue necesario realizar ninguna transformación.

Relación entre la colonización de las raíces y los nutrientes del suelo

El largo total de raíz micorrizada fue relacionada con las características químicas del suelo en 4 de las poblaciones, P10, P11, P16 y p18, de las cuales se contaba con dichos datos. Para éste análisis se empleó una correlación simple (Pearson), utilizando el porcentaje de raíz micorrizado como variable dependiente y las variables del suelo como independientes.

Ensayo en vivero

Diseño experimental

Con el objetivo de estudiar el efecto de la colonización con endofitos sobre el porcentaje de micorrización también se llevó a cabo un ensayo en vivero.

Los resultados obtenidos en el estudio de raíces recogidas en el campo, generaron nuevos interrogantes. Para contestarlos, utilizamos suelo tomada de los sitios donde recolectamos los cariopses usados en este ensayo, de manera de comparar el porcentaje de colonización debido a diferencias en la fuente de inóculo y a propiedades inherentes del suelo.

El ensayo contó con un diseño 3x2x2. Los efectos principales analizados fueron. estatus de la colonización con endofitos (E+ vs E-), estatus de la colonización con micorrizas (Micorrizas/ suelo estéril/ microorganismos) y el tipo de suelo (suelo del sitio 10/ suelo del sitio 16). La combinación de todos los factores de los efectos principales dio como resultado un total de 12 tratamientos. Para cada tratamiento se contó con 5 réplicas.

A través del estudio de caracteres del crecimiento y desarrollo de las plántulas, se comparó la respuesta del hospedante a los mencionados efectos principales. Los caracteres analizados fueron: largo de la hoja más larga, peso fresco y peso seco de los vástagos y de las raíces. También se registró el número de plantas muerta en cada tratamiento. No se reemplazó ninguna planta muerta.

Análisis estadístico

El porcentaje de colonización con micorrizas fue analizado a través de un estudio de la varianza (ANOVA) de dos factores cruzados. Las comparaciones a posteriori se realizaron con el método de Mínima diferencia significativa (LSD). No se necesitó realizar ninguna transformación de los datos para que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedacia.

Las variables de respuesta, peso fresco de los vástagos, peso fresco y seco de raíces y largo de las hojas, del hospedante fueron analizadas mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores cruzados. Se chequearon todos los supuestos requeridos para el test utilizado. Los datos de peso fresco de los vástagos y de las raíces fueron transformados mediante la función de raíz cuadrada y los datos de peso seco de las raíces mediante la función logarítmica. Los datos correspondientes al largo de las hojas, no requirieron de transformación alguna. Se realizaron comparaciones de medias utilizando el test de LSD.

Luego de numerosos intentos de transformar los datos de peso seco de los vástagos no fue posible que éstos cumplieran con los supuestos del método. Así que se recurrió al método no-paramétrico de Kruskal Wallis para su análisis.

Se estudió la tasa de mortalidad analizando el efecto de cada tratamiento por separado. La tasa de mortalidad debida al tratamiento de Micorrizas, fue analizada mediante pruebas de X^2 usando tablas de contingencia de 3x2. Dado que los datos no cumplían con el requisito de que menos del 20% de las celdas tengan una frecuencia esperada menor de 5, se procedió a combinar categorías para incrementar dichas frecuencias. El criterio utilizado para la combinación de categorías fue el de reunir los tratamientos en los que el suelo que hubiera sido tinalizado (Suelo estéril y Microorganismos) y compararlo contra el suelo con micorrizas. Los efectos debidos a los tratamientos con Endofitos y Suelo se compararon utilizando tablas de contingencia de 2x2. En estos casos como $N > 40$ se utilizaron tablas de X^2 corregidas para continuidad (Anexo I).

Cariopses y Suelos

El inóculo utilizado consistió en las muestras de suelo traídas desde los mismos sitios de donde se recolectaron los cariopses usados en este ensayo. La población de hongos micorrícicos estaba constituida por esporas de micorrizas de diversos géneros (*Glomus* sp, y *Gigaspora*, entre otros), por fragmento de raíces y de micelio (inóculo total). El criterio

utilizado para la elección de los sitios se basó en los resultados obtenidos en el estudio de raíces de campo, pero la elección quedó supeditada a la disponibilidad de cariopses.

Para homogeneizar el suelo, cada una de las muestras, por separado, fue tamizada (2 mm), y los trozos de raíces retenidos en el tamiz fueron cortados en fragmentos de aproximadamente 1 cm. Finalmente se mezcló el suelo con las raíces. La mezcla de cada suelo fue diluida con arena estéril (1:3 v/v).

Para lograr los distintos tratamientos con micorrizas se separó un tercio de la muestra con el objetivo de que sirviera como inóculo. El resto fue tinalizado a 100°C por una hora durante 3 días consecutivos para obtener una esterilización total del mismo y así obtener el tratamiento control. Para estudiar el efecto de los microorganismos nativos del suelo con excepción de las micorrizas, la mitad de el suelo estéril se separó para el 3° tratamiento. A la misma se agregó un extracto de suelo virgen [solución de 20 ml de suelo por maceta/ agua (1:10 v/v), filtrado con un filtro Whatman N° 1] para introducir la flora nativa no micorrícica.

Los cariopses utilizados en este ensayo fueron recolectados de las poblaciones P10 (E-) y P16 (E+). En ambos casos, luego de ser esterilizados superficialmente en hipoclorito de sodio diluido (1:1 v/v), fueron pregerminados en toallas de papel estériles, humedecidas con agua estéril. Las plántulas fueron seleccionadas por uniformidad de tamaño, aproximadamente 3 cm de largo, y fueron transplantadas a macetas (12 cm x 12 cm) rellenas con el suelo correspondiente para cada tratamiento.

Las macetas se organizaron en bandejas y se mantuvieron en un vivero por 6 meses. Las macetas fueron regadas con agua destilada una vez por semana. La temperatura presentó una variación de 18°C a 39°C. Luego del mencionado periodo, se realizó la cosecha de las plantas.

Antes de ser cosechadas se registró el largo de la hoja más larga de cada planta. Luego se sacó cuidadosamente cada pan de suelo de la maceta y se eliminó todo el suelo asociado a las raíces. Finalmente se cortó cada planta a la altura de la corona, se separó un tercio de la masa radicular de cada planta para su posterior tinción y se secaron por separado las raíces y el vástago a 80°C durante 48 hs.

La tinción de las raíces se realizó siguiendo el mismo procedimiento explicado para el estudio de raíces de campo. La estimación del porcentaje de micorrización se realizó a través del método de slide propuesto por Giovannetti & Mosse (1980).

Corroboración de los porcentajes de colonización por endofitos

De la misma manera que se realizó en el capítulo anterior, se constató que el porcentaje de colonización de las con endofitos fuera similar al determinado en los cariopses.

RESULTADOS

Colonización micorrícica en raíces recolectadas a campo

En las muestras de todas las poblaciones que fueron analizadas se encontraron estructuras específicas de los hongos MA como arbuscúlos y vesículas (Fig. 27). La morfología que predominó en todas las muestras fue la que se conoce como *Paris*. Este tipo de morfología se caracteriza por la formación de numerosos enrulamientos (coils) de las hifas de manera intracelular (Fig. 28). También presenta puntos de entrada múltiples y arbuscúlos. La morfología *Arum*, mencionada habitualmente como la más difundida, también fue observada (Fig. 27). Esta, presenta hifas paralelas al eje principal de la raíz y desarrolla arbuscúlos y vesículas. En algunos casos, se observó la morfología "endofito fino", que presenta hifas de menor diámetro que corren por la superficie de la raíz y forman puntos de entrada en "abanico". Además desarrollan arbuscúlos finos y pequeñas vesículas (Fig. 27). Esta morfología podría corresponder a la especie *Glomus tenuis* (Bonfante-Fasolo, 1986).

En la mayoría de las muestras, se observaron hifas no micorrícicas castañas y teñidas de azul, corriendo intra y extraradicalmente. Asimismo, se evidenciaron zoosporangios de Chitridiomycetes junto con la colonización micorrícica.

Si bien, en las muestras de todas las poblaciones se encontraron estructuras específicas de los hongos MA, el porcentaje de micorrización fue diferente entre las distintas poblaciones ($F= 16,81$; $P<0,0001$).

Las raíces de las plantas de las poblaciones E+ y las E+/ E- mostraron una mayor micorrización que las E- y en las poblaciones con mayor porcentaje de colonización con *Neotyphodium* esto fue más evidente (Fig. 29). La comparación de medias con el método LSD mostró una asociación de las poblaciones en tres grupos dentro de los cuales las diferencias encontradas no son significativas. Dos de los grupos quedaron conformados por una única población cada uno, siendo éstas las poblaciones 7 y 16. La población 7 presentó el menor porcentaje de colonización entre todas las poblaciones, y la 16 presentó el mayor. El resto de las poblaciones conformaron el 3° grupo con porcentajes intermedios.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de micorrización entre las plantas E+ y las E- de las poblaciones P18 ($F= 3,68$; $P= 0,0914$) y P40 ($F= 0,97$; $P= 0,3529$).

Fig. 27: Observación de estructuras de los hongos micorrízico arbusculares (MA) en raíces de plantas de *Bromus setifolius* tomadas del sitio 40.

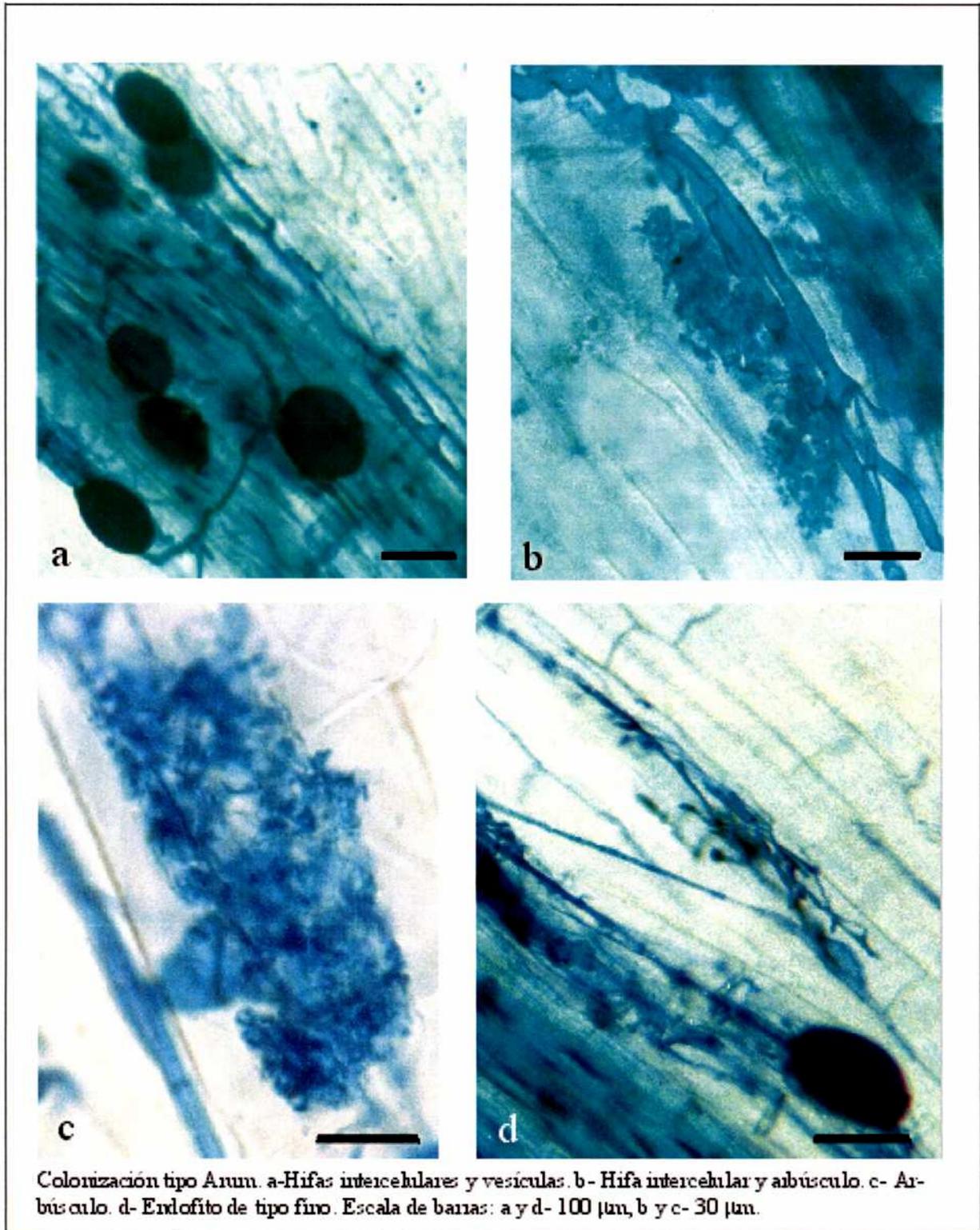


Fig. 28: Estructuras características de los hongos MA en raíces de plantas de *Bromus setifolius* tomadas del sitio 40.

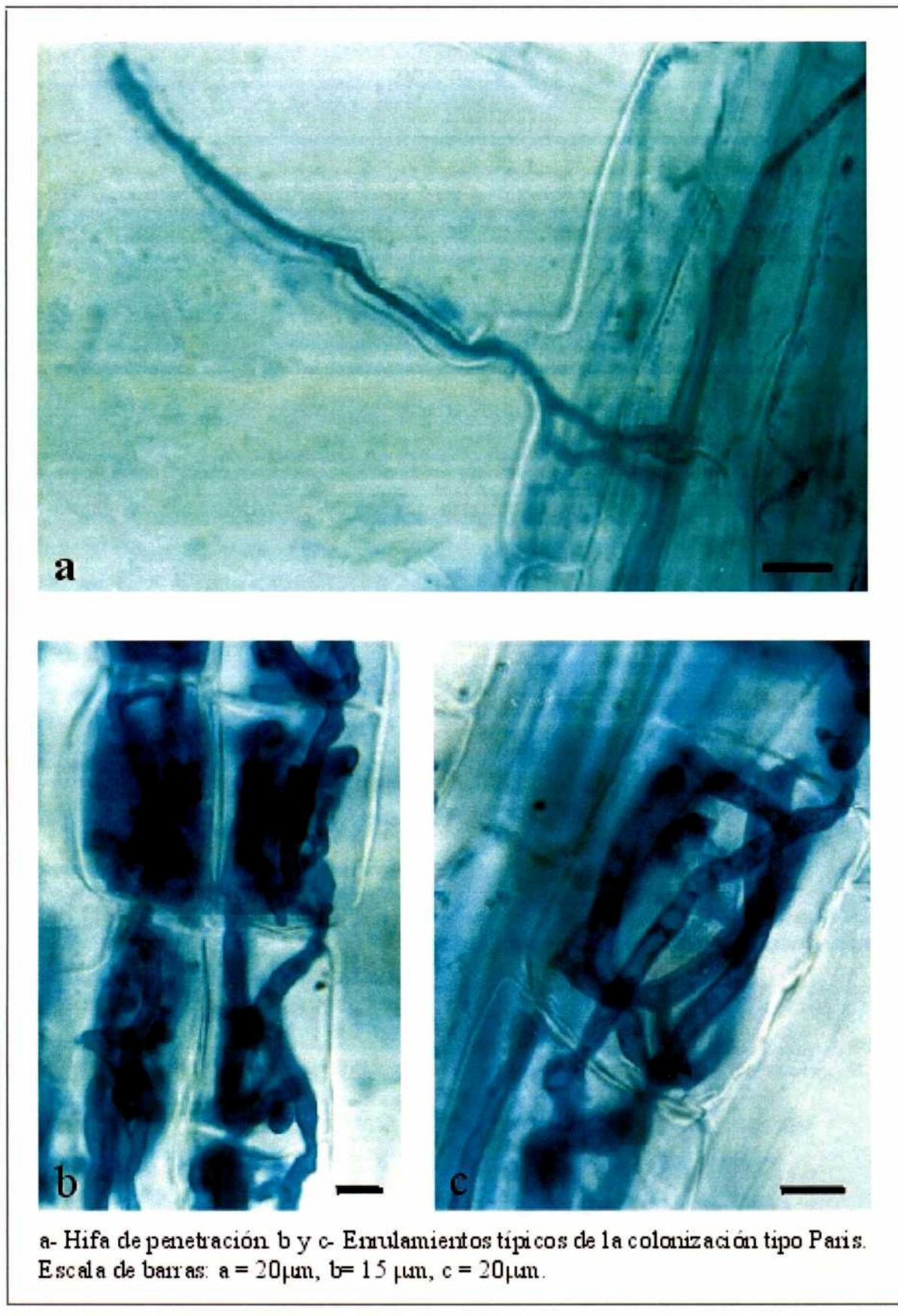
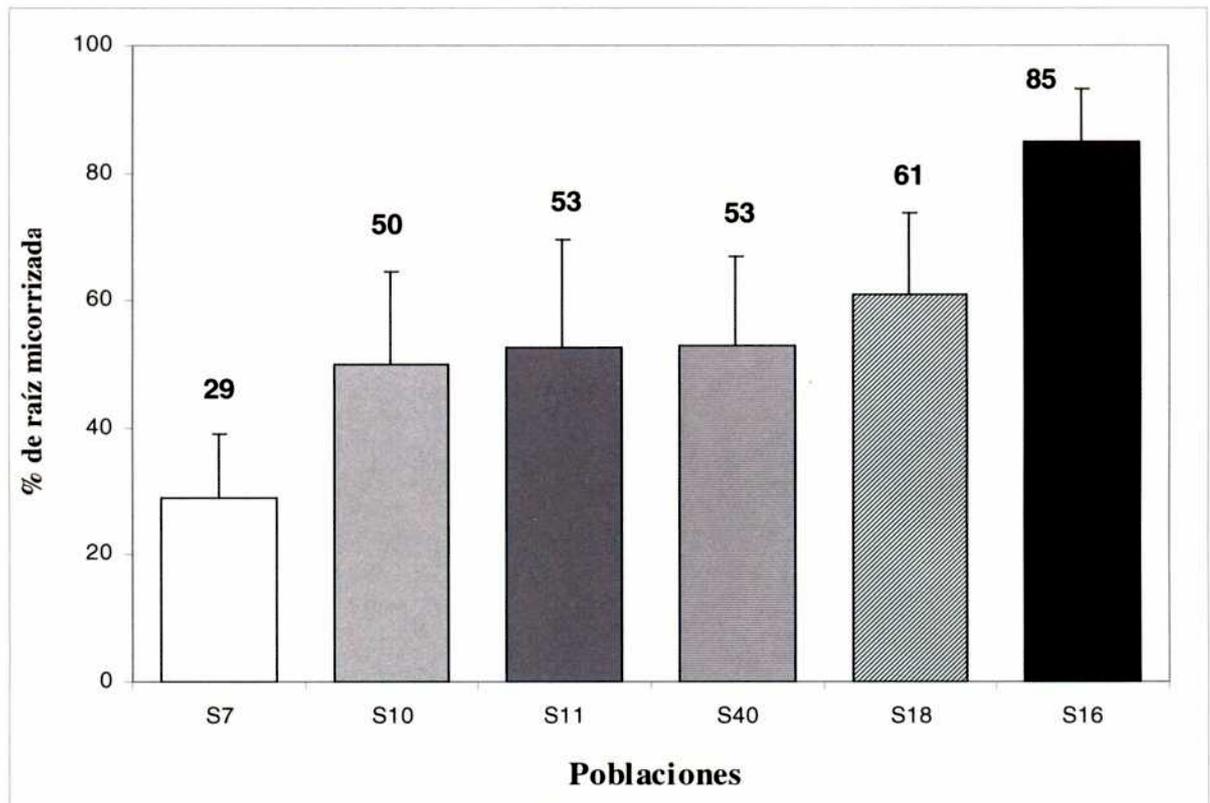


Fig. 29: Porcentaje de colonización por micorrizas arbusculares de raíces de plantas de *B. setifolius*



El valor que se encuentra sobre cada columna indica el % de colonización por endofitos de dicha población.

Relación entre la colonización de las raíces y los nutrientes del suelo

El largo total de raíz micorrizada se correlacionó de manera significativa sólo con 2 de las 10 características químicas que definen la fertilidad del suelo, Ct y Nt (Tabla 18). Pero dado que la relación C/N no mostró diferencias significativas entre los sitios consideramos que éstos caracteres no tienen una influencia sobre la colonización por hongo MA.

Ensayo en vivero

Efecto de los endofitos y del tipo de suelo sobre la colonización de micorrizas

En el tratamiento de micorrizas, donde el suelo no recibió ningún acondicionamiento, se observaron estructuras típicas de hongos MA (hifas, arbusculos y vesículas) tanto en la población 10 como en la 16. Aquí también predominó la morfología *Paris*, con la formación de numerosos enrulamientos. De igual modo, fue evidenciada la morfología *Arum*.

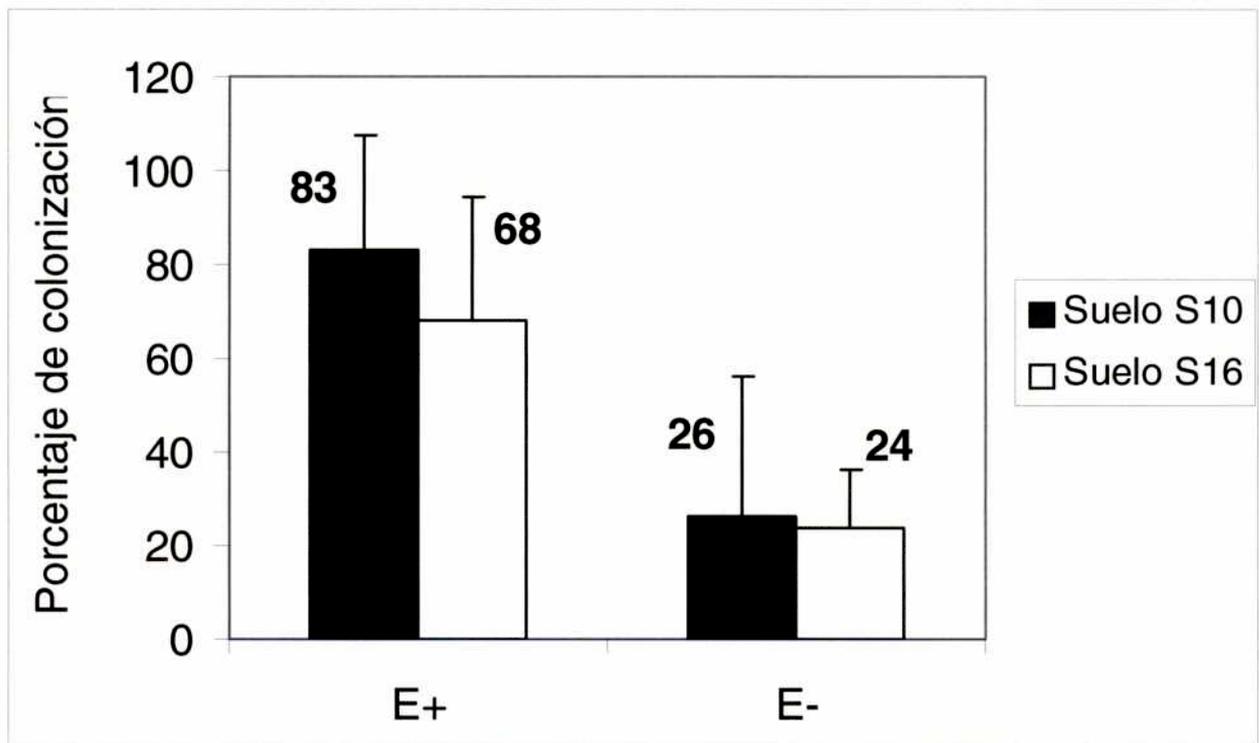
No se observó ninguna estructura con características de los hongos MA en los tratamientos de suelo estéril y microorganismos.

El porcentaje de colonización fue afectado significativamente por el estatus de colonización con endofitos ($F= 20,53$; $P=0,0003$) pero no fue afectado por el tipo del suelo ($F= 0,51$; $P=0,48$) (Anexo 2-1). No hubo interacción entre los dos efectos principales. Las raíces de las poblaciones E+ presentaron un porcentaje de colonización mayor que las E- (Fig. 30).

Tabla 18: Valores del Coeficiente de Correlación de Pearson entre el largo total de raíz micorrizada (RC) y los nutrientes medidos en suelo para las poblaciones P10, P11, P16 y P18.

Nutrientes	RC	
	CC	<i>P</i>
pH	0,163	0,837
C total	0,982	0,018
N total	0,989	0,011
C/N	-0,633	0,367
P	-0,484	0,516
CIC	0,778	0,222
Ca	0,614	0,385
Mg	-0,336	0,669
Na	-0,399	0,6
K	0,838	0,161

Fig. 30: Comparación de los porcentajes de colonización de raíces de poblaciones E+ y E- de *B. setifolius* en distintos tipos de suelo.



Respuesta del hospedante

Peso fresco de las raíces

El peso fresco de las raíces fue afectado significativamente por el estatus de las micorrizas ($F= 5,24$; $P= 0,0092$) y de los endofitos ($F= 34,27$; $P< 0,0001$). El tipo de suelo no afectó significativamente esta variable ($F= 0,9$; $P= 0,3493$).

Las plantas colonizadas con endofitos presentaron los mayores valores de peso, mientras que las plantas del tratamiento con micorrizas presentaron los menores valores, comparadas con los otros dos tratamientos. La comparación de medias utilizando el test de LSD revela la formación de dos grupos, uno de los grupos conformado por las plantas con endofitos de los tratamientos de suelo estéril y microorganismos, y el otro por los restantes.

Peso seco de las raíces

El peso seco de las raíces fue afectado significativamente por el estatus de colonización con endofitos de la población ($F= 42,98$; $P<0,0001$) (Anexo 2-2). El promedio del peso seco de las raíces de las plantas E+ fue mayor al de las plantas E- en todos los tratamientos (Fig. 31). Se registró un máximo en el tratamiento con microorganismos, donde el peso promedio de las plantas E+ fue 12 veces superior al de las E-. Se puede observar que las plantas E+ generaron mayor biomasa cuando se cultivaron en el suelo correspondiente al sitio de las plantas E-. Ninguno de los otros dos tratamientos generaron diferencias significativas sobre la variable estudiada. No se observó interacción entre ninguno de los tres efectos principales.

Largo de las hojas

El largo de las hojas se vio afectado significativamente por el estatus de colonización de los endofitos ($F = 495,15$; $P< 0,0001$) y de las micorrizas ($F = 7,46$; $P = 0,002$), pero no se observaron diferencias significativas como consecuencia de los tipos de suelos ($F = 0,52$; $P = 0,473$) (Anexo 2-3).

A partir del resultado de las comparaciones de medias, se observa la formación de dos grupos dentro de los cuales las diferencias observadas no son significativas. Estos dos grupos corresponden a las dos poblaciones utilizadas. Se puede apreciar que las plantas E+ presentaron hojas con aproximadamente el doble del largo que las E- en cualquiera de las combinaciones con los tratamientos de micorrizas (Fig. 31). De todos modos, los valores obtenidos en los tratamientos con micorrizas y microorganismos son mayores que en el suelo

estéril, sin importar de qué tipo de suelo se tratara. Las plantas E+ presentaron hojas más largas que las E- sin importar el tipo de suelo (Fig. 33).

Peso fresco de los vástagos

El peso fresco de los tallos fue afectado significativamente por el estatus de endofitos ($F= 58,79$; $P < 0,0001$) y las micorrizas ($F= 7,42$; $P= 0,0016$), pero no así por el tipo de suelo ($F= 3,02$; $P= 0,0889$).

Las plantas colonizadas con endofitos y el tratamiento microorganismos presentaron los valores de peso más elevados. El tratamiento de suelo estéril asociado a las plantas sin endofitos presentó el menor valor de peso.

Peso seco de los vástagos

En el caso de ésta variable los factores principales fueron analizados por separado. El efecto de los suelos no fue significativo ($H= 0,816$; $P= 0,3661$) aunque se observa una tendencia de presentar mayor peso en el suelo del sitio 10. El efecto de los endofitos ($H= 23,222$; $P < 0,0001$) como el de las micorrizas ($H = 7,56$; $P= 0,0229$) si fueron significativos. Las plantas E+ presentaron una mayor biomasa de vástago que las E- en todas las combinaciones de tratamientos posibles presentando un máximo en el tratamiento de microorganismos en combinación con el suelo del sitio 10 (Fig. 34). Como resultado del factor micorrizas, los promedios de peso se pueden ordenar de manera descendente como: microorganismos, suelo estéril y micorrizas.

Tasa de mortalidad

Las diferencias en la mortalidad, debidas a los tratamientos de micorrizas, agrupando los datos de suelo tinalizado y comparándolos contra el de micorrizas no son significativas ($X^2=2,21$; $P= 0,3308$). Las diferencias observadas por el uso de suelos de diferente origen no son significativas ($X^2=1,15$; $P= 0,2845$). Las diferencias observadas por el efecto de la presencia/ ausencia de endofitos tampoco fueron significativas ($X^2=1,15$; $P= 0,2845$).

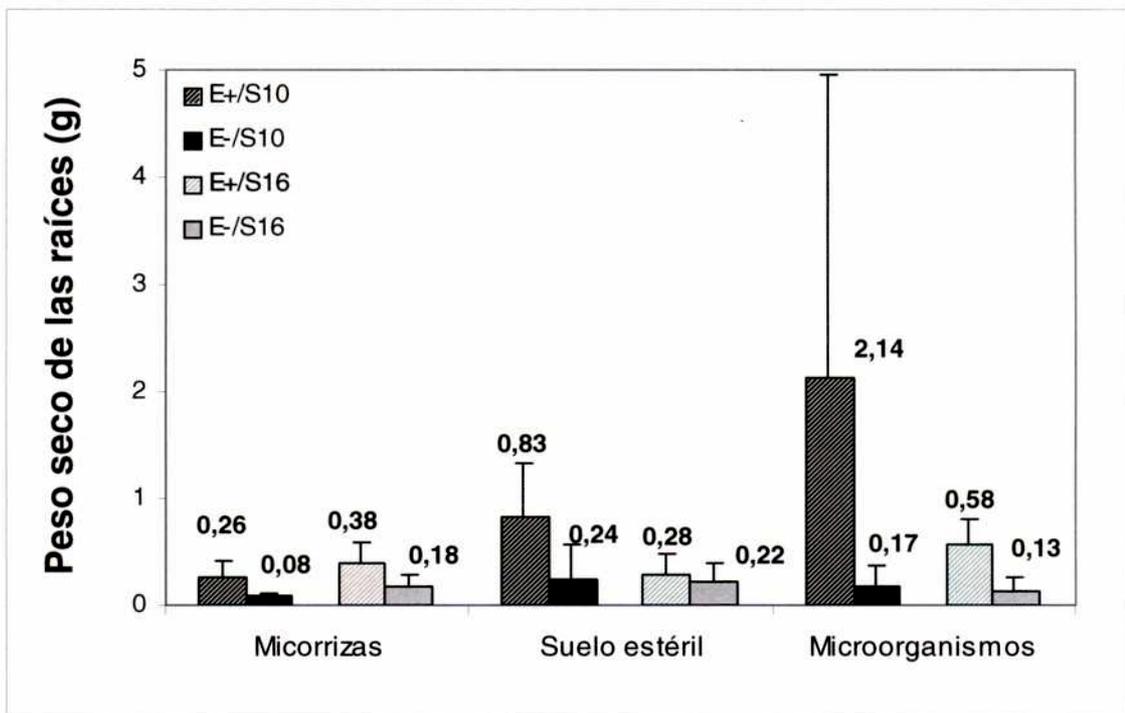
Corroboración de los porcentajes de colonización

Los porcentajes de colonización presentados por las plántulas utilizadas en el ensayo coincidieron con los determinados *a priori* en los cariopses.



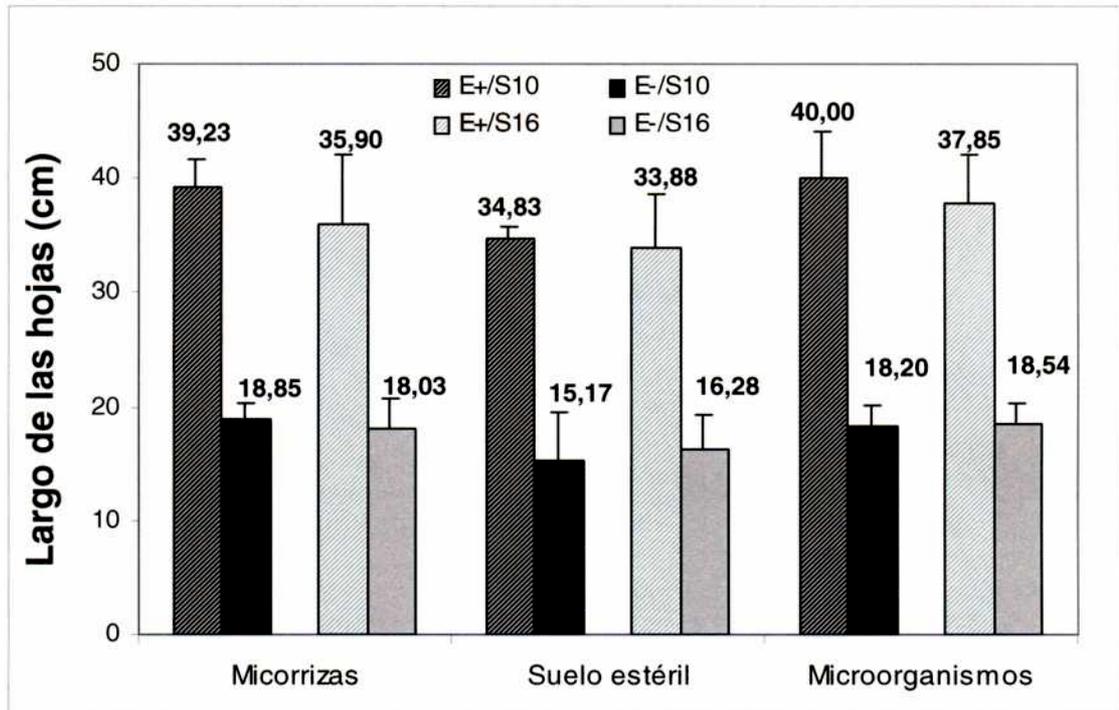
Fig. 31: Comparación en el largo entre las plántulas E+ y E- de 4 semanas del tratamiento con micorrizas .
a- Se observa que las plantas E+ superan significativamente en el largo a las E- b- Observación en detalle de las plántulas.

Fig. 32: Comparación del promedio del peso seco de las raíces de plantas de *B. setifolius* de la provincia de Santa Cruz.



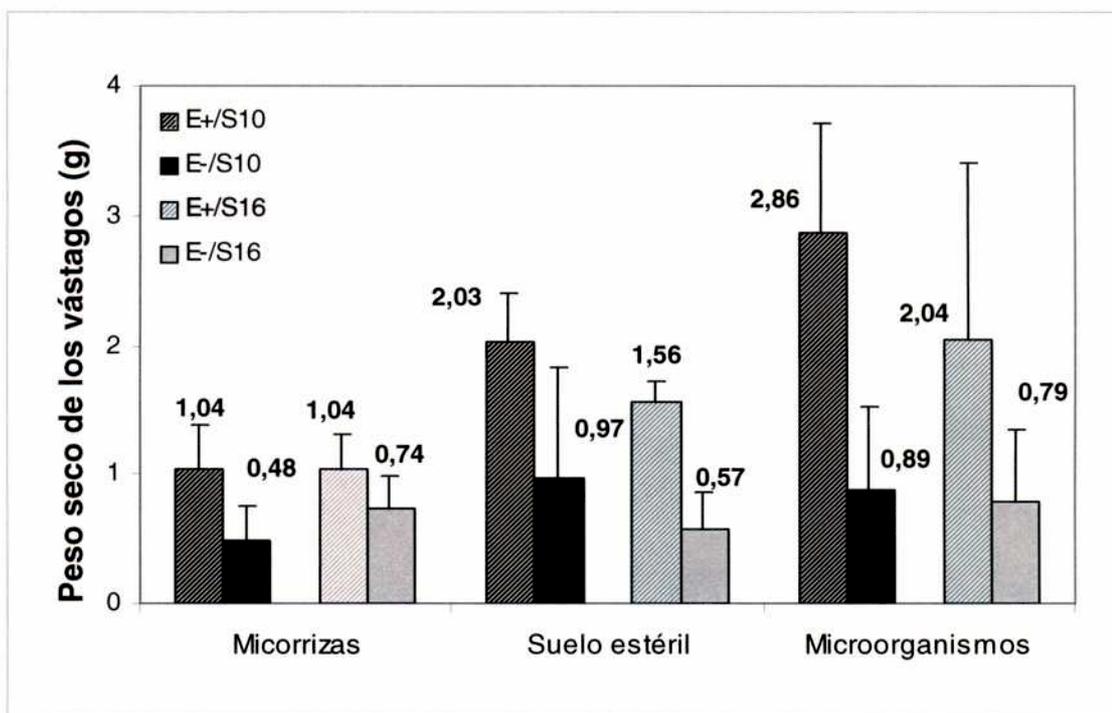
Las columnas con negro indican que se utilizó tierra del sitio 10 y con gris, tierra del sitio 16. El relleno liso corresponde la población E- y el rayado a la E+.

Fig. 33: Comparación del promedio del largo de las hojas de plantas de *B. setifolius*.



Las columnas con negro indican que se utilizó tierra del sitio 10 y con gris, tierra del sitio 16. El color liso corresponde a la población E- y el rayado a la E+.

Fig. 34: Comparación del peso seco de los vástagos de *B. setifolius* de la provincia de Santa Cruz.



Las columnas con negro indican que se utilizó tierra del sitio 10 y con gris, tierra del sitio 16. El color liso corresponde a la población E- y el rayado a la E+.

DISCUSIÓN

Tanto en el estudio de la colonización de raíces provenientes tomadas en el campo como en el ensayo realizado se observó el desarrollo predominante de enrulamientos intracelulares (colonización tipo *Paris*). Aunque también se detectó micelio intercelular acompañado de arbusculos intracelulares (colonización tipo *Arum*) en muestras de raíces de las mismas plantas. La distinción entre las distintas morfologías es todavía importante cuando el interés subyace en el desarrollo y fisiología de la simbiosis y (especialmente) cualquier diferenciación en la función entre las diferentes interfases. Esto se relaciona especialmente con diferencias en las respuestas a la micorrización (incremento del crecimiento comparado con controles no-micorrizados) si pueden correlacionarse con las diferencias estructurales (Smith & Smith, 1997).

Actualmente se considera que la colonización tipo *Paris* es muy común (Bundrett & Kendrick, 1990b). Ya se han registrado casos de familias de hospedantes como Apocinacea, Euphorbiaceae, Solanaceae y Gramineae con géneros que presentan uno u otro tipo de colonización (Smith & Smith, 1997). Nicolson (1959), debido a un "recuento" de pastos en Inglaterra, sugirió que el tipo *Paris* es muy frecuente en este grupo. Según Greny (1973) (en: Smith & Smith, 1997) *Phleum*, *Alopecurus*, *Agrostis* y *Agropyron* presentan este tipo de colonización.

Bundrett & Kendrick (1990a) demostraron que la colonización de tipo *Paris* era relativamente lenta comparada con la *Arum*. Las condiciones ambientales como el P, la temperatura y la intensidad lumínica pueden influir en el nivel de colonización y en la abundancia relativa de estructuras (Smith & Read, 1997). Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias que demuestren su influencia sobre el tipo de morfología de los hongos MA. Dadas las condiciones en las que se desarrolla *B. setifolius*, una colonización lenta por parte de las MA podría ser más favorable para el establecimiento y crecimiento de los hospedantes.

Algunos estudios que han utilizado diferentes combinaciones de hospedantes y hongos MA sugieren que los tipos de morfologías dependen de la especie del hospedante (Barrett, 1958; Smith & Smith, 1997). Bundrett & Kendrick (1988, 1990a) propusieron que la presencia o ausencia de espacios intercelulares en las raíces podrían actuar como vía de control. Cavagnano *et al.* (2001) sugirieron que los hongos que colonizan dichas raíces también influyen en la morfología a través del diámetro de las hifas, plasticidad y características enzimáticas y mecánicas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los de Cavagnano *et al.* (2001) dado que en muestras de raíces de la misma planta se observaron estructuras correspondientes a los dos tipos de colonización.

Los resultados obtenidos del análisis del porcentaje de micorrización entre poblaciones E+ y E- nativas se contrapusieron a nuestra hipótesis inicial. Según ésta, en las poblaciones E+ se vería una menor colonización por parte de los hongos MA como consecuencia de un antagonismo entre los mencionados hongos y los endofitos del género *Neotyphodium*. Dado que los endofitos acceden más rápidamente a las fuentes de carbono del hospedante, se esperaba un menor desarrollo de los hongos MA. Esto era lo postulado por Clay (1992), en una revisión teórica de las características de ambos tipos de simbiosis, basándose en los dos trabajos realizados hasta el momento (Barker, 1987, Chu-Chou *et al.*, 1992, Guo *et al.*, 1992).

Para estudiar la interacción entre las dos simbiosis a campo, contamos con poblaciones E+, E-, y poblaciones mixtas (E+/E-). Los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones con endofitos presentan un mayor porcentaje de colonización. Sin embargo, dado que una población E-, una E+ y las mixtas conformaron un grupo con porcentajes similares, lo que se ve es una tendencia.

De la correlación del largo de raíz micorrizada con los nutrientes, se desprende que a mayor fertilidad del suelo, (con respecto al Ct y Nt) mayor es el porcentaje de colonización. Mendoza *et al.* (2002) no encontraron ninguna correlación entre éstas variables, sin embargo, encontraron una correlación positiva y significativa entre la cantidad total de esporas y la mayoría de las características químicas del suelo. En la bibliografía se señala que una mayor fertilidad del suelo se corresponde con una menor cantidad de esporas (Egerton-Warburton & Allen, 2000; Hayman, 1970; Hayman *et al.*, 1975) pero Mendoza *et al.* (2002) proponen la posibilidad que, para las condiciones edafoclimáticas del norte de Tierra del Fuego, el modelo clásico postulado para otros climas, suelos, latitudes y comunidades vegetales, no se cumpla. Éstos resultados, considerando las semejanzas climáticas con el sur de Santa Cruz, podrían extrapolarse a nuestros sitios de muestreo.

Dado que las poblaciones E- y las mixtas se caracterizan por estar conformadas por gramíneas aisladas con una alta proporción de suelo desnudo, mientras que las E+ se trataban de plantas asociadas a *Mulinum spinosum* y a otras plantas herbáceas, nos preguntamos si el inóculo nativo sería mayor en el segundo caso. En otros trabajos se ha mencionado esta posibilidad (Jasper *et al.*, 1992; Ripoll, 1999). El inóculo compuesto por raíces colonizadas parece ser mayor en parches de arbustos. En estos parches la biomasa es mayor que en los parches de gramíneas y además las raíces parecerían estar más colonizadas. Esto

sumado a los resultados obtenidos por Mendoza *et al.* (2002) con respecto a la cantidad total de esporas, podría indicar entonces que la cantidad de inóculo sea en parte reguladora de la colonización.

Para poder estudiar el efecto que ejercen los suelos sobre el porcentaje de colonización, ya sea a través de sus diferentes propiedades químicas o por presentar diferencias en la cantidad de inóculo, decidimos incluir en el ensayo el suelo de los mismos sitios de donde provenían los cariopses y sembrarlos de forma directa y cruzada. De ésta manera, si se observaba una mayor colonización en las raíces de la plantas, E+ o E-, que fueron sembradas en el suelo del sitio compuesto por mayor vegetación, el factor ecológico empezaba a tener mayor incidencia en nuestras conclusiones.

Como resultado del ensayo se obtuvo que el porcentaje de micorrización fue significativamente mayor en las plantas E+, independientemente de el suelo utilizado. Este es el primer trabajo dónde se registra una interacción positiva entre endofitos *Neotyphodium* y micorrizas arbusculares. Estos resultados no concuerdan con trabajos previos donde las plantas colonizadas con *Neotyphodium* tuvieron un efecto de inhibición en la colonización y esporulación de hongos MA (Chu-Chou *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1992).

Guo *et al.* (1992) sugieren que el efecto negativo de los endofitos sobre las micorrizas podría deberse a la producción de alcaloides por parte de los endofitos. Ya hemos discutido en otros capítulos de esta tesis, el papel que juegan los alcaloides en la interacción gramíneas-endofitos-herbívoros particularmente en los modelos más estudiados como *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne*. Sin embargo también sabemos que no todas las gramíneas son tóxicas para el ganado y en la mayoría de las gramíneas nativas no se han realizado estudios químicos para confirmar la producción de alcaloides.

Es importante destacar que en los trabajos mencionadas se utilizó a *F. arundinacea* como un posible inhibidor de la colonización de raíces de tabaco por parte de *Glomus macrocarpum*, un patógeno de dicho cultivo. Estos resultados no son del todo extrapolables al modelo utilizado en el presente trabajo, dado que utilizamos una gramínea nativa y no contamos con ninguna información de que los hongos MA asociados a la misma tengan algún efecto negativo en la naturaleza.

En otros dos estudios (Barker, 1987; Vicari *et al.*, 2002), se comparó la capacidad antiherbívoro de plantas colonizadas con *Neotyphodium* cuando se encontraban micorrizadas. Barker (1987) mostró que el hongo *Glomus fasciculatum* no ejercía ningún efecto sobre la alimentación del gorgojo argentino del tallo *Listronotus bonariensis*, en plantas de *L. perenne* libres de endofitos. Sin embargo, cuando las plantas estaban colonizadas, la tendencia general

por parte del gorgojo de evitar hospedantes de *Neotyphodium*, se reducía en presencia de *G. fasciculatum*. Posteriormente, Vicari *et al.* (2002) estudiaron este mismo tipo de interacción en un trabajo más minucioso. Aquí concluyen que ambos tipos de simbiosis afectan el desarrollo larval y supervivencia de *Phlogophora meticulosa*, un insecto herbívoro generalista que se alimenta de una gran variedad de plantas herbáceas. Sugieren que el efecto protector que le brinda *N. lolii* a su hospedante, en términos de resistencia contra insectos, fue reducido por hongos MA, aunque no eliminado. Las diferencias encontradas en estos dos trabajos sugieren que no todas las especies de hongos MA interactúan con los endofitos foliares de la misma manera.

La existencia de interacciones entre diferentes hongos simbioses de plantas parece ser un fenómeno ampliamente distribuido. Gange (2001) también observó que dos hongos MA, *G. mosseae* y *G. fasciculatum*, tenían efectos adversos sobre insectos herbívoros de forma individual en *Fragaria X ananassa*. Cuando ambos hongos estaban juntos, no se observaban efectos significativos sobre la herbivoría. Aparentemente cancelaban sus efectos mutuamente. Sin embargo, la mayoría de las plantas en la naturaleza estarían colonizadas simultáneamente por varias especies de micorrizas y probablemente más de una especie de *Neotyphodium*. Por esto los resultados obtenidos de interacciones individuales sobre herbívoros por estos autores, son muy difíciles de estudiar en la naturaleza.

En el presente trabajo se utilizó inóculo general y nativo, por lo que se asemejó más a la que ocurre en la naturaleza. De hecho, además de la presencia de más de un género de hongos MA se contó con saprobios nativos del suelo que seguramente ejercen algún tipo de influencia en estas interacciones.

En todos los parámetros de crecimiento analizados en el ensayo en vivero, se observa un mayor desarrollo del hospedante cuando están colonizados con endofitos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el capítulo 2, donde se propone que la presencia de los endofitos promueve el desarrollo de sus hospedantes.

El efecto de los distintos tratamientos con micorrizas varió según el parámetro de crecimiento analizado. Las diferencias observadas en el peso seco de las raíces no fueron significativas pero aquellas detectadas en el largo de las hojas y el peso seco de los vástagos, sí lo fueron. Con respecto a la biomasa de los vástagos se puede suponer que la presencia de los dos simbioses podría representar un importante drenaje de carbohidratos resultando en un menor desarrollo de biomasa. Sin embargo, el largo de las hojas no se vio afectado de la misma forma observándose los valores más pequeños en el tratamiento de suelo estéril.

Los dos tipos de suelo utilizados en el ensayo en vivero, no tuvieron ningún efecto sobre ninguna de las variables estudiadas. De hecho, en el caso del peso seco de las raíces y de los vástagos, en los tratamientos de suelo estéril y con microorganismos, se puede observar, que las plantas E+ presentan una mayor biomasa cuando crecen asociadas al suelo del sitio 10 que cuando lo hacen con suelo de su propio sitio. A partir de estos resultados consideramos que no deben existir diferencias importantes entre las dos fuentes de suelo de manera que ejerzan un efecto significativo sobre la colonización de los hongos MA.

Un importante elemento de la endosimbiosis fúngica concierne a la entrada a la célula vegetal. La mayoría de los patógenos foliares desarrollan apresorios que pueden generar suficiente presión como para penetrar la pared (Bechinger *et al.*, 1999), lo que se combina con enzimas hidrolíticas. Como en el caso de los patógenos, no existe suficiente evidencia de que las plantas contribuyan a la entrada de los hongos MA (Nagahashi & Douds, 1997).

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el establecimiento y desarrollo de la simbiosis micorrícica, son poco conocidos, aún siendo ésta de gran importancia (Harrison, 1999).

Estudios realizados en mutantes de *Medicago truncatula* muestran que las plantas tiene bloqueada una vía relacionada con la nodulación y con la micorrización (Catoria, *et al.*, 2000) sugiriendo que existen señales en común entre éstos dos procesos.

Es muy probable que la mayoría de las asociaciones simbióticas hayan evolucionado explotando algunos componentes centrales en común. Algunos de éstos constituyen funciones celulares básicas como la reorganización de la pared, la síntesis de membrana y el rearrreglo del citoesqueleto. Estos procesos probablemente sean similares, sino idénticos entre los sistemas (Parniske, 2000).

La presencia inicial de los endofitos en las plántulas podrían generar una mayor susceptibilidad por parte del hospedante para ser colonizado por hongos MA. Sin embargo, el estudio de la interacción entre plantas y endosimbiontes obligados no ha podido ser abordado ampliamente dadas las obvias restricciones experimentales. Ya se ha registrado que cuando un hongo micorrícico entra en contacto con una planta hospedante, en ésta se producen cambios en la composición de los flavonoides (Scervino, com. per.). De la misma manera la presencia previa de los endofitos en el hospedante podría desencadenar procesos que favorezcan el ingreso a los hongos MA. Pero todavía se necesitan estudios químicos y moleculares que identifiquen las potenciales señales que participan en la colonización de los microorganismos.

CONCLUSIONES PARCIALES

Las plantas de *B. setifolius*, de la provincia de Santa Cruz, cuando están colonizadas por endofitos presentan mayor colonización por hongos micorrícicos arbusculares (MA). Este es el primer trabajo dónde se registra una interacción positiva entre endofitos *Neotyphodium* y micorrizas arbusculares.

En todos los parámetros de crecimiento analizados, se observa un mayor desarrollo del hospedante cuando están infectados con endofitos.

Las plantas colonizadas únicamente por endofitos desarrollan una mayor biomasa que aquellas colonizadas por endofitos y hongos MA.

Las raíces de plantas de *B. setifolius* pueden presentar simultáneamente los dos tipos de colonización *Arum* y *Paris*.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

- Los endofitos que colonizan las poblaciones de los tres hospedantes estudiados: *Bromus setifolius*, *Phleum commutatum* y *Poa rigidifolia*, pertenecen al género *Neotyphodium*, como ocurre con la mayor parte de los endofitos de otras partes del mundo.
- La distribución e incidencia de colonización por endofitos está determinada por uno o más factores bióticos y abióticos, que dependen del sistema bajo estudio.
- Ratificamos, en condiciones de campo y con especies no cultivadas, lo observado para plantas cultivadas. Cuando las condiciones de uno o más factores son extremas, el endofito deja de ser beneficioso para la planta y la relación se pierde evolutivamente.
- A diferencia de lo postulado hasta el momento, en *B. setifolius*, la colonización por endofitos y micorrizas no es excluyente, si no, por el contrario, parece existir una mutua estimulación.

BIBLIOGRAFIA

-
- Abbot, L.K. 1982. A quantitative study of the spores and anatomy of mycorrhizas formed by species of *Glomus*, with references to its taxonomy. *Australian Journal of Botany* 27: 363.
- Ahlholm, J.U., Helander, M., Lehtimäki, S. Wäli, P. & Saikkonen, K. 2002. Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos* 99: 173-183.
- Anchorena, J. 1978. Regiones Ecológicas de la Patagonia. EERA INTA Bariloche. (Informe Inédito) Pp 8.
- Arechevaleta, M., Bacon, C.W., Hoveland, C.S. & Radcliffe, D.E. 1989. Effect of tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal* 81: 83: 90.
- Bacon, C. W. 1994. Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses: historic perspectives. *Journal of Animal Science* 73: 861-870.
- Bacon, C.W. & Hill, N. 1996. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. En: *Endophytic fungi in grasses and woody plants. Systematics, Ecology and Evolution*. Redlin, S.C. & Carris, L.M. (eds.). APS Press. pp. 155-178.
- Bacon, C.W., Porter, J.K; Robbins, J.D. & Lutrell, E.S. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 576-581.
- Barker, G.M. 1987. Mycorrhizal infection influences *Acremonium*-induced resistance to Argentine stem weevil in ryegrass. *Proceedings of the New Zealand Weed Pest Control Conference* 40: 199-203.
- Barrett, J.T. 1958. Synthesis of mycorrhiza with pure cultures of *Rhizophagus*. *Phytopathology* 48: 391.

-
- Bechinger, C., Giebel, K.F., Schnell, M., Leidered, P., Deising, H.B. & Bastmeyer, F. 1999. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285: 1896-1899.
- Bertoni, M.D. 1989. Contribución al estudio de los endofitos fúngicos. Tesis Doctoral, Dir. J. Wright, Dpto. Cs. Biológicas, FCEyN, UBA.
- Bertoni, M.D., Cabral, D., Romero, N. & Dubcovsky, J. 1993. Endofitos fúngicos en especies sudamericanas de *Festuca* (Poaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 29: 25-34.
- Bier, J. 1995. Relationship between transmission mode and mutualism in the grass-endophyte system. Ph.D. diss. Indiana University, Bloomington.
- Blankenship, J.D., Spiering, M.J., Wilkinson, H.H., Fannin, F.F., Bush, L.B. & Schardl, C.L. 2001. Production of loline alkaloids by the grass endophyte, *Neotyphodium uncinatum*, in defined media. *Phytochemistry* 58: 395-401.
- Bonfante-Fasolo, P. 1986. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. En: VA mycorrhiza. Powell, C.L. Bagyaraj, D.J. (eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- Borelli, P., Iacomini, M., Baetti, C. & Anglesio, F. 1987. Areas ecológicas de Santa Cruz y Norte de Tierra del Fuego. Informe interno EEA Santa Cruz. Manuscrito.
- Bouton, J.H., Gates, R N., Belesky, D.P. & Owsley, M. 1993. Yield and persistence of tall fescue in the southeastern coastal plain after removal of its endophyte. *Agronomy Journal* 85: 52-55.
- Bower, C.A. & Wilcox, L.W. 1965. Soluble salts. En: *Methods in soil analysis: agronomy*. CA Black (ed.). 1° edition. Am. Soc. Agron., Madison. Pp. 933-951.
- Breen, J.P. 1994. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology* 39: 401-423.

-
- Brem, D. & Leuchtman, A. 2001. *Epichloë* grass endophytes increase herbivore resistance in the woodland grass *Brachypodium sylvaticum*. *Oecologia* 126: 522-530.
- Brenner, J.M. & Mulavaney, C.S. 1982. Nitrogen total. En: *Methods in soil analysis: agronomy*. CA Black (ed.). 1° edition. Am. Soc. Agron., Madison. Pp: 595-624.
- Brundrett, M.C. & Kendrick, W.B. 1988. The mycorrhizal status, root anatomy, and phenology of plants in a sugar maple forest. *Canadian Journal of Botany* 66: 1153-1173.
- Brundrett, M.C. & Kendrick, W.B. 1990a. The roots and mycorrhizae of herbaceous woodland plants. I. Quantitative aspects of morphology. *New Phytologist* 114: 457-468.
- Brundrett, M.C. & Kendrick, W.B. 1990b. The roots and mycorrhizae of herbaceous woodland plants. II. Structural aspects of morphology. *New Phytologist* 114: 469-479.
- Bultman, T.L. & White, J.F. 1988. "Pollination" of a fungus by a fly. *Oecologia* 75: 317-319.
- Burgos, J. 1985. Clima en el extremo sur de Sudamérica. En: *Transecta Botánica de la Patagonia Austral*. Boelcke, O., Moore, D. & Roig, F. (eds.). CONICET, Instituto de la Patagonia y Royal Society, Buenos Aires. Pp. 10-40.
- Bush, L.P., Wilkinson, H.H. & Scharld, C.L. 1997. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology* 114: 1-7.
- Cabral, D. 2002. Endofitos de Gramíneas Nativas de Argentina. IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa, Veracruz, México.
- Cabral, D. & Bertoni, M.D. 1991. Una nueva especie de *Acremonium* endofito de *Festuca argentina*. Resúmenes de las XXIII Jornadas Argentinas de Botánica.
- Cabral, D. & Lugo, M. 1993. Los endofitos de *Festuca hieronymi* y *Poa huecu*, dos plantas tóxicas para el ganado. Resúmenes del VI Congreso Argentino de Micología.
-

-
- Cabral, D. & Lugo, M. 1994. Los endofitos fúngicos en gramíneas de Argentina. Resúmenes del VI Congreso Latinoamericano de Botánica.
- Cabral, D., Cafaro, M.J., Saidman, B., Lugo, M., Reddy, P.V & White, J.F. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia* 91: 315-325.
- Cabral, D., Lugo, M., Cafaro, M.J. & White, J.F. 1996. Asociación con endofitos en gramíneas autóctonas de Argentina. II Congreso Latinoamericano de Micología. La Habana, Cuba.
- Cabral, D.; Lugo, M; Cafaro, M.J. & White, J.F. 1999. Asociación con endofitos en gramíneas autóctonas de Argentina. II. III Congreso Latinoamericano de Micología. Caracas, Venezuela.
- Cabrera, A. 1953. Esquema fitogeográfico de la República argentina. *Revista del Museo Ciudad Eva Perón (Nueva Serie)* 8: 87-168.
- Casabuono, A.D. 1994. Estudio químico y toxicológico de *Festuca argentina* (Speg). Par. y su comparación con *Festuca hieronymi* Hackel (Familia Gramineae). Tesis Doctoral N° 2646, Dir. A. Pomilio, Dpto. Química Orgánica, FCEyN, UBA.
- Catoira, R., galera, C., de Billy, F., Penmetsa, V., Journet, E-P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. & Dénarié, J. 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12: 1647-1665.
- Cavagnaro, T.R., Gao, L-L., Smith, F.A. & Smith, S.E. 2001. Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytologist* 151: 469-475.
- Cheplick, G.P. & Clay, K. 1988. Acquired chemical defenses of grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos* 52: 309-318.

-
- Cheplick, G.P., Clay, K. & Marks, S. 1989. Interactions between fungal endophyte infection and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytologist* 111: 89-97.
- Christensen, M.J., Leutchmann, A., Rowan, D.D. & Trapper, B.A. 1993. Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial rye-grass (*Lolium perenne*). *Mycological Research* 97: 1083-1092.
- Chu-Chou, M., Guo, B., An, Z.-Q., Hendrix, J.W., Ferris, R.S., Siegel, M.R., Dougherty, C.T. & Burrus, P.B. 1992. Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the *Acremonium coenophialum* endophyte. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 633-637.
- Cingolani, A., Anchorena, J. & Collantes, M. 1998. Landscape heterogeneity and long-term animal production in Tierra del Fuego. *Journal of Range Management* 51: 79-87.
- Clark, E.M., White, J.F. & Patterson, R.M. 1983. Improved histochemical techniques for the detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue and methods of in vitro culture of the fungus. *Journal of Microbiological Methods* 1: 149-155.
- Clay, K. 1987. Effects of fungal endophytes on seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia* 73: 358-362.
- Clay, K. 1989. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. *Mycological Research* 92: 1-12.
- Clay, K. 1990a. Fungal endophyte of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 275-297.
- Clay, K. 1990b. Insect endophytic fungi and plants. En: *Pests, pathogens and plants communities*. Burdon, J.J. & Leather, S.R. (eds.). Blackwell, Oxford. Pp. 111-130.
- Clay, K. 1992. Mycophyllas and Mycorrhizas: Comparisons and Contrasts. En: *Mycorrhizas in Ecosystems*. Read, Lewis, Fitter, Alexander (eds.) pp. 13-25. falta editorial
-

-
- Clay, K. 1994. The potential role of endophytes in ecosystems. En: Biotechnology of endophytic fungi of grasses. Bacon, C.W. & White, J.F., Jr. (eds.) CRC Press. Boca Raton, FL, pp: 73-86.
- Clay, K. 1996. Fungal Endophytes, herbivores and the structure of grassland communities. En Multitrophic Interactions in Terrestrial systems. Gange, A.C. (ed.). Oxford: Blackwell Scientific. Pp. 151-69.
- Clay, K. & Scharld, C.L 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbioses with grasses. *American Naturalist* 160: 99-127.
- Clay, K., Hardy, T.N. & Hammond, A.M. 1985. Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia* 66: 1-6.
- Clay, K., Cheplick, G.P & Marks, S.M. 1989. Impact of the fungus *Balansia henningsiana* on the grass *Panicum agrostoides*: frequency of infection, plant growth and reproduction, and resistance to pests. *Oecologia* 80: 374-380.
- Clement, S.L. Elberson, L.R., Youssef, N.N., Davitt, C.N. & Doss, R.P. 2001. Incidence and diversity of *Neotyphodium* fungal endophytes in Tall fescue from Morocco, Tunisia and Sardinia. *Crop Science* 41: 570-576.
- Collantes, M., Anchorena, J.A. & Koremblit, G. 1989. A soil nutrient gradient in Magellanic Empetrum Heathlands. *Vegetatio* 80: 183-193.0
- Collantes, M., Anchorena, J.A. & Cingolani, A. 1999. The steppes of Tierra del Fuego: floristic and growthform patterns controlled by soil fertility and moisture. *Plant Ecology* 140: 61-75.
- Conover, M.R. 1998. Impact of consuming tall fescue leaves with the endophyte fungus, *Acremonium coenophialum*, on meadow voles. *Journal of Mammalogy* 79: 457-463.
- Conover, M.R. & Messmer, T.A. 1996. Feeding preferences and changes in mass of Canada geese grazing endophyte-infected tall fescue. *Auk* 98: 859-862.
-

-
- Correa, M.N. 1998. Flora Patagonica. Colección Científica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Tomo VIII. Parte
- Craven, K.D., Blankenship, J.D., Leuchtman, A., Hignight, K. & Schardl, C.L. 2001. Hybrid fungal endophyte symbiotic with the grass *Lolium pretense*. *Sydowia* 53: 44-73.
- Crisci, J.V. & Lopez Armengol, M.F. 1983. Introducción a la Teoría y Practica de la Taxonomía Numérica. Monografía nro. 26, Serie de Biología, Programa de Monografías Científicas, OEA, Washington D.C., USA. 128 pp.
- Cuadra, D. & Oliva, G. 1994. Ambientes naturales de la provincia de Santa Cruz. Revista Espacios. Universidad Nacional de la Patagonia Austral. UARG:
- De Battista, J.P., Bacon, C.W., Severson, R., Plattner, R.D. & Bouton, J.H. 1990. Indole acetic acid production by the fungal endophyte of tall fescue. *Agronomy Journal* 82: 878-880.
- De Fina, A. L. 1992. Aptitud agroclimática de la República Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. 427 pp.
- De Fina, A.L., Garbosky, A., Gianetto, F. & Sabella, L. 1968. Difusión geográfica de cultivos índices en la Provincia de Santa Cruz. Vol. Publicación 111. INTA, Buenos Aires. Pp. 30.
- Egerton-Warburton, L. M. & Allen, E.B. 2000. Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecological applications* 10: 484-496.
- Elmi, A.A. & West, C.P. 1995. Endophyte infection effects on stomatal conductance, osmotic adjustment and drought recovery of tall fescue. *New Phytologist* 131: 61-67.
- Faeth, S.H. & Fagan, W.F. 2002. Fungal endophytes: Common host Plant Symbionts but uncommon mutualists. *Comparative and Integrative Biology* 42: 360-368.

-
- Faeth, S.H., Bush P.L. & Sullivan, T.J. 2002. Peramine alkaloid variation in *Neotyphodium*-infected *Arizonica fescue*: Effects of endophyte and host genotype and environment. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1511-1526.
- Ford, V.L. & Kirkpatrick, T.L. 1989. Effects of *Acremonium coenophialum* in tall fescue on host disease and insect resistance and allelopathy to *Pinus taeda* seedlings. *Proceedings of the Arkansas Fescue Toxicosis Conference* 140: 29-34.
- Fontela, S., Puntieri, J. & Ocampo, J.A. 2001. Mycorrhizal associations in the Patagonian steppe, Argentina. *Plant and Soil* 233: 13-29.
- Fortier, G.M., Bard, N., Jansen, M. & Clay, K. 2000. Effects of tall fescue endophyte infection and population density on growth and reproduction in prairie voles. *Journal of Wildlife Management* 64: 122-128.
- Freeman, E.M. 1904. The seed fungus of *Lolium tementulum* L., the darnel. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 214: 1-28.
- Gallaud, I. 1905. Etudes sur les mycorrhizes endotrophs. *Revue Générale de Botanique* 17: 5-500.
- Gange, A.C. 2001. Species-specific responses of a root- and shoot-feeding insect to arbuscular mycorrhizal colonization of its host plant. *New Phytologist* 150: 611-618.
- Gentile, A.; Rossi, M.S. & Cabral, D. 2003. Filogenia molecular de endofitos *Neotyphodium* simbioses de gramíneas nativas de argentina. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica XV Reunion Anual Sociedad de Botánica de Chile, San Luis, Argentina.
- Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B. & Gianinazzi, S. 1989. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host roots exudates and plant flavonoids. *Symbioses* 7: 243-255.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
-

-
- Giovanetti, M. & Sbrana, C. 2001. Self and non-self responses in hyphal tips of arbuscular mycorrhizal fungi. En: Cell biology of plant and fungal tip growth. Geitmann, A. (ed). IOS, Amsterdam. Pp. 221-231.
- Giuliano, W.M, Elliott, C.L. & Sole, J.D. 1994. Significance of tall fescue in the diet of the eastern cottontail. *Prairie Naturalist* 26: 53-60.
- Glenn, A., Bacon, C., Price, R. & Hanlin, R.T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomy implications. *Mycologia* 88:369-383.
- Godeas, A.M., Arambarri, A.M. & Gamundí, I. 1993. Micosociología en los bosques del Norte de Tierra del Fuego. I. Diversidad, abundancia y Fenología. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas Físicas y Naturales de Buenos Aires* 45: 291-302.
- Greny, A. 1973. Étude anatomo-morphologique des endomycorrices constitue par le Maïs, l'Avoine, le Blé, l'Orge et diverses gramineés prairiales et adventices. Mémoire presentee au Conservatoire des Arts et Métiers pour obtenir le Diplome d'Ingenieur C.N.A.M.
- Groger, D. 1972. Ergot. En: *Microbial toxins*. Kadis, S. Ciegler, A. & Ajil, S.J (eds.). Academic Press, New York. pp. 321-373.
- Groppe, K., Steinger, T., Sanders, I., Schmid, B., Wiemken, A., Boller, T. 1999. Interaction between the endophytic fungus *Epichloë bromicola* and the grass *Bromus erectus*: effects of endophyte infection, fungal concentration and environment on grass growth and flowering. *Molecular Ecology* 8: 1827-1835.
- Guo, B.Z., Hendrix, J.W. An, Z.-Q. & Ferriss, R.S. 1992. Role of *Acremonium* endophyte of fescue on inhibition of colonisation and reproduction of mycorrhizal fungi. *Mycologia* 84: 882-885.
- Gutiérrez, H.F. & Penseiro, J.F. 1998. Sinopsis de las especies argentinas del género *Bromus* (Poaceae). *Darwiniana* 335: 75-114.
-

-
- Gwinn, K.D. & Galvin, A.M. 1992. Relationship between endophyte infection level of tall fescue seed lots and *Rhizoctonia zae* seedling disease. *Plant Disease* 76: 911-914.
- Harrison, M.J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 361-389.
- Hayman, D.S. 1970. *Endogone* spores numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. *Transactions of the British Mycological Society* 54: 53-63.
- Hayman, D.S, Johnson, A.M. & Ruddlesdin, I. 1975. The influence of phosphate and crop species on *Endogone* spores and vesicular-arbuscular mycorrhiza under field conditions. *Plant Soil* 43: 489-495.
- Hepper, C.M. & Jacobsen, I. 1983. Role of organic matter in growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 81: 155-156.
- Hill, N.S. 1994. Ecological relationships of *Balansia*-infected graminoids. En: *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. Bacon, C.W. & White, J.F. (eds.). CRC Press. Pp. 59-71.
- Hill, N.S., Stringer, W.C., Rottinghaus, G.E., Belesky, D.P, Parrott, W.A. & Pope, D.D. 1990. Growth, morphological and chemical component responses of Tall fescue to *Acremonium coenophialum*. *Crop Science* 30: 156-161.
- Hodge, A. Campbell, C.D. & Fitter, A.H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413: 297-299.
- Iannone, L. 2003. Caracterización del endofito de *Bromus auleticus* y sus efectos sobre la biología del hospedante. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

-
- Jasper, D.A., Abbott, L.K. & Robson, A.D. 1992. Soil disturbance in native ecosystems. The decline and recovery of infectivity of VA mycorrhizal fungi. En: Mycorrhizas in Ecosystems. Read, D.L., Fitter, A.H. & Alexander, I.J (eds.). CAB International, Wallingford, UK. pp 151-155.
- Johnson-Cicalese, J., Secks, M.E., Lam, C.K., Meyer, W.A., Murphy, J.A. & Belanger, F.C. 2000. Cross science inoculation of chewings and strong creeping red fescues with fungal endophytes. *Crop Science* 40: 1485-1489.
- Kelley, S.E. & Clay, K. 1987. Interspecific competitive interactions and the maintenance of genotypic variation within the populations of the two perennial grasses. *Evolution* 41: 92-103.
- Kover, P.X., Dolan, T. & Clay, K. 1997. Potential versus actual contribution of vertical transmission to pathogen fitness. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 264: 903-909.
- Kuldau, G.A., Tsai, H.-F. & Scharld, C.L. 1997. Molecular systematics of Clavicipitaceae supporting monophyly of genus *Epichloë* and for genus *Ephelis*. *Mycologia* 89: 431-441.
- Latch, G.C.M. 1993. Incidence of endophytes in seedlings and their control with fungicide. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 44: 251-253.
- Latch, G.C.M., Christensen, M.J. & Samuels, G.J. 1984. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. *Mycotaxon* 20: 535-550.
- Latch, G.C.M., Hunt, W.F. & Musgrave, D.R. 1985. Endophyte fungi affect growth of perennial ryegrass. *N.Z.J. Agricultural Research* 28: 165-168.
- León, R.J.C., Bran, D., Collantes, M., Paruelo, J.M. & Soriano, A. 1998. Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral* 8: 125-144.

-
- Leuchtman, A., Schmidt, D. & Bush, L.P. 2000. Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloe/Neotyphodium* endophytes. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1025-1036.
- Levitt, D.A. & Kerster, H.W. 1974. Gene flow in seed plants. *Journal of Evolutionary Biology* 7: 139-220.
- Lewis, G.C., Ravel, C., Naffaa, W., Astier, C. & Charmet, G. 1997. Occurrence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France. *Annals of Applied Biology* 130: 227-238.
- Lugo, M., Anton, A. & Cabral, D. 1998. Presencia y distribución de micófilas en gramíneas de Argentina. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56: 15-22.
- Madej, C.W. & Clay, K. 1991. Avian seed preference and weight loss experiments: the effect of fungal endophyte-infected tall fescue seeds. *Oecologia* 88: 296-302.
- Malinowski, D. & Beleski, D.P. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40: 923-940.
- Malinowski, D., Leuchtman, A., Schmidt, D. & Nosberger, J. 1997a. Growth and water status in meadow fescue is affected by *Neotyphodium* and *Phialophora* species endophytes. *Agronomy Journal* 89: 673-678.
- Malinowski, D., Leuchtman, A., Schmidt, D. & Nosberger, J. 1997b. Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* increases the competitive ability of meadow fescue (*Festuca pratensis*). *Agronomy Journal* 89: 833-839.
- Marks, S. & Clay, K. 1996. Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection. *New Phytologist* 133: 727-733.

-
- Marks, S., Clay, K. & Cheplick, G.P. 1991. Effects of fungal endophytes on interspecific and intraspecific competition in the grasses *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. *Journal of Applied Ecology* 28: 194-204.
- Martone, S.E. 1992. Estudio químico y toxicológico de *Festuca hieronymi*. tesis de Licenciatura, Dir. A. Pomilio, Dpto. Química Orgánica, FCEyN, UBA.
- Matteucci, S.D. & Colma, A. 1982. Metodología para el estudio de la vegetación. Monografía nro. 22, Serie de Biología, Programa de Monografías Científicas, OEA, Washington D.C., USA. Pp. 168.
- McCune, B. 1991. Multivariate analysis on the PC-ORD system. Oregon State University, Corvallis.
- Meijer, G. & Leuchtman, A. 1999. Multistrain infections of the grass *Brachypodium sylvaticum* by its fungal endophyte *Epichloë sylvatica*. *New Phytologist* 141: 355-368.
- Mendoza, R.E., Goldmann, V., Rivas, J., Escudero, V. Pagani, E., Collantes, M. & Marbán, L. 2002. Poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares en relación con las propiedades del suelo y de la planta hospedante en pastizales de Tierra del Fuego. *Ecología Austral* 12: 105-116.
- Miles, C.O., di Menna M.E, Jacobs, S.W.L., Garthwaite, I., Lane, G.A, Prestidge, R.A., Marshall, S.L., *et al.* 1998. Endophytic fungi in indigenous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 601-606.
- Moon, C.D., Scott, B., Schardl, C.L. & Christensen, M.J. 2000. The evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia* 92: 1103-1118.
- Moon, C.D., Miles, C.O., Jarlfors, U. & Schardl, C.L. 2002. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. *Mycologia* 94: 694-711.

-
- Morgan-Jones, G. & Gams, W. 1982. Notes on Hyphomycetes . XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. *Mycotaxon* 15: 311-318.
- Morgan-Jones, G., White, J.F. & Piontelli, E.L. 1990. Endophyte-host associations in forage grasses. XIII. *Acremonium chilense*, an undescribed endophyte occurring in *Dactylis glomerata* in Chile. *Mycotaxon* 39: 441-454.
- Morton, J.B. & Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491.
- Morton, J. B. & D. Redecker. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195.
- Nagahashi, g. & Douds, D.D. 1997. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist* 136: 299-304.
- Nelson, L.R., Phillips, T.D. & Watson, C.E. Jr. 1995. Plant breeding for improved production in annual ryegrass. *Agronomical Abstracts* 125.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H. & Merryweather, J.W. 1995. Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Tree* 10: 407-411.
- Nicolson, T.H. 1959. Mycorrhiza in the Gramineae. I. Vesicular-arbuscular endophytes, with special reference to the external phase. *Transactions of the British Mycological Society* 42: 421-438.
- Nicora, E.G. 1978. Graminea. Parte III. En *Flora Patagónica*. Dir. Correa, M.N. Inta (ed). Pp. 570.
- Noy-Meir, I. 1973. Desert ecosystems: environment and producers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4:25-51.
-

-
- Oliva, G., González, L., Rial, P. & Livraghi, E. 2001. El ambiente en la Patagonia Austral. En: Ganadería ovino sustentable en la Patagonia Austral. Tecnología de manejo extensivo. Borelli, P. & Oliva, G. (eds.). Estación Experimental Agropecuaria Santa Cruz Convenio INTA-UNPA-CAP. 272 pp.
- Panaccione, D.G., Johnson, R.D., Wnag, J., Young, C.A., Damrongkool, P., Scott, B. & Schardl, C.L. 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 USA 98: 12820-12825.
- Parniske, M. 2000. Intracellular accomodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? Current Opinion in Plant Biology 3: 320-328.
- Paruelo, J.M., Beltrán, A., Jobbágy, E., Sala, O. & Golluscio, R.A. 1998. The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. Ecología Austral 8: 85-101.
- Peech, M. 1965. Hydrogen-ion activity. En: Methods in soil analysis : agronomy. CA Black (ed.). 1° edition. Am. Soc. Agron., Madison. Pp. 914-926.
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158.
- Pomilio, A.B., Rofi, R.D., Gambino, M.P. Mazzini, C.A. & Debenedetti de Langenheim, R.T. 1989. The lethal principle of *Poa huecu* (cirón blanco): a plant indigenous to Argentina. Toxicon 27: 1251.
- Porter, J.K. 1994. Chemical constituents of grss endophytes. En: Biotechnology of endophytic fungi of grasses. Bacon, C.W. & White, J.F., Jr. (eds.) CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 103-123.

-
- Porter, J.K., Bacon, C.W., Cutler, H.G., Arrendale, R.F. & Robbins, J.D. 1985. *In vitro* auxin production by *Balansia epichloë*. *Phytochemistry* 24: 1429-1431.
- Posse, G., Anchorena, J. & Collantes, M. 2000. Spatial micro-patterns in the steppe of Tierra del Fuego induced by sheep grazing. *Journal of Vegetation Science* 11: 43-50.
- Ravel, C., Michalakis, Y. & Charmet, G. 1997. The effect of imperfect transmission of the frequency of mutualistic seed-born endophytes in natural populations of grasses. *Oikos*: 80: 18-24.
- Rice, J.S., Pinkerton, B.W., Stringer, W.C. & Undersander, D.J. 1990. Seed production in tall fescue as affected by fungal endophyte. *Crop Science* 30: 1303-1305.
- Richardson, M.D., Hoveland, C.S. & Bacon, C.W. 1993. Photosynthesis and stomatal conductance of symbiotic and nonsymbiotic tall fescue. *Crop Science* 33: 145-149.
- Richter, M. & Wistinghausen, E Von. 1981. Unterscheidbarkeit von humusfraktionen in boden bei unterschiedlicher bewirtschaftung. *Z. Pflanz. Bodenkunde* 144: 395-406.
- Ripoll, M.P. 1999. Factores que regulan la asociación entre hongos vesículo-arbusculares y las gramíneas dominantes del Distrito Occidental Patagónico. Tesis de Licenciatura. Dir. M. Oesterheld, A. Godeas. FCEyN, UBA:
- Rivas, H. & Zanolli, M. 1909. La tembladera. Enfermedad propia de los animales herbívoros de las regiones andinas. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de La Plata* 5: 5-35.
- Rowan, D.D., Hunt, M.B. & Gaynor, D.L. 1986. Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae*. *Journal of the Chemical Society D, Chemical Communications* 142: 935-936.
- Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M.L. & Sullivan, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.
-

-
- Saikkonen, K., Helander, M., Faeth, S.H., Schultness, F. & Wilson, D. 1999. Endophyte-herbivore interactions: The case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia* 121: 411-420.
- Scharld, C.L. 1996. *Epichloë* species: Fungal Symbionts of Grasses. *Annual Review of Phytopathology* 34: 109-130.
- Scharld, C.L. & Wilkinson, H.H. 2000. Hybridization and coespeciation hypotheses for the evolution of grass endophytes. En *Microbial Endophytes*. Bacon, W.C. & White, J.F. (eds.) Marcel Dekker, Inc. Basel. Pp. 487.
- Scharld, C.L., Lui, J., White, J.F., Finkel, R.A., An, Z. & Siegel, M.R. 1991. Molecular phylogenetic relationships of non-pathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. *Plant Systematics and Evolution* 178: 27-41.
- Scharld, C.L., Leuchtman, A., Tsai, H.-F., Collet, M.A., Watt, D.M. & Scott, D.B. 1994. Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen *Epichloë typhina*. *Genetics* 136: 1307-1317.
- Shimanuki, T. 1987. Studies on the mechanisms of the infection of timothy with purple spot disease caused by *Cladosporium phlei* (Gregory) de Vries. *Research Bulletin of Hokkaido National Agricultural Experiment Station* 148: 1-56.
- Siegel, M.R. 1993. *Acremonium* endophytes: our current state of knowledge and future directions for research. *Agriculture, Ecosystems and Environments* 44: 301-321.
- Siegel, M.R. & Bush, L.P. 1997. Toxin production in grass/endophyte associations. En: *The Mycota V. Pt. A. Plant relationships*. Carroll, G. & Tudzynski, P. (eds.) Springer, Berlin pp185-207.
- Siegel, S. & Castellan, N.J.Jr. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2^o edition. Mc. Graw-Hill, New York.
- Siegel, M.R. & Latch, G.C.M. 1991. Expression of antifungal activity in agar culture by isolates of grass endophytes. *Mycologia* 83: 529-537.
-

-
- Siegel, M.R., Latch, G.C.M., Bush, L.P., Fennell, N.F., Rowan, D.D., Tapper, B.A., Bacon, C.W. & Johnson, M.C. 1990. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology* 16: 3301-3315.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London. Pp. 605.
- Smith, K.T., Bacon, C.W. & Luttrell E.S. 1985. Reciprocal translocation of carbohydrates between host and fungus in bahiagrass infected with *Myriogenospora atramentosa*. *Phytopathology* 75: 407-411
- Smith, F.A. & Smith, S.E. 1997. Transley Review N° 96: Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 137: 373-388.
- Soriano, A. 1956. Los distritos florísticos de la provincia de Patagónica. *Revista de investigaciones Agropecuarias* 10: 323-347.
- Stovall, M.E. & Clay, K. 1988. The effect of the fungus *Balansia cyperi* on the growth and reproduction of purple nutsedge, *Cyperus rotundus*. *New Phytologist* 109: 351-359.
- Stovall, M.E. & Clay, K. 1991. Fungitoxic effects of *Balansia cyperi* (Clavicipitaceae). *Mycologia* 83: 288-295.
- TePaske, M.R., Powell, R.G. & Clement, S.L. 1993. Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 2299-2303.
- Thrower, L.B. & Lewis, D.H. 1973. Uptake of sugars by *Epichloe typhina* (Pers.ex Fr.) Tul. in culture and from its host, *Agrostis stolonifera* L. *New Phytologist* 72: 501-508.
- Tsai, H.-F., Liu, J.S., Staben, C. Christensen, M.J., Latch, G.C.M. Siegel, M.R. & Scharld, C.L. 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 2542-2546.
-

-
- Vicari, M., Hatcher, P.E. & Ayres, P.G. 2002. Combined effect of foliar and mycorrhizal endophytes on an insect herbivore. *Ecology* 83: 2452-2464.
- Wennstrom, A. 1994. Endophyte-the misuse of an old term. *Oikos* 71: 535-536.
- Werker, E. 1997. Morphological characteristics of seeds. En: *Seed Anatomy*. Werker, E. (ed.). Berlín, Stuttgart: Borntraeger. Pp 2-22.
- West, C.P. 1994. Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses. En: *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. Bacon, C.W. & White, J.F. (eds.). CRC Press. Boca Raton, FL. Pp: 87-99.
- Westhoff, V. & van der Maarel. 1978. The Braun-Blanquet approach. En: *Classification of plant communities*. Whittaker, R.H. (ed.). Junk, The Hague. pp. 287-399.
- White, J.F. 1987. The widespread distribution of endophytes in the Poaceae. *Plant Disease* 71: 340-342.
- White, J.F. 1988. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. *Mycologia* 80: 442-446.
- White, J.F. 1997. Systematics of the Graminicolous Clavicipitaceae: applications of morphological and molecular approaches. En: *Neotyphodium grass interactions*. Bacon, C.W. & Hill, N.S. (eds.) Plenum Press. New York. Pp. 27-39.
- White, J.F. & Cole, G.T. 1985. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. *Mycologia* 77: 323-327.
- White, J.F. & Morgan-Jones, G. 1987. Endophyte-host association in forage grasses. X. Cultural studies on some species of *Acremonium* Sect. *Albo-lanosa*, including a new species, *A. starri*. *Mycotaxon* 30: 87-95.
- White, J.F., Martin, T.I. & Cabral, D. 1996. Endophyte-host associations in forage grasses. XXIII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes in the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia* 88: 174-178.
-

White, J.F., Sullivan, R.F., Balady, G.A., Gianfagna, T.J., Yue, Q., Meyer, W.A. & Cabral, D. 2001. A fungal endosymbiont of the grass *Bromus setifolius*: Distribution in some Andean populations, identification and examination of beneficial properties. *Symbioses* 31: 241-257.

ANEXO 1

1. Detección de endofitos del género *Neotyphodium in situ*

Caña

1. El escapo floral es cortado al nivel del suelo, se realiza una incisión longitudinal y se raspa el tejido parenquimático de los internudos más distantes.
2. El material obtenido se monta en un portaobjetos con una gota de azul de anilina (2 partes de 1% de anilina azul acuosa : 1 parte de ácido láctico al 85%).
3. El exceso de colorante es eliminado, y se realiza un aplastado del material, al que se le apoya un cubreobjetos
4. El hongo puede ser observado a un aumento de 100X, aunque se recomienda el de 400X para una observación más detallada.

Cariopse

Los endofitos del género *Neotyphodium* se observan en asociación con la capa de aleurona del cariopse.

1. Hidratación de los cariopses sumergiendo los mismos en una solución de KOH (5%) por alrededor de una hora.
 2. Se monta un cariopse sobre un portaobjetos junto con una gota de colorante (2 partes de 1% de anilina azul acuosa: 1 parte de ácido láctico al 85%).
 3. Se aplasta el cariopse con la ayuda de un cubreobjetos
 4. Se agrega más colorante para eliminar las burbujas de aire. Se observa a un aumento de 100X. El micelio se distingue en forma de hifas teñidas de azul oscuro y muy convolutas, asociadas a grupos de células de la capa de aleurona, que también se tiñen.
-

2. Aislamiento de cepas de *Neotyphodium* sp.

A partir de semillas, cañas florales y/o vainas foliares de plantas de poblaciones E+ se procedió al aislamiento del endofito.

Las semillas enteras o trozos de aproximadamente 5mm de vaina o caña se esterilizaron superficialmente mediante lavados sucesivos con etanol 70% durante 1 minuto, lavandina (hipoclorito de sodio 55g/l) 50% 10 minutos y finalmente en etanol 50% durante 1 minuto. A continuación se los colocó en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con medio de cultivo agar papa glucosado (APG) (Clark et al., 1983).

Las semillas, luego de esterilizadas fueron cortadas estérilmente en tres porciones para luego sembrarlas.

Estas cajas se mantuvieron en cámara de cultivo a 23°C en oscuridad durante 1 a 2 meses y se revisaron periódicamente para detectar el desarrollo de micelio hialino y de crecimiento lento (característico de los endofitos de gramíneas) desde el interior de las porciones del tejido vegetal sembrado.

El micelio desarrollado a partir del tejido fue inspeccionado bajo microscopio para descartar la posibilidad de que se tratara de un contaminante.

Cuando el simbionte aislado presentó las características de crecimiento buscadas fue transferido a otra caja de Petri con medio APG e incubado a 23°C para permitir su desarrollo en forma aislada y se conservó en tubos en pico de flauta con APG en heladera a 5°C.

3. Metodología para la determinación del pH de muestras de suelo.

Las muestras de suelo de cada sitio son tamizadas con un tamiz menor de 2mm y a continuación se preparan tres réplicas de las siguiente forma:

Para cada réplica se pesan 10 g de suelo y se colocan en un vaso precipitado de 50 ml.

Se agrega 10 ml de agua destilada aireada.

Se agitar 3 veces 15 segundos cada 5 minutos.

Se medir el pH después de una hora.

Se obtener el valor promedio entre las tres réplicas

4. Test de X^2 para dos muestras independientes

Tabla de contingencia de 2x2

Variable	Grupo		Combinados
	I	II	
1	A	B	A+B
2	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	N

Como a partir de los datos usados en las tasas de mortalidad de los ensayos del Capítulo 2, $N > 40$, entonces debe realizarse una corrección por continuidad.

$$X^2 = \frac{N(|AD-BC| - N/2)^2}{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)}$$

Tabla de contingencia de 3x2 usada para analizar las diferencias entre la mortalidad de los distintos tratamientos)

Variable	Grupo		Combinación
	1	2	
1	n_{11}	n_{12}	R_1
2	n_{21}	n_{22}	R_2
3	n_{31}	n_{32}	R_3
total	C_1	C_2	N

$$R_i = \sum_{j=1} n_{ij}$$

$$E_{ij} = \frac{R_i \cdot C_j}{N}$$

$$C_j = \sum_{i=1} n_{ji}$$

Combinación de categorías de la tabla de 3x2 para aumentar el valor de las frecuencias:

n_{11}	n_{12}	R_1
+	+	+
n_{21}	n_{22}	R_2
n_{31}	n_{32}	R_3
C_1	C_2	N

$$X^2 = \frac{N[n_{32}(n_{11} + n_{21}) - n_{31}(n_{12} + n_{22})]^2}{C_1 C_2 R_3 (R_1 + R_2)}$$

5. Tinción de raíces

- 1- Se lavaron las raíces bajo agua para eliminar los restos de fijador.
- 2- Se clarificaron las raíces sumergiéndolas en una solución de KOH (10%) y se dejaron por 1 hora a 90°C o por 12 hs a temperatura ambiente.
- 3- Se enjuagaron las raíces con agua de la canilla.
- 4- Las raíces se sumergieron en una solución de HCL (1%) para neutralizar los restos de KOH y se las dejó 3 minutos
- 5- Las raíces fueron sumergidas en una solución de azul de Tripan (0.05%) al lactofenol por 15 minutos a 90°C o por varias horas a temperatura ambiente.
- 6- Las raíces fueron sumergidas en lactofenol para eliminar restos del colorante.
- 7- Las raíces fueron guardadas en lactofenol para su posterior observación.

6. Estimación del porcentaje del largo de raíces colonizadas

Método slide (Giovannetti & Mosse, 1980)

- 1- Se montaron en portaobjetos 50 fragmentos de raíces de 1 cm de largo aproximadamente, elegidos al azar.
 - 2- Las raíces fueron observadas en microscopio óptico a 400 X. En cada campo se cuantificó el porcentaje de largo colonizado (LRC). El criterio para decidir sobre la colonización por hongos MA fue observar la presencia de estructuras típicas como ser arbusculos, vesículas, esporas.
 - 3- Para cada raíz se calculó el LRC estimando el porcentaje total de la raíz.
 - 4- Para cada planta se calculó el promedio de los porcentajes individuales de colonización de las plantas y se obtuvo el LRC para cada población.
-

ANEXO 2

1.

Análisis de la varianza (Anova) del efecto de los endofitos y el tipo de suelo sobre la colonización de hongos MA en raíces de *B. setifolius*.

	df	MS	F	P
Endofitos (A)	1	12557,6	20,53	0,003
Suelos (B)	1	311,971	0,51	0,4854
A * B	1	163,42	0,27	0,6123
Error	16	611,538		

2.

Análisis de la varianza (ANOVA) de los tratamientos de Micorrizas, Endofitos y Tipo de suelo sobre el peso seco de las raíces de *B. setifolius*.

	df	MS	F	P
Tratamiento Micorrizas (A)	2	0.908	0,92	0,405
Tratamiento suelos (B)	1	0,023	0,03	0,871
Tratamiento Endofitos (C)	1	42,289	42,98	<0,001
A * B	2	2,071	2,1	0,134
A * C	2	3,019	3,07	0,056
B * C	1	3,307	3,36	0,074
A*B*C	2	1,376	1,4	0,258
Error	43	0,984		

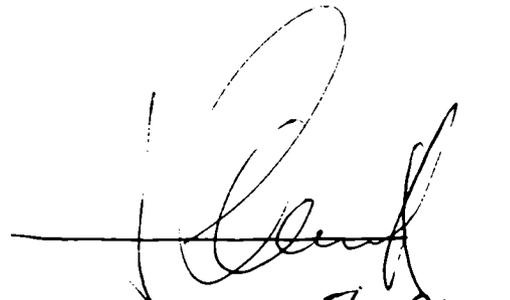
3.

Análisis de la varianza (ANOVA) de los tratamientos de Micorrizas, Endofitos y Tipo de suelo sobre el largo de las hojas de *B. setifolius*.

	df	MS	F	P
Tratamiento Micorrizas(A)	2	85.73	7.46	0.002
Tratamiento suelos (B)	1	6.02	0.52	0.473
Tratamiento endofitos (C)	1	5688.97	495.15	<0.0001
A * B	2	1.97	0.17	0.843
A * C	2	4.84	0.42	0.658
B * C	1	15.75	1.37	0.248
A*B*C	2	0.24	0.02	0.978
Error	42	11.48		



A. GODEAS



Daniel Cab



MARIA VICTORIA NOVA