

Tesis Doctoral

Evolución y diversidad de endofitos Epichloë de la forrajera nativa Bromus auleticus

Mc Cargo, Patricia Débora

2015-03-30

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 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:

Mc Cargo, Patricia Débora. (2015-03-30). Evolución y diversidad de endofitos Epichloë de la forrajera nativa Bromus auleticus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mc Cargo, Patricia Débora. "Evolución y diversidad de endofitos Epichloë de la forrajera nativa Bromus auleticus". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Evolución y diversidad de endofitos *Epichloë*
de la forrajera nativa *Bromus auleticus***

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

en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Patricia Débora Mc Cargo

Director de Tesis: Dr. Leopoldo Javier Iannone

Consejero de Estudios: Dra. Silvia Edith Lopez

Lugar de Trabajo: Lab de Micología-FCEyN-UBA y PROPLAME-PRHIDEB-CONICET

Buenos Aires, 2015.

EVOLUCIÓN Y DIVERSIDAD DE ENDOFITOS *EPICHLÖË* DE LA FORRAJERA NATIVA *BROMUS AULETICUS*

RESUMEN

Bromus auleticus Trin. es una gramínea forrajera nativa que establece asociaciones simbióticas con al menos dos especies de hongos endofitos del género *Epichloë* Tul. & C. Tul (*E. tembladerae* y *E. pampeana*). Por ser especies asexuales, se considera que se transmiten exclusivamente en forma vertical a la siguiente generación del hospedante. Estos hongos pueden conferir ventajas adaptativas a sus hospedantes, como resistencia a stress y a herbivoría debido a la producción de alcaloides tóxicos para insectos, como las lolinas y peraminas, o para el ganado, como el indol-diterpeno lolitrem B y alcaloides del ergot.

Esta tesis se centra en el estudio de 3 aspectos principales de esta asociación: i) la diversidad de endofitos abordada mediante análisis morfológicos y filogenéticos de secuencias de genes nucleares, complementados con la caracterización del perfil toxicogénico potencial mediante la detección por PCR de genes involucrados en la síntesis de alcaloides, ii) la distribución geográfica de los linajes identificados y iii) la posible existencia de eventos de transmisión horizontal a través de una aproximación filogenética así como mediante la implementación de técnicas de inoculación de endofitos en ejemplares libres de ellos.

Se aislaron y caracterizaron los endofitos de *B. auleticus* y otros hospedantes simpátricos de más de 50 localidades, abarcando el área de distribución de *B. auleticus*. Los caracteres morfológicos y las reconstrucciones filogenéticas de los genes *calM* (calmodulina) e *idtG* (lolitrem B) permitieron identificar al menos 5 linajes de endofitos presentes en *B. auleticus*. La genotipificación del perfil potencial de alcaloides de los distintos endofitos apoyó la existencia de estos linajes.

El análisis de la distribución de los linajes endofíticos, basado en su relación con variables bioclimáticas, permitió establecer las áreas geográficas donde cada uno es preponderante. Estas zonas resultaron mayormente disyuntas e influenciadas principalmente por variables relacionadas con las precipitaciones.

Para poner a prueba la hipótesis de transmisión horizontal de endofitos entre diferentes plantas hospedantes de la misma y distintas especies, se evaluaron tres técnicas de inoculación de endofitos de *B. auleticus* y *Poa lanigera* (hospedantes simpátricos) en plantas de *B. auleticus*. Sólo se obtuvieron resultados positivos al inocular con *E. tembladerae* en meristema de plántulas. Además, los análisis de los endofitos aislados de hospedantes simpátricos apoyarían también la existencia de transmisión horizontal en *Epichloë tembladerae* ya que no pudieron diferenciarse mediante las filogenias ni otros marcadores utilizados. Sin embargo, aún deberían evaluarse mecanismos de dispersión alternativos en condiciones naturales.

Los resultados obtenidos indican la existencia de una gran diversidad de endofitos con diferentes capacidades toxicogénicas potenciales, que deben ser considerados como una herramienta determinante en el mejoramiento agronómico de *Bromus auleticus*.

PALABRAS CLAVES: endofitos, *Neotyphodium*, *Epichloë*, hospedantes nativos, transmisión, distribución geográfica

EVOLUTION AND DIVERSITY OF *EPICHLÖË* ENDOPHYTES FROM THE NATIVE FORAGE GRASS *BROMUS AULETICUS*

ABSTRACT

Bromus auleticus Trin. is a native forage grass that establishes symbiotic associations with at least two species of endophytic fungi of the genus *Epichloë* Tul. & C. Tul (*E. tembladerae* and *E. pampeana*). As asexual species, they are considered to be solely vertically transmitted to the next generation of the host plant. These fungi can confer adaptive advantages to their hosts, such as the production of alkaloids which can be toxic to insects, such as lolines and peramine, or toxic to livestock, such as indole diterpene (lolitrem B) and ergot alkaloids..

This thesis is focused on the study of 3 main aspects of this association: i) the diversity of endophytes addressed by morphological and phylogenetic analyses of nuclear gene sequences, complemented by the characterization of the potential chemotypic profile by PCR detection of genes involved in the synthesis of alkaloids, ii) the geographical distribution of the identified lineages and iii) the possible existence of horizontal transmission events through a phylogenetic approach and through the implementation of techniques for the inoculation of endophytes to uninfected plants.

The endophytes from *B. auleticus* and other sympatric hosts from more than 50 localities, in the distribution area of *B. auleticus* were isolated and characterized. The morphological characters and phylogenetic analyses of calM (calmodulin) and *idtG* (lolitrem B) genes allowed the identification of at least 5 endophyte lineages associated to *B. auleticus*. Genotyping of the different endophytes' potential alkaloid profiles supported the existence of these lineages.

The distribution analysis of the endophytic lineages, based on their relationship with bioclimatic variables, let us identify the geographic areas where each is predominant. These areas were mostly disjunct and mainly influenced by variables related to precipitation.

To test the hypothesis of horizontal transmission of endophytes between different host plants of the same and different species, three techniques of inoculation of endophytes from *B. auleticus* and *Poa lanigera* (sympatric hosts) in plants of *B. auleticus* were evaluated. Positive results were obtained only when plants were inoculated with *E. tembladerae* into seedling's meristem. Furthermore, the analyses of endophytes isolated from sympatric hosts also supported the existence of horizontal transmission for *Epichloë tembladerae* as they could not be differentiated by filogenies nor by the other markers. However, alternative mechanisms of dispersion in natural conditions should still be evaluated.

Results indicate the existence of a great diversity of endophytes with different potential toxigenic capabilities, which should be considered as a decisive tool in the agronomic improvement of *Bromus auleticus*.

KEY WORDS: endophytes, *Neotyphodium*, *Epichloë*, native hosts, transmission, geographic distribution

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, el Dr. Leopoldo J. Iannone y la Dra. M. Victoria Novas, por haberme dado la posibilidad de investigar y por guiarme en mi formación científica. Por la paciencia y apoyo pero por sobre todo por la calidez y calidad en el trato. Por acompañarme durante todos estos años en el día a día les estoy inmensamente agradecida.

A mi familia por acompañarme siempre.

A la UBA por la beca que me otorgó haciendo posible el comienzo de mi doctorado y al CONICET por la beca para culminarlo.

A los jurados por su comprensión y buena predisposición para evaluar esta tesis rápido.

A la Dra. Carolyn A. Young por darme la oportunidad de realizar una estadía en su laboratorio de la Samuel Roberts Noble Foundation, integrándome a su equipo de trabajo y brindándome toda su ayuda.

A la Dra. Susana Rossi por ser mi co-directora de beca CONICET y brindarme su apoyo y ayuda.

Al Dr. José De Battista y su grupo de trabajo, Daniela y Alejo, por su ayuda con los experimentos en el campo.

A Vickyta por ser una gran amiga.

A Agus Scambato, Ale, Lau, Flor, Anahí y Pablo por decidir integrarse al laboratorio y compartir las aventuras de todos los días.

A los becarios del Proplame-prhideb por compartir más que un lugar de trabajo. Por la ayuda, compañía, consejos y salidas.

A Agus, Caro y Flor. A Aye, Sole, Dieguito, Vale y Lis, y a Pau, Pablo, Fabi y Nico por unirse a este gran grupo. A Luis. A la comunidad de Urdininea (Laucha, Aye, Ema) por muchos buenos momentos y alojarme varias noches. A solcito.

A la Dra. Nikki D. Charlton por enseñarme y ayudarme en todo lo posible tanto en el laboratorio como fuera. Y junto a Will, por dedicarme su tiempo para que tenga una perfecta estadía. A Mihwa y Chi por compartir su cultura y sus pasatiempos, y al igual que Ginger y Shauna, por su compañía y siempre estar dispuestos a ayudarme durante mi estadía.

A Ana Paez y Amaia Seminario, mejores compañeras de estadía no podría pedir. Y a Yanina y Varvara, por formar parte de esta inolvidable experiencia.

Al Proplame-prhideb por abrirme las puertas. Y a toda la gente que lo integra por compartir su tiempo y calidez. Gracias!

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
La simbiosis entre endofitos del género <i>Epichloë</i> y gramíneas.....	2
Estabilidad de la asociación	7
Efectos de la asociación.....	8
<i>Toxicidad contra herbívoros</i>	8
<i>Promoción del crecimiento y resistencia a estrés abiótico</i>	8
<i>Efectos sobre otros hongos</i>	8
<i>Efectos en la comunidad</i>	9
Biosíntesis de alcaloides	10
Ventajas de la hibridación como estrategia evolutiva	12
Endofitos <i>Epichloë</i> asociados a gramíneas nativas de Argentina	14
La forrajera <i>Bromus auleticus</i> como hospedante de endofitos.....	16
HIPÓTESIS GENERALES	18
OBJETIVOS GENERALES	19
CAPÍTULO 1: Diversidad de endofitos <i>Epichloë</i> asociados a <i>Bromus auleticus</i>	20
INTRODUCCIÓN	21
El estudio de la diversidad de endofitos <i>Epichloë</i>	24
HIPÓTESIS PARCIALES	26
OBJETIVOS PARCIALES	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Muestreos.....	27
Detección y aislamiento de endofitos a partir de las muestras recolectadas.....	27
Obtención y preservación de cultivos monospóricos	28
Caracterización molecular	29
Extracción de ADN de cultivos monospóricos	29
Amplificación y secuenciación de regiones génicas	29
Análisis filogenéticos.....	31
Obtención de los perfiles de genes de alcaloides y <i>mating type</i>	31
Caracterización morfológica	34

RESULTADOS.....	36
Caracterización molecular	39
Análisis filogenéticos	39
<i>Calmodulina (calM)</i>	39
<i>Presencia y filogenia del gen idtG</i>	42
Perfiles de genes de alcaloides y mating type	46
Caracterización morfológica	47
Consideraciones taxonómicas.....	48
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES PARCIALES.....	56
CAPÍTULO 2: Distribución de endofitos <i>Epichloë</i> asociados a <i>Bromus auleticus</i>	57
INTRODUCCIÓN	58
Nicho ecológico	58
Modelado de la distribución potencial de una especie	58
Área de distribución geográfica de <i>Bromus auleticus</i>	59
HIPÓTESIS PARCIALES	62
OBJETIVOS PARCIALES	62
MATERIALES Y MÉTODOS	63
RESULTADOS.....	66
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES PARCIALES.....	73
CAPÍTULO 3: Análisis de endofitos <i>Epichloë</i> asociados a gramíneas simpátricas y alopátricas con <i>Bromus auleticus</i> - Evidencias filogenéticas de transmisión horizontal.	74
INTRODUCCIÓN	75
HIPÓTESIS PARCIALES.....	77
OBJETIVOS PARCIALES	77
MATERIALES Y MÉTODOS	78
Recolección de potenciales hospedantes de endofitos <i>Epichloë</i>	78
Caracterización de los endofitos.....	78
RESULTADOS.....	79
Caracterización molecular	81

Análisis filogenéticos	81
<i>Calmodulina (calM)</i>	81
<i>Presencia y filogenia del gen idtM</i>	84
Perfiles de genes de alcaloides y <i>mating type</i>	87
Caracterización morfológica	88
Presencia de genotipos en las comunidades estudiadas.....	89
DISCUSIÓN.....	92
CONCLUSIONES PARCIALES.....	95
CAPÍTULO 4: En busca de los posibles mecanismos de transmisión horizontal de los endofitos asexuales <i>Epichloë</i> spp.	96
INTRODUCCIÓN	97
HIPÓTESIS PARCIALES	99
OBJETIVOS PARCIALES	99
MATERIALES Y MÉTODOS	100
Técnica 1	102
Técnica 2	103
Técnica 3	104
RESULTADOS.....	107
DISCUSIÓN	110
CONCLUSIONES PARCIALES.....	113
DISCUSIÓN GENERAL	114
CONCLUSIONES GENERALES.....	118
REFERENCIAS	119
ANEXO	132

INTRODUCCIÓN GENERAL

Un término que ha ido aumentando en relevancia en la ecología microbiana es el de “endofito”, que deriva del griego (“endon”=dentro y “phyton”=planta) y fue originalmente aplicado por de Barry (1866), usado actualmente para hacer referencia a “aquellos microorganismos que colonizan inter y/o intracelularmente tejido vegetal sano, persistiendo por todo o parte del ciclo de vida de la planta sin causarle síntomas de enfermedad”(Petrini 1991; Wilson 1995). Por ser un término sin implicancia taxonómica, su amplia aplicación se debe a que agrupa a una gran diversidad de organismos (algunas algas, bacterias y hongos) que pueden interactuar con las plantas y poseen un gran potencial de producir compuestos químicos con diferentes propiedades (Schulz et al. 2002; Strobel y Daisy 2003; Kusari et al. 2012).

Los endofitos fúngicos (hongos endofitos) son generalmente clasificados en dos grandes grupos, los Clavicipitaceos y los No clavicipitaceos, usando como base para esta clasificación características filogenéticas, su historia de vida, y las características de la simbiosis como ser el rango de hospedantes, los tejidos a los que se asocia y el grado de colonización, el modo de transmisión, la diversidad existente por planta y los efectos sobre el hospedante (Rodríguez et al. 2009). Los endofitos Clavicipitaceos son un grupo monofilético de organismos pertenecientes al género *Epichloë* (Fr.) Tul. & C. Tul. (Clavicipitaceae, Hypocreales, Ascomycota) también conocidos comúnmente como “endofitos de pastos” por estar exclusivamente asociados a gramíneas.

La simbiosis entre endofitos del género *Epichloë* y gramíneas:

Los endofitos fúngicos del género *Epichloë* han despertado interés por las particularidades biológicas, ecológicas y evolutivas de dicha asociación. Son simbiosis fúngicos de algunas especies de gramíneas con metabolismo fotosintético C3 pertenecientes a la subfamilia Pooideae (Clay 1990; Glenn et al. 1996; Leuchtman et al. 2014). Entre las especies hospedantes de estos hongos se destacan las especies forrajeras más comúnmente utilizadas en zonas de climas templados, como *Schedonorus arundinaceus* (*Festuca arundinacea*), *Lolium perenne* y *L. multiflorum*. En estos hospedantes los endofitos pueden causar intoxicaciones en el ganado y/o promover el desarrollo y resistencia al estrés de las plantas hospedantes. Por lo que el conocimiento de estas interacciones, además de ser interesante desde el punto de vista biológico tiene implicancias a nivel comercial.

Las distintas especies varían en cuanto a su modo de reproducción (sexual y/o asexual), su interacción con el hospedante (patogénica a mutualista), su mecanismo de transmisión (vertical y/o horizontal), su composición genómica (haploide o híbrido), y su efecto sobre la planta hospedante y la comunidad (Saikkonen et al. 1998; Omacini et al. 2001; Moon et al. 2004; Casas et al. 2010; Tadych et al. 2014).

Estos hongos crecen en forma sistémica e intercelular, desarrollándose en los tejidos de las estructuras aéreas de sus hospedantes. El endofito coloniza meristemas de macollos y flores en formación, en donde se caracteriza por un crecimiento hifal ramificado. Las hifas crecen en el apoplasto adheridas a la pared celular vegetal y son estiradas al elongarse las células parenquimáticas del hospedante (Christensen et al. 2008). Por lo que, en los tejidos diferenciados de la planta se pueden observar las hifas dispuestas en forma paralela al eje longitudinal de las células de los tejidos del hospedante, en forma recta o convoluta y raramente ramificadas (Fig 1A y B). No se han observado haustorios u otro tipo de estructura intracelular involucrada en asociaciones de tipo patogénico, ni degradación de pared celular que desencadene mecanismos de respuesta en el hospedante (Christensen et al. 2002; Christensen et al. 2008). Se considera que los endofitos se desarrollan a expensas de los nutrientes (aminoácidos y azúcares) transportados por vía apoplástica (Moy et al. 2002).

Los endofitos pueden cultivarse en medios axénicos semidefinidos, característica que ha simplificado muchos aspectos de su estudio. En estos medios se caracterizan por presentar micelio de color blanco y crecimiento lento (Fig 1C) y producir como estructuras reproductivas asexuales células conidiógenas enteroblásticas, en general no ramificadas de las que surgen conidios alantoides de tamaños variables (Fig 1D). Las especies sexuales suelen poseer conidios pequeños de 4 – 6 μm de longitud mientras que en las especies asexuales alcanzan tamaños de 6 – 13 μm de longitud (Schardl et al. 2004). Debido a estas características en cultivo las formas asexuales se clasificaron originalmente en el género *Acremonium* Link, pero posteriormente se pasaron al género *Neotyphodium* Glenn, Bacon & Hanlin. La unificación de nombres dispuesta en el último Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Melbourne 2011) las ha colocado a todas dentro del género *Epichloë* (Leuchtmann et al. 2014; McNeill 2012).

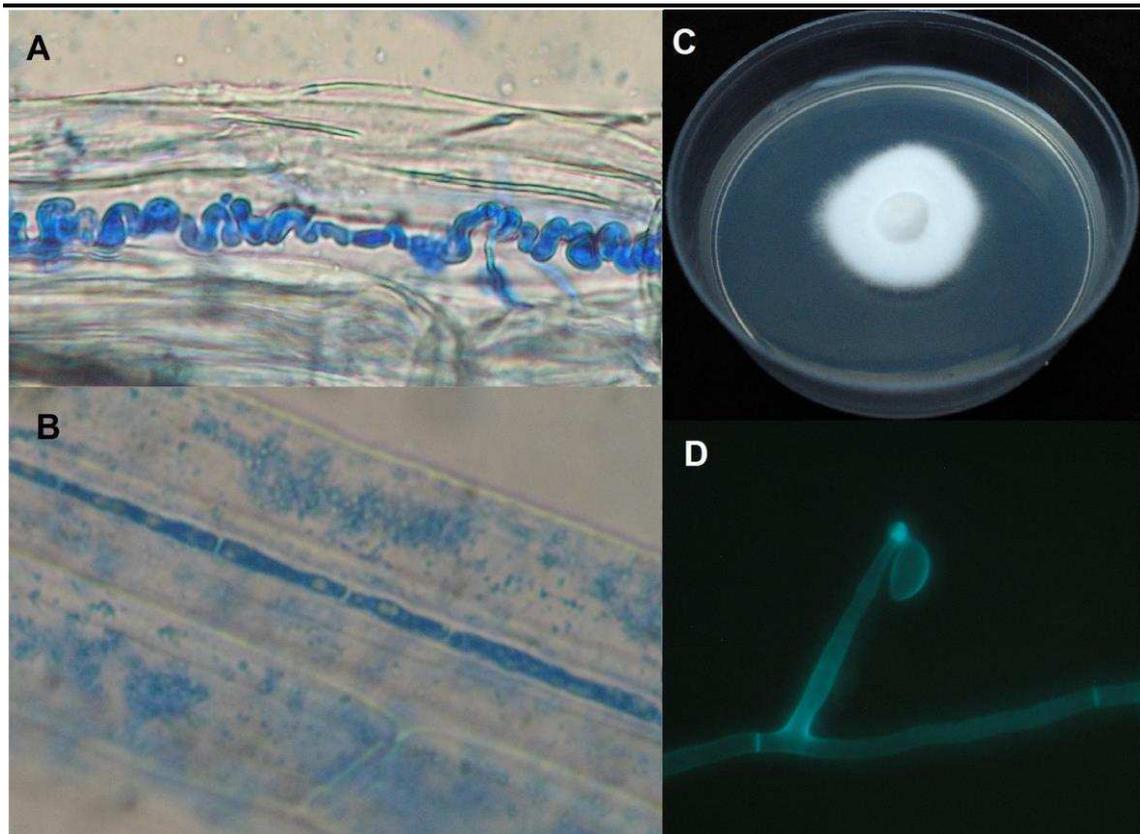


Figura 1: Imágenes de endofitos. A y B: en parénquima foliar, C: colonia en medio de cultivo, D: Estructura reproductiva asexual, célula conidiógena y conidio.

En base a diferencias en sus ciclos de vida (Fig. 2), se han establecido 3 tipos de asociaciones con distintos grados de patogenicidad (White Jr 1988). Las especies sexuales, que pueden corresponder a la Asociación Tipo I o Tipo II, se caracterizan por producir estromas (signo de infección) sobre las cañas florales de su hospedante, en las que impiden la expansión de la hoja bandera evitando el desarrollo de la inflorescencia (causando la enfermedad conocida como “choke”) (Fig. 3A). Allí se generan conidios que actúan como espermacios. Dado que se trata de especies heterotálicas, el proceso de reproducción sexual se desencadena cuando los espermacios son llevados a un estroma del tipo de apareamiento opuesto, por moscas del género *Botanophila* y en algunos casos babosas que se alimentan de los estromas (Schardl et al. 2004; Hoffman y Rao 2014). El locus *MAT* determina el tipo de apareamiento, y por lo tanto, la compatibilidad reproductiva. Las secuencias suelen codificar para factores de transcripción y se las denomina idiomorfos (no alelos) ya que son muy diferentes pero ocupan el mismo locus en el genoma (Conde-Ferrández 2007). Luego de la fecundación, en el estroma maduran los peritecios con ascos y ascosporas filiformes (Fig. 3B), las cuales son responsables del contagio, al infectar flores y ovarios en desarrollo en plantas vecinas (transmisión horizontal). Luego de la fecundación del óvulo, las hifas permanecen dentro de la semilla, para colonizar a las

plántulas hijas luego de la germinación (Philipson y Christey 1986; Schardl y Phillips 1997; Schardl et al. 2004). Cuando se desarrollan estromas sobre todos los macollos reproductivos de la planta hospedante impidiéndole completamente la producción de semillas (Asociación Tipo I), producen esterilidad total de la planta y la transmisión de los endofitos se realiza mediante esporas sexuales únicamente. Este tipo de asociaciones se establecen entre *E. glyceriae* y *Glyceria striata* y entre algunas cepas de *E. typhina* y distintos hospedantes como *Dactylis glomerata* (White Jr 1988; Schardl 2010). En cambio, en la Asociación Tipo II se produce una esterilidad parcial. Los estromas se desarrollan sobre algunos de los macollos reproductivos mientras que en otros macollos las flores desarrollan normalmente y el endofito coloniza el ovario sin alterar la formación de la semilla, de esta manera, la producción de semillas es suprimida sólo en parte y el hongo se propaga tanto a través de las ascosporas como en las semillas, como ocurre por ejemplo con *E. brachyelytri* y *Brachyelytrium erectum* o *E. festucae* y *Festuca rubra* (Schardl et al. 2004; Schardl 2010) Las especies asexuales, no suprimen la reproducción de su hospedante (Asociación Tipo III), sino que colonizan el ovario sin alterar el desarrollo de la semilla, permaneciendo generalmente asociados a la capa de aleuronas, y luego infectan la plántula al germinar la semilla. Por lo que, se considera que la forma de transmisión y reproducción de los endofitos asexuales es mayormente vertical a través de las semillas del hospedante, de la planta madre a las plantas hijas (White Jr 1988). En los últimos años se ha comprobado que especies asexuales pueden transmitirse en forma horizontal por la infección de conidios del simbionte producidos sobre el hospedante (Tadych et al. 2012; Oberhofer y Leuchtman 2014).

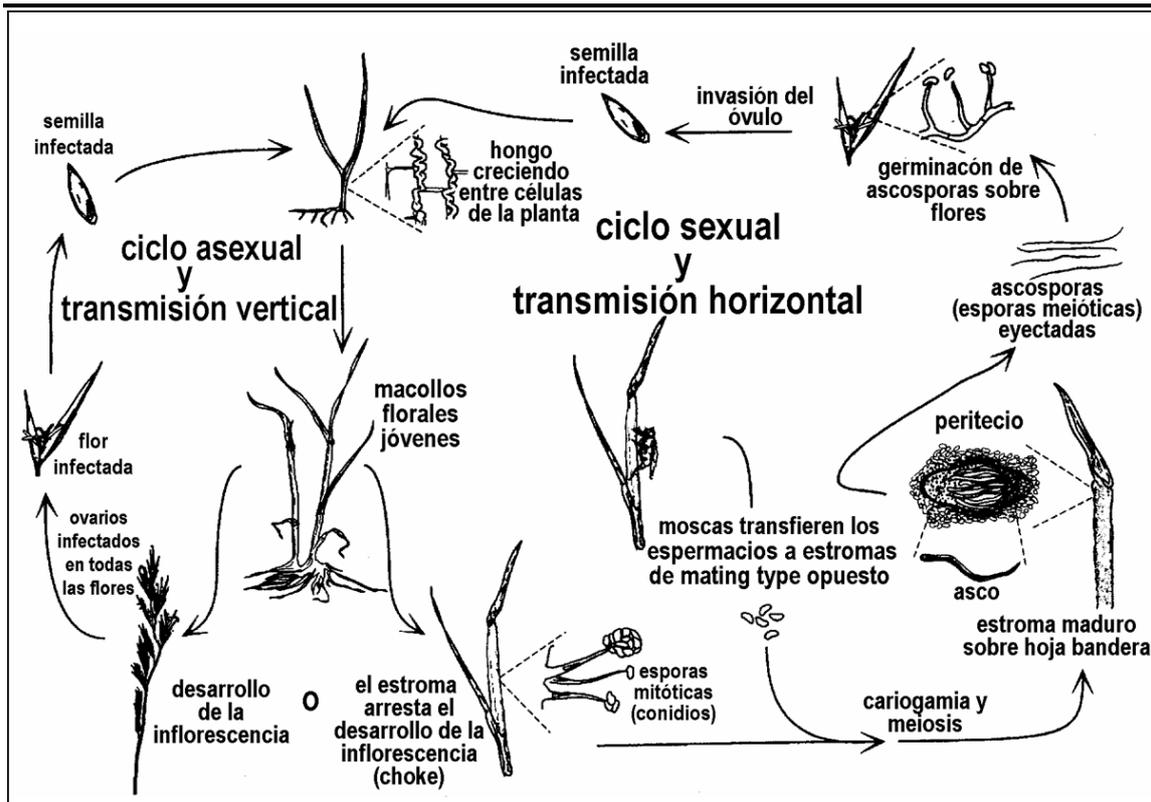


Figura 2: Ciclos de vida de los endofitos *Epichloë*. (tomado de Schardl (2010))

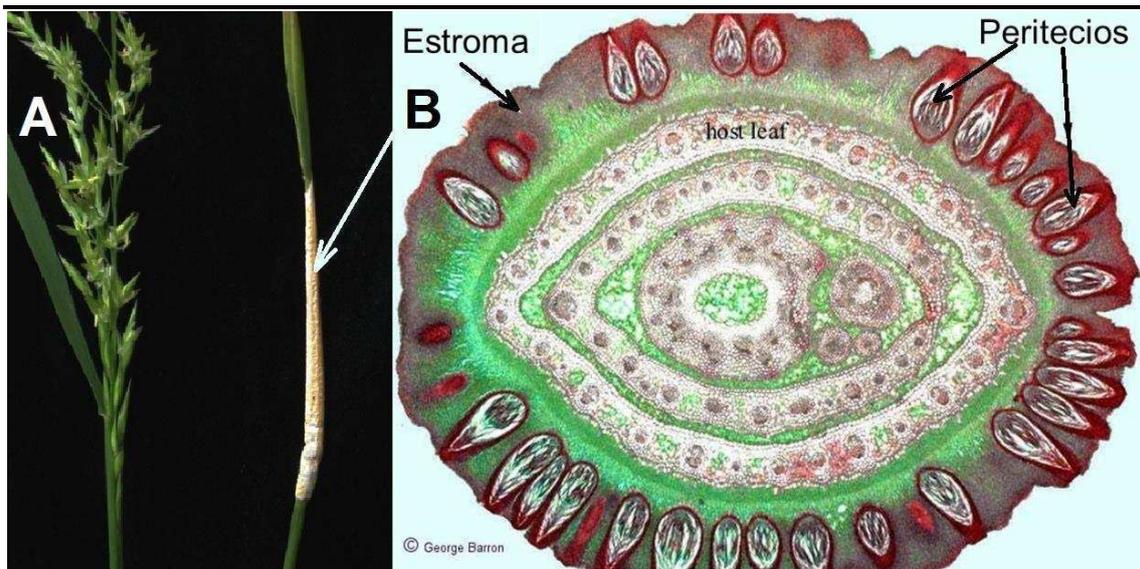


Figura 3: Estromas de *Epichloë*. A. Inflorescencia afectada. B. Corte transversal donde se pueden observar los peritecios (tomado de <http://hdl.handle.net/10214/5749>).

El estudio filogenético de este grupo de endofitos, basado en la secuenciación de genes nucleares, ha permitido dilucidar las llamativas relaciones evolutivas existentes entre las distintas especies de *Epichloë*, habiéndose descrito actualmente 37 especies (Fungorum 2008). El análisis de secuencias, tales como el factor de elongación 1- α (*tefA*), β -tubulina (*tubB*), γ -actina (*actG*), ARN polimerasa II (*rpb*), ha demostrado que se trata de un grupo monofilético de hongos estrechamente

relacionado con especies patógenas de plantas, insectos y otros hongos de la familia Clavicipitaceae (White Jr 1988; Clay y Schardl 2002; Spatafora et al. 2007). La mayoría de las especies sexuales son haploides mientras que, en contraposición, la mayoría de las especies asexuales son híbridos, inter o intraespecíficos. Es decir, que derivan de ancestros haploides con la posibilidad de eventos de hibridación sucesiva, posiblemente mediados por la fusión de hifas de las especies parentales presentes en una misma planta hospedante (Clay y Schardl 2002; Moon et al. 2004; Gentile et al. 2005). Análisis filogenéticos junto con estimaciones de tamaños de genomas, y en los últimos años la secuenciación de genomas enteros, muestran que las especies híbridas han conservado la mayoría o el total de los genomas aportados por las dos, y a veces tres, especies ancestrales (Kuldau et al. 1999; Schardl et al. 2013b).

Estabilidad de la asociación

Dada la sincronización que presenta el ciclo de vida del endofito con su hospedante, estas asociaciones simbióticas presentan un alto grado de especificidad (Chung et al. 1997; Brem y Leuchtman 2003; Karimi et al. 2012; Schirrmann et al. 2014). Diversos mecanismos de señalización entre el hospedante y el simbionte fúngico, como por ejemplo por especies reactivas de oxígeno (Tanaka et al. 2006) colaboran en mantener el delicado balance en estas relaciones mutualistas (Eaton et al. 2011).

Aunque se considera que la asociación es perenne y que la transmisión por semillas es muy eficiente (con tasas de hasta el 100%) (Bouton et al. 2002; Pérez 2008), ocasionalmente, puede observarse la pérdida de la asociación por mecanismos naturales en diferentes momentos del ciclo de vida de la planta. Las fallas pueden ocurrir en la colonización de los meristemas que darán lugar a nuevos macollos florales o vegetativos y en la colonización de los ovarios en desarrollo dando lugar a la producción de semillas sin endofitos. También, se ha observado muy comúnmente pérdida de viabilidad del endofito en las semillas durante su almacenamiento (Rolston et al. 1986) o fallas en la colonización de las plántulas (Afkhami y Rudgers 2008).

Así como la asociación puede perderse naturalmente, es posible también establecer nuevas combinaciones endofito-hospedante mediante su inoculación en plantas con potencial como hospedantes que se encuentren libres de los mismos (Latches y Christensen 1985; Simpson et al. 2012).

Debido a los efectos beneficiosos o negativos que estas asociaciones pueden presentar para el manejo agronómico de pasturas, tanto la pérdida de la asociación como la posibilidad de generar nuevas combinaciones gramínea-endofito han sido utilizadas para el mejoramiento de pasturas, mediante la eliminación de endofitos con

características no deseadas o la inoculación de endofitos beneficiosos en cultivares comerciales de especies de gramíneas naturalmente hospedantes.

Efectos de la asociación

La simbiosis entre los endofitos asexuales *Epichloë* y sus gramíneas hospedantes se considera generalmente mutualista ya que el endofito obtiene de su hospedante nutrición, protección y modo de dispersión mientras que contribuye con un incremento en el fitness del mismo (Kuldau y Bacon 2008). Los beneficios registrados incluyen desde toxicidad contra herbívoros y cambios en la fisiología del hospedante hasta efectos en otros organismos (Malinowski y Belesky 2000; Schardl et al. 2004).

Toxicidad contra herbívoros

Una de las características distintivas de esta asociación simbiótica, y quizá la que ha sido objeto de mayor estudio, es la capacidad fúngica de producir diversas clases de alcaloides con efecto anti-herbívoros. Al igual que otros miembros de la familia Clavicipitaceae, los endofitos del género *Epichloë* pueden producir alcaloides del ergot como la ergovalina y la ergotamina, y/o indol-diterpenos como el lolitremB, que poseen fuertes efectos neurotóxicos en mamíferos (Gallagher et al. 1981; Panaccione 2005). Pero además, muchos representantes de exclusivamente este género fúngico, pueden producir lolinas (aminopirrolzidinas) y peramina (pirrolpirazinas), que tienen efectos neurotóxicos o alteran la alimentación de insectos fitófagos y posiblemente otros invertebrados como los nematodos (Tanaka et al. 2005; Schardl et al. 2007; Bacetty et al. 2009).

Promoción del crecimiento y resistencia a estrés abiótico

Además de la protección contra herbívoros, diversos estudios han revelado que los endofitos promueven el desarrollo de biomasa, la producción de semillas y la capacidad de rebrote de las plantas (Clay 1988; Hill et al. 1990; Gundel et al. 2006; Zhang et al. 2015). Además, pueden conferir resistencia al estrés por inundación (Song et al. 2015) como por sequía (Arachevaleta et al. 1989; Malinowski et al. 1997; Malinowski y Belesky 2000) y por metales pesados (Zaurov et al. 2001; Soleimani et al. 2010).

Efectos sobre otros hongos

En cuanto a su efecto sobre hongos patógenos, los pocos ensayos realizados indican que las plantas E+ son afectadas en menor medida que las E- por estos, viéndose efectos de inhibición *in vivo* e *in vitro* (Yue et al. 2000; Clarke et al. 2006; Tian et al. 2008; Pérez et al. 2013; Vignale et al. 2013). En relación a su efecto sobre

otros simbiontes mutualistas, como los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), los resultados son variables. En estudios realizados con gramíneas seleccionadas agrónomicamente se ha registrado un efecto negativo de la presencia de endofitos sobre la infección o colonización por micorrizas (Chu-Chou et al. 1992; Omacini et al. 2006; Mack y Rudgers 2008), mientras que en los que se utilizó como hospedante una gramínea nativa, la asociación fue registrada como positiva (Novas et al. 2005; Novas et al. 2009).

Efectos en la comunidad

La presencia de plantas infectadas con endofitos promueve cambios en su entorno. Por ejemplo puede alterar tasas de descomposición de la materia orgánica, cadenas tróficas y las comunidades del suelo (Matthews y Clay 2001; Omacini et al. 2001; Omacini et al. 2004; Lemons et al. 2005; Casas et al. 2010; Bultman et al. 2012; Omacini et al. 2012). Incluso se ha demostrado que los alcaloides producidos por endofitos pueden ser utilizados por plantas hemiparásitas para afectar la comunidad (Lehtonen et al. 2005). Además, en mayor o menor medida, la presencia de plantas con endofitos puede modificar la composición de la comunidad vegetal (Rudgers et al. 2004; Rudgers et al. 2010). A pesar de la gran cantidad de resultados recopilados a lo largo de los años, sobre los efectos del endofito en organismos y comunidades del suelo es necesario seguir investigando estos aspectos de la interacción incluyendo diferentes sistemas gramínea-endofito (Omacini et al. 2012).

Los efectos mencionados anteriormente, resultantes de esta interacción, están influenciados por varios factores entre los que se encuentran el genotipo de cada miembro de la asociación (Gundel et al. 2010; Saikkonen et al. 2010) y las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla (Ahlholm et al. 2002; Hesse et al. 2003; Davitt et al. 2011). Estos tres factores interactúan entre sí generando combinaciones en las que la asociación puede resultar desde beneficiosa a perjudicial para el hospedante y la supervivencia y transmisión del endofito. Por ejemplo, se han observado diferencias en cuanto al rol de los endofitos en la resistencia a la sequía entre gramíneas no infectadas e infectadas con especies haploides o híbridas de endofitos (Hamilton et al. 2009; Oberhofer et al. 2013). De esta manera, en determinados ambientes puede verse favorecida la presencia de plantas E-, generando gradientes en la incidencia de endofitos en distintas poblaciones de una especie hospedante a lo largo de gradientes ambientales. Entre otros parámetros ambientales que influyen en la incidencia de estos endofitos se encuentran los nutrientes, el pH del suelo, la comunidad vegetal y las precipitaciones (Malinowski y Belesky 2000; Novas et al. 2007).

Biosíntesis de alcaloides

Las técnicas de secuenciación masiva y comparación de genomas desarrolladas en los últimos años han permitido realizar análisis más exhaustivos de la genómica de los endofitos *Epichloë*. La identificación y análisis funcional de los *loci* genéticos involucrados en las vías de biosíntesis de cada una de las 4 clases de alcaloides ha permitido comenzar a comprender la gran variabilidad quimiotípica que presentan las diferentes especies o cepas de una misma especie (Schardl et al. 2012).

Los genes involucrados en la biosíntesis de alcaloides del ergot (EAS), lolinas (LOL) e indol-diterpenos (IDT) se disponen en *clusters* mientras que un único gen (*perA*), que codifica para una enzima multifuncional, es el responsable de la producción de peramina (Young et al. 2006; Fleetwood et al. 2011) (Fig 4). Además, en la mayoría de las especies de *Epichloë* analizadas hasta el momento los *clusters* tienen una disposición particular. En el centro se encuentran los genes responsables de la estructura básica de los compuestos químicos y en la periferia de sus respectivos *clusters* aquellos genes que según su presencia, ausencia o variaciones de secuencia determinan la diversidad estructural de los alcaloides (Fig 5) (Schardl et al. 2013b; Schardl et al. 2013c). Recientemente se ha encontrado que enzimas del simbionte vegetal también pueden estar involucradas en la diversificación de las lolinas (Pan et al. 2014). Estos *loci* se caracterizan por tener grandes bloques de repeticiones AT (adenina-timina) derivados de transposones y MITEs (miniature inverted repeat transposable elements), y en los casos de EAS e IDT, encontrarse cerca de los telómeros. Dichas singularidades generarían inestabilidad en los genes de alcaloides, reflejándose en la detección de cepas con pérdida de grandes porciones o clusters genéticos completos y cepas con variantes debidas a duplicaciones de genes con nuevas funciones, lo que genera una gran diversidad de quimiotipos entre y dentro de las especies de *Epichloë* (Schardl et al. 2013b; Schardl et al. 2013c).

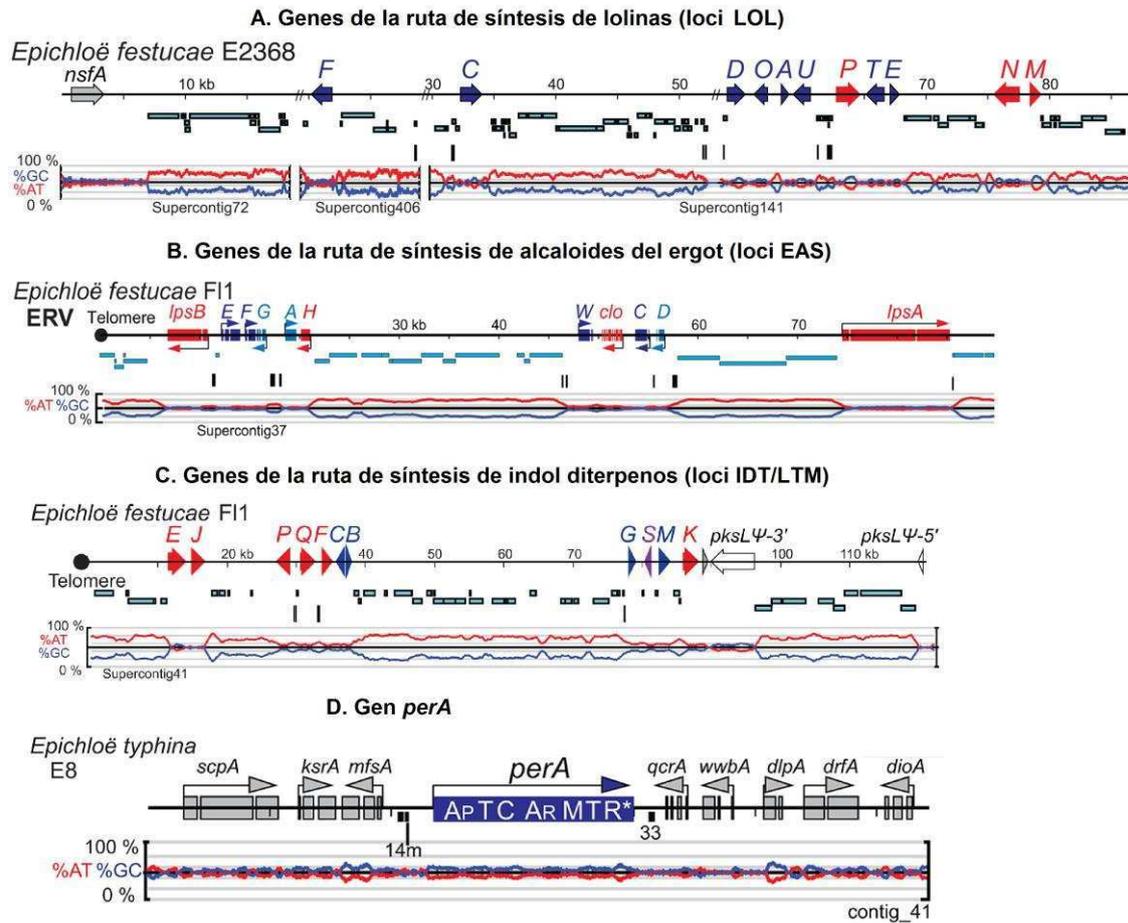


Figura 4: Disposición de los genes involucrados en la síntesis de alcaloides en diferentes endofitos *Epichloë*. A. en clusters, la abreviación de genes es acorde a F=*lolF*, etc. B. en clusters, la abreviación de genes es acorde a E=*easE* salvo para W=*dmaW* y clo=*cloA*. C. en clusters, la abreviación de genes acorde a E=*idtE* o *ltmE*. D. dominios del gen *perA*, A=adenilación, T=tiolación, C=condensación, M= N-metilación y R*=reducción, los subíndices indican la especificidad postulada por A_P: 1-pirrolina-5-carboxilato y A_R: arginina. Las barras celestes por debajo indican repeticiones de secuencias, las barras verticales negras MITEs, y el gráfico de abajo el contenido de bases AT (rojo) o GC (azul) de la secuencia (modificado de Schardl et al. (2013b)).

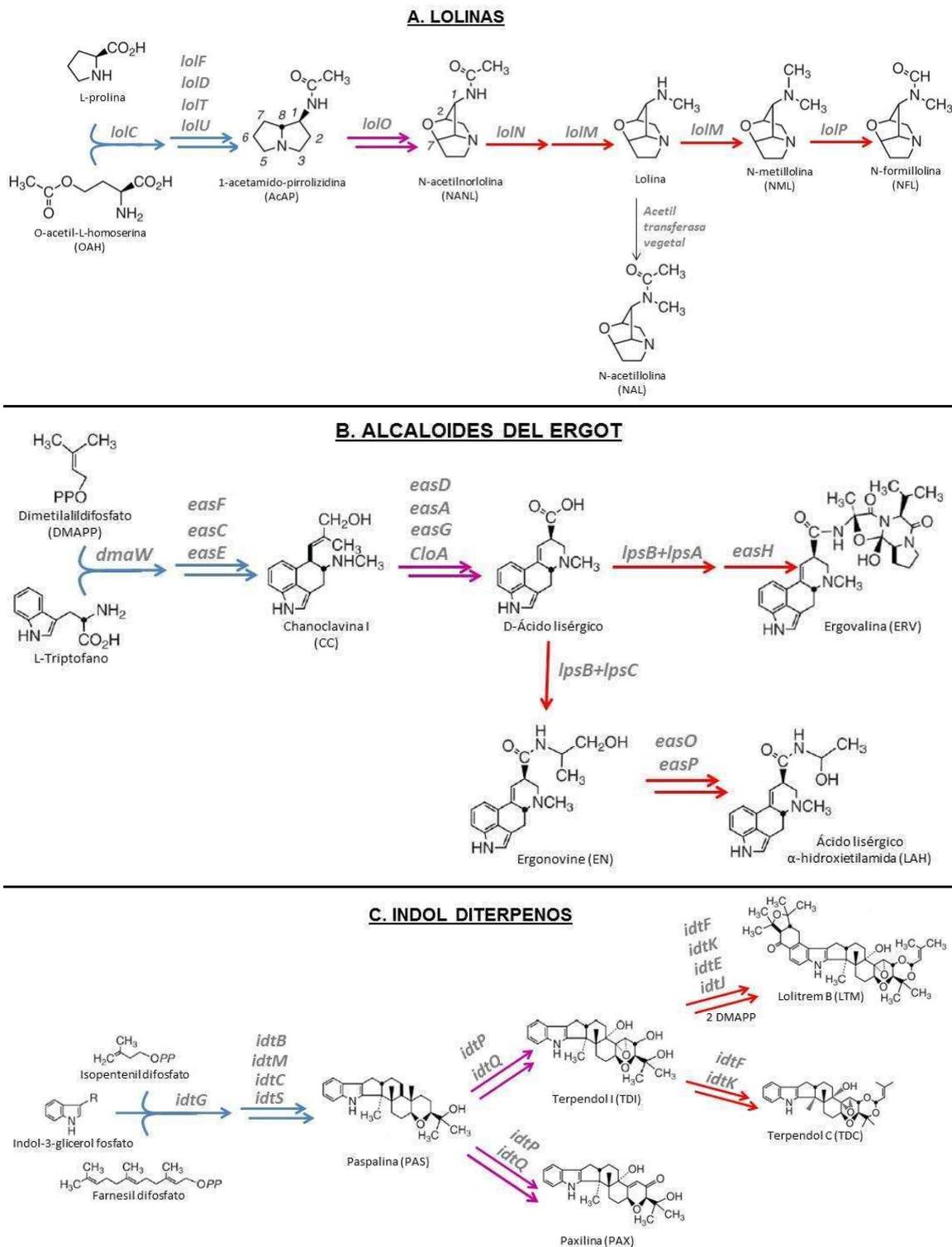


Figura 5: Esquema de las vías de síntesis de las cuatro clases de alcaloides producidos por los endofitos *Epichloë* y los genes involucrados en cada transformación de los compuestos químicos (modificada de Schardl et al. (2012); Schardl et al. (2013a)).

Ventajas de la hibridación como estrategia evolutiva

La existencia de una gran cantidad de especies asexuales híbridas de endofitos *Epichloë* ha llevado a hipotetizar acerca de la importancia de las ventajas adaptativas

que estos hongos brindan a su hospedante frente a sus contrapartes sexuales, y su relación con la selección y co-evolución de los simbioses (Selosse y Schardl 2007). Las especies asexuales son mayormente dependientes de la transmisión vertical, por lo que se espera que aquellas que resulten más beneficiosas para el hospedante sean seleccionadas positivamente. La hibridación generaría una acumulación de genes para la síntesis de alcaloides, y por lo tanto una mayor protección del hospedante. Esto se evidenciaría en el hecho de que las plantas asociadas a híbridos parecen presentar más diversidad y abundancia de alcaloides que las asociadas a especies sexuales (Leuchtmann et al. 2000; Selosse y Schardl 2007). Schardl y colaboradores (2013b), han notado que varias de las especies sexuales secuenciadas no poseen genes esenciales requeridos para producir alcaloides del ergot, indol-diterpenos y lolinas, aunque la producción de peramina es habitual tanto en especies sexuales como asexuales. Además, la mayoría de las plantas E+ que producen el metabolito final de alguna clase de alcaloide también se han registrado niveles altos de los intermediarios (TePaske et al. 1993; Young et al. 2009). Por último, cabe mencionar que siempre que los híbridos presentan dos grupos de genes homólogos para un alcaloide (derivados de cada especie parental), uno de los grupos carece de algunos genes de los pasos finales de la vía. Debido a esto, plantean la posibilidad de que la falta de genes involucrados en los últimos pasos de las vías de biosíntesis de los alcaloides se deba a una evolución por selección. Las numerosas y extensas repeticiones y la proximidad a los telómeros favorecerían la pérdida de dichos genes y por lo tanto una acumulación de intermediarios químicos de estas vías, resultando en una mezcla más compleja de alcaloides. Estos diversos alcaloides pueden diferir en actividad biológica, y así ejercer efectos aditivos o sinérgicos contra un mayor espectro de organismos (Schardl et al. 2013c).

Todos los beneficios mencionados anteriormente destacan las particularidades adaptativas que pueden brindar estos endofitos a sus hospedantes; y su aún mayor potencial para ser utilizados en el mejoramiento de pasturas, tanto por las especies endofíticas por descubrir en áreas no muestreadas como por las nuevas combinaciones de simbioses que se pueden establecer mediante inoculaciones. Por lo tanto, la prospección de nuevos hospedantes y de genotipos de endofitos para su inoculación en forrajeras de interés comercial ha sido y será uno de las estrategias centrales en el manejo de estos hongos en el mejoramiento agronómico de gramíneas.

Endofitos *Epichloë* asociados a gramíneas nativas de Argentina

El primer registro en nuestro territorio sería aquel en el que Rivas y Zanolli sugieren al endofito *Endoconidium tembladeraae* de *Festuca hieronymi* Hack como responsable de la “tembladera”, enfermedad responsable de la muerte de burros y ganado vacuno en el noroeste argentino (Rivas y Zanolli 1909). Sin embargo, el estudio de los endofitos *Epichloë* en la Argentina no tomó relevancia hasta varias décadas después.

Hasta la fecha, en Argentina (y todo el hemisferio sur) sólo se han encontrado especies asexuales, generalmente híbridas pero también haploides, no habiéndose registrado formación de estromas (Moon et al. 2002; Gentile et al. 2005; Mc Cargo et al. 2014). En Argentina, se han registrado estos endofitos asociados a 36 especies de gramíneas, generalmente no tóxicas para el ganado, pertenecientes a los géneros *Briza*, *Bromus*, *Festuca*, *Hordeum*, *Melica*, *Phleum* y *Poa*. En su mayoría, estos endofitos analizados corresponden a especies asexuales híbridas interespecíficas que derivan de las especies sexuales *E. typhina* subsp. *poae* y *E. festucae* las cuales no han sido reportadas en Argentina (Gentile et al. 2005; Iannone et al. 2012a; Iannone et al. 2015; Mc Cargo et al. 2014). Basados en enfoques morfológicos y filogenéticos, 5 linajes han sido encontrados en la Argentina (Fig 6). ***Epichloë tembladeraae*** (Cabral & J.F. White) Iannone & Schardl, presente en los géneros *Poa*, *Briza*, *Festuca*, *Bromus*, *Phleum* y *Melica*; ***Epichloë pampeana*** (Iannone & Cabral) Iannone & Schardl asociada a algunas poblaciones de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees; ***Epichloë cabralii*** Iannone, Rossi & Schardl, híbrido entre *E. typhina* x *E. amarillans* asociado a *Phleum alpinum*; ***E. typhina* subsp. *poae* var. *anikenkana*** Iannone, Rossi & Schardl, endofito asexual, no híbrido asociado a *Bromus setifolius*; y **un aislamiento de *Hordeum comosum*** híbrido entre *E. typhina* y un ancestro común de *E. amarillans* y *E. baconii* (Cabral et al. 1999; Gentile et al. 2005; Iannone et al. 2009; Mc Cargo et al. 2014; Iannone et al. 2015). Cabe destacar, la presencia de *E. tembladeraae* en especies hospedantes no relacionadas filogenéticamente y la presencia de más de una especie de endofito por especie hospedante en algunos casos, como se ha observado en *B. auleticus* (Iannone et al. 2009), *Phleum alpinum* y *Bromus setifolius* J. Presl (Mc Cargo et al. 2014).

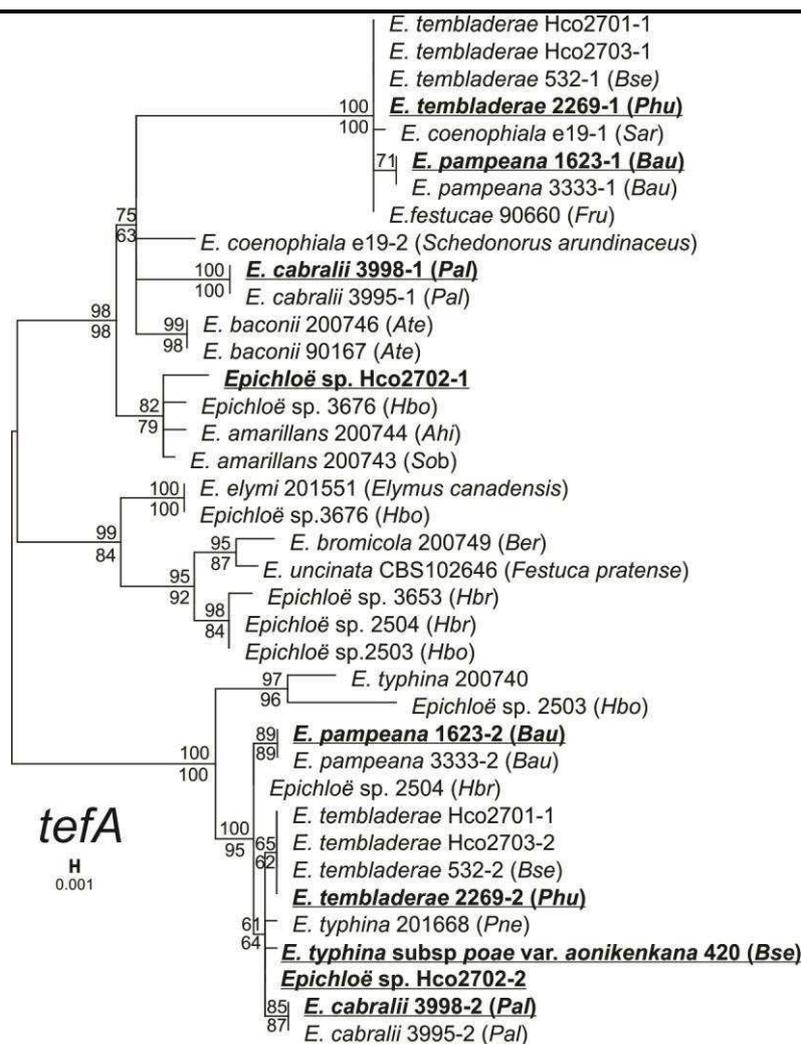


Figura 6: árbol filogenético basado en secuencias del gen *tefA*. Se indican en negrita los cinco linajes de endofitos encontrados en Argentina hasta la fecha (modificado de Iannone et al. (2015)).

El área relevada cubre grandes extensiones de la Argentina pero aún quedan zonas sin estudiar, sin embargo, se ha logrado abarcar diversas regiones biogeográficas (Bertoni et al. 1993; Lugo et al. 1998; Benavente et al. 2008; Iannone et al. 2011; Iannone et al. 2012b). Entre los ambientes estudiados se encuentran algunos que se consideran estresantes, como la estepa Patagónica o las dunas de la costa bonaerense, y algunos de condiciones más moderadas como es la Pampa Húmeda. La incidencia de estos endofitos se correlacionó con diversas variables ambientales en diferentes hospedantes. Por ejemplo, en *Bromus setifolius* se encontró una correlación positiva con la precipitación media anual, mientras que lo opuesto ocurrió con *Phleum alpinum* (Novas et al. 2007). También, la incidencia en poblaciones de *Hordeum comosum* aumenta en regiones más áridas (Iannone et al. 2015). En el caso de *Poa spiciformis* y *P. bonariensis*, un factor influyente sería la comunidad vegetal (Novas et al. 2007; Iannone et al. 2012a). Por último, *P. lanuginosa* presentó poblaciones

infectadas en áreas costeras con dunas, encontrándose una correlación positiva con el régimen de lluvias en invierno y la disponibilidad de agua en el suelo en primavera (Iannone et al. 2012a).

La gran diversidad de pastizales naturales que pueden encontrarse en la Argentina proporciona numerosos sistemas biológicos nativos para seguir profundizando en el conocimiento de esta particular simbiosis e investigando el espectro de combinaciones endofito-gramínea-ambiente con potencial para su aplicación agro-ganadera. En particular, una de las asociaciones que presenta mayor interés es la que se establece con *Bromus auleticus*.

La forrajera *Bromus auleticus* como hospedante de endofitos:

Bromus auleticus Trin. ex Nees (Pooideae) es una gramínea C3 perenne invernifera nativa de Argentina, sur de Brasil (estados de Rio Grande do Sul y Santa Catarina) y Uruguay. Dentro de Argentina, donde es vulgarmente denominada cebadilla chaqueña, su área de distribución abarca las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, San Luis y Santa Fe. Se la puede encontrar tanto en pastizales de la región pampeana como en las sierras cordobesas y puntanas, sur de la región chaqueña y en la Mesopotamia hasta la mitad sur de Corrientes. Habita en suelos arenosos o arenosos-humíferos pero en las áreas de gran explotación agro-ganadera es más difícil de encontrar por efecto del laboreo continuado (Gutiérrez y Pensiero 1998). Se caracteriza por poseer buenas características forrajeras, por su palatabilidad, digestibilidad y características bromatológicas para los animales (Bustamante et al. 2012). Se adapta bien a condiciones de cultivo y a pastoreos rotativos. Además, su uso en pasturas mixtas es aconsejable por ser tolerante al estrés hídrico estival y encontrarse en suelos de variable fertilidad, pH y profundidad siempre y cuando tengan buen drenaje. Estas propiedades hacen de *B. auleticus* una forrajera atractiva para el desarrollo de cultivares comerciales (Milot 2001).

Como ya se ha mencionado, se han descrito dos especies de endofitos de pastos asociadas a *B. auleticus*: *Epichloë tembladera* y *E. pampeana* (Iannone et al. 2009; Gentile et al. 2005). La asociación con estos endofitos produce importantes efectos sobre las plantas de esta especie. Tanto en experimentos realizados en invernadero como a campo, las plantas asociadas a endofitos (E+) mostraron beneficios en comparación con sus contrapartes libres de endofitos (E-). Un aumento en el crecimiento vegetativo y una mayor tasa de supervivencia y rebrote fueron registrados para asociaciones con ambas especies fúngicas (Iannone et al. 2012c). Además han sido estudiados aspectos relacionados con la semilla y su germinación. Las semillas

infectadas con *E. pampeana* resultaron más livianas y con mayor porcentaje y tasa de emergencia que las contrapartes E- (Iannone y Cabral 2006), mientras que aquellas infectadas con *E. tembladera* mostraron un efecto perjudicial con respecto a la producción de semillas frente a sus correspondientes E- (Iannone et al. 2012c).

En cuanto a su efecto sobre otros microorganismos se evaluó el efecto de la presencia de endofitos en *B. auleticus* frente a la infección por el hongo patógeno *Ustilago bullata* y por los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). En el primer caso, se observó que *B. auleticus-Epichloë* spp. presentaban menos síntomas de enfermedad (carbón) y mejor desarrollo y supervivencia de las plántulas (Vignale et al. 2013). En el caso de los HMA, se evaluó *in vitro* el efecto de los exudados de las raíces de las plantas E+, observándose un aumento en la longitud y ramificación hifal y en el número de esporas (Novas et al. 2011; Vignale et al. 2014).

Las características mencionadas de la asociación *Bromus auleticus*-endofitos como ser: la diversidad de endofitos y los efectos que estos tienen sobre características de interés agronómico, su amplia distribución geográfica y ambiental, y que además habita en simpatria con otras especies de gramíneas hospedantes de endofitos, hacen de esta asociación un modelo sumamente interesante para el estudio de distintos aspectos evolutivos de estas simbiosis. El conocimiento de la diversidad de endofitos presentes en esta especie junto con su capacidad para producir diferentes alcaloides, su rango de distribución y sus formas de dispersión no sólo permitirán conocer aspectos claves de la biología de estos hongos sino que también serán de suma utilidad en el proceso de selección y mejoramiento de esta planta forrajera.

HIPÓTESIS GENERALES

- **Sobre el origen de los endofitos de *B. auleticus*.** Se presentan dos hipótesis alternativas: i) *Epichloë tembladerae* representa al linaje ancestral del que derivó *E. pampeana*. La amplia distribución de *E. tembladerae* respecto a *E. pampeana* en *B. auleticus* apoyaría esta hipótesis. ii) El establecimiento de la simbiosis *E. pampeana*-*B. auleticus* fue independiente de la simbiosis con *E. tembladerae*.
- **Sobre los endofitos de las comunidades de gramíneas.** Gramíneas de distintas especies de una misma comunidad presentan simbiosis con endofitos de la misma especie, adquiridos por transferencia horizontal, lo cual llevaría al agrupamiento de los endofitos en clados por comunidad y no por hospedante.
- **Sobre la capacidad toxicogénica de los endofitos de *B. auleticus*.** *Epichloë tembladerae* y *E. pampeana* tendrían genes para la síntesis de alcaloides tóxicos para insectos pero no para mamíferos.

OBJETIVOS GENERALES

- Estudiar la distribución geográfica de las dos especies de endofitos, *E. pampeana* y *E. tembladeraae*, actualmente descritas en *B. auleticus* e identificar poblaciones en las que habita en simpatría con otras especies de gramíneas hospedantes.
- Estudiar la diversidad de endofitos *Epichloë* entre poblaciones de *Bromus auleticus*. Establecer las relaciones filogenéticas entre ellos y con los endofitos de otras especies de gramíneas que habitan en alopatría como en simpatría, mediante filogenias basadas en el gen *calM*.
- Evaluar si distintos genotipos de *Epichloë* aislados de *B. auleticus* difieren en cuanto a su capacidad de producción de alcaloides con actividad anti-herbívoro (insectos o mamíferos), mediante la evaluación de la presencia y el análisis filogenético de secuencias de genes pertenecientes a las rutas de biosíntesis de los alcaloides del ergot, indol diterpenos, lolinas y peramina. Además, analizar el *mating type* de los aislamientos.
- Evaluar la existencia de transmisión horizontal de endofitos asexuales entre hospedantes de la misma u otra especie. Investigar posibles mecanismos naturales de transmisión horizontal de estos endofitos.

CAPÍTULO 1

Diversidad de endofitos *Epichloë* asociados a *Bromus auleticus*

INTRODUCCIÓN

Bromus auleticus Trin. ex Nees es la gramínea forrajera invernal nativa con mejores perspectivas de domesticación y explotación comercial en zonas templado cálidas de la cuenca del Río de la Plata (Milot 2001). Las plantas de *B. auleticus* poseen rizomas brevemente viajeros o son altamente rizomatosas con numerosas innovaciones cubiertas por abundantes fibras de vainas foliares secas. Esta planta herbácea presenta láminas lineares (10-30(-50) cm de long. por 0,3-0,5 cm lat.) que al tacto resultan retrorso-escabrosas (Gutiérrez y Pensiero 1998). Es una especie casmógama alógama (Gutiérrez et al. 2006) que florece abundantemente presentando cañas erguidas de 40-120 cm de alto, con inflorescencia en panoja contraída erecta de hasta 25 cm de longitud. Sus espiguillas son grandes (2-3 cm), de glumas desiguales (gluma inferior 7-12 mm long. y 3-nervia mientras que gluma superior de 9-13mm de long. y 5-nervia) y con 6-11(-16) flores pero la mayoría de los antecios carece de cariopsis (Gutiérrez y Pensiero 1998) (Fig 1.1). Según el origen de la población, florece simultáneamente desde mediados de Septiembre hasta Octubre y sus semillas maduran desde finales de Noviembre hasta Diciembre (Milot 2001).



Figura 1.1: Ejemplares de *Bromus auleticus*.

Todas las poblaciones naturales de *B. auleticus* inspeccionadas hasta el momento presentaron niveles de infección por endofitos del 100% (Iannone et al. 2009; Iannone et al. 2011). Esta especie se encuentra asociada a dos especies de endofitos diferentes de acuerdo a la región de donde proceden las plantas. Los aislamientos obtenidos de poblaciones de *B. auleticus* provenientes de las provincias de Corrientes, Entre Ríos, Córdoba, San Luis y la costa de Buenos Aires fueron determinados como pertenecientes a *Epichloë tembladerae* (Iannone et al. 2009) debido a sus características morfológicas (Fig. 1.2A y 1.2C). Estas incluyen tasas de crecimiento en PDA a los 30 días y 23°C de entre 12-18mm (aislamientos de la Mesopotamia y sierras de Córdoba) o 22-30mm (aislamientos de la costa bonaerense y sierras de San Luis). Microscópicamente presentan conidios alantoides y a veces sigmoides de $8 \pm 1 \times 3,2 \pm 0,7(6,5) \mu\text{m}$ de longitud (Iannone et al. 2009). Mientras las plantas del norte de la provincia de La Pampa, oeste y noroeste de Buenos Aires y centro de Santa Fe se asocian a *E. pampeana* (Fig. 1.2B y 1.2D). Esta especie se caracteriza por una baja velocidad de crecimiento en PDA (5-12mm/30 días a 23°C) y conidios uncinados (8-14(20) μm long.) los cuales son liberados junto con una porción de la célula conidiógena (Iannone et al. 2009). Estas especies producen estructuras reproductivas en las plantas ya que se observaron células conidiógenas y conidios en el filopiano y en el interior de las cañas de plantas colonizadas por *E. pampeana* y *E. tembladerae* respectivamente (Iannone et al. 2009). La caracterización molecular de ambas especies, mediante filogenias de los genes *tubB* y *tefA* indica que ambas especies son el resultado de la hibridación entre las especies parentales *E. typhina* x *E. festucae* (Fig 1.3).

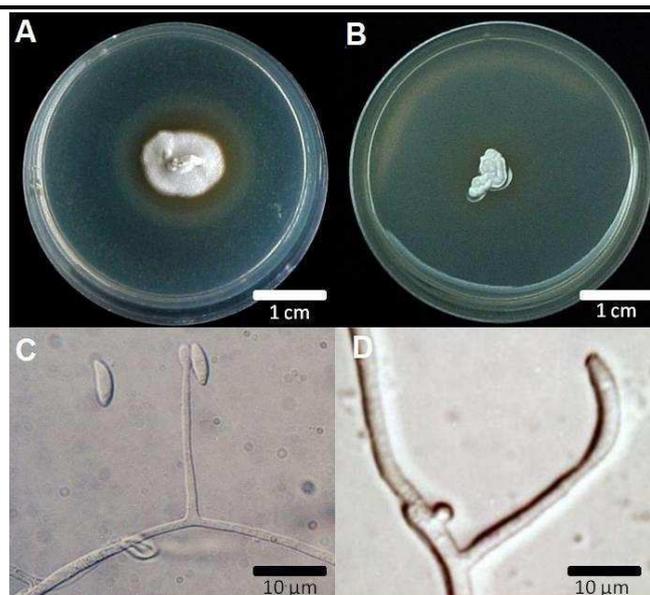


Figura 1.2: Morfología de endofitos aislados de *Bromus auleticus*. A y B. Colonias de *Epichloë tembladerae* y *Epichloë pampeana*, respectivamente. C y D. Células conidiógenas y conidios de *E. tembladerae* y *E. pampeana*, respectivamente (modificado de Iannone et al. (2009)).

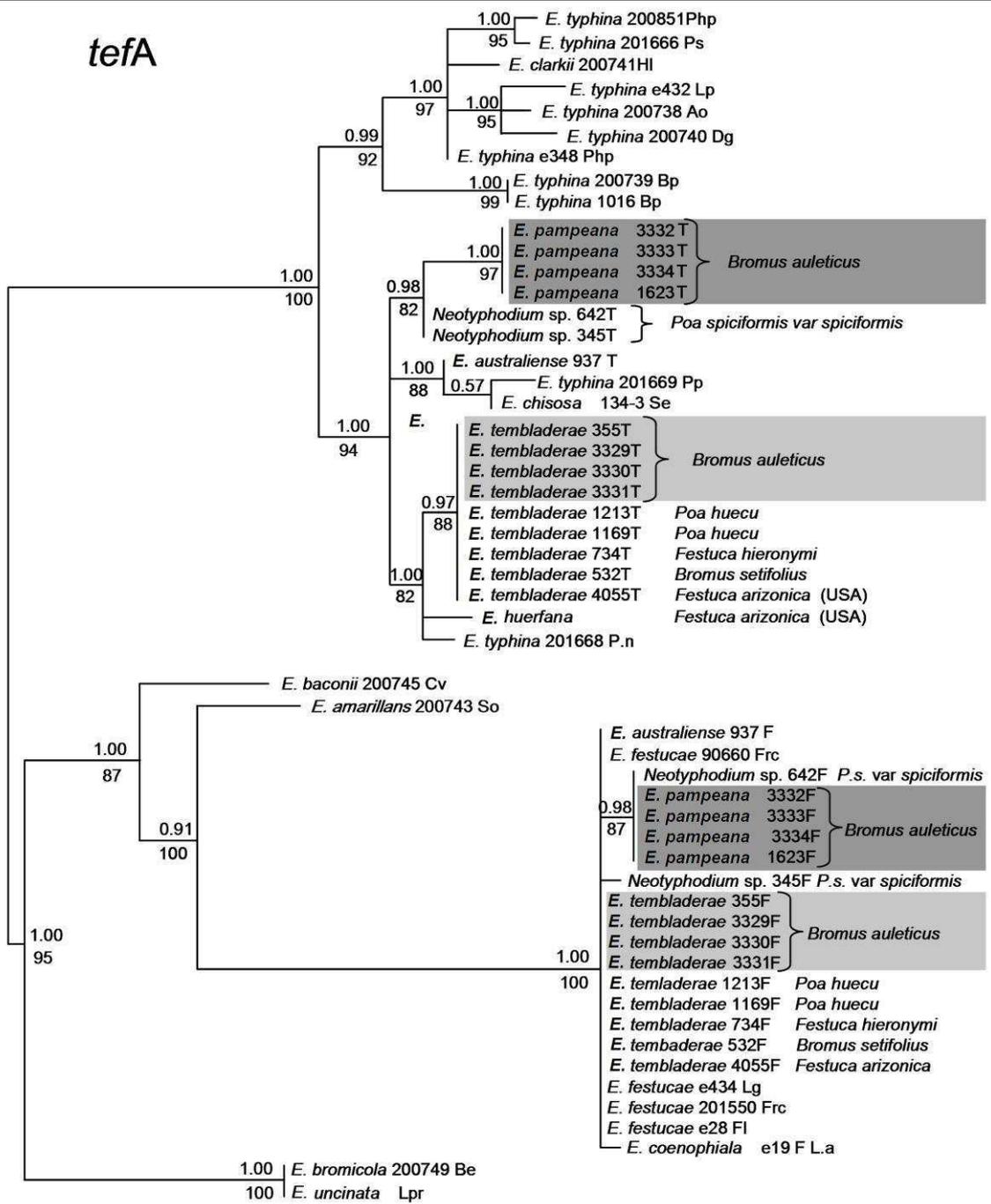


Figura 1.3: Árbol filogenético basado en el gen *tefA* mostrando el origen híbrido de los endofitos asociados a *Bromus auleticus*, con los alelos designadas como T y F (modificado de Iannone et al. (2009)).

Respecto de las cuatro clases de alcaloides que estos endofitos pueden sintetizar, se sabe que *Epichloë pampeana* puede producir lolinas, otra característica que la diferencia de *E. tembladerae* (Iannone et al. 2012c). Sin embargo, en cuanto a la capacidad potencial de producir los otros alcaloides por parte de las especies endofíticas de *B. auleticus*, los genes evaluados son pocos. Para la síntesis de alcaloides del ergot sólo el gen *dmaW*, para indol-diterpenos los genes *idtG*, *idtP* e *idtJ*,

y para lolinas únicamente *lolC* (Tabla 1.1). Estos resultados sugieren que no deberían encontrarse alcaloides tóxicos para el ganado en *B. auleticus*, y aunque hace falta ampliar el perfil de genes y realizar el análisis en planta, coincide con que no se reportó ningún caso de toxicosis debido a estas asociaciones.

Considerando la amplitud del área de distribución de este hospedante, la diversidad de ambientes en los que habita y el escaso número de aislamientos empleados en la descripción de las dos especies de endofitos conocidas, es necesario el estudio de un mayor número de aislamientos y poblaciones para mejorar la caracterización de *B. auleticus* y sus endofitos.

Endofito	<i>dmaW</i>	<i>idtG</i>	<i>idtP</i>	<i>idtJ</i>	<i>lolC</i>
<i>E. pampeana</i>	-	-	-	-	+
<i>E. tembladera</i>	-	+	+	-	-

Tabla 1.1: Perfil de genes de alcaloides de los endofitos de *Bromus auleticus*. Cuatro cepas de cada especie endofítica fueron analizadas siendo coincidentes los resultados (modificada de Iannone et al. (2012b)).

El estudio de la diversidad de endofitos *Epichloë*:

Dadas las pocas características morfológicas que presentan los endofitos de pastos, el avance en las técnicas moleculares ha sido y será esencial para profundizar el conocimiento general de los endofitos *Epichloë* y estudiar su evolución. Gracias a la biología molecular se ha comprobado el origen híbrido de muchas especies de endofitos, lo que se puede visualizar fácilmente al analizar los electroferogramas de secuencias génicas obteniendo picos polimórficos en ciertas posiciones (Fig. 1.4) (Moon et al. 2004; Gentile et al. 2005). En la búsqueda de una región genómica con potencial para ser utilizada para todo el Reino Fungi, se comenzó con la amplificación y secuenciación de rARN con sus conocidas regiones ITS (White et al. 1990; Schoch et al. 2012). Otras regiones génicas también tomaron relevancia a la hora de secuenciar, como ser *tefA*, *tubB* y *actG*, llevando a un aumento en el número de loci analizados y al desarrollo de proyectos de secuenciación de genomas enteros, actualmente en proceso (Schardl et al. 2013b).

En los últimos años se han empleado diversas técnicas basadas en perfiles de ADN como AFLP y microsatélites (Moon et al. 1999; Van Zijll De Jong et al. 2003; Moon et al. 2004; Schirrmann et al. 2014). Sin embargo, los AFLP han sido de difícil aplicación en endofitos debido a la dificultad para obtener ADN en cantidad y calidad suficiente, y los marcadores microsatélites desarrollados hasta el momento han resultado poco eficientes para su aplicación en especies de endofitos diferentes a las empleadas para

su diseño. Debido al uso de estos endofitos en el mejoramiento de pasturas, el análisis de la producción de alcaloides en la planta es de crucial importancia. La caracterización química mediante técnicas como la cromatografía líquida, espectrometría de masa y cromatografía gaseosa en sus diferentes variantes son utilizadas para la detección y cuantificación de los alcaloides (Rasmussen et al. 2012; Shymanovich et al. 2014). Sin embargo, dado que la producción de alcaloides depende de factores ambientales y de la interacción de los genotipos de la planta hospedante y del endofito, la caracterización química no permite asegurar el potencial químico del endofito. En este sentido, el análisis del perfil de los genes involucrados en la síntesis de alcaloides presentes en los diferentes aislamientos ha resultado una herramienta muy útil para profundizar en el conocimiento y entendimiento de la variabilidad intra e inter-específica registrada en *Epichloë*, prediciendo además la capacidad toxicogénica potencial (Takach et al. 2012; Charlton et al. 2014).

El desarrollo y puesta a punto de diversas reacciones PCR multiplex para detectar simultáneamente los genes involucrados en la síntesis de las diferentes clases de alcaloides es una metodología que presenta muchas ventajas. Entre ellas, se puede mencionar, que está basada en una técnica ya ampliamente utilizada en estudios moleculares lo que la hace fácil de aplicar y relativamente económica de utilizar, que permite tener una visión general rápida del potencial químico de los endofitos, y que es posible trabajar con numerosos aislamientos a la vez. Las multiplex PCR han resultado ser una herramienta muy útil en la detección de variabilidad entre y dentro de especies, que ya ha sido aplicada a diversos sistemas de endofitos-hospedante con éxito (Charlton et al. 2012; Takach et al. 2012; Charlton et al. 2014; Shymanovich et al. 2014). Por lo tanto, puede ser utilizada en estudios científicos básicos como para prospección de cepas con aplicación biotecnológica, para la selección de cepas no tóxicas a ser inoculadas en gramíneas de interés agronómico.

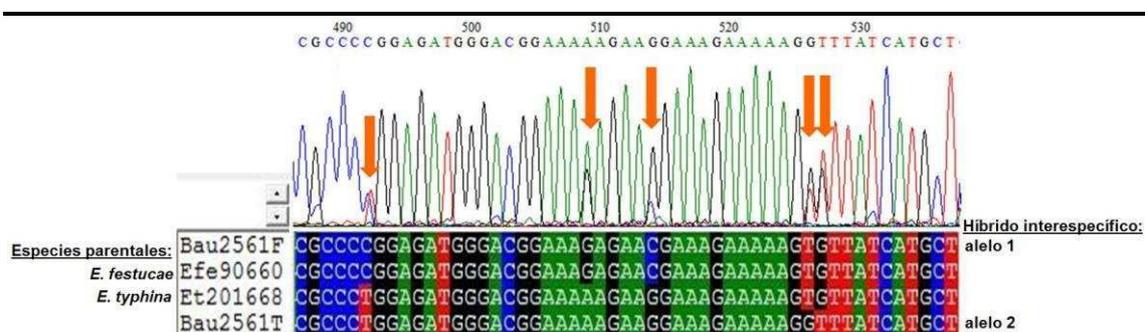


Figura 1.4: Electroferograma del gen β -tubulina de un endofito de *B. auleticus* (alelo 1+alelo 2), donde se pueden observar ciertos picos polimórficos (flechas naranjas) debido a su origen híbrido interespecífico de parentales *E. festucae* x *E. typhina*.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Existe un gran número de poblaciones de *B. auleticus* dispersas en su área de distribución, predominantemente en sitios no utilizados para actividades agroganaderas.
- Los dos endofitos de *B. auleticus* presentan una diversidad mayor a la evidenciada mediante los marcadores utilizados hasta el momento (*tefA* y *tubB*), que podría ser detectada mediante el uso de otros marcadores como el gen *calM*.
- Los endofitos *Epichloë* asociados a *Bromus auleticus* presentan diferencias genéticas a nivel de las rutas de biosíntesis de alcaloides y de tipo de apareamiento.
- Es posible detectar genotipos de endofitos con perfiles de alcaloides tóxicos para insectos pero no para el ganado que puedan ser seleccionados para el mejoramiento de esta gramínea forrajera.

OBJETIVOS PARCIALES

- Detectar nuevas poblaciones de *Bromus auleticus* para ampliar la caracterización de sus endofitos.
- Evaluar la presencia de endofitos *Epichloë* spp. en poblaciones de *B. auleticus* no registradas anteriormente y aislar los endofitos provenientes de diferentes sitios geográficos para su posterior caracterización.
- Estudiar la diversidad de endofitos *Epichloë* de diferentes poblaciones de *Bromus auleticus* mediante el análisis filogenético de secuencias de los genes nucleares calmodulina (*calM*) e indol di-terpeno G (*idtG*) y su caracterización morfológica.
- Estudiar si distintos genotipos de *Epichloë* aislados de *B. auleticus* difieren en cuanto a su potencial de producción de alcaloides con actividad anti-herbívoros (insectos o mamíferos), mediante la evaluación por PCR de la presencia de genes pertenecientes a las rutas de biosíntesis de los indol-diterpenos, alcaloides del ergot, lolinas y peraminas. Además, analizar el tipo de apareamiento de los diferentes aislamientos.
- Detectar genotipos de endofitos aptos para su aplicación en el mejoramiento de *B. auleticus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreos:

El esfuerzo de muestreo se centró en la búsqueda de sitios con *Bromus auleticus*. De cada sitio muestreado, dependiendo de la disponibilidad, se recolectaron 10 plantas de *B. auleticus*. Las muestras se rotularon para distinguirlas por planta y población, guardándolas en bolsas de nylon bien cerradas hasta su inspección en el laboratorio.

Se registró la posición geográfica de cada uno de los sitios utilizando un sistema de posicionamiento global (GPS 2000; Magellan). A continuación se detallan las campañas realizadas:

- 25 de Octubre del 2010 - Entre Ríos (Concepción del Uruguay)
- 12 al 16 de Noviembre del 2010 - Áreas de Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe.
- 29 de Diciembre del 2010 - Bs As (Pigüé)
- 05 al 12 de Enero del 2011 - Áreas de Buenos Aires, Córdoba, La Pampa, San Luis, Santa Fe.
- 27 de Noviembre del 2011 - Bs As (Punta Indio)
- 03 al 07 de Diciembre del 2011 - Bs As (Oeste y Sur)
- 10 de Enero del 2012 - Bs As (Balcarce)
- 02 de Noviembre del 2012 - Entre Ríos (Colón)
- 15 al 18 de Diciembre del 2012 - Bs As (Este)
- 08 al 13 de Enero del 2013 - Córdoba

Además, el Dr. Iannone y colaboradores realizaron campañas de muestreo en la República Oriental del Uruguay en Diciembre del 2012 y 2013, también registrando la posición geográfica de los sitios muestreados. Las muestras vegetales de dichas campañas de colecta fueron traídas al laboratorio donde se inspeccionaron, procesaron e aislaron los endofitos para su identificación y estudio.

Detección y aislamiento de endofitos a partir de las muestras recolectadas:

Inmediatamente después de cada campaña, se examinaron al microscopio óptico plantas de cada sitio para determinar el estatus endofítico mediante inspección en parénquima de caña floral, vainas foliares o células de la capa de aleurona de semillas teñidas con el colorante azul de anilina en solución acuosa al 0.01% o en ácido láctico (Clark et al. 1983). En dichos tejidos se examinó la presencia de hifas no ramificadas,

de crecimiento intercelular paralelo al eje longitudinal de las células del hospedante o en forma sinuosa en las semillas, características de los endofitos del género *Epichloë*. De cada sitio de muestreo se seleccionaron al menos 3 plantas, si había disponibles, con presencia de hifas características de *Epichloë* (plantas E+). Las plantas E+ fueron procesadas para aislar el endofito esterilizando superficialmente 30 fragmentos sanos/planta en lavados sucesivos de etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sodio 2,5% por 5-7 minutos y etanol 50% por 1 minuto. Luego, se sembraron 5 fragmentos/placa de Petri (6cm) con medio agar papa glucosado con 100 ppm de cloranfenicol (APGc) para restringir la proliferación de bacterias. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 24°C por un período de hasta 6 meses durante el cual fueron examinadas periódicamente, para descartar aquellos fragmentos que resultaran contaminados o de los cuales surgieran endofitos de otros géneros. En general el micelio endofítico comenzó a surgir de los fragmentos desinfectados entre los 20 días y dos meses de incubación pero en algunos casos se detectó micelio de *Epichloë* sp. surgiendo de un fragmento a los 4 meses de incubación. Se seleccionaron sólo aquellos aislamientos de micelio blanco y lento crecimiento correspondientes a endofitos *Epichloë*, repicándolos para obtener cultivos axénicos en nuevas cajas de Petri (6 cm) con APGc. En general se obtuvo más de un aislamiento de cada planta pero los aislamientos de *Epichloë* provenientes de una misma planta suelen corresponder a una misma cepa, debido a la colonización sistémica de la planta por parte de estos endofitos por lo que se repicó un aislamiento por planta. Posteriormente, se los repicó en tubos con APGc en pico de flauta para conservarlos en heladera a 4°C.

Obtención y preservación de cultivos monospóricos:

De los aislamientos obtenidos, a partir de las colonias axénicas crecidas en medio APGc fresco, se realizaron cultivos monospóricos. Para esto, cada colonia fue lavada con 300 µl de una solución esterilizada de tween 80 en agua para obtener una suspensión de conidios. Cincuenta microlitros/placa de esta suspensión fueron sembrados en forma de césped con espátula de Drigalsky en nuevas placas de Petri (6cm) con APGc. Estas placas se observaron bajo lupa hasta la germinación de los conidios (a los 4-7 días) traspasándolos individualmente con una aguja hipodérmica (0,45-0,5mm diámetro) a nuevas cajas con APGc, de a 5 por placa.

Caracterización molecular:

Extracción de ADN de cultivos monospóricos:

Luego de probar diferentes protocolos de extracción, se utilizaron tres metodologías diferentes para extraer ADN. Los aislamientos de más rápido crecimiento, se repicaron por duplicado en APGc y fueron incubados en oscuridad a 24°C por 15-20 días. Luego se colocó en un eppendorf (1,5ml) 60-90mg de micelio en el buffer de lisis del kit de extracción ZR Fungal/Bacterial DNA miniprep (ZymoResearch) y se trituró mediante un embolo sujeto a un taladro eléctrico, seguido del uso del kit según las instrucciones del producto. Las cepas de menor velocidad de crecimiento, fueron cultivadas por 20 días en cajas de Petri con 30ml de caldo papa glucosado a 24°C, en oscuridad y agitación para luego liofilizar el micelio, molerlo con nitrógeno líquido y finalmente aislar el ADN a partir de 15mg de micelio usando el mismo kit de extracción. De 4 poblaciones que no se logró aislar endofito y se habían recolectado semillas, se extrajo ADN de los endofitos desde semillas de plantas E+. Para esto, se congelaron las semillas en nitrógeno líquido y se trituraron con el disruptor de tejidos TissueLyser II (QIAGEN) para luego utilizar el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) según las instrucciones del producto.

Amplificación y secuenciación de regiones génicas:

Las secuencias génicas amplificadas fueron calmodulina M (*calM*) e indol diterpeno G (*idtG*). *CalM* es un gen altamente conservado que se encuentra en todos los linajes eucariotas. La proteína calmodulina es un receptor multifuncional intercelular de Ca²⁺ que se une a varias otras proteínas alterando su actividad (Chin y Means 2000). El gen *idtG* pertenece a un grupo de genes involucrados en la síntesis de indol diterpenos, siendo el primero en la ruta de biosíntesis. Codifica una GGPP sintetasa que cataliza la síntesis de geranylgeranyl difosfato (GGPP) a partir de farnesil difosfato e isopentenil difosfato (Saikia et al. 2008; Schardl et al. 2013a).

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron con primers específicos (Tabla 1.2) en un volumen de 50µl conteniendo: 5µl de *buffer* de PCR 10X (Life Technologies), MgCl₂ 1.5mM, cada uno de los dNTPs 0.2mM, de cada *primer* 0.2nM, 0.025U/µl de Taq DNA Polimerasa Recombinante (Life Technologies), entre 3 y 10 ng de ADN genómico del endofito, llevando a volumen con agua miliQ.

Para amplificar el gen *calM*, dado que los endofitos de Argentina en general poseen dos copias de cada gen por ser habitualmente híbridos de *E. festucae* y *E. typhina* (que denominamos como alelo 1 y alelo 2), se utilizaron *primers* selectivos diseñados sobre regiones variables observadas en la secuencia de cada ancestro para amplificar

selectivamente y obtener cada copia por separado. Dado que la amplificación selectiva del alelo 2 en determinados casos no fue eficiente, se utilizaron alternativamente dos combinaciones de *primers*. Se comenzó trabajando con la combinación de *primers cal-exon7u* x *cal-intron1d-ty* para amplificar y secuenciar, luego sólo para amplificar mientras se secuenció con *cal-intron1d-ty*, *cal-exon4d* y *cal-exon4u*. Alternativamente se diseñó el *primer cal-ty4* para amplificar y secuenciar con éste en combinación con *cal-intron1d-ty* el alelo derivado de *E. typhina*. Para ambos alelos de *calM* (y todas las combinaciones de *primers*) el programa de ciclos de temperatura de PCR consistió en una desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, annealing a 53°C por 45 segundos y amplificación a 72°C durante 1 minuto, terminando con 7 minutos a 72°C y guardando a 4°C. Para amplificar *idtG*, el programa de PCR utilizado consistió en: un ciclo de 2 minutos a 94°C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 60 segundos a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C, guardándolos a 4°C.

Gen	Primer	Secuencia (5–3')	Uso	Tamaño(bp)
<i>calM</i>	<i>cal-exon1d</i>	TATCAAATTTTCCACCATGG	A y S	1000
alelo 1	<i>cal-exon7u</i>	TACTTCTGCATCATAAGCT	A y S	
<i>calM</i>	<i>cal-exon7u</i>	TACTTCTGCATCATAAGCT	A y S	1000
alelo 2	<i>cal-intron1d-ty</i>	GGTAAGTCCTTCATTCAG	A y S	
	<i>Cal-ty4</i>	CTGTTAGGTAATATTAGTAAA	A y S	950
<i>calM</i>	<i>cal-exon4d</i>	TCACCACTAAAGAGCTAGG	S	
	<i>cal-exon4u</i>	ATCATATCTTGCAATTCGG	S	
<i>idtG</i>	<i>ltmG-156</i>	GCACAAACAATAAATTCGGCCAA	A y S	383
	<i>ltmG-157</i>	AATTTGCCCTCTGTAAATCCTC	A y S	

Tabla 1.2: *Primers* utilizados para las diferentes reacciones de amplificación por PCR, para secuenciación y posterior análisis filogenético (modificado de Mc Cargo et al. (2014)). A: amplificación y S: secuenciación

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer Tris-bórico-EDTA 0,5X (TBE) teñidos con gel red y revelados en un transiluminador de luz UV. Los productos de PCR fueron purificados con el kit Pure Link PCR Purification kit (Invitrogen) o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. Se secuenciaron ambas cadenas de los fragmentos de ADN amplificados en el servicio de Secuenciación y Genotipificado de la FCEyN-UBA o de la “The Samuel Roberts Noble Foundation” (Ardmore, Oklahoma, Estados Unidos) usando los *primers* según lo indicado en la Tabla 1.2. Los electroferogramas de secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizados con el programa Contig Express, Vector NTI Advance 10.3.0 (Invitrogen) para armar las secuencias consenso.

Análisis filogenéticos:

Las secuencias consenso fueron utilizadas junto con secuencias de referencia de otros endofitos del hemisferio norte obtenidas de GenBank (Benson et al. 2013), del proyecto de secuenciación de genomas de *Epichloë* (Schardl et al. 2013b) y de Argentina publicadas en trabajos anteriores del grupo de trabajo (Mc Cargo et al. 2014). Todas las secuencias fueron alineadas utilizando Clustal W (Thompson et al. 1994) paquete del programa BioEdit7.0.9 (Hall 1999), asignando un costo de 15 a la apertura y 6 a la extensión de gaps, los cuales fueron tomados como un quinto estado. Los alineamientos obtenidos fueron corregidos manualmente en caso de ambigüedades. Con la matriz que se obtuvo luego del alineamiento, se realizaron análisis filogenéticos mediante la aplicación del criterio de máxima parsimonia (MP) utilizando el programa Winclada v1.00.08 (Nixon 2002). El soporte de los nodos obtenidos en el análisis de MP fue calculado mediante un análisis de Bootstrap con 1000 réplicas (Felsenstein 1985). Además, se calcularon los modelos evolutivos adecuados para cada matriz con el programa MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013), los cuales se aplicaron en los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud (MV) realizados con MEGA 6.0 e inferencia bayesiana (IB) con Mr. Bayes 3.2 (Ronquist et al. 2012). En los análisis de IB el número de generaciones corridas varió entre 1000000 y 2000000 para alcanzar un desvío estándar entre las cadenas que fuera menor al 0.01% y el 25% fue descartado como burn-in.

Obtención de los perfiles de genes de alcaloides y mating type:

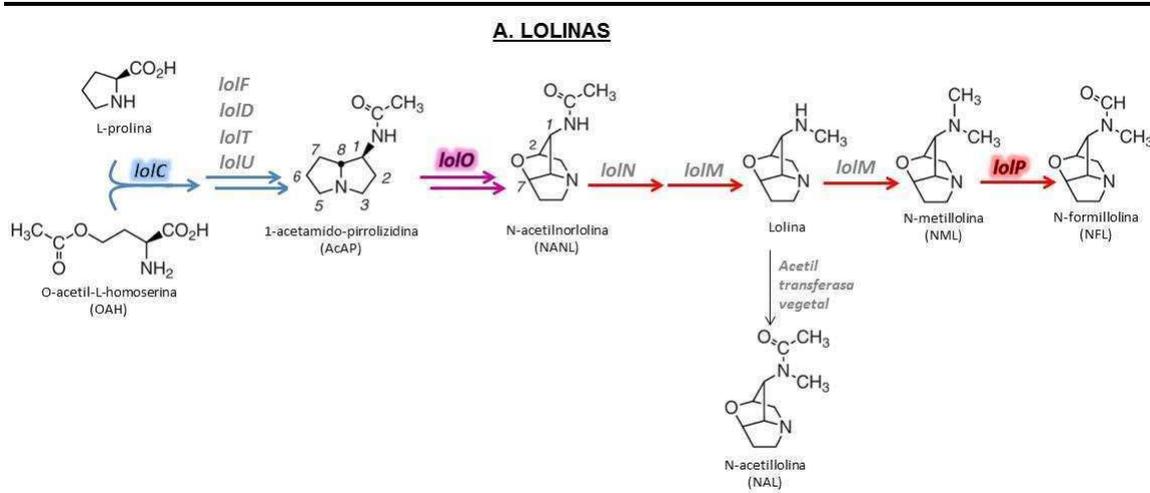
El análisis de presencia o ausencia de genes involucrados en la biosíntesis de las cuatro clases de alcaloides fue realizado mediante 6 diferentes PCR multiplex y cuatro PCR individuales. En la Tabla 1.3 se detallan los genes amplificados en cada multiplex o en PCR individuales, los *primers* utilizados y los tamaños esperados para cada fragmento mientras que en la Figura 1.5, se esquematiza la ubicación de estos genes en las rutas de biosíntesis de los diferentes alcaloides (*lolA* de función desconocida). Cada PCR se realizó en un volumen total de 25 μ L conteniendo 3 ng de ADN, 1,0 U GoTaq ADN polimerasa (Promega Corp., Madison, WI), 1X *buffer* de reacción verde GoTaq que contiene 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (Promega Corp.) y 1 μ M de los *primers* específicos para cada gen (Charlton et al. 2014). El programa de ciclos constó de: 94°C durante 1 minuto, luego 30 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos (o 1 min kb⁻¹ para los productos de mayor tamaño), seguidos por 72°C durante 10 minutos. Las PCR multiplex y las PCR para un solo producto se hicieron utilizando las mismas condiciones de reacción y de ciclos. En el caso de las PCR multiplex para ADN extraído de semillas se realizaron

con 6 ng de ADN y 35 ciclos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% en *buffer* TBE 1X y visualizados con bromuro de etidio mediante transiluminación UV.

Gen	Primers	Secuencia (5–3')	Tamaño (bp)	Multiplex
Control PCR				
<i>tefA</i>	tef1-exon1d-1 tef1-exon6u-1	GGGTAAGGACGAAAAGACTCA CGGCAGCGATAATCAGGATAG	860	1
Mating type				
<i>Mating type 1 (MTA)</i>				
<i>mtAC</i>	mtAC-F mtAC-R	CAATGGTGGTCACCTGAGAAG CGGTCTCATTCTTCCAGAGAGAGG	785	2
<i>Mating type 2 (MTB)</i>				
<i>mtBA</i>	mtBA-F mtBA-R	TCTACCGCAAGGAACGACACAATACCG GCTTTTCCAGCAAGGCTTGCTTGACTC	213	2
ALCALOIDES				
Peramina (PER)				
<i>perA-5'</i>	perA-5' F3 perA-5' R	ATGACGAGCTCGGAGCGAGTTG TCGCAGCTGCAAGTCGAGCAC	309	5
<i>perA-T2</i>	perA T2-F perA T2-R	TCTTCAGGCATCGCAGGAAC TCGGCCACCTCCAGCCTGATG	600	1
<i>perA-R</i>	perA red F2 perA red R	GAGATCAGTTCGCAGTTGTCAG CTAGCCTCCAGATCTTGTGAAAG	447-589	2
<i>perA-17bp</i>	perA T2-F perA 17 bp	TCTTCAGGCATCGCAGGAAC GTACGGATAACCTCAAC	742	6+PCR
Lolinas (LOL)				
<i>lolC</i>	lolC-3a lolC-5b	GGTCTAGTATTACGTTGCCAGGG TCTAAACTTGACGCAGTTCGGC	442	1
<i>lolA</i>	lolA-F1 lolA-R1	GAGACACTAGAGAAATGGCAGCTGC GGCATCCATGGTGGCGAAGATGTG	270	3
<i>lolO</i>	lolO-F1 lolO-R2	GTGAACTGGCAGTAGTCCGTATG AATCCATGCCAGTGTCGGGAATG	492-719	4
<i>lolP</i>	lolP-F1 lolP-R1	GTTCTAAACATCGTGACTGGGC GGTAGGTCAGCATCTTGCAACG	566	5
Alcaloides del ergot (EAS)				
<i>dmaW</i>	dmaW-F4 dmaW-6R	GTGTACTTTACTGTGTTTCGGCATG GTGGAGATACACACTTAAATATGGC	282	1
<i>alt-dmaW</i>	dmaW818(311+21)d dmaW818(1068-24)u	AACCCATCAACGGAGCAACTG GCCAAACACTGTGAAATACACCTG	758	3
<i>easC</i>	easC-F2 easC-R2	CTGGAGCATATGGAGAGTTTG AATGTTTCAGGCAAACCCAGTC	278	4+PCR
<i>easA</i>	easA-F easA-R	GCGGTTGCATTGAGAATCGCTC ATCTACCACAAGCTTGGCGGAC	350	4
<i>cloA</i>	cloA-MP-F2 cloA-MP-R2	CGCACAACGCTCCATTGATGGC AAGCTCGTGCCGGGAATTAGGC	434	5

<i>lpsB</i>	p12-F p12-R	CCGTCTTCCCGTATAACCGAA TACCCACTGCCTCGAACTTG	598	3
<i>easH</i>	easH-F easH-R	AGATATGGCATCGTGACCAGCC GGCATGTAGCATCAAATGGTGTC	333	6
<i>Indol diterpenos (IDT/LTM)</i>				
<i>idtG</i>	idtG-F idtG-R	GAGCTTGAGAAGCTTACGAATCC GGGCAATGGAGCGATTCTCTC	113	1
<i>idtB</i>	ltmB-345 ltmB-346	AACATCGCCTGGGAGCTCGTATA CGCAGGTCCTATTTCCATCGC	240	PCR
<i>idtQ</i>	ltmQ-313 ltmQ-282	CTACCAGGACAGGCGTGACGTCC CAGAGGTTTAACCCTCTTGACGC	334	3
<i>idtF</i>	ltmF-359 ltmF-360	GAATTATGTTACTCTTGGGG AAGTTGGCACATAGGTCTTC	227	PCR
<i>idtK</i>	ltmK-160 ltmK-161	ATATTGAATTGCTGCGTGAGGAG AGAGGCCAAGAAGCGGCCTGGACA	568	6
<i>idtE</i>	ltmE-356 ltmE-341	CCGAGTTTGATGACCTGCTG TTCCGCTTCCGAGTAGACTC	687	PCR
<i>idtJ</i>	ltmJ-205 ltmJ-206	CCAAGCATCGATTTGTCACC AATCTGATCGCCATCTTTGC	242	5

Tabla 1.3: Genes, *primers* y tamaños de fragmentos amplificados para el análisis del perfil de alcaloides



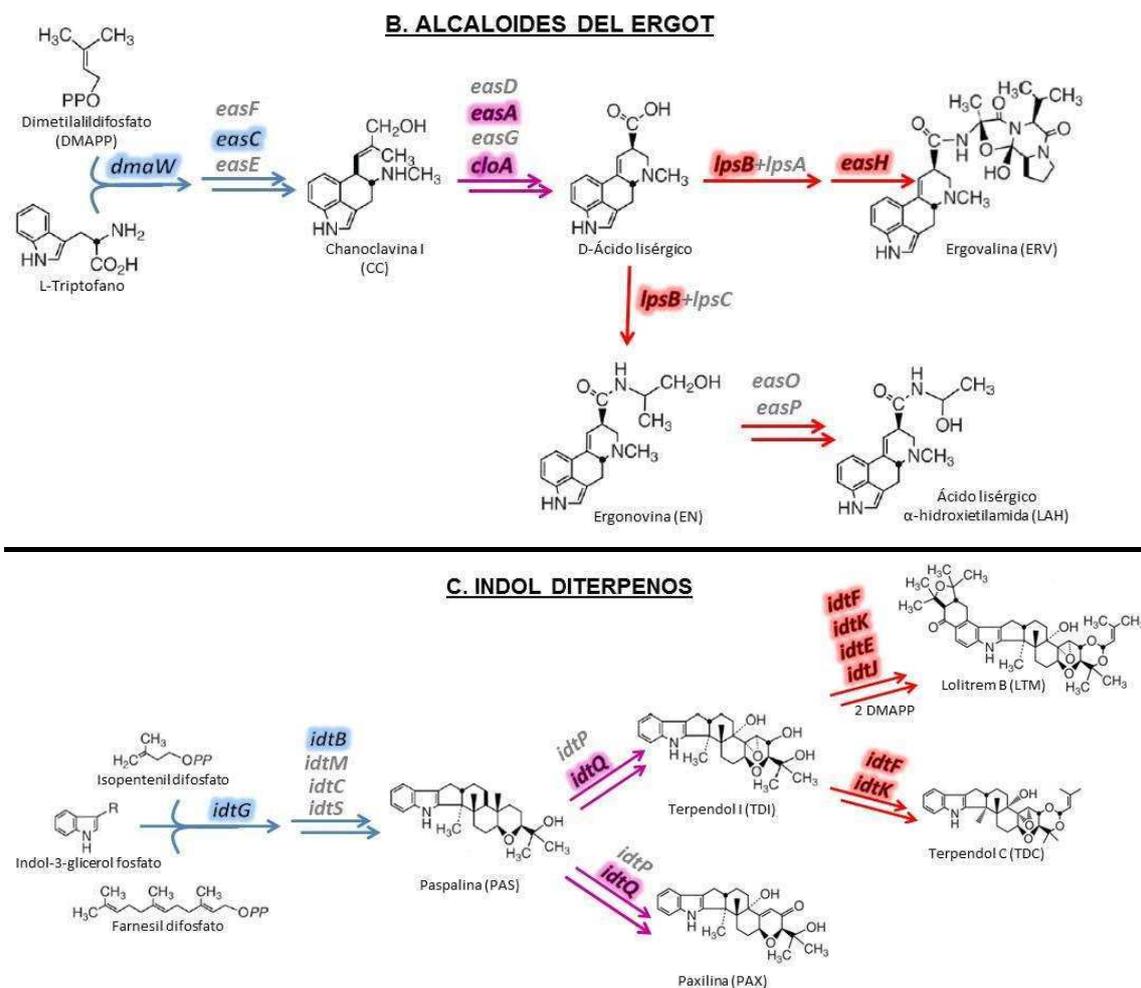


Figura 1.5: Resumen de las vías de síntesis de los alcaloides cuyos genes se disponen en *clusters* y sus principales compuestos químicos para especies de endofitos *Epichloë*, resaltando los genes testeados (modificado de Schardl et al. (2012); Schardl et al. (2013a)).

En función de las relaciones filogenéticas para secuencias de *calM* e *idtG* y de los perfiles de genes de alcaloides y *mating type* obtenidos, los aislamientos fueron agrupados en genotipos. De estos genotipos se seleccionaron aislamientos en los que se secuenciaron (si estaban presentes) los genes *lolC*, *dmaW*, *idtG*, *idtM* y *perA*, para corroborar que el producto de PCR fuera el esperado y detectar eventualmente el carácter híbrido para estos genes. Las condiciones de PCR fueron las mismas utilizadas para las reacciones multiplex pero las reacciones se llevaron a cabo por simplificado con el par de *primers* específico.

Caracterización morfológica:

Para la caracterización macroscópica, cada aislamiento monospórico fue repicado por duplicado, tomando un cuadrado de 2mm de lado del borde de una colonia en activo crecimiento y colocándolo en placas de Petri con medio APGc. Los cultivos se incubaron por 30 días en oscuridad a 24°C, luego de los cuales se evaluó como

caracteres descriptivos el aspecto de la colonia (anverso y reverso) y su diámetro (promedio de 4 medidas: dos diámetros perpendiculares de cada réplica).

Para la caracterización microscópica, el inóculo de cada aislamiento se sembró en placas de Petri con medio agar (2%) sin nutrientes y se los incubó por 15-20 días en oscuridad a 24°C. La utilización del medio sin nutrientes posibilita el crecimiento de micelios con pocas hifas sin alterar las características de las estructuras reproductivas, permitiendo además el montaje en el microscopio del bloque entero pudiendo observar la disposición de las células conidiógenas y conidios. Luego de la incubación, de cada cultivo se cortó un bloque de agar con micelio y se observó tiñendo o no con calcofluor White M2R bajo microscopio óptico (Karl Zeiss Axioskope) para determinar el largo y ancho de las células conidiógenas y de los conidios (20 medidas de cada uno).

RESULTADOS

De los más de 132 sitios estudiados y georreferenciados, se detectaron 71 poblaciones de *Bromus auleticus* dispersas en todas las provincias que integran su área de distribución. Éstas estaban ubicadas en diversos ambientes como bosques xerófilos de llanuras y sierras, pastizales serranos, palmares, sabanas, bajos inundables y ambientes costeros rocosos o arenosos (Tabla 1.4). En ambientes de pastizal y bosques xerófilos de llanura, las poblaciones se encontraron principalmente en lugares que no son utilizados para el cultivo o la alimentación de ganado, como plazas, al costado de las vías o al costado de rutas y caminos de tierra.

Aislamiento ^a	Origen ^a	Ambiente ^c	Coordenadas geográficas (dec)	
			Latitud	Longitud
<u>3333</u>	Agustina - BA	Pastizal de la PI-PO	-32,48	-61,07
269;270	Ayacucho - BA	Pastizal de la PF	-37,15	-58,54
E-	Balcarce - BA	Pastizal Sierras de Tandilia, PA	-37,87	-58,26
E-	Bosch - BA	Pastizal Sierras de Tandilia, PA	-37,71	-58,28
<u>100</u>	Cañada Seca - BA	Pastizal de la PI	-34,41	-62,96
<u>199</u>	Carhué - BA	Pastizal de la PI	-37,24	-62,82
E-	Cobos - BA	Pastizal de la PI	-37,75	-57,64
195;196	Daireaux - BA	Pastizal de la PI	-36,62	-61,78
105;108	General Villegas - BA	Pastizal de la PI	-35,02	-63,01
<u>190</u>	General Pinto - BA	Pastizal de la PI	-34,77	-61,90
<u>252;253</u>	Gorchs - BA	Pastizal de la PF	-35,68	-58,96
<u>191</u>	Guanaco - BA	Pastizal de la PI	-35,72	-61,66
E-	Madariaga - BA	Pastizal de la PF	-37,07	-57,05
<u>193;194</u>	Madero - BA	Pastizal de la PI	-35,85	-62,08
<u>185;187</u>	Mar Azul - BA	Bajo húmedo en suelo arenoso, PI	-37,36	-57,09
<u>182;184;239</u>	Mar Chiquita - BA	Pastizal en suelo arenoso, PF	-37,74	-57,43
S.A.	Miranda - BA	Pastizal de la PF	-36,52	-59,13
<u>203</u>	Olavarría - BA	Pastizal de la PF-PA	-36,86	-60,27
<u>64;66</u>	Pigüé - BA	Pastizal en Sierras de Ventania, PA	-37,65	-62,42
177;178;179; 180;181;188; 189	Punta Indio - BA	Bosque xerofítico de <i>Celtis tala</i> , PF	-35,267	-57,26
<u>L99</u>	Ruta 2 km 307 - BA	Pastizal en bajo húmedo, PF	-37,14	-57,82
<u>279</u>	Ruta 2 km 353 - BA	Pastizal en bajo húmedo, PF-PA	-37,54	-57,70
<u>285;286;3330</u>	San Clemente del Tuyú - BA	Pastizal en suelo arenoso, PF	-36,34	-56,74
E-	Sierra de Los Padres - BA	Pastizal en Sierras de Tandilia, PA	-37,96	-57,78
<u>201</u>	Sierras Pillahuincó - BA	Pastizal en Sierras de Ventania, PA	-38,21	-61,48
E-	Tandil - BA	Pastizal en Sierras de Tandilia, PA	-37,35	-59,12
<u>99</u>	Adelia María - CD	Pastizal de llanura, PI	-33,63	-64,00
<u>302;303</u>	Arias - CD	Pastizal, PI	-33,65	-62,37
<u>94</u>	Berrotarán - CD	Ecotono bosque serrano pastizal, ES-CH	-32,43	-64,30
S.A.	Chilibroste - CD	Pastizal, ES-PI	-32,34	-62,52
<u>L47</u>	Coronel Moldes - CD	Pastizal, ES-PI	-33,61	-64,60

<u>75</u>	Despeñaderos - CD	Bosque xerófilo, ES-CH	-31,80	-64,30
<u>309;310</u>	General Roca - CD	Pastizal, PO	-32,73	-61,92
<u>318;319</u>	Dean Funes 1 - CD	Bosque xerófilo serrano, CH	-30,43	-64,25
<u>322;371</u>	Dean Funes 2 - CD	Bosque xerófilo serrano, CH	-30,39	-64,22
<u>L53</u>	Las Colecitas - CD	Pastizal serrano, ES-CH	-32,89	-64,88
<u>315;316</u>	Ascochinga - CD	Pastizal serrano, CH	-30,95	-64,32
<u>335;367</u>	La Cumbre - CD	Bosque serrano, ES-CH	-31,00	-64,47
<u>L57</u>	La Cumbrecita - CD	Pastizal serrano, CH	-31,88	-64,80
<u>349;350;351;</u> <u>2434</u>	Los Gigantes 1 - CD	Pastizal serrano, ES-CH	-31,21	-64,65
<u>392;393</u>	Los Gigantes 2 - CD	Pastizal serrano, ES-CH	-31,39	-64,73
S.A.	Los Gigantes 3 - CD	Pastizal serrano, ES-CH	-31,35	-64,81
<u>342</u>	Los Gigantes 4 - CD	Pastizal serrano, CH	-31,35	-64,91
<u>168</u>	Las Higueras - CD	Pastizal, ES-PI	-33,08	-64,28
<u>306</u>	Sierra de Pocho - CD	Bosque xerófilo serrano, CH	-31,37	-65,36
<u>395</u>	Ticino - CD	Pastizal, ES	-32,66	-63,49
<u>155</u>	Villa Gral Belgrano - CD	Bosque xerófilo serrano, CH-ES	-31,98	-64,54
<u>29;52;53;</u> <u>2479</u>	Felipe Yofré - CR	Bosque de <i>Prosopis</i> , CH-ES	-29,03	-58,48
<u>26</u>	Miriñay - CR	Bosque de <i>Prosopis</i> y palmar, CN	-29,56	-57,52
<u>35;2594;2595</u>	Arroyo Don Gonzalo - ER	Bosque de <i>Prosopis</i> y <i>Celtis</i> , ES	-31,11	-59,35
<u>3329</u>	Arroyo Urquiza - ER	Bosque de <i>Prosopis</i> , PM	-32,34	-58,26
<u>247;248;355</u>	Colón - ER	Pastizal, PM	-32,24	-58,15
<u>21</u>	Concordia - ER	Pastizal, PM	-31,37	-58,00
<u>30</u>	Federal - ER	Bosque de <i>Prosopis</i> y <i>Celtis</i> , ES	-31,01	-58,91
<u>7;9</u>	PN El Palmar1 - ER	Pastizal con <i>Butia</i> sobre suelo rocoso, PM	-31,88	-58,26
S.A.	PN El Palmar2 - ER	Selva Marginal, Río Uruguay, PM	-31,87	-58,22
<u>16</u>	PN El Palmar3 - ER	Selva Marginal, Río Uruguay, PM	-31,86	-58,21
<u>115;117;1623</u>	Intendente Alvear - LP	Pastizal, PI	-35,27	-63,45
<u>122</u>	Rancul - LP	Pastizal, PI	-35,06	-64,68
<u>119</u>	Realicó - LP	Pastizal, PI	-35,04	-64,26
<u>36;170;3335</u>	Lehmann - SF	Pastizal, ES	-31,14	-61,38
<u>2463</u>	Merlo - SL	Pastizal serrano, CH	-32,36	-64,95
S.A.	Villa Elena - SL	Bosque xerófilo serrano, CH	-32,51	-64,97
<u>U2</u>	Punta Ballenas - UR	Pastizal sobre suelo rocoso costero, CS	-34,91	-55,05
<u>U5</u>	Florida - UR	Pastizal sobre suelo rocoso, CS-CN	-33,57	-56,37
<u>U6</u>	Tacuarembó	Pastizal sobre suelo rocoso, CN	-32,74	-56,51
<u>U9.1</u>	Valle Edén - UR	Bosque xerófilo sobre suelo rocoso, CN	-31,82	-56,17
<u>U9.2</u>	Rivera - UR	Pastizal sobre suelo rocoso, CN	-32,74	-56,51
<u>U10</u>	Rocha - UR	Pastizal sobre suelo rocoso, CS	-34,06	-54,19
<u>U12</u>	Arroyo Araujo - UR	Pastizal sobre suelo rocoso, CN	-32,07	-57,80
<u>U14</u>	Treinta y Tres - UR	Pastizal sobre suelo rocoso, CS	-33,27	-54,19

Tabla 1.4: Aislamientos y poblaciones estudiadas de *Bromus auleticus*. Se detalla el origen y coordenadas geográficas junto con una descripción del ambiente de cada una. ^a Los aislamientos subrayados fueron utilizados en algún análisis molecular. ^b Las abreviaturas a continuación del nombre de la localidad corresponden a provincias de Argentina o Uruguay (UR), BA: Buenos Aires, CD: Córdoba, CR: Corrientes, ER: Entre Ríos, LP: La Pampa, SF: Santa Fe, SL: San Luis. S.A.: Sin aislamiento. E-: población libre de endofitos. ^c Clasificación de regiones tomada de Puelo et al. (2004) y de Cabrera (1976) (explicadas más en detalle en el Capítulo 2), PA: Pampa austral, PF: Pampa inundable, PI: PM: Pampa mesopotámica, Pampa interior, PO: Pampa ondulada, CS: Campos del sur, CN: Campos del norte, ES: Provincia del Espinal, CH: Provincia chaqueña.

El tamaño de las poblaciones fue variable, principalmente en la llanura pampeana donde las plantas son altamente rizomatosa, por lo que en algunas poblaciones el número de plantas consideradas no fue mayor a cuatro con distancias entre plantas de hasta 100m. En ambientes serranos, donde las plantas forman matas y el terreno ofrece lugares protegidos del ganado el número de individuos considerados en la población fue mayor.

En 7 de los 71 sitios estudiados, las plantas resultaron estar libres de endofitos *Epichloë* (E-). Estos 7 sitios se localizan en pastizales de llanura o serranos del sudeste de la Provincia de Buenos Aires (Tabla 1.4; Fig. 1.6).

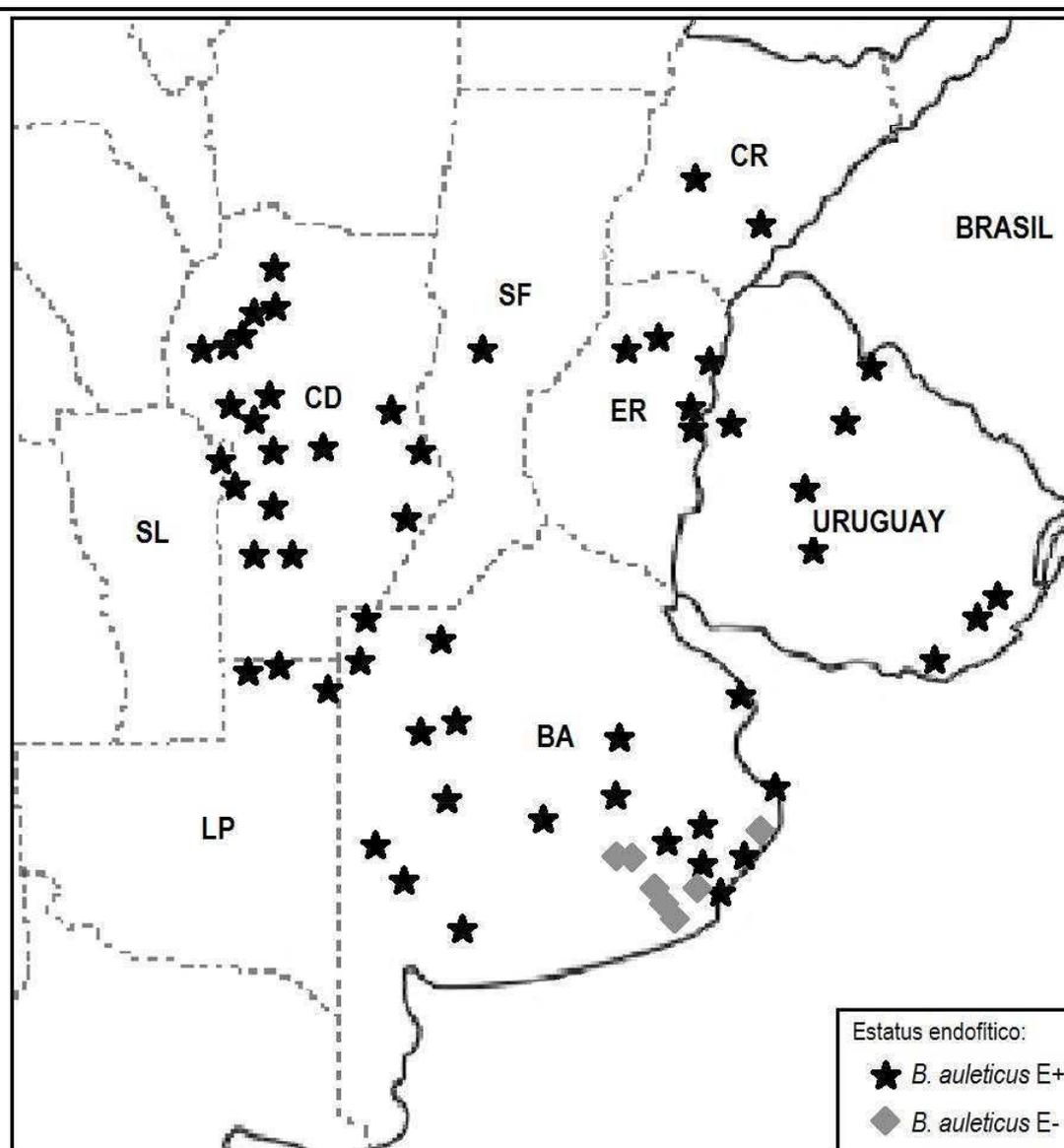


Figura 1.6. Mapa ilustrativo de la ubicación de las poblaciones de *Bromus auleticus* muestreadas durante las campañas del período 2010-2013, junto con la clasificación resultante luego de la inspección bajo MO en busca de endofitos *Epichloë*. (Las poblaciones de Dean Funes, El Palmar y Los Gigantes representadas por un solo punto). Provincias de Argentina, BA: Buenos Aires, CD: Córdoba, CR: Corrientes, ER: Entre Ríos, LP: La Pampa, SF: Santa Fe, SL: San Luis.

Se inspeccionaron bajo microscopio óptico (MO) un total de 216 plantas de *B. auleticus* provenientes de diferentes regiones de la Argentina, resultando 134 asociadas a endofitos *Epichloë* y 58 libres de estos hongos. Las plantas de aquellos sitios que ya habían sido inspeccionados en trabajos anteriores del grupo de investigación y caracterizados como 100% E+ (Iannone et al. 2009) fueron directamente procesadas para el aislamiento de endofitos. Se intentó aislar endofitos de 239 plantas de *B. auleticus* incluyendo, para corroborar el resultado negativo de la inspección al MO, 11 plantas de las poblaciones E-. Se obtuvieron un total de 83 aislamientos de endofitos *Epichloë* de Argentina y se incluyeron 8 aislamientos provenientes de diferentes áreas de Uruguay para la caracterización.

Caracterización molecular:

Análisis filogenéticos:

Calmodulina (*calM*)

Se amplificó el gen *calM* de 52 aislamientos y de 4 endofitos en semilla, obteniéndose para todos los endofitos de *B. auleticus* dos alelos de dicho gen, denominados arbitrariamente alelo 1 y alelo 2, lo que refleja el origen híbrido de todos los aislamientos caracterizados. Por lo tanto, la matriz obtenida del alineamiento constó de 112 secuencias nuevas de endofitos de *B. auleticus*, 18 secuencias de referencia (ver Tabla 1.1 Anexo) y 937 caracteres de los cuales 86 resultaron parsimoniosamente informativos.

El análisis de MP dio como resultado un único árbol de 101 pasos de longitud (Ci=92, Ri=99). El modelo evolutivo utilizado para ML e IB fue K2P (Kimura 2-parámetros). Las topologías de los árboles obtenidos por MP, ML e IB fueron congruentes (Fig. 1.7). En todos los casos se observaron dos grandes clados: el Clado 1 que incluye secuencias de referencia de las especies sexuales *E. festucae*, *E. amarillans* y *E. baconii* y el alelo 1 de todos los endofitos de *B. auleticus* y secuencias de cepas de referencia de Argentina; y el Clado 2 que incluye secuencias de *E. typhina*, *E. typhina* subsp *poae* var *aonikenkana* (la variedad no híbrida, asexual encontrada en Argentina) y el alelo 2 de todos los aislamientos estudiados y secuencias de cepas de referencia de Argentina. Esto indica que los aislamientos de *B. auleticus* analizados corresponden a híbridos interespecíficos. El aislamiento U9.2 (proveniente de Uruguay) sería un híbrido entre un ancestro común a *E. baconii* y *E. amarillans* y *E. typhina*, ya que posee el alelo 1 relacionada con el primero y el alelo 2 con el segundo. Todos los demás endofitos presentaron un ancestro común con *E.*

festucae para el alelo 1 y con *E. typhina* para el alelo 2 por lo que serían híbridos derivados de estas dos especies sexuales.

Dentro del Clado 1 las secuencias del alelo 1 de aislamientos de *B. auleticus* se separaron en 7 grupos o genotipos (denominados 1I a 1VII), ya sea por formar parte de subclados bien soportados, o por agruparse en la base de politomías que contienen secuencias con 100% de homología entre sí (ver Tabla 1.2 del Anexo) y que se diferencian de las secuencias agrupadas en los subclados pero cuya posición filogenética respecto a dichos subclados es incierta (ver Tabla 1.3 del Anexo). Este mismo tipo de subagrupamiento pudo establecerse para las secuencias del alelo 2 contenidas en el Clado 2. En este caso, se separaron en 4 grupos o genotipos para el alelo 2 (denominados 2I a 2IV), y al igual que para el alelo 1, algunos están formados por secuencias que se ubicaron en politomías basales pero que presentan 100% de homología entre sí.

Mediante la combinación del genotipo del alelo 1 con el alelo 2 de cada aislamiento, pudieron establecerse 8 genotipos híbridos denominados A - H. De esta manera el genotipo A corresponde al aislamiento de Uruguay U9.2, híbrido entre un ancestro común de *E. amarillans*/*E. baconii* x *E. typhina*. Los genotipos B y C corresponderían a las especies *E. pampeana* y *E. tembladera* respectivamente, ya descritas en *Bromus auleticus* por incluir secuencias de referencia de cada especie. El establecimiento de los genotipos D, E, F, G y H indicaría la existencia de una diversidad de endofitos mayor a la previamente descrita en Argentina y particularmente en *B. auleticus*. Mientras que los genotipos E, F, G y H constituyen un linaje monofilético para el alelo 2, el genotipo H queda en una politomía basal en el Clado 1 (grupo 1-IV). La filogenia de ambas copias de *calM* del genotipo D lo ubican en una posición indefinida entre *E. pampeana* y los restantes linajes identificados. En la Figura 1.7 se pueden observar los genotipos híbridos (A-H), la variabilidad genética de cada copia reflejada en los subclados observados (1I – 1VII y 2I – 2IV) y el origen geográfico de cada aislamiento.

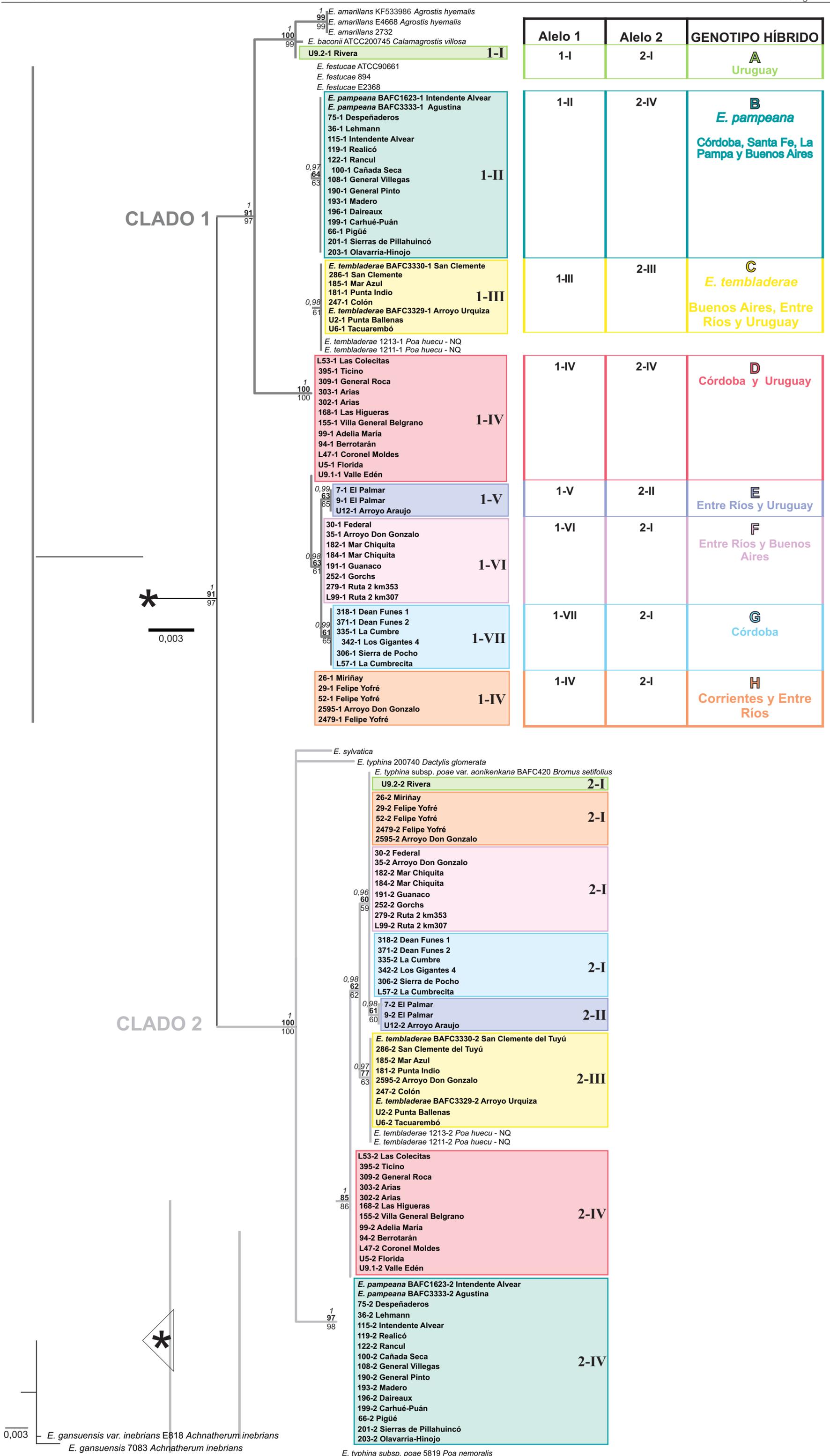


Figura 1.7: Árbol filogenético de aislamientos de *Epichloë* basado en secuencias de ambos alelos del gen *calM*. Los alelos de los aislamientos híbridos están indicadas como 1 o 2. Los aislamientos de *B. auleticus* se muestran en negrita y se informa el origen geográfico. Los recuadros de colores indican en cada copia los aislamientos de igual genotipo híbrido. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap y las probabilidades posteriores (MP=normal, ML=negrita e IB=italica).

Debido a que los *primers* selectivos utilizados para amplificar cada alelo del gen *calM* son complementarios con secuencias ubicadas en distintas partes del gen, las secuencias que se obtienen para el alelo 2 son ligeramente más cortas que las del alelo 1, por lo que los extremos del alelo 1 no pudieron ser utilizados en el análisis filogenético anterior. Por esta razón, se realizaron análisis filogenéticos considerando sólo las secuencias del alelo 1 en toda su extensión. De esta manera se obtuvo una matriz de 963 caracteres con 94 de ellos informativos. El análisis de MP dio un único árbol (L=123, Ci=85, Ri=96) de topología coincidente con los obtenidos mediante ML e IB y que permiten reflejar la presencia de los 8 genotipos establecidos previamente (Fig. 1.8), por lo que los extremos de este gen (correspondientes a regiones exónicas no traducidas) parecen aportar información genética relevante. Además, la información contenida en el extremo 5' no codificante del gen permitió resolver politomías observadas en el Clado 1 del árbol que contiene los dos alelos (Fig 1.7 vs. Fig 1.8).

Presencia y filogenia del gen *idtG*

Mediante la amplificación por PCR del gen *idtG* se obtuvo un fragmento del tamaño esperado para la mayor parte de los aislamientos. La excepción fueron los aislamientos incluidos en los genotipos B (*E. pampeana*) y D de la filogenia del gen *calM*, para los cuales no se obtuvieron productos de PCR (*idtG*-). Este gen fue secuenciado para aislamientos representantes de los diferentes genotipos híbridos (salvo el A) y aislamientos representativos de las especies de endofitos previamente descritas para Argentina, que presentaron el gen. Para ningún aislamiento se obtuvieron dos alelos del gen *idtG*. El alineamiento de las secuencias consenso de cada aislamiento y secuencias de endofitos de otras partes del mundo publicadas en GenBank (consulta 23/2/15) permitió obtener una matriz de 357 caracteres, 30 de los cuales fueron parsimoniosamente informativos y el modelo evolutivo utilizado para ML e IB fue K2+G.

Los árboles filogenéticos de *idtG*, obtenidos mediante análisis de MP (L=48, Ci=70, Ri=97), ML e IB resultaron coincidentes, y en todos los casos las secuencias de endofitos de *Bromus auleticus* se agruparon en dos grandes clados (Fig. 1.9). Uno de los clados incluyó secuencias de la especie sexual *E. festucae*, secuencias de referencia de *E. tembladerae* y secuencias de aislamientos de *B. auleticus* representativos del genotipo C (*E. tembladerae*). El otro clado incluyó secuencias de los genotipos E, F, G y H junto con secuencias obtenidas de la especie no híbrida asexual *E. typhina* subsp. *poae* var *aonikenkana*, asociada a *Bromus setifolius* J. Presl. de Argentina y *Bromus laevipes* Shear de Estados Unidos. Posiblemente, estas secuencias sean derivadas del parental *E. typhina* subsp. *poae*, sin embargo, la

búsqueda de *idtG* mediante BLAST en GenBank o en proyectos genoma de las distintas cepas sexuales de *E. typhina* no arrojó resultados positivos.

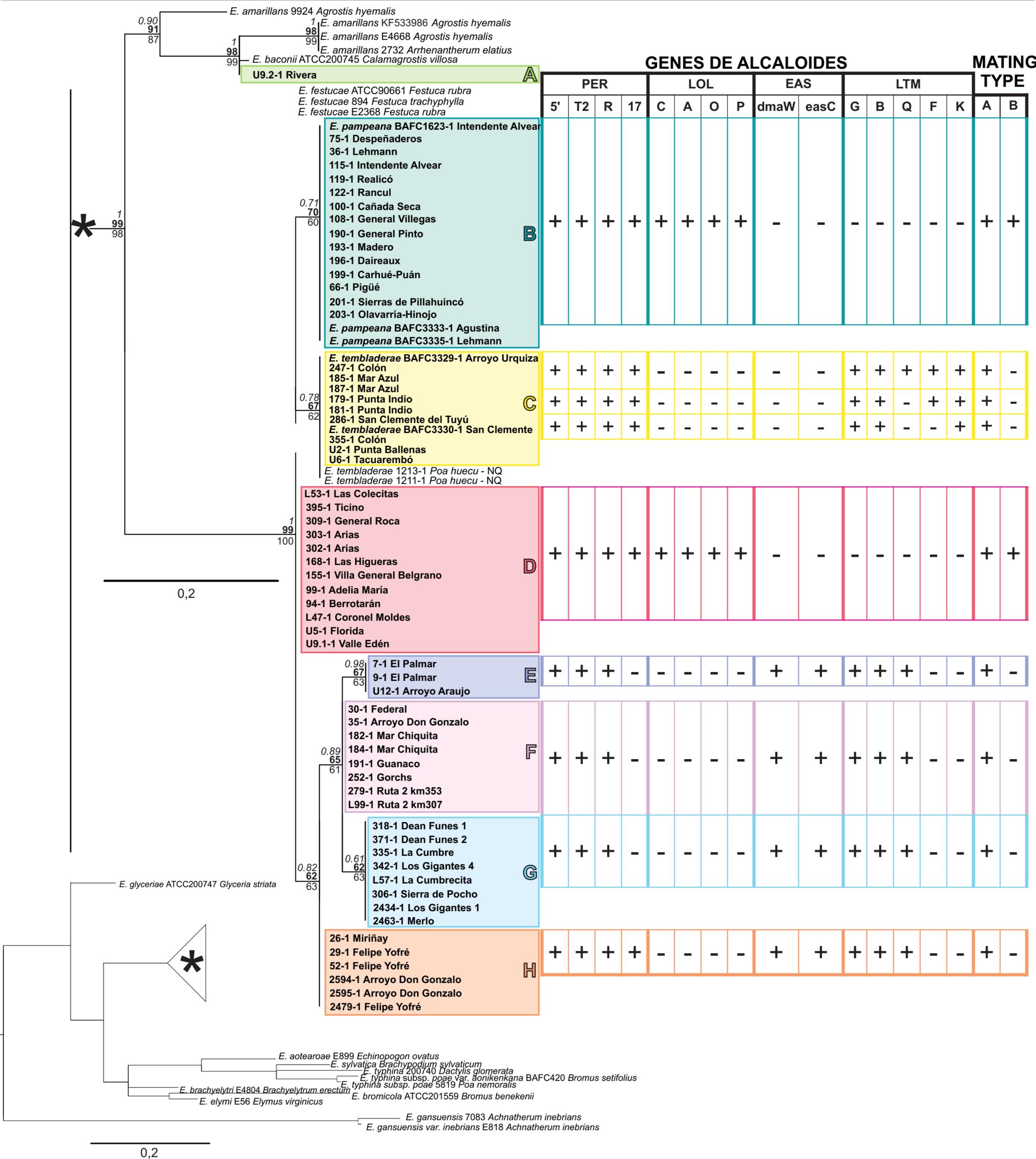


Figura 1.8: Árbol filogenético de aislamientos de *Epichloë* basado en secuencias del alelo1 del gen *calM*. Los aislamientos de *B. auleticus* se muestran en negrita, si son de Uruguay tienen una U antepuesta y se recuadran con los mismos colores que en la figura 1.7 aquellos correspondientes a los diferentes genotipos híbridos. Además, se informa el perfil de genes de alcaloides y mating type. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap y las probabilidades posteriores (MP=normal, ML=negrita e IB=itálica).

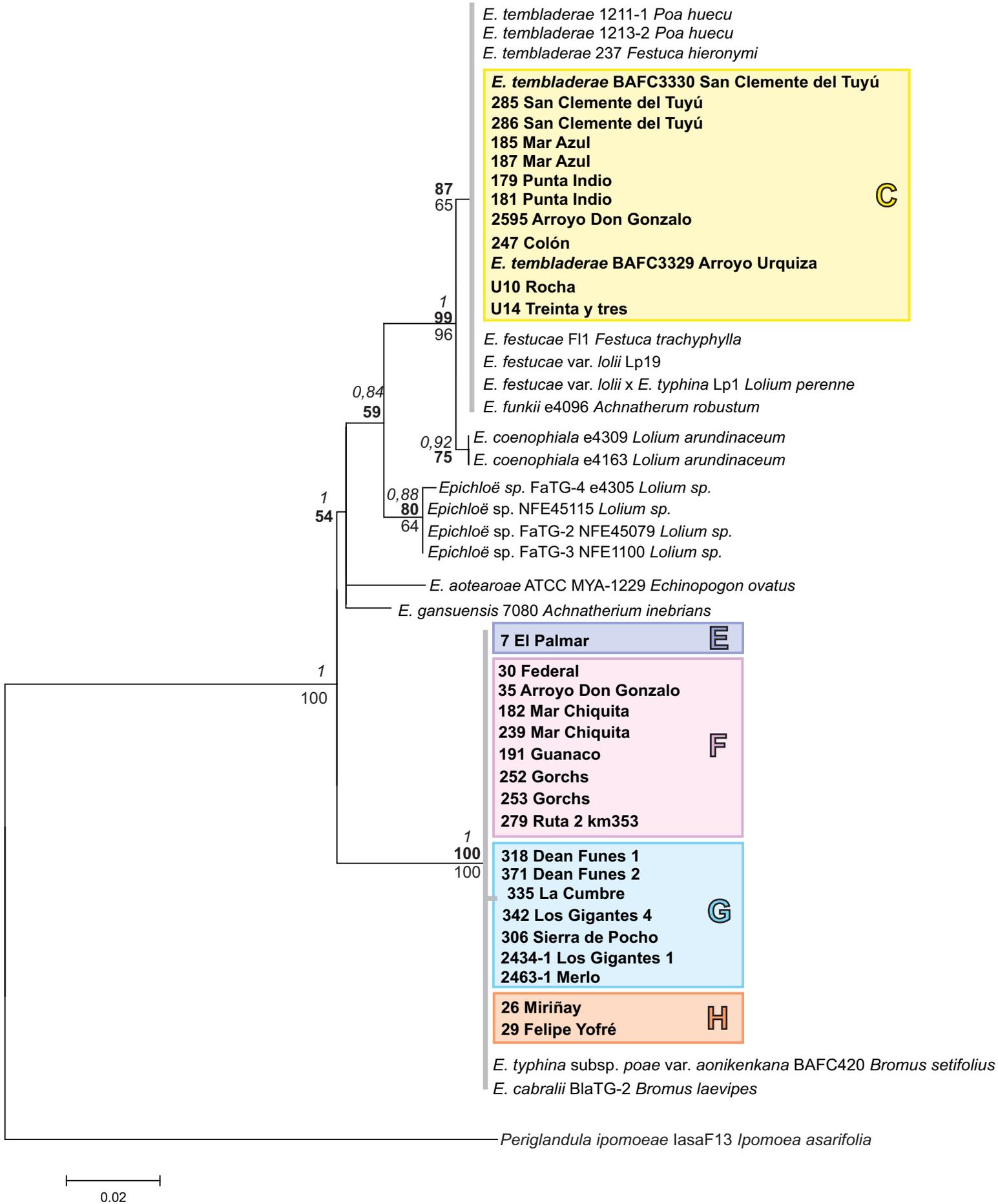


Figura 1.9: Árbol filogenético de ML de aislamientos de *Epichloë* basado en secuencias del gen *idtG*. Los aislamientos de *B. auleticus* se muestran en negrita, si son de Uruguay tienen una U antepuesta y se recuadran con los mismos colores que en la figura 1.7 aquellos correspondientes a los diferentes genotipos híbridos. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap y las probabilidades posteriores (MP=normal, ML=negrita e IB=itálica).

Perfiles de genes de alcaloides y mating type:

Los distintos aislamientos de Argentina (los de Uruguay no fueron incluidos en este análisis) presentaron diferencias en cuanto a la presencia/ausencia de genes de alcaloides y tipo de apareamiento, evaluados mediante PCR multiplex, permitiendo establecer 6 perfiles genéticos diferentes para los endofitos aislados de *B. auleticus* (Fig. 1.8 y 1.10). Todos los aislamientos estudiados fueron negativos para los genes, *easA*, *cloA*, *lpsB*, *easH* involucrados en la biosíntesis de alcaloides del ergot, e *idtJ* e *idtE* constituyentes del cluster 3 de los genes involucrados en la ruta biosintética de lolitrem B. Además, la secuenciación de los genes *lolC*, *dmaW*, *idtG*, *idtM* y *perA* de aislamientos representativos de los 7 genotipos de Argentina (que resultaron positivos para algunos de estos genes) mostró que únicamente en el caso del gen *perA* presentaban dos alelos, al obtenerse electroferogramas con picos polimórficos para ciertos sitios de las secuencias en todos los aislamientos estudiados.

Estos perfiles mostraron correlación con los genotipos establecidos mediante la filogenia del gen *calM*. Los aislamientos considerados *E. pampeana* y el genotipo D presentaron el mismo perfil de genes de alcaloides y *mating type*. En el linaje que incluyó a los genotipos E, F, G y H, se detectaron dos perfiles bastante similares donde el de los genotipos E, F y G difirió levemente del presentado por el genotipo H en cuanto a la presencia en este último de una mutación (detectada por los *primers* per-17bp x perA T2-F) que hace no funcional a uno de los dos alelos del gen *perA*. Los aislamientos incluidos en el genotipo C (*Epichloë tembladera*) presentaron tres perfiles diferentes debido a variaciones en la presencia de genes involucrados en la síntesis de indol diterpenos (Fig. 1.8).

Según estos perfiles (ver Fig 1.8 y 1.5), todos los aislamientos serían productores de peramina y sólo los genotipos B y D serían capaces de sintetizar lolinas, teniendo como compuesto final la N-formillolina (NFL). En cuanto a los alcaloides del ergot, sólo se detectaron dos genes que pertenecen al inicio de la vía de biosíntesis en el linaje compuesto por los genotipos E, F, G y H, que serían capaces de producir chanoclavina-I (CC). Por último, la vía de síntesis de los indol diterpenos es la que presenta mayor variación de presencia-ausencia de genes. Los genotipos B y D no poseen ninguno de los genes evaluados por lo que no producirían precursores de lolitrem B. Los genotipos E – H serían productores de paxilina (PAX) y terpendol-I (TDI) como compuestos finales. Dentro del linaje C encontramos aislamientos (originarios de Arroyo Urquiza, Colón y Mar Azul) que pueden llegar a sintetizar terpendol C (TDC) mientras que tanto los aislamientos de Punta Indio como de San Clemente del Tuyú podrían producir paspalina (PAS).

En cuanto al *mating type*, también se observaron diferencias entre los genotipos (Fig. 1.8). Cinco de los genotipos híbridos establecidos (C, E, F, G y H) presentaron dos alelos para el idiomorfo *matAC* (*mating type A*) detectada por la presencia de picos polimórficos en los electroferogramas (información no mostrada) mientras que los aislamientos incluidos en los genotipos B y D presentaron los idiomorfos *matAC* y *matBA*, indicando que todos los aislamientos también son híbridos con respecto a este carácter.

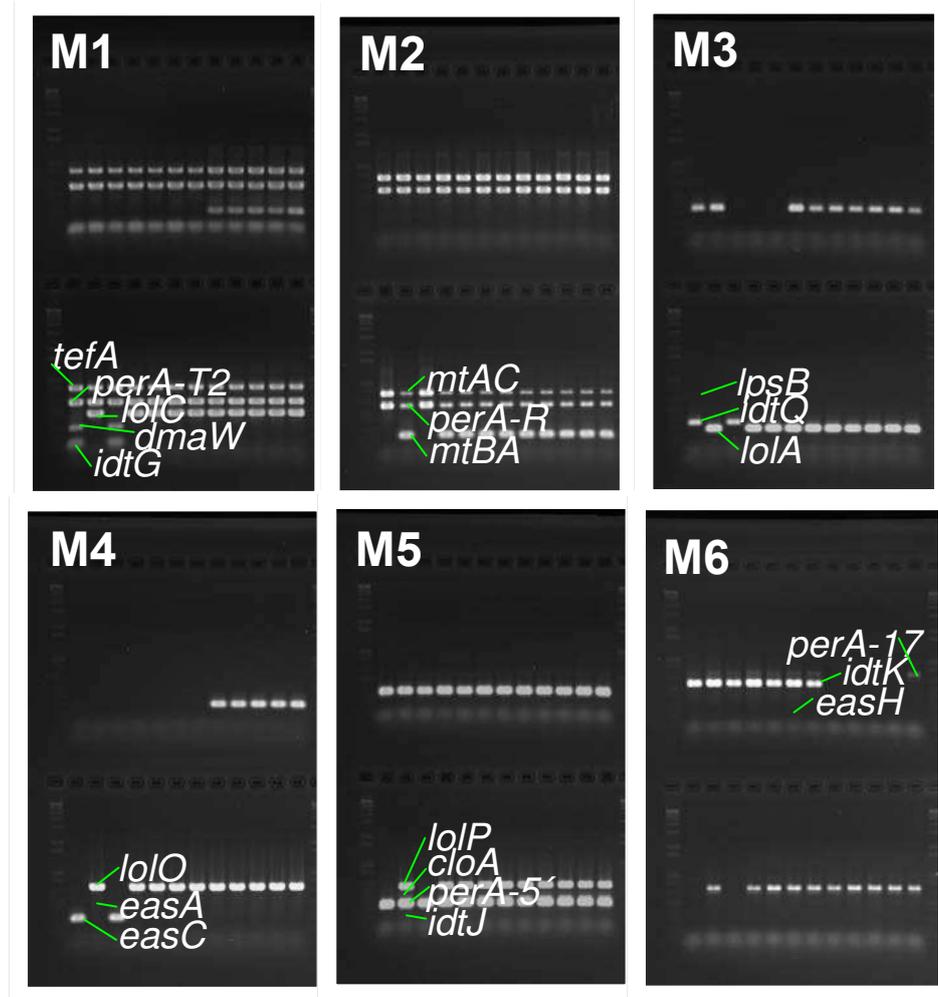


Figura 1.10: Geles de agarosa donde se visualizan los diferentes perfiles de productos de PCR multiplex para endofitos de *Bromus auleticus*.

Caracterización morfológica:

Se caracterizaron morfológicamente todos los aislamientos obtenidos, pudiendo observar que en los casos en los que se examinó más de un aislamiento por población no hubo diferencias morfológicas dentro de ellas.

El genotipo A es el que presenta una mayor velocidad de crecimiento en APG, seguido por el genotipo G (Tabla 1.5). El resto de los genotipos presentan velocidades de crecimiento bastante menores. A pesar de esto, *E. pampeana* sigue siendo el

genotipo asociado a *B. auleticus* más lento en su crecimiento. En la Figura 1.11 se pueden ver el anverso y reverso de las colonias. Siempre son micelios blancos, aunque pueden ser compactos como *E. pampeana* o algodonosos como el genotipo G, con reverso castaño. Generalmente de conidios alantoides, destacándose la forma particular y el modo en que se desprenden los de *E. pampeana*. Algunos conidios del genotipo D se asemejan a los de dicha especie. Se puede ver en la Tabla 1.5, las medidas promedio para cada genotipo híbrido detectado por los análisis filogenéticos del gen *calM* y en la Figura 1.11 imágenes de dichas características.

Genotipo	Diámetro de colonias (mm)	Células conidiógenas (µm)			Conidios (µm)	
		Largo	Ancho base	Ancho ápice	Largo	Ancho
A	23,3±0,6	27,3±1	2,75±0,16	1,28±0,07	8,74±0,16	4,74±0,07
B	7,1±0,2	20,67±0,5	1,86±0,2	1,24±0,04	10,39±0,57	2,14±0,09
C	15,9±0,3	20,37±0,49	1,90±0,04	1,02±0,02	7,09±0,05	3,39±0,02
D	10±0,2	17,64±0,65	1,96±0,06	1,07±0,03	9,14±0,25	2,91±0,04
E	14,8±0,6	24,50±0,69	2,15±0,06	1,10±0,04	9,67±0,17	3,20±0,04
F	16,5±1,1	19,59±0,64	2,06±0,07	1,05±0,03	7,72±0,11	3,12±0,03
G	21,7±0,8	19,42±0,78	2,08±0,08	1,16±0,03	8,83±0,15	3,08±0,03
H	12,9±0,9	13,41±0,49	2,05±0,05	1,08±0,04	8,31±0,11	3,20±0,04

Tabla 1.5: Características de las colonias, células conidiógenas y conidios observados en cada genotipo híbrido de endofito presente en *Bromus auleticus* (media±error estándar).

Consideraciones taxonómicas

Con base en la caracterización realizada, se propone considerar a los aislamientos de los genotipos E, F, G y H como una nueva especie del género *Epichloë* con variabilidad intraespecífica.

***Epichloë platensis* Mc Cargo PD et Iannone, sp. nov. (Fig 1.11B)**

Typus: (BAFCcult 4154 (PMC26)), cultivo en agar papa glucosado. Aislado de lámina foliar de *Bromus auleticus* obtenida de población en la localidad de Miriñay, Corrientes. Etimología: *Epichloë* de la cuenca del Río de la Plata, en referencia a la amplia región geográfica influenciada por esta cuenca fluvial en la cual habitan las plantas asociadas a este endofito.

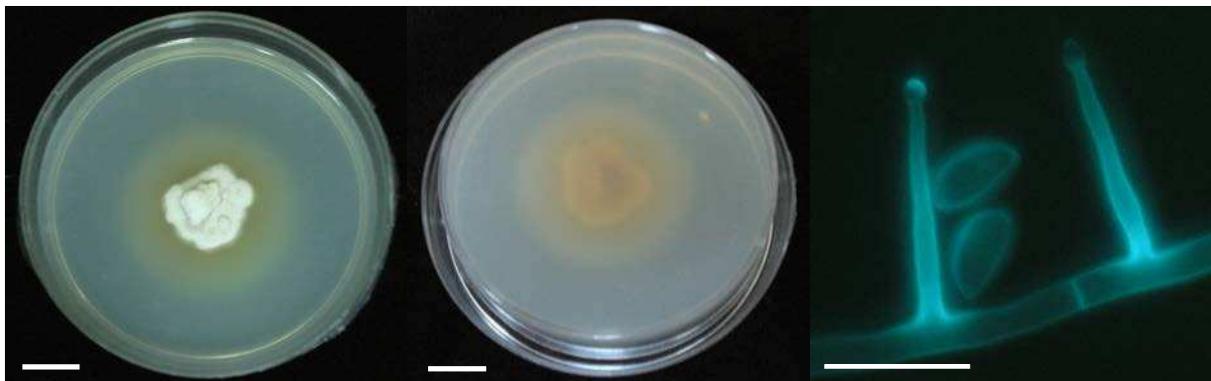
Colonias en APG que alcanzan un diámetro de 12 a 22 mm en 30 días a 24°C en oscuridad. Superficie de la colonia blanca con micelio aéreo blanco, agamuzado a algodonoso y textura compacta a laxa. Reverso de la colonia castaño oscuro. Hifas hialinas 1,5 a 2 µm de ancho. Células conidiógenas terminales o laterales, enteroblásticas, tabique basal ocasionalmente presente. Los conidios son alantoides de tamaños variables con 7,5-10µm de longitud y 3-3,5µm de ancho. Genes de

alcaloides presentes: *perA*, *dmaW*, *easC*, *idtG*, *idtB*, *idtQ*. Presenta un origen híbrido entre *E. typhina* subsp. *poae* var. *aonikenkana* y *E. festucae* de igual tipo de apareamiento (mtAC).

Esta especie se encuentra asociada a poblaciones de *B. auleticus* que se desarrollan en pastizales mesopotámicos de las provincias de Entre Ríos y Corrientes, pastizales de la provincia de Buenos Aires y de las sierras del norte de Córdoba.



Genotipo híbrido A

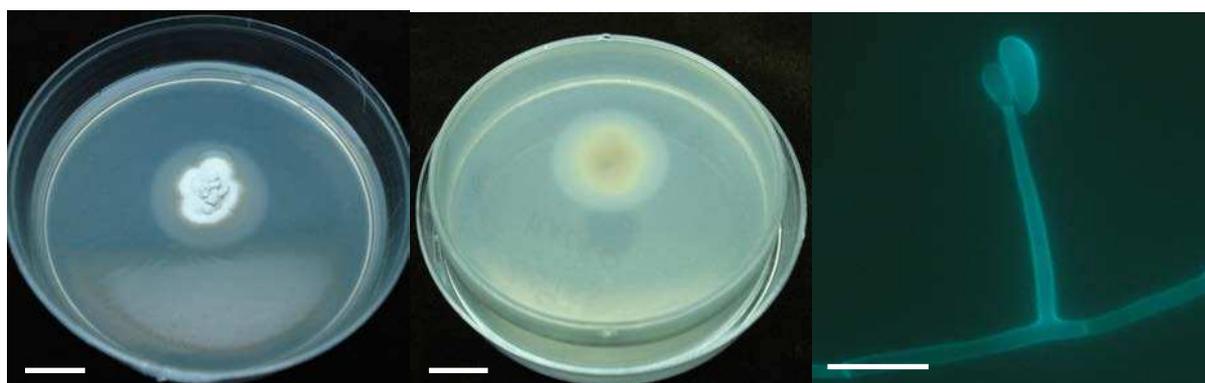
Genotipo híbrido B (*E. pampeana*)Genotipo híbrido C (*E. tembladerae*)

Genotipo híbrido D

Figura 1.11A: Aspecto de las colonias (30 días APGc - barra: 10mm), células conidiógenas y conidios (barra: 10 μ m) de los diferentes genotipos híbridos de endofitos *Epichloë* aislados de *Bromus auleticus* (continúa en la siguiente pag.).



Genotipo híbrido E



Genotipo híbrido F



Genotipo híbrido G



Genotipo híbrido H

Figura 1.11B Aspecto de las colonias (30 días APGc - barra: 10mm), células conidiógenas y conidios (barra: 10 μ m) de los diferentes genotipos híbridos de endofitos *Epichloë* aislados de *Bromus auleticus*.

DISCUSIÓN

Los muestreos realizados han permitido abarcar el área de distribución de *Bromus auleticus* en Argentina y encontrar un número considerable de poblaciones no muestreadas con anterioridad. Sin embargo, a pesar de haber recorrido el área que abarca el norte de Buenos Aires, sur de Entre Ríos y Santa Fe, no fue posible registrar ninguna población en esa zona. Posiblemente, ésto se deba a diferentes factores, como la presencia de las grandes ciudades sumado a que se trata de una zona con una historia agro-ganadera de siglos donde se ven incluso grandes extensiones de banquinas ocupadas por monocultivos y la dispersión del sorgo a los costados de las vías de ferrocarril.

Relevamientos previos indicaron que las poblaciones de *B. auleticus* presentaban siempre un 100% de infección de endofitos (Iannone et al. 2011). A pesar de que no se focalizó en medir estadísticamente este dato, al examinar al microscopio óptico las plantas de las diferentes poblaciones, no todas presentaron tal nivel de infección. Aunque la incidencia de endofitos fue generalmente alta, *B. auleticus* presenta niveles de infección variables entre 0 y 100%, al igual que en otras especies de gramíneas nativas asociadas a endofitos con un área de distribución amplia y de variados ambientes (Iannone et al. 2011). Las poblaciones naturales libres de estos simbioses registradas en esta tesis se encuentran relativamente próximas unas de las otras ocupando un área relativamente pequeña en las sierras de Tandil y Balcarce y sus estribaciones hacia la costa atlántica, lo que resulta sugerente y merece más estudios para evaluar las posibles causas de este patrón de distribución. Sin embargo, se podrían considerar características edáficas y climáticas como posibles influencias sobre el *fitness* de esta gramínea, haciendo desfavorable la asociación en estos ambientes. Considerando que la viabilidad del endofito en semillas de *B. auleticus* es bastante corta (Pérez 2008), y que los potenciales beneficios de la simbiosis dependen de la interacción entre los genotipos de ambos simbioses (Saikkonen et al. 2010), tampoco puede descartarse que las plantas de esta región presenten características genotípicas tales que la asociación con endofitos resulte desfavorable o poco persistente (Bec et al. 2013).

Antes de comenzar esta tesis, sólo se conocía la presencia de dos linajes endofíticos asociados a *B. auleticus*. Los resultados obtenidos mediante la caracterización realizada demuestran la existencia de una mayor diversidad de endofitos *Epichloë* en *B. auleticus* que la ya descrita mediante el empleo de otros

marcadores como *tubB* y *tefA* por Iannone et al. (2009). Además de las dos especies ya conocidas, las filogenias realizadas del gen *calM* han permitido detectar 6 nuevos genotipos híbridos, todos ellos de origen interespecífico. Estos resultados indican una gran utilidad del gen *calM* y los demás marcadores utilizados para el estudio de la diversidad de endofitos.

La filogenia del gen *calM* indica que siete (B-H) de los ocho genotipos de endofitos asociados a *B. auleticus*, son híbridos de parentales *E. typhina* x *E. festucae* con diferentes grados de diferenciación entre ellos. El genotipo B corresponde a *E. pampeana*, especie que se diferencia claramente de los demás endofitos por sus características morfológicas particulares, crecimiento lento y conidios uncinados que no se desprenden de la célula conidiógena. Los genotipos C, E, F, G y H presentaron características morfológicas típicas de los endofitos de pastos, que si bien permiten diferenciar parcialmente estos grupos, no permiten establecer diferencias tan claras como las obtenidas mediante el uso de marcadores moleculares. Más aún, las características morfológicas de los cinco genotipos son coincidentes con las descritas para *E. tembladerae* según Cabral et al. (1999). De esta forma la caracterización molecular y morfológica indican que el genotipo C es *E. tembladerae*, ya que se asocia filogenéticamente a aislamientos de *Poa huecu* Parodi representativos de esta especie. Los genotipos E, F, G y H conforman un linaje diferente que presentaría una considerable diversificación en poblaciones de *Bromus auleticus* del este de San Luis, norte de Córdoba, parte de Buenos Aires, la Mesopotamia y Uruguay. Por esta y demás características analizadas, se propone agruparlos en una nueva especie, *Epichloë platensis*. Sin embargo presentan cierta diferenciación entre ellos, las relaciones filogenéticas parecen estar relacionadas con el origen geográfico de las poblaciones de las que fueron aislados, quedando por definir la existencia de otros niveles taxonómicos.

Resulta interesante la posición de los aislamientos considerados en el genotipo D en los árboles de *calM*, ubicándose en general en la base de politomías entre los otros grupos o junto con *E. pampeana*. Estos aislamientos que presentaron secuencias de *calM* idénticas entre sí tienen características morfológicas intermedias entre *E. pampeana* y *E. tembladerae* y los genotipos E, F, G, H. El genotipo restante (A), sólo representado por un aislamiento originario de Uruguay, presenta una combinación de parentales (*E. amarillans*/*E. baconii* x *E. typhina*) no encontrada en endofitos de *B. auleticus* de la Argentina, pero sí en *Phleum alpinum* (Mc Cargo et al. 2014) y *Hordeum comosum* de la Patagonia (Iannone et al. 2015) (Ver discusión Capítulo 3).

Si bien el número de aislamientos estudiados de cada población es bajo, llama la atención que en general los distintos genotipos están formados por aislamientos de orígenes geográficos cercanos, siendo la excepción el genotipo D que incluyó aislamientos de Córdoba y Uruguay. Únicamente en la población de Don Gonzalo (norte de Entre Ríos) se detectaron endofitos pertenecientes a distintos genotipos (F y H). Ambos genotipos pertenecen a un mismo linaje y el genotipo H fue detectado en una población relativamente cercana (Felipe Yofré) en el sur de Corrientes.

La detección y secuenciación del gen *idtG* permitió agrupar los aislamientos en tres grupos, uno *idtG*⁻ y dos *idtG*⁺ congruentes con los agrupamientos mostrados por *calM*. La filogenia de este gen indica la posibilidad de dos orígenes evolutivos diferentes. Mientras que *E. tembladerae* posee una copia derivada de *E. festucae*, los restantes genotipos *idtG*⁺ (E, F, G y H) heredaron la copia derivada de *E. typhina*.

Las reacciones de PCR multiplex permitieron confirmar la caracterización preliminar previa realizada por Iannone et al. (2012b) con respecto a la ausencia de genes EAS en *E. tembladerae* y *E. pampeana* y la presencia de genes LOL en aislamientos de *E. pampeana*. Pero principalmente, aportaron más evidencias en favor de la diversidad observada en la filogenia de *calM*. Si bien los resultados de las PCR multiplex indican similitudes en cuanto a los perfiles génicos de los distintos aislamientos, no permiten establecer el origen evolutivo de los genes presentes. Sin embargo, permitirían plantear posibles relaciones entre grupos. En este sentido indicarían una relación cercana entre los genotipos B (*E. pampeana*) y D que presentaron perfiles idénticos ya que son los únicos que no poseen genes IDT ni EAS y poseen *mating type* AB. Los genotipos incluidos en el linaje E, F, G y H presentaron un perfil muy similar entre sí, pero con diferencias consistentes con la diversidad observada en la filogenia de *calM*. *Epichloë tembladerae* (C) fue el genotipo que presentó mayor variabilidad en cuanto a esta caracterización, por lo que la quimirotipificación empleada permitió evidenciar la existencia de variabilidad entre aislamientos de *E. tembladerae* asociados a *B. auleticus* no observada mediante el análisis de secuencias del gen *calM*.

Además de su utilidad para estudiar la diversidad de endofitos, la quimirotipificación mediante el análisis de genes involucrados en rutas de biosíntesis de alcaloides representa una herramienta útil para predecir el potencial toxicogénico de los distintos endofitos (Takach et al. 2012; Shymanovich et al. 2014). Este conocimiento es de vital importancia al momento de seleccionar genotipos para su uso en el mejoramiento de especies forrajeras. La caracterización realizada indica que ningún endofito de *B. auleticus* sería capaz de producir lolitrem B ni alcaloides del ergot complejos. Entre los indol diterpenos que podría producir *E. tembladerae* y *E. platensis*, la paxilina y el

terpendol C son levemente tóxicos para ratones pero no parecen tener este efecto en el ganado (Young et al. 2009). En contraposición, todas las cepas producirían peramina, compuesto que protege contra insectos herbívoros (Tanaka et al. 2005). Además, los aislamientos de los linajes B (*E. pampeana*) y D producirían N-formillolina como compuesto final, es decir, que también podrían encontrarse niveles significativos de los intermediarios. Las lolinas difieren en la especificidad contra diferentes estadios del desarrollo y especies de insectos, por lo que se consideran eficientes compuestos anti-insectos (Schardl et al. 2007). Estos resultados habría que corroborarlos mediante análisis de alcaloides en las plantas. La presencia de N-metillolina, N-acetilnorlolina y N-formillolina en plantas de *B.auleticus* asociadas a *E. pampeana* ha sido reportada por Iannone et al. (2012c).

La quimiotipificación realizada mediante la prospección de genes de alcaloides arroja resultados auspiciosos ya que los endofitos caracterizados podrían ser utilizados para la selección y mejoramiento de cultivares de *B. auleticus*. Aquellos que pertenecen a los genotipos B y D son los que presentarían mayores ventajas contra los insectos herbívoros por su capacidad potencial para producir lolinas y peramina, y ser inocuos para el ganado. Además *Epichloë pampeana* (B) y *E. tembladera* (C) han demostrado tener efectos positivos en el crecimiento y resistencia a patógenos fúngicos de sus hospedantes (Iannone y Cabral 2006; Vignale et al. 2013).

En conjunto las metodologías empleadas para caracterizar a los endofitos de esta especie hospedante permitieron evidenciar la existencia de una alta diversidad de endofitos, casi inesperada, considerando que se trata de organismos asexuales cuya reproducción y evolución estaría íntimamente ligada a la de su hospedante. En este sentido hay dos aspectos a resaltar. El primero, en cuanto a estudios recientes de caracterización de endofitos con un amplio número de aislamientos obtenidos de una única especie hospedante, los cuales han revelado diversos genotipos endofíticos en una misma especie hospedante (Oberhofer y Leuchtmann 2012; Mc Cargo et al. 2014). El segundo, se refiere a que en este estudio no se analizó la posible existencia de diversidad genotípica y diferentes variedades de la especie hospedante y cómo ésta podría relacionarse con la diversidad encontrada en los endofitos.

CONCLUSIONES PARCIALES

- La detección de poblaciones de *Bromus auleticus* asociadas a endofitos *Epichloë* en el área de distribución descrita por Gutiérrez y Pensiero (1998) fue exitosa. Ciertas zonas parecen estar muy afectadas por la actividad antrópica y requieren realizar muestreos con una búsqueda más intensiva.
- Debido a las pocas características morfológicas que presentan estos endofitos, el uso de marcadores moleculares es esencial para estudiar la diversidad de endofitos *Epichloë*.
- Los análisis filogenéticos basados en secuencias del gen *calM* de endofitos *Epichloë* de *B. auleticus* permiten revelar una mayor diversidad genética que la detectada con los genes *tubB* y *tefA*. Sería interesante diseñar nuevos *primers* que permitan obtener la secuencia de sus extremos.
- *Bromus auleticus* es hospedante de más linajes de endofitos *Epichloë* que las dos especies descritas hasta el momento, *E. tembladeraae* y *E. pampeana*. Se pueden reconocer al menos seis nuevos genotipos endofíticos para *B. auleticus*: una nueva especie (*Epichloë platensis*) de amplia distribución que presentaría cuatro subgrupos taxonómicos, un genotipo emparentado a *E. pampeana* y un genotipo híbrido de diferentes parentales en Uruguay.
- La información brindada por los genes del tipo de apareamiento y genes de alcaloides (tanto las filogenias como el análisis de presencia-ausencia de ellos) complementan la caracterización de las cepas, siendo congruente con las filogenias del gen *calM*.
- De acuerdo con el perfil de alcaloides predicho por el análisis de genes involucrados en sus síntesis, los endofitos de *B. auleticus* serían adecuados para el mejoramiento de esta especie forrajera nativa, por producir alcaloides con actividad anti-insectos pero ser inocuos para el ganado.

CAPÍTULO 2

Distribución de endofitos *Epichloë* asociados a *Bromus auleticus*

INTRODUCCIÓN

Nicho ecológico:

El concepto del nicho ecológico de una especie ha ido variando y reformulándose a lo largo de la historia, siendo el marco teórico propuesto por Hutchinson (1957) de amplia aceptación. Mediante un enfoque matemático, propone definir el nicho como un hipervolumen, un hiperespacio de n-dimensiones donde se encuentran las variables físicas y biológicas que afectan a la especie. Entonces, se define como nicho fundamental o potencial a la combinación de variables donde la especie puede persistir en ausencia de otras especies. Mientras que, se define como nicho efectivo al subconjunto del nicho fundamental por el efecto de las interacciones interespecíficas, y por lo tanto es donde realmente la especie se podría encontrar. El mayor dilema en el tema es el de las variables involucradas y su modelado (Holt 2009; Soberón y Nakamura 2009). Además de los factores bióticos y abióticos, el espacio geográfico accesible para la especie debido a su historia biogeográfica (dispersión, colonización) es el tercer factor que influye en la presencia de una especie en un área geográfica (Soberón y Peterson 2011). Estos factores interactúan de forma dinámica, siendo relevantes también cuestiones de cambio climático y capacidad evolutiva de las especies para adaptarse a nuevas condiciones a mayores escalas de tiempo, generando la entidad conocida como la distribución geográfica de especies (Soberón 2005).

Modelado de la distribución potencial de una especie:

Los datos de presencia y/o ausencia geográfica de individuos de una especie que suele haber disponibles generalmente no cubren todo el rango de distribución de la especie. El modelado de la distribución potencial de una especie, también conocido como modelado del nicho ecológico de una especie, se basa generalmente en el análisis de posibles asociaciones entre presencia geográfica de una especie y un conjunto de variables (ambientales, biológicas, etc.) para explorar y reconocer patrones, y así poder predecir mecanismos que gobiernan la distribución de las especies (Araujo y Guisan 2006). Es decir, es un instrumento que nos permite analizar la influencia de diversos factores en las poblaciones de una determinada especie y entonces proyectar a nivel geográfico el área potencial que ocuparía dicha especie.

En los últimos años, han surgido diversos programas basados en diferentes algoritmos para modelar la distribución de especies, siendo de gran interés como

herramientas para estudios ecológicos, evolutivos y de conservación. Para poder palear con el problema de la escasa y difícil tarea de obtener datos reales de ausencia de especies, muchos de ellos se basan en datos de presencia únicamente. Entre ellos se destaca un método basado en la máxima entropía conocido como MaxEnt (Phillips et al. 2006), que ha sido comparado con otros y ha demostrado ser capaz de modelar distribuciones geográficas confiables para un gran número de especies con relativamente pocos datos, permitiendo generar hipótesis espaciales en escenarios geográficos distintos en tiempo y espacio (Elith et al. 2006; Pearson et al. 2007). El principio en el que se basa es en encontrar la distribución de máxima entropía (la más uniforme) sujeta a las limitaciones impuestas por la información disponible de datos de presencia y las condiciones ambientales del área en estudio. Es decir, que identifica sitios con ambientes similares a aquellos donde ya se ha registrado la especie como áreas de posible incidencia, generando una imagen de salida continua (de valores entre 0 y 1) con las predicciones de condiciones adecuadas para la especie. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el modelado de distribución potencial es una disciplina relativamente reciente que aún necesita continuar perfeccionando los algoritmos para el análisis con pocos datos geográficos y mejores proyecciones en tiempo y espacio, ya que sus resultados pueden tener múltiples aplicaciones de diferentes impactos (Araujo y Guisan 2006). El resultado de estos análisis se puede utilizar para evaluar el impacto del cambio climático en la distribución de las especies, del riesgo de especies invasoras, identificar áreas de colecta o zonas apropiadas para la conservación de especies entre otros.

Área de distribución geográfica de *Bromus auleticus*:

El área de distribución de esta gramínea incluye los pastizales de la Cuenca del Río de la Plata extendiéndose a la provincia fitogeográfica del Espinal y parte de la provincia Chaqueña (Cabrera 1976; Paruelo et al. 2004) (Fig. 2.1). Se encuentra en áreas templadas con influencia subtropical hacia el norte, con clima bastante variable debido a su extensión. Esta área se caracteriza por un gradiente de precipitaciones de NE a SO, de entre 1500mm/año en el sur de Brasil a 400mm/año en el centro de Argentina. Hacia el norte el verano es la estación más lluviosa, mientras que en el sudoeste se registran precipitaciones máximas en primavera-otoño y mínimas en invierno. En el sur de Brasil y este de Uruguay aumentan las lluvias en invierno. Las heladas son comunes en esta región, siendo más extenso el período de heladas hacia el sur de la región pudiendo ocurrir hasta en primavera. La temperatura media anual aumenta hacia el norte, siendo de entre 14-22°C (Cabrera 1971; Paruelo et al. 2007).

Los pastizales de la cuenca del Río de la Plata pueden dividirse en 7 subregiones. Las cuatro subregiones del norte (Campos del Norte, Campos del Sur, Pampa Mesopotámica y Pampa Ondulada) comparten un bien definido sistema de drenaje con el área al oeste del Río Uruguay sujeta a inundaciones. Se encuentran praderas y estepas con suelos más chatos en los Campos del Sur y de textura más fina en la Pampa Mesopotámica. La composición vegetal es más rica en especies subtropicales hacia el norte (como *Andropogon* o *Axonopus*) y dominada proporcionalmente por gramíneas C3 y C4 en la Pampa Ondulada, aunque toda la región se encuentra afectada por pastoreo o cultivos anuales. La zona de las tres subregiones del sur (Pampa Inundable, Pampa Interior y Pampa Austral), abarca depresiones y serranías. En la Pampa Inundable encontramos las depresiones de las cuencas de los Ríos Salado y Laprida, caracterizada por variaciones topográficas mínimas y parches con alta salinidad en el suelo que son responsables del patrón de mosaico de la vegetación. Encontramos pequeñas elevaciones que nunca se inundan, áreas ocasionalmente inundadas y extensas áreas de tierras bajas regularmente inundadas por varios meses cubiertas de praderas y estepas mesofíticas y halofíticas. En contraposición, en la Pampa Austral se encuentran las Sierras de Tandilia y Ventana (que raramente exceden los 1000m) con áreas arbustivas y el resto de los suelos sedimentarios con vegetación dominada por pastos invernales aunque afectada por la agricultura extensiva. En la Pampa Interior encontramos suelos de textura más gruesa, menos precipitaciones y vegetación menos densa que las otras dos subregiones del sur pero también con historia de pastoreo y agricultura (Paruelo et al. 2007).

En cuanto a la provincia del Espinal, que se extiende como un arco alrededor de las anteriores regiones, presenta llanuras suavemente onduladas, serranías bajas y medanales. Hacia el norte, el clima es cálido y húmedo mientras que hacia el suroeste el clima es más templado y seco. Las precipitaciones varían de 340 mm a 1170 mm/año y la temperatura media anual de 15 a 20°C. En el norte encontramos suelo loessoide (limosos) mientras que hacia el sur aumentan en su contenido arenoso. Dominada por bosques xerófilos (*Prosopis*, *Celtis*, *Scutia*, *Acacia*, *Schinus*, etc), también pueden encontrarse palmares (*Butia*), sabanas y estepas arbustivas y herbáceas (Cabrera 1971; 1976). La región serrana de la provincia fitogeográfica Chaqueña presenta clima continental, cálido, con precipitaciones escasas (500mm/año) y principalmente estivales. La temperatura media ronda los 22°C. La vegetación dominante es el bosque xerófilo alternando con estepas de gramíneas, siendo estos pastizales de altura utilizados para pastoreo (Cabrera 1971).

Dada la variabilidad ambiental presente en el área de distribución de *B. auleticus*, resulta interesante estudiar como la tripartita relación hospedante-endofito-ambiente se refleja en las distribuciones potenciales de sus endofitos.

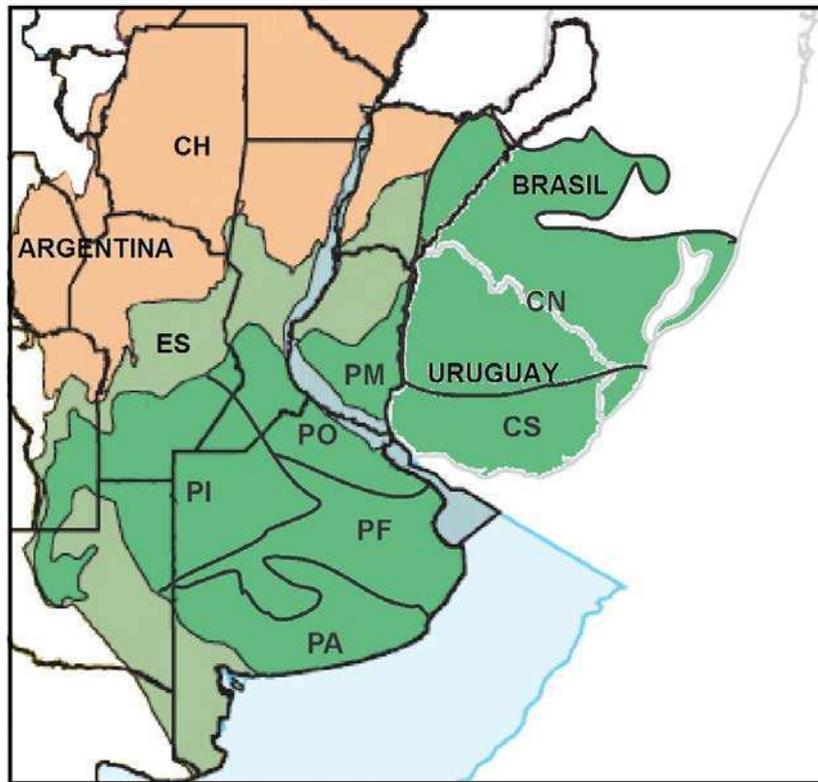


Figura 2.1: Regiones fitogeográficas presentes dentro del área de distribución de *B. auleticus* (modificado de Cabrera (1976); Paruelo et al. (2004)) CH: Provincia chaqueña (naranja); ES: Provincia del Espinal (verde claro); Subregiones: CN: Campos del Norte, CS: Campos del Sur, PA: Pampa Austral, PF: Pampa Inundable PI: Pampa Interior, PM: Pampa mesopotámica, PO: Pampa Ondulada.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Las áreas que resultan más adecuadas para la presencia de los genotipos de endofitos *Epichloë* asociados a *Bromus auleticus* son diferentes entre sí.
- Existen áreas adecuadas para encontrar diferentes genotipos de endofitos de *B. auleticus* en simpatría.
- Los distintos genotipos de endofitos presentes en *B. auleticus* se asocian a distintos ambientes.

OBJETIVOS PARCIALES

- Estudiar la distribución potencial de los genotipos de endofitos descritos en el Capítulo 1 en el área de distribución conocida para *Bromus auleticus*.
- Determinar variables bioclimáticas que influyen en la distribución geográfica de cada genotipo.
- Definir áreas de interés para futuros muestreos más exhaustivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Luego de la caracterización de los endofitos descripta en el Capítulo 1, se agruparon los sitios de las poblaciones de *B. auleticus* de acuerdo al genotipo endofítico con el que se asocia. Se consideraron los genotipos E, F, G y H como un único linaje a modelar debido a los resultados de los análisis filogenéticos de *calM* e *idtG*, y concordante con la propuesta realizada de que pertenecen a una nueva especie. Con el programa MaxEnt 3.3.3k (Phillips et al. 2006) se modelaron las potenciales áreas de distribución de *E. pampeana* (B), *E. tembladera* (C), genotipo D y *E. platensis* (E, F, G y H), utilizándose los datos de presencia junto con variables bioclimáticas y de altitud obtenidas de la base de datos WorldClim (Hijmans et al. 2005). Dichas variables derivan de los valores mensuales de temperatura y precipitación para generar variables biológicamente más significativas, representando tendencias anuales, estacionales y factores ambientales extremos o limitantes. A continuación se detalla la denominación y significado de cada variable:

BIO1 = Temperatura media anual.

BIO2 = Rango de temperatura media diurna (media mensual de (temp. máxima – temp. mínima)).

BIO3 = Isotermalidad (BIO2/BIO7) (* 100).

BIO4 = Estacionalidad de la temperatura (desviación estándar * 100).

BIO5 = Temperatura máxima del mes más cálido.

BIO6 = Temperatura mínima del mes más frío.

BIO7 = Rango de temperatura anual (BIO5-BIO6).

BIO8 = Temperatura media del trimestre más húmedo.

BIO9 = Temperatura media del trimestre más seco.

BIO10 = Temperatura media del trimestre más cálido.

BIO11 = Temperatura media del trimestre más frío.

BIO12 = Precipitación anual.

BIO13 = Precipitación del mes más húmedo.

BIO14 = Precipitación del mes más seco.

BIO15 = Estacionalidad de las precipitaciones (coeficiente de variación).

BIO16 = Precipitación del trimestre más húmedo.

BIO17 = Precipitación del trimestre más seco.

BIO18 = Precipitación del trimestre más cálido.

BIO19 = Precipitación del trimestre más frío.

Las diferentes variables ambientales, en formato de *rasters* o cuadrículas (30 arc-segundos o $\sim 1 \text{ km}^2$ de resolución espacial), fueron recortadas para limitar el modelado al área de distribución de *Bromus auleticus* en Sudamérica. Esto se hizo ya que el programa se basa en los valores ambientales que corresponden a los puntos de presencia utilizados en el análisis para predecir la distribución en el resto del área que se estudie, no resultando por lo tanto significativo extender más allá del área en que el hospedante puede encontrarse. Luego, para cada celda del *raster*, el programa calcula las similitudes entre los valores ambientales en una celda específica y los valores del nicho de la especie modelada. Con esta información, el modelo calcula la probabilidad de la presencia de una especie en cada celda del *raster*, indicando el espacio geográfico que es propicio para cada especie (Phillips y Dudík, 2008), por lo que mostrará áreas ecológicamente similares a aquellas en las que se registró la especie. Las coordenadas geográficas utilizadas para modelar la distribución de cada genotipo fueron las presentadas en la tabla 1.4 en función del genotipo encontrado en cada población.

Se establecieron los parámetros del MaxEnt de forma tal que divida aleatoriamente los datos de presencia en dos subconjuntos, uno con el 75% de los datos de presencia utilizados para entrenar el modelo y otro con el 25% restante para evaluar su capacidad de predicción. Este paso se repitió 100 veces usando un bootstrap cada vez con selección aleatoria de los subconjuntos de datos. Se establecieron 1000 iteraciones como máximo para construir un modelo con un alto poder predictivo (Phillips et al. 2006), con el resto de los parámetros por default (Phillips et al. 2006). El poder predictivo del modelo se evaluó mediante el cálculo del área bajo la curva ROC (AUC), que toma valores de 0,5 para una predicción aleatoria y aumenta cuanto mejor sea (Swets 1988; Phillips et al., 2006). La importancia de cada una de las variables en el modelado se chequeó mediante análisis de jackknife (Phillips et al. 2006). En las figuras se muestran las distribuciones potenciales resultantes utilizando el umbral del 10 percentil de presencia de entrenamiento como límite inferior. Es decir, el valor de probabilidad en el que el 90% de los puntos de presencia estarán dentro del área potencial. El 10% restante de los puntos caerán por fuera del área potencial y son aquellos con un ambiente atípico, no incluidos dentro de los límites del nicho (Phillips y Dudík, 2008). Este concepto supone que los sitios con una probabilidad superior al umbral tienen condiciones climáticas apropiadas para la ocurrencia de la especie, mientras que la especie no ocurriría en sitios por debajo del umbral. Entre más alto sea el umbral, más restringidas las áreas de distribución potencial. Los parámetros aplicados se eligieron basados en que se trabaja con conjuntos de datos de presencia

pequeños, por lo que se optó por tener una estimación conservadora al elegir obtener los promedios de los modelos y predicciones para cada linaje (Pearson et al. 2007; Roscioni et al. 2014).

RESULTADOS

Las áreas resultantes del modelado de la distribución potencial de los diferentes linajes endofíticos asociados a *Bromus auleticus* se muestran, tanto superpuestas como por separado, en la Figura 2.2, los colores empleados para mostrar la distribución de cada genotipo corresponden a los usados en el Capítulo 1, salvo que *E. platensis* se representa en celeste.

El área de distribución potencial de *E. pampeana* (B) (Fig. 2.2.B) se extiende principalmente en el oeste de Buenos Aires, este y noreste de La Pampa y sur de Córdoba, encontrándose un pequeño parche bastante adecuado en los alrededores de la localidad de Dolores (Bs. As.). El modelo de distribución logró una muy buena capacidad predictiva ($AUC_B = 0,924$). Para *E. pampeana*, la variable más informativa por si sola resultó ser las precipitaciones del mes más seco (BIO14), mostrando una relación negativa a partir de los 40mm, mientras que aquella que más afectaba el modelo cuando fue omitida fue la isothermalidad (BIO3), mostrando una correlación negativa aproximadamente lineal dentro de los valores registrados en el área. Esto indica que las regiones con mayor potencialidad para *E. pampeana* son aquellas que presentan bajas precipitaciones en el mes más seco y mayor amplitud térmica. Como áreas altamente adecuadas, se encuentra la más grande en el oeste de la provincia de Buenos Aires (alrededor de la zona de Carhué) y una pequeña cerca del límite de las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Córdoba, aproximadamente por la ciudad de General Villegas.

El área de distribución potencial modelada para *E. tembladera* (Fig 2.2.C) abarca regiones de los tres países en los que se puede encontrar *B. auleticus*, extendiéndose por las diferentes zonas costeras. Alta potencialidad presentan la zona este de la provincia de Buenos Aires y su costa atlántica norte, adentrándose por ambos márgenes del Río de la Plata y zonas de influencia de los cauces inferiores de los ríos Uruguay y Paraná, y toda la costa marítima de Uruguay y el estado Rio Grande do Sul de Brasil, según el modelo con muy buena capacidad predictiva ($AUC_C = 0,947$). Para este genotipo, la altitud resultó ser la variable ambiental primordial en el modelado de su distribución, tanto por la ganancia como por la pérdida por omisión, siendo más favorables las zonas de menor altitud. En este caso, el área más adecuada para encontrar *E. tembladera* en simbiosis con *B. auleticus* se encuentra en el extremo sur de la Bahía de Samborombón.

El modelado del genotipo D (Fig 2.2.D) lo sitúa en el área central de la Argentina y los estados de Santa Catalina y norte de Rio Grande do Sul (Brasil), siendo confiable el poder predictivo del modelo ($AUC_D = 0,858$). La estacionalidad de las precipitaciones (BIO15) resultó ser la variable que más aportó al modelado y cuya exclusión más afectó al modelo, presentando una correlación positiva. Este genotipo presenta las más extensas áreas de distribución potencial para encontrarlo en simbiosis con *B. auleticus*. Si bien las áreas más apropiadas para la distribución de este genotipo se encuentran en las estribaciones de la Sierra de Comechingones de Córdoba, norte de San Luis y en el extremo norte del estado de Santa Catalina, las llanuras del sur y este de Córdoba resultaron altamente adecuadas.

En cuanto al modelado de *E. platensis* que incluye los genotipos E, F, G y H (Fig. 2.2.E), de buen poder predictivo ($AUC_{E, F, G \text{ y } H} = 0,951$), se puede observar que el resultado es un conjunto de áreas con diferentes niveles de aptitud, reflejo de que los genotipos detectados en este linaje se encuentran en áreas dispersas. Los distintos genotipos de este linaje pueden encontrarse en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, San Luis y Santa Fe, extendiéndose hasta Uruguay y Brasil en zonas limítrofes. Para este linaje, se observa que la altitud es la variable más importante, con preferencias por tierras bajas o zonas que no superen los 1000msnm. La estacionalidad de las temperaturas (BIO4) también es una variable altamente influyente en el modelado de la distribución de este linaje, con preferencia por valores intermedios. Según el modelo, las áreas óptimas para este linaje se restringen a las sierras del norte de Córdoba y el norte de Mar del Plata y sus alrededores. Los gráficos del jackknife para los modelos de los diferentes genotipos se muestran en el anexo (Tablas 2.1 del Anexo).

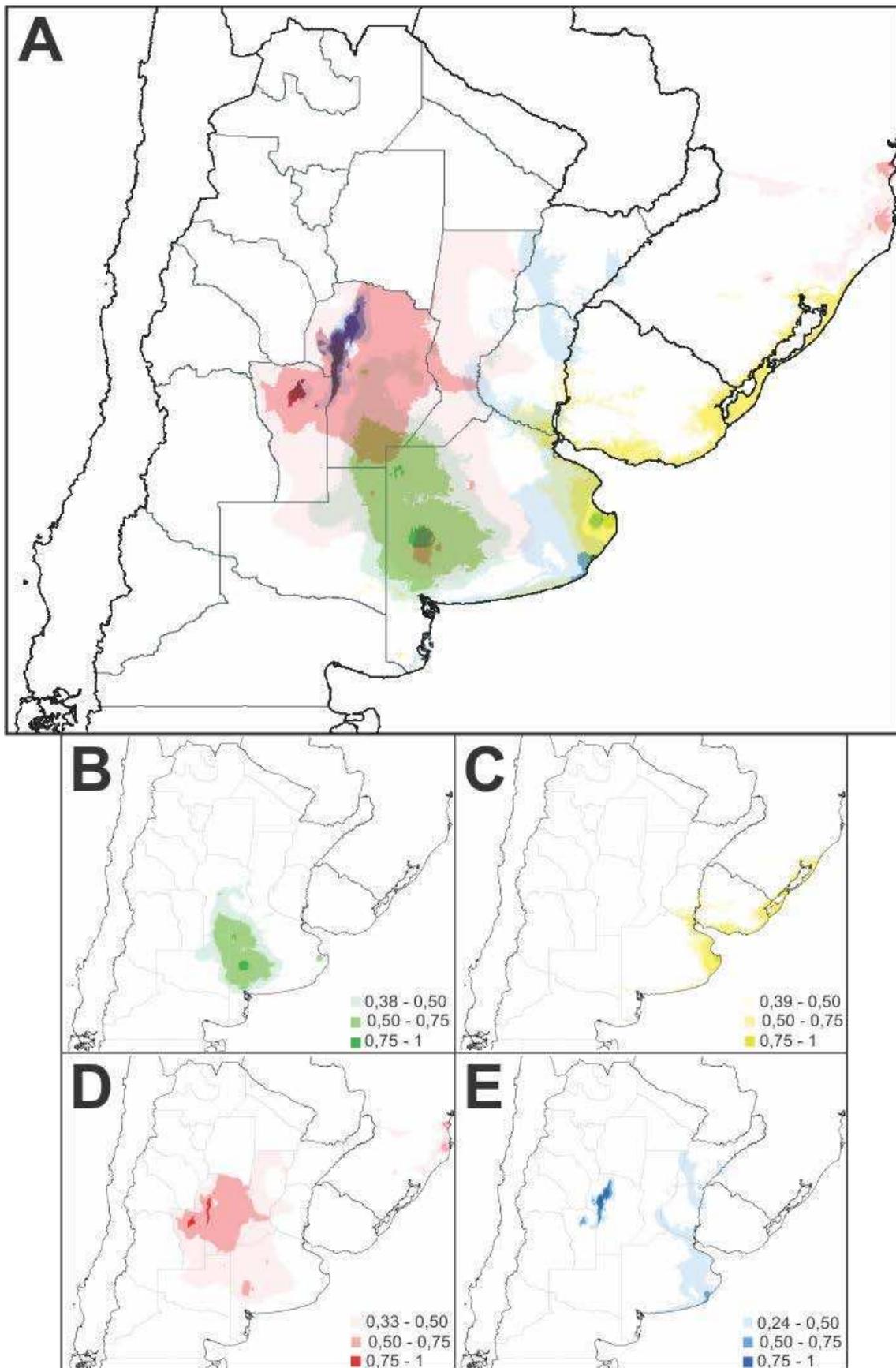


Figura 2.2: Mapas con las áreas de distribución potencial de los linajes *Epichloë* asociados a *B. auleticus*, cuanto más oscuros los diferentes colores más adecuado el área para ese linaje. A: Todos los linajes superpuestos, B: *E. pampeana* o genotipo B, C: *E. tembladera* o genotipo C, D: genotipo D, E: *E. platensis* o genotipos E, F, G y H.

DISCUSIÓN

La persistencia de la asociación simbiótica entre una gramínea y su endofito depende del genotipo de ambos simbioses y del efecto que las condiciones ambientales ejercen sobre el balance beneficio-perjuicio que la asociación tiene sobre la asociación y sobre cada simbiote (Saikkonen et al. 2010; Davitt et al. 2011). El área de distribución de *Bromus auleticus* abarca ambientes con condiciones climáticas diversas, por lo que la asociación simbiótica con los diferentes genotipos de endofitos caracterizados en el Capítulo 1 puede estar relacionada con las condiciones reinantes en el área donde cada genotipo fúngico se encuentra. Debido a que en estas asociaciones el éxito (capacidad de reproducción) del endofito depende de la supervivencia y éxito reproductivo del hospedante, el área de distribución de cada sistema *B. auleticus*-genotipo fúngico puede estar relacionada con los beneficios que el endofito involucrado le confiere a las plantas hospedantes ante las condiciones ambientales imperantes en el área de distribución. Además, dados los beneficios que se conoce que la asociación con estos endofitos puede brindarle a su hospedante respecto a estreses bióticos y abióticos es esperable que se observen diferencias en las áreas de distribución, ya sea entre plantas libres de endofitos y aquellas infectadas como entre las diferentes combinaciones de simbioses (Afkhami et al. 2014).

El modelado de las áreas de distribución potencial de los distintos endofitos detectados en asociación con *B. auleticus* permitió en muchos casos predecir posibles áreas de distribución de los genotipos detectados en el Capítulo 1 en regiones no estudiadas o donde no se hallaron poblaciones del hospedante durante esta tesis. Los resultados indicaron además que el área central para cada genotipo endofítico, en general, no se superpone con la de otros linajes.

Las áreas que resultan altamente adecuadas para la presencia de *E. pampeana* se encuentran principalmente en la región de la Pampa Interna pero extendiéndose hacia la Pampa Austral y la región oeste de la Pampa Inundable. Esta región se caracteriza por sus bajas precipitaciones en invierno, por lo que las precipitaciones del mes más seco sin duda pueden considerarse un factor de importancia para el balance de la simbiosis, posiblemente resultando favorable en condiciones de sequía como se ha registrado para otros sistemas (Malinowski y Belesky 2000; Oberhofer et al. 2013).

Las zonas costeras de Argentina principalmente en la Pampa Inundable, Brasil y Uruguay resultaron adecuadas para *E. tembladerae* (genotipo C), viéndose

fuertemente influenciada de forma negativa por la altitud y en menor medida por la poca variación estacional de las precipitaciones.

El genotipo D se extiende por las regiones de ecotono entre la Pampa Interna, el Espinal y la región Chaqueña, es decir que se distribuiría preferentemente en el área continental de la distribución de *B. auleticus*, con una preferencia por la estacionalidad de las precipitaciones, en contraposición al genotipo C.

El área de distribución potencial obtenida para el linaje comprendido por los genotipos E, F, G y H, posee la altitud como variable de importancia, con preferencias por leves depresiones o hasta zonas de elevaciones próximas a los 1000msnm, razón por la que su área coincide en su mayoría con la Pampa Inundable o zonas bajas de la Pampa Ondulada y Mesopotámica pero sería altamente adecuada el área de las sierras cordobesas y con buena tolerancia a la estacionalidad de las temperaturas.

Se puede observar que los genotipos B y D se vieron influenciados por variables climáticas relacionadas a las precipitaciones principalmente. Si bien la altitud parece describir la distribución de los linajes *E. tembladerae* y *E. platensis* la forma en que lo hace resulta contradictoria, principalmente en el linaje *E. platensis*. Posiblemente otros factores ambientales de tipo edáfico (pH, tipo de suelo) o biológico (comunidad vegetal, presencia de herbívoros) estén afectando a la distribución de estos linajes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que variables edáficas y características de la comunidad vegetal también pueden estar moldeando el área de distribución de los diferentes simbiontes, como se ha observado que estas características influyen en las incidencias de endofitos registradas en poblaciones con gradientes ambientales de este tipo (Novas et al. 2007; Iannone et al. 2012a). Por lo que, sería interesante incluir *rasters* de estos datos en futuros modelados y así buscar otras variables de igual o mayor relevancia. Otro factor a tener en cuenta en el modelado de las áreas de distribución de *E. tembladerae* y *E. platensis* es que dentro de cada linaje presentan distintos genotipos, cada uno de los cuales podría estar asociados a características ambientales diferentes. Por lo que, resulta necesario obtener un mayor número de datos (poblaciones) de cada linaje para poder modelar su distribución en forma independiente.

Si bien es posible encontrar áreas de potencial simpatria entre distintos linajes, los resultados sugirieron que cada genotipo se asocia a condiciones bioclimáticas particulares. Además debe destacarse que aún cuando las áreas centrales para algunos genotipos puedan coincidir, este resultado se debe al modelado y no a la presencia de aislamientos de un genotipo obtenidos en el área más probable de otro

genotipo. Estos resultados podrían deberse a que el número de aislamientos caracterizados genéticamente de cada población no fue lo suficientemente alto como para evidenciar la presencia de más de un genotipo por población. Sin embargo, los genotipos que presentan mayores áreas potenciales de superposición (*E. pampeana*, genotipo D y *E. platensis*) pueden ser fácilmente identificables por su morfología y en ningún caso los aislamientos obtenidos (no caracterizados genéticamente) de una misma población presentaron características morfológicas que los asociara a distintos genotipos. Sin embargo, posiblemente un muestreo más exhaustivo permita encontrar poblaciones de *Bromus auleticus* infectadas con más de un genotipo de endofito, como la zona altamente adecuada para D y G de las sierras de la provincia Chaqueña. La presencia de diferentes endofitos en una misma población es un hecho frecuente y ha sido detectada en *Hordelymus europaeus* en el norte europeo y en *Bromus setifolius* donde cohabitan plantas asociadas a una especie híbrida y otra haploide (Oberhofer y Leuchtmann 2012) o en *Phleum alpinum* donde pueden encontrarse dos especies híbridas (Mc Cargo et al., 2014).

Dada la amplitud en el área de distribución, la alta variabilidad genética y morfológica que puede observarse entre y dentro de poblaciones de *B. auleticus*, también es necesario completar estos análisis con la caracterización molecular de cada población del hospedante. De esta manera, podrá establecerse si cada linaje de endofitos se asocia a un linaje de la especie hospedante cuya distribución geográfica puede estar también afectada por características ambientales. Dada la complejidad de estas simbiosis, donde los efectos en la planta hospedante pueden variar frente a condiciones ambientales y al genotipo del endofito, conocer la diversidad genética del componente vegetal resulta imprescindible para poder explicar en que forma patrones de distribución del endofito responden a efectos del ambiente sobre el endofito, sobre el hospedante o sobre la combinación de ambos.

Además, el intenso laboreo y pastoreo que el hombre desarrolla en la mayoría de estas regiones pueden estar influenciando la distribución de las diferentes combinaciones gramínea-endofito, debido a los cambios en diversos aspectos del ambiente que estas actividades generan. La actividad agro-ganadera muy probablemente ejerza y haya ejercido fuerzas de selección en los diferentes ambientes de acuerdo al uso que se le dé a la región, tanto por los beneficios que puede traer esta asociación frente a estreses bióticos y abióticos como por su plasticidad ante los grandes cambios que generan el avance de diferentes actividades antrópicas como son la urbanización, plantaciones forestales, monocultivos y pastoreo.

En cuanto a la relación entre áreas de distribución predichas para cada linaje se puede observar que el área más adecuada para el genotipo *E. platensis* se encuentra en gran parte superpuesta con las áreas de mayor e intermedia potencialidad para el genotipo D (Fig. 2.1.A). Al tratarse de la zona serrana de Córdoba, se podría decir que se está describiendo la distribución del genotipo D en relación con G. Analizando la distribución del genotipo D con respecto a *E. pampeana* (B), se puede ver que la mayoría del área de B forma parte del área descrita para D, aunque siendo poco adecuada para D; y que el área más adecuada para B coincide con un área bastante apta para D. Respecto a la relación de la distribución de C con respecto a E, se puede ver que la primera está más restringida a zonas costeras y la segunda a las zonas circundantes a C con excepción de la bastante alta idoneidad de la costa bonaerense próxima a Mar del Plata. También se observa que el parche de la distribución de B por el área de Dolores se superpone con la distribución de C, siendo áreas medianamente adecuadas para ambas especies.

Sería también interesante contar con la posibilidad de extender los muestreos en los límites de la distribución de esta forrajera nativa, por ejemplo hacia el límite de Córdoba con Santiago del Estero y norte de Santa Fe en busca de endofitos asociados a esta gramínea en climas más templados. Debido al carácter mutualista que las asociaciones *B.auleticus-Epichloë* spp. han demostrado tener en diversos experimentos (Iannone y Cabral 2006; Iannone et al. 2012c; Vignale et al. 2013), existe la posibilidad de que esta simbiosis confiera una mayor resistencia a la sequía expandiendo el área de distribución de este hospedante a regiones más áridas, como fue demostrado para el congénere *Bromus laevipes* (Afkhami et al. 2014).

CONCLUSIONES PARCIALES

- Los endofitos asociados a *B. auleticus* muestran distribuciones potenciales predominantemente no superpuestas, como lo observado hasta el momento.
- Variables ambientales relacionadas con el régimen de precipitaciones y la altitud fueron las más influyentes para los diferentes modelos. Sería necesario incluir variables edáficas o de comunidad vegetal que ya fueron descritas como importantes en la incidencia de endofitos.
- Dada la amplitud en el área de distribución de *B. auleticus* es necesario completar los análisis de distribución de los diferentes linajes endofíticos con la caracterización molecular de cada población del hospedante.

CAPÍTULO 3

Análisis de endofitos *Epichloë* asociados a gramíneas simpátricas y alopátricas con *Bromus auleticus* - Evidencias filogenéticas de transmisión horizontal.

INTRODUCCIÓN

Las especies *Epichloë* están especializadas en la asociación con gramíneas C3. La asociación endofito-gramínea requiere una estrecha coordinación de los ciclos de vida de ambos organismos involucrados (Leuchtman 1993; Schardl et al. 1997). Es por esto que se los considera buenos modelos para el estudio de procesos evolutivos en los que se refleje un alto grado de especificidad y análisis filogenéticos que muestren la coevolución con sus hospedantes y posible coespeciación (Vienne et al. 2013). Sin embargo, no todos los sistemas estudiados muestran tal estrecha relación en sus filogenias, planteando la existencia de transmisión horizontal incluso con saltos a diferentes hospedantes. A pesar de que diversos investigadores han observado estructuras reproductivas asexuales en el filoplano, sólo en los años recientes se han encontrado sistemas gramínea-endofito asexual que presentan transmisión entre plantas vecinas (Tadych et al. 2014).

La búsqueda de especies de gramíneas nativas asociadas a endofitos del género *Epichloë* es relativamente reciente en Argentina. A pesar de ello, se han analizado diversas especies de pastos originarias de variadas regiones geográficas, dando como resultado el hallazgo de 36 especies pertenecientes a 7 géneros (*Briza*, *Bromus*, *Festuca*, *Hordeum*, *Melica*, *Phleum* y *Poa*) asociadas únicamente a especies asexuales de dichos endofitos (Iannone et al. 2011; Iannone et al. 2012b). La caracterización morfológica y molecular de estos endofitos permitió describir 5 linajes, cuatro de los cuales son el resultado de la hibridación interespecífica derivada de especies sexuales que no se han encontrado en Sudamérica (Cabral et al. 1999; Gentile et al. 2005; Iannone et al. 2009; Mc Cargo et al. 2014; Iannone et al. 2015):

- *E. typhina* subsp. *poae* x *E. festucae* = *E. tembladera* y *E. pampeana*
- *E. typhina* x ancestro común de *E. amarillans* y *E. baconii* = *E. cabralii* y 1 aislamiento de *H. comosum*
- una variedad haploide = *E. typhina* subsp. *poae* var. *aonikenkana*

Con el aumento de estudios de la diversidad de endofitos de diferentes partes del mundo, particularmente en gramíneas nativas silvestres, se han registrado sistemas donde una especie hospedante está asociada a diversos endofitos y una especie endofítica está infectando más de una especie de hospedante (Oberhofer y Leuchtman 2012). En la Argentina, los linajes de endofitos *Epichloë* descritos hasta el momento parecen conservar la especificidad característica, encontrándose en su

mayoría asociadas a una única especie hospedante. La excepción la constituye *Epichloë tembladera*, que se ha registrado asociada a muchas especies de gramíneas que incluso pertenecen a diversos géneros. Dicha especie endofítica fue descrita por primera vez por Cabral et al. (1999) asociada a *Festuca argentina* (Speg.) Parodi, *F. hieronymi* Hack y *Poa huecu* (Speg.) Parodi con propiedades toxicogénicas. Desde entonces se ha encontrado asociada a 15 especies hospedantes más, aparentemente inocuas para el ganado, los cuales son *Briza paleopilifera* Parodi, *Bromus auleticus* Trin ex Nees, *Bromus brachyanthera* Doell, *Bromus setifolius* J. Presl, *Festuca magellanica* Lam, *Hordeum comosum* J. Presl, *Melica stuckertii* Hack, *Phleum alpinum* L., *Poa bergii* Arech, *Poa bonariensis* (Lamb.) Kunth, *Poa calchaquiensis* Hack, *Poa durifolia* Giussani Nicora & Roig, *Poa lanuginosa* Poir. y *Poa ligularis* Nees (Iannone et al. 2011; Iannone et al. 2012b; Iannone et al. 2015) e incluso a *Festuca arizonica* Vasey en Estados Unidos (Moon et al. 2004). Todos estos hospedantes habitan ambientes con diversas características climáticas, edáficas y biogeográficas, haciendo de *E. tembladera* una especie prácticamente ubicua en Argentina. Por lo que, estas observaciones generan muchos interrogantes en cuanto a su origen, evolución y posibles modos de transmisión.

HIPÓTESIS PARCIALES

- Existen diversas especies de gramíneas asociadas a endofitos *Epichloë* spp. que habitan en simpatría con *Bromus auleticus*.
- Se detecta una baja variabilidad genética con los marcadores moleculares analizados entre los endofitos asexuales del género *Epichloë* de una misma comunidad. Esto se debe a que existe transmisión horizontal entre diferentes especies de gramíneas simpátricas.
- *Epichloë tembladera* se encuentra asociada a diversas gramíneas de una misma comunidad debido a que puede presentar transmisión horizontal.

OBJETIVOS PARCIALES

- Explorar el área de distribución de *Bromus auleticus* en busca de poblaciones donde habita en simpatría con otras especies de gramíneas asociadas a endofitos *Epichloë* spp.
- Lograr aislar endofitos *Epichloë* spp. de hospedantes simpátricos a *B. auleticus*.
- Estudiar la diversidad de endofitos *Epichloë* aislados de estas otras especies hospedantes mediante análisis filogenéticos de los genes nucleares calmodulina (*calM*) e indol di-terpeno M (*idtM*), y su caracterización morfológica.
- Obtener perfiles genéticos de cepas de *Epichloë* aisladas de los diferentes hospedantes mediante la evaluación de la presencia de genes pertenecientes a las rutas de biosíntesis de los indol diterpenos, alcaloides del ergot, lolinas y peraminas y *mating type*.
- Estudiar las relaciones filogenéticas entre endofitos de *Bromus auleticus* y de otras especies hospedantes de una misma comunidad para detectar relaciones que permitan evidenciar eventos de transmisión horizontal entre ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de potenciales hospedantes de endofitos *Epichloë*:

Simultáneamente al muestreo de *Bromus auleticus*, descrito en el Capítulo 1, se recolectaron otras gramíneas potenciales hospedantes de endofitos *Epichloë*. En cada sitio muestreado, dependiendo de la disponibilidad, se recolectaron aproximadamente otras 25 plantas repartidas entre especies de gramíneas que se encontraran en simpatria. Dichas gramíneas también se recolectaron en sitios donde no se encontró *B. auleticus*, pero que corresponden a su área de distribución (Gutiérrez y Pensiero 1998), para complementar el análisis de la diversidad genética endofítica y su evolución. Las plantas asociadas a endofitos fueron determinadas con base en sus características morfológicas utilizando claves dicotómicas de gramíneas (Zuloaga et al. 2012).

Caracterización de los endofitos:

Para la detección de endofitos en las plantas, su aislamiento y caracterización morfológica y genética se siguieron las mismas técnicas y análisis que se describieron en detalle en el Capítulo 1, sección de Materiales y Métodos. La selección de aislamientos a estudiar se basó en priorizar el análisis de endofitos aislados de gramíneas simpátricas a *B. auleticus* y por lo menos un aislamiento de los otros hospedantes alopátricos en el territorio argentino, disponible en la colección de cultivos del laboratorio.

En los análisis filogenéticos del gen *calM* se utilizaron las secuencias de endofitos aislados de *B. auleticus* del Capítulo 1, secuencias de referencia y secuencias de endofitos aislados de otros hospedantes de Argentina (de algunos de los cuales ya se contaba con ADN en el laboratorio), tanto del área de distribución de *B. auleticus* como del resto del territorio. La única modificación que se hizo con respecto a los estudios realizados en el Capítulo 1 fue realizar análisis filogenéticos del gen *idtM*, en lugar de *idtG*, ya que el fragmento amplificado es más largo y podría resultar más informativo (Tabla 3.1). Este gen codifica una monooxigenasa FAD-dependiente involucrada en la síntesis de indol diterpenos (Young et al. 2009).

Gen	Primer	Secuencia (5–3')	Uso	Tamaño(bp)
<i>idtM</i>	<i>idtM-F</i>	GCGACTTCAAGGTAATAATCGTGG	A y S	1551
	<i>idtM-R</i>	CATCCTACAAAGCTTGGTCTATT	A y S	
	<i>ltmM-158</i>	GTGATCGGTGCTGACGGGGTCCA	S	

Tabla 3.1: Primers utilizados para las reacciones de amplificación por PCR del gen *idtM*, para secuenciación y posterior análisis filogenético (tomado de Charlton et al. (2014)). A: amplificación y S: secuenciación.

RESULTADOS

Se recolectaron ejemplares pertenecientes a los géneros *Briza*, *Bromus*, *Calamagrostis*, *Danthonia*, *Elymus*, *Festuca*, *Melica*, *Poa*, *Polypogon* y *Stipa* como hospedantes potenciales de endofitos *Epichloë* spp. dentro del área de distribución de *B. auleticus*. Luego de la inspección bajo el microscopio óptico, se estableció que en 20 de los 71 sitios descritos en el Capítulo 1 donde se encontró *B. auleticus* también habitaban otras gramíneas asociadas a *Epichloë* (E+). Además, se muestrearon otros 25 sitios dentro del área de distribución de *B. auleticus*, donde se encontraron gramíneas de diferentes especies que en otros sitios sí cohabitan con *B. auleticus*. En 16 de éstos se encontraron gramíneas asociadas a endofitos *Epichloë* y en 9 libres de ellos. En la *Figura 3.1* se puede observar la ubicación de todos los sitios muestreados diferenciados de acuerdo a los datos previamente mencionados.

Se determinó que 12 especies de gramíneas, además de *B. auleticus*, se encontraban asociadas a endofitos *Epichloë*, destacándose la detección de dos nuevos hospedantes: *Calamagrostis alba* (J. Presl) Steud. y *Polypogon elongatus* Kunth. En la *Tabla 3.2* se detallan las especies, el número de plantas procesadas y el número de aislamientos que se lograron obtener.

Hospedante	Nº plantas procesadas para aislamientos	Nº de aislamientos obtenidos
<i>Briza paleapilifera</i>	28	23
<i>Bromus brachyanthera</i>	8	4
<i>Calamagrostis alba</i>	13	5
<i>Festuca arundinacea</i>	7	0
<i>Festuca fimbriata</i>	5	0
<i>Festuca hieronymi</i>	27	9
<i>Melica stuckertii</i>	32	1
<i>Poa bergii</i>	6	4
<i>Poa bonariensis</i>	12	6
<i>Poa lanigera</i>	35	13
<i>Poa lanuginosa</i>	4	3
<i>Polypogon elongatus</i>	15	3
Total	192	71

Tabla 3.2: Gramíneas que resultaron de status endofítico positivo, número de plantas procesadas y cantidad de aislamientos de *Epichloë* obtenidos por especie hospedante.

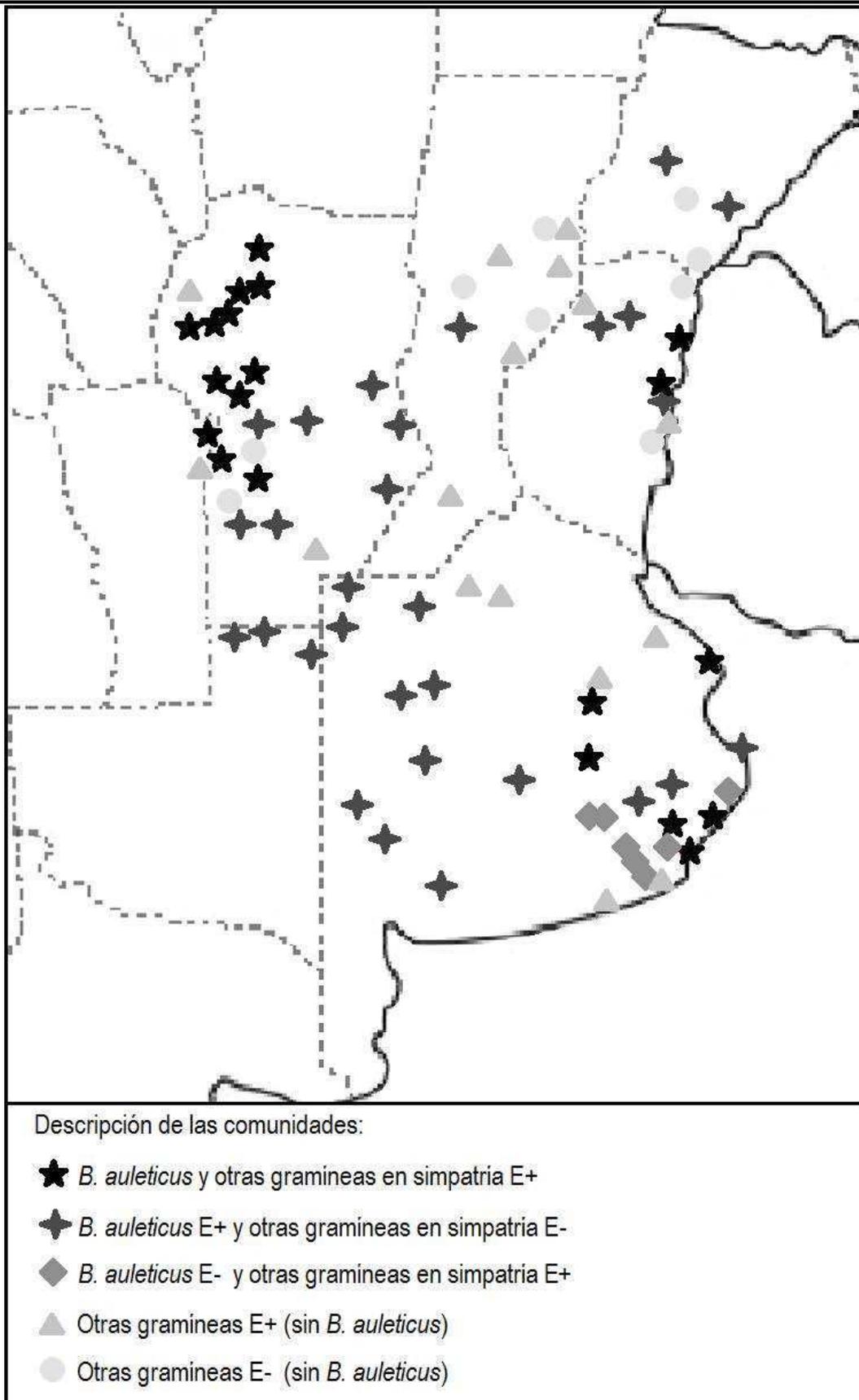


Figura 3.1. Mapa ilustrativo de los sitios muestreados durante las campañas del período 2010-2013, junto con la descripción de lo hallado en cada uno.

Caracterización molecular:

Análisis filogenéticos:

Calmodulina (*calM*)

Se amplificó el gen *calM* y se obtuvieron secuencias de 39 aislamientos provenientes de hospedantes diferentes a *B. auleticus*, obteniéndose en su mayoría dos alelos de dicho gen, denominados arbitrariamente alelo 1 y alelo 2. Un único aislamiento (denominado 150) de *Festuca hieronymi*, originario de la localidad de Villa General Belgrano (Córdoba), resultó haploide. Es decir, que salvo por dicho aislamiento, todos los aislamientos caracterizados poseen un origen híbrido. La matriz obtenida del alineamiento constó de las secuencias de endofitos de *B. auleticus* estudiados en el Capítulo 1, 77 secuencias de otros hospedantes de Argentina, 31 secuencias de referencia tanto de endofitos de Argentina como de otras partes del mundo (ver Tabla 1.1 Anexo) y 948 caracteres de los cuales 88 resultaron parsimoniosamente informativos.

El análisis de máxima parsimonia (MP) dio como resultado un único árbol de 105 pasos de longitud ($Ci=91$, $Ri=99$). El modelo evolutivo utilizado para ML e IB fue K2P (Kimura 2-parámetros). Las topologías de los árboles obtenidos por MP, ML e IB fueron congruentes. Con este grupo de endofitos también en todos los casos se observaron dos grandes clados: el Clado 1 que incluye secuencias de referencia de las especies sexuales *E. festucae*, *E. amarillans* y *E. baconii* y el alelo 1 de todos los endofitos analizados y secuencias de cepas de referencia de Argentina; y el Clado 2 que incluye secuencias de *E. typhina*, *E. typhina* subsp. *poae* var. *aonikenkana* (la variedad no híbrida asexual), del aislamiento de *F. hieronymi* haploide (150) y el alelo 2 del resto de los aislamientos estudiados y de los usados como referencia (Fig. 3.2). Por lo tanto, los nuevos aislamientos analizados corresponden a híbridos interespecíficos con un ancestro común con *E. festucae* para el alelo 1 y con *E. typhina* para el alelo 2, mientras que el aislamiento 150 es haploide y deriva de *E. typhina*. Para facilitar la lectura del árbol, se muestran sólo algunos aislamientos de *B. auleticus* de cada genotipo establecido en el Capítulo 1 y se utilizaron los mismos colores que en el Capítulo 1 para señalar los genotipos de *B. auleticus* aplicándolos también para señalar aquellos aislamientos de otros hospedantes originarios de una comunidad donde *B. auleticus* presenta el genotipo indicado con ese color.

Dentro del Clado 1, las secuencias del alelo 1 de aislamientos de Argentina se separaron en 7 grupos o genotipos (denominados 1I a 1VII). Dentro del Clado 2, las

secuencias del alelo 2 se separaron en 6 grupos o genotipos para el alelo 2 (denominados 2I a 2VI).

Mediante la combinación del genotipo de alelo 1 con el de alelo 2 de cada aislamiento se pudieron establecer 12 genotipos presentes entre endofitos de Argentina. Estos son: los 8 genotipos (A-H) descritos en el Capítulo 1 para *B. auleticus*, 2 genotipos híbridos nuevos denominados J y K, además de *E. cabralii* de *Phleum alpinum* (genotipo I) ya descrito por Mc Cargo et al. (2014) emparentado con el genotipo A y *E. typhina* subsp. *poae* var. *aonikenkana* (genotipo L) de *B. setifolius* con la cual se relacionó el aislamiento 150 de *Festuca hieronymi*. Los dos genotipos híbridos nuevos (J y K) corresponden a híbridos interespecíficos de *E. typhina* x *E. festucae*. El genotipo K corresponde a dos aislamientos de *B. brachyanthera* mientras que el genotipo J agrupa a aislamientos de *B. brachyanthera*, *P. lanigera* y *F. superba*. En la Figura 3.2 se pueden observar los genotipos híbridos (A-L), la variabilidad genética de cada alelo reflejada en los subclados observados (1I – 1VII y 2I – 2IV) y el origen geográfico de cada aislamiento.

Los aislamientos obtenidos de los hospedantes estudiados en este Capítulo se agruparon principalmente con *E. tembladeraae* (genotipo C). Es decir que, además de estar asociado a los hospedantes enunciados en la introducción de este Capítulo, se detectó en los dos nuevos hospedantes presentados en esta tesis, *C. alba* y *P. elongatus*. Las secuencias del gen *calM* no permiten resolver las relaciones evolutivas entre aislamientos de distintos hospedantes dentro de esta especie.

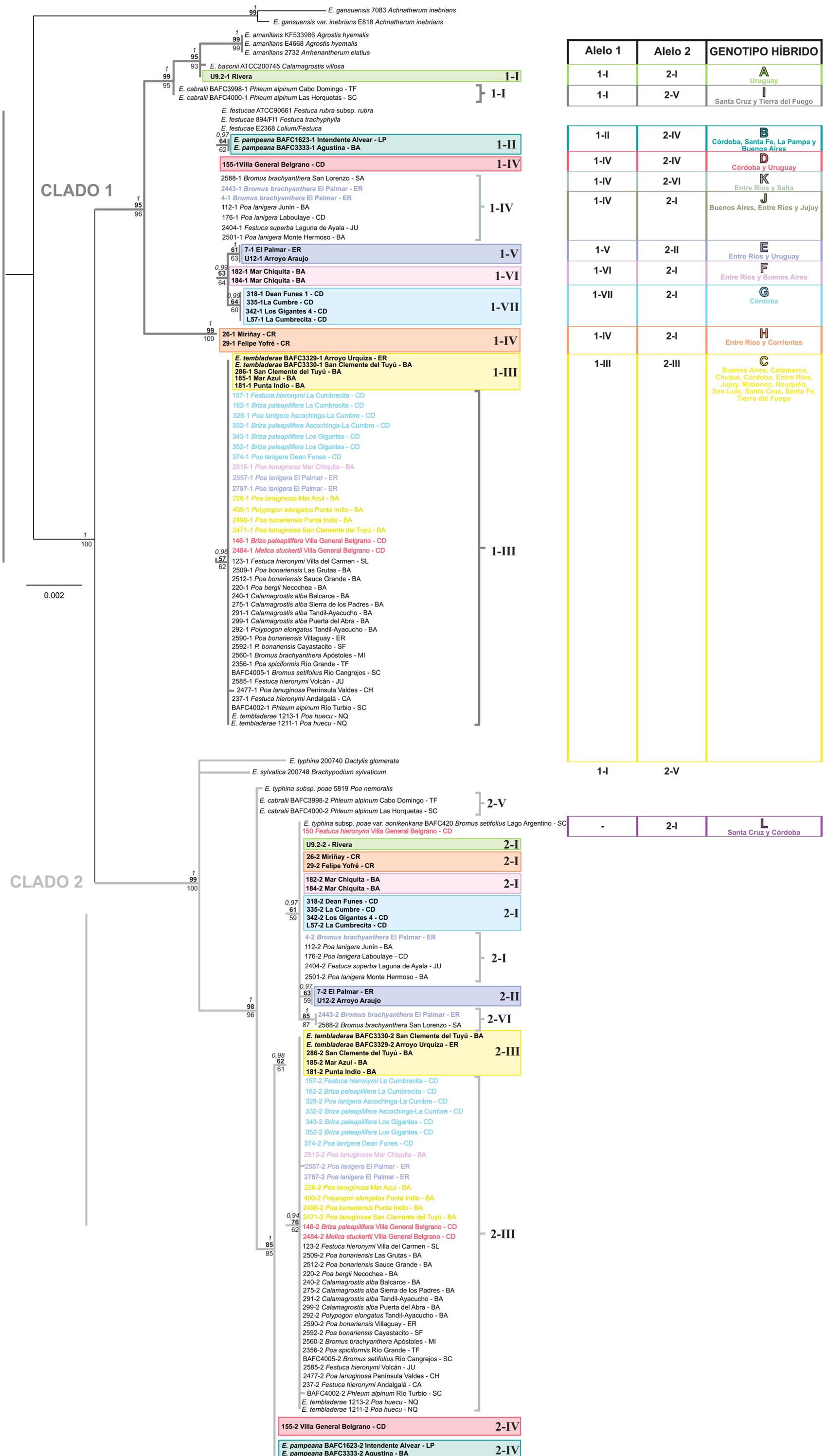


Figura 3.2: Árbol filogenético de aislamientos de *Epichloë* basado en secuencias de ambos alelos del gen *calM*. Los alelos de los aislamientos híbridos están indicados como 1 o 2. Se muestran sólo algunos aislamientos de *B. auleticus* (en negrita) como representativos del genotipo, utilizando los recuadros de colores para indicar cada alelo de igual genotipo híbrido. El color de los aislamientos de otros hospedantes señalan que provienen de una comunidad donde *B. auleticus* tiene el genotipo indicado con ese color. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap y las probabilidades posteriores (MP=normal, ML=negrita e IB=itálica).

Al igual que en el Capítulo 1, se realizaron análisis filogenéticos considerando sólo las secuencias del alelo 1 por ser de mayor extensión y presentar más sitios informativos. Además, se incluyeron secuencias de referencia de *E. typhina* y la secuencia del aislamiento 150 que fue secuenciado con los *primers cal-intron1d-ty*, *cal-exon4d* y *cal-exon4u* para obtener una secuencia de igual longitud. De esta manera, se obtuvo una matriz compuesta de las secuencias de endofitos de *B. auleticus* del Capítulo 1, 49 de otros hospedantes de Argentina y 25 secuencias de referencia tanto de endofitos de Argentina como de otras partes del mundo (ver Tabla 1.1 Anexo) de 963 caracteres con 98 de ellos informativos. El análisis de MP dio un único árbol (L=202, Ci=90, Ri=96) de topología congruente con los obtenidos mediante ML e IB (Fig. 3.3). Sin embargo, solo permitió establecer diez de los grupos. Por lo que, sólo por la combinación de ambos alelos se logra apreciar la diversidad existente en los endofitos de Argentina.

Presencia y filogenia del gen *idtM*

Mediante la amplificación por PCR del gen *idtM* se obtuvo un fragmento del tamaño esperado para la mayor parte de los aislamientos. Los aislamientos incluidos en los genotipos B, D e I de la filogenia *calM* resultaron *idtM*-, y falta este análisis para el genotipo K. Para ningún aislamiento se obtuvo dos alelos del gen *idtM*. Las secuencias consenso de cada aislamiento y secuencias de endofitos de otras partes del mundo publicadas en GenBank (fecha de consulta 23/2/15) se alinearon mediante el algoritmo Clustal W, obteniéndose una matriz de 38 taxones, 1420 caracteres, 127 de los cuales fueron parsimoniosamente informativos.

Los árboles filogenéticos de *idtM*, obtenidos mediante análisis de MP (1 árbol L=154, Ci=90, Ri=98), ML e IB resultaron concordantes, y en todos los casos las secuencias de endofitos de Argentina se agruparon en dos grandes clados (Fig. 3.4). Uno de los clados incluyó secuencias de la especie sexual *E. festucae* y las secuencias de aquellos aislamientos elegidos del genotipo C (*E. tembladeraae*), mientras el otro clado incluyó secuencias de los genotipos E, F, G, H, J y L que se agruparon junto con la secuencia de la cepa referencia de *E. typhina* subsp. *poae* var. *aonikenkana*.

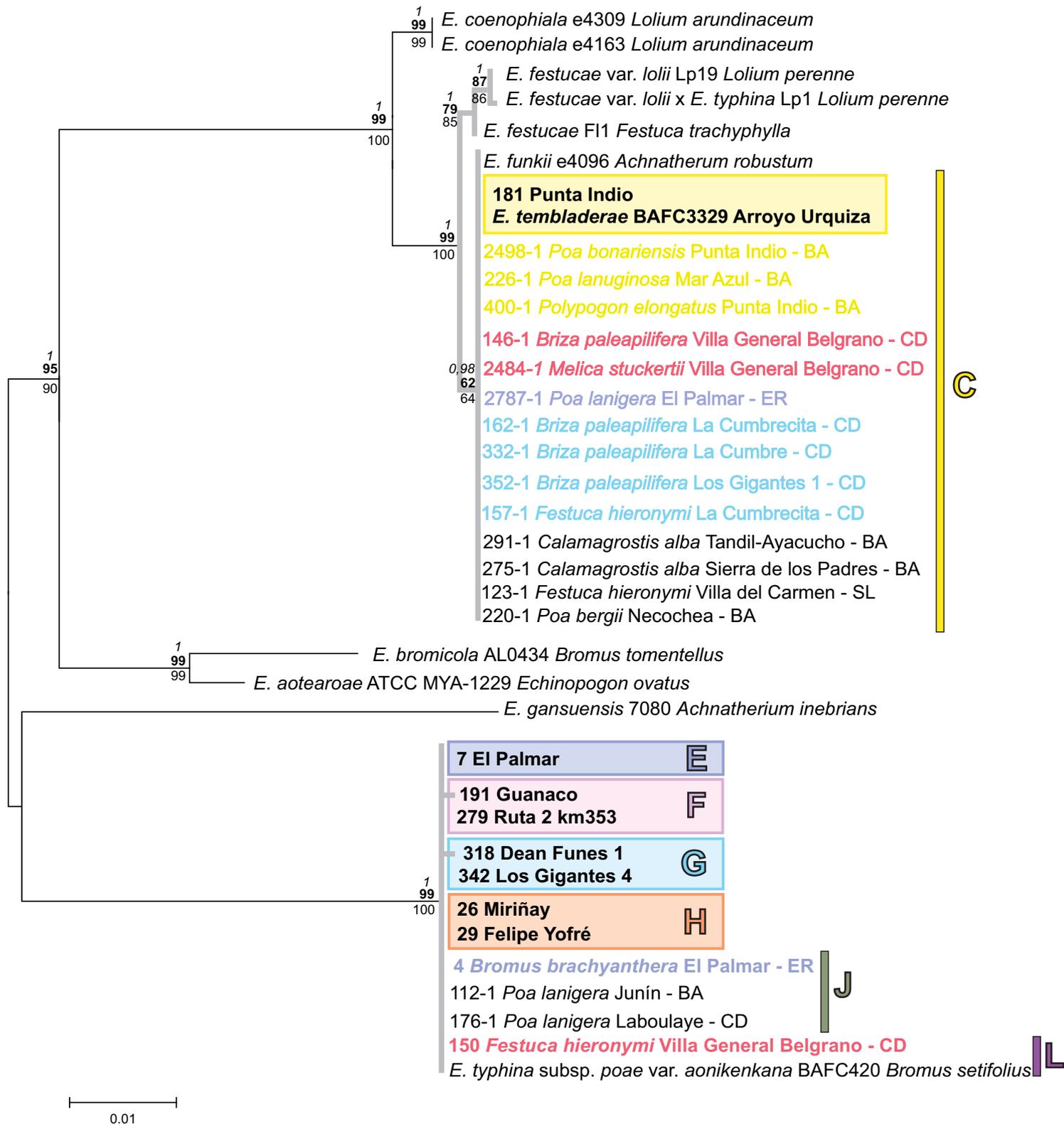


Figura 3.4: Árbol filogenético de ML de aislamientos de *Epichloë* basado en secuencias del gen *idtM*. Se secuenciaron sólo algunos aislamientos de *B. auleticus* (en negrita) como representativos de cada genotipo. Los recuadros de colores y las letras mayúsculas indican cada genotipo híbrido. El color de los aislamientos de otros hospedantes señalan que provienen de una comunidad donde *B. auleticus* tiene el genotipo indicado con ese color. En cada nodo se muestran los soportes de bootstrap y las probabilidades posteriores (MP=normal, ML=negrita e IB=itálica).

Perfiles de genes de alcaloides y mating type:

Los aislamientos seleccionados como representantes de endofitos de Argentina presentaron diferencias en cuanto a la presencia/ausencia de genes de alcaloides (Fig. 3.3).

En cuanto al tipo de apareamiento, *E. cabralii* presentó *mtBA* (*mating type* B) mientras que el resto de los aislamientos presentaron el idiomorfo *mtAC* (*mating type* A) siendo todos híbridos para este gen, salvo el aislamiento *Festuca hieronymi* 150 que por ser haploide presentó un solo alelo de este idiomorfo. Se establecieron 6 perfiles de genes de alcaloides y *mating type* adicionales a los ya detectados en endofitos de *B. auleticus* (Fig. 3.3), principalmente debido a variaciones en la composición del *cluster* IDT y del *mating type*. Al igual que para los aislamientos de *B. auleticus*, todos los aislamientos de los otros hospedantes analizados resultaron negativos para los genes *easA*, *cloA*, *lpsB*, *easH* involucrados en la biosíntesis de alcaloides del ergot, e *idtJ* y *idtE* correspondientes a la síntesis de indol diterpenos. Además, la secuenciación de los genes *lolC*, *dmaW*, *idtG*, *idtM* y *perA* de los aislamientos que resultaron positivos para algunos de estos genes mostró que únicamente *perA* presentó dos alelos. Como se esperaba, el aislamiento haploide para el gen *calM* (150) sólo poseyó un alelo para los genes de alcaloides presentes en su genoma.

Los perfiles de genes mostraron que *E. tembladera* (genotipo C) presenta una gran variabilidad genética que se puede visualizar en cambios en la presencia de genes IDT, sin observar variaciones en las otras rutas de biosíntesis estudiadas. En los aislamientos analizados se evidencian 5 variantes diferentes (2 más a las ya registradas en endofitos *B. auleticus*) denominadas C₁-C₅ (Tabla 3.3). Dentro de dicha variabilidad en esta ruta de síntesis, el genotipo C₁ parece ser el más común, presente en 9 de los 12 hospedantes simpátricos de *B. auleticus*. Los genotipos C₂ y C₄ se asocian a dos especies hospedantes y C₃ y C₅ sólo a una. En cuanto a los nuevos genotipos detectados por *calM* (sin datos para el genotipo K), se detectaron dos variantes dentro del genotipo J. Se observó que el perfil de genes de aislamientos obtenidos de *P. lanigera* del noroeste de Buenos Aires y sudeste de Córdoba coincide con los genotipos B (*E. pampeana*) y D excepto porque sólo presentan el idiomorfo *mtAC*, mientras que el aislamiento obtenido de *B. brachyanthera* de El Palmar presenta un perfil único.

La filogenia de *calM*, *idtM* y el perfil de genes de alcaloides y *mating type* permitió identificar 17 genotipos entre los endofitos de *Bromus auleticus*, sus hospedantes

simpátricos y otros hospedantes de Argentina. Un resumen de los genotipos detectados y su rango de hospedantes se muestra en la Tabla 3.3.

Hospedante	Genotipo																
	A	B	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	D	E	F	G	H	I	J ₁	J ₂	K	L
<i>Bromus auleticus</i> (56)	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x					
<i>Briza paleapilifera</i> (4)			x			x	x										
<i>Bromus brachyanthera</i> (3)														x		x	
<i>Calamagrostis alba</i> (4)			x	x													
<i>Festuca hieronymi</i> (3)			x														x
<i>Melica stuckertii</i> (1)						x											
<i>Phleum alpinum</i> (2)													x				
<i>Poa bergii</i> (1)			x														
<i>Poa bonariensis</i> (1)			x														
<i>Poa lanigera</i> (7)			x												x		
<i>Poa lanuginosa</i> (2)			x														
<i>Polypogon elongatus</i> (2)			x														

Tabla 3.3: Genotipos de endofitos asociados a gramíneas nativas que habitan en el área de distribución de *Bromus auleticus*, y *Phleum alpinum*. Los genotipos fueron establecidos con base a su posición en las filogenias de los genes *calM*, *idtG* o *idtM* y el perfil de genes de alcaloides y *mating type*. El número entre paréntesis indica la cantidad de aislamientos estudiados de cada hospedante.

Caracterización morfológica:

En la tabla 3.4 se observan los diámetros de la colonia a los 30 días de crecidas en APGc y los tamaños de las células conidiógenas y conidios de los diferentes genotipos no descritos hasta el momento en esta tesis, por hospedante.

Hospedante	Diámetro de colonia (mm)	Células conidiógenas (µm)			Conidios (µm)	
		Largo	Ancho base	Ancho ápice	Largo	Ancho
C <i>Br. paleapilifera</i>	25,7±0,4	19,03±0,70	1,49±0,06	1,01±0,04	8,31±0,20	2,48±0,04
C <i>C. alba</i>	15,5±0,5	10,08±1,28	1,86±0,05	1,09±0,16	8,68±0,27	2,79±0,10
C <i>F. hieronymi</i>	22,6±1,1	17,60±0,83	1,78±0,05	1,20±0,14	7,42±0,24	2,70±0,6
C <i>M. stuckertii</i>	10,5±0,5	24,30±0,73	1,52±0,05	1,18±0,07	8,06±0,21	3,24±0,12
C <i>P. bergii</i>	15,1±1	21,06±0,83	2,02±0,07	1,14±0,04	6,94±0,24	3,10±0,08
C <i>P. bonariensis</i>	17,5±0,7	17,85±0,73	2,10±0,10	1,20±0,13	7,34±0,14	3,29±0,06
C <i>P. lanigera</i>	21,2±0,6	18,51±1,18	1,77±0,08	1,40±0,08	7,19±0,15	2,70±0,05
C <i>P. lanuginosa</i>	15,5±0,3	22,82±1,27	1,72±0,06	1,18±0,06	7,92±0,22	2,83±0,07
C <i>Po. elongatus</i>	13,2±0,5	16,15±1,14	2,02±0,13	0,99±0,06	7,44±0,23	2,79±0,08
J <i>B. brachyanthera</i>	8,4±0,5	12,68±0,79	1,89±0,07	0,98±0,05	6,32±0,13	3,39±0,10
J <i>P. lanigera</i>	10,3±0,5	15,89±0,69	1,90±0,07	1,09±0,06	9,24±0,18	2,48±0,07
L <i>F. hieronymi</i>	11,4±0,2	12,95±0,67	1,68±0,09	1,19±0,10	5,70±0,15	2,50±0,06

Tabla 3.4: Características de las colonias, células conidiógenas y conidios observados (A, B, D-H descritos en Capítulo 1, I y L en *Ph. alpinum* en Mc Cargo et al. (2014) y K sin datos). (media±error estándar).

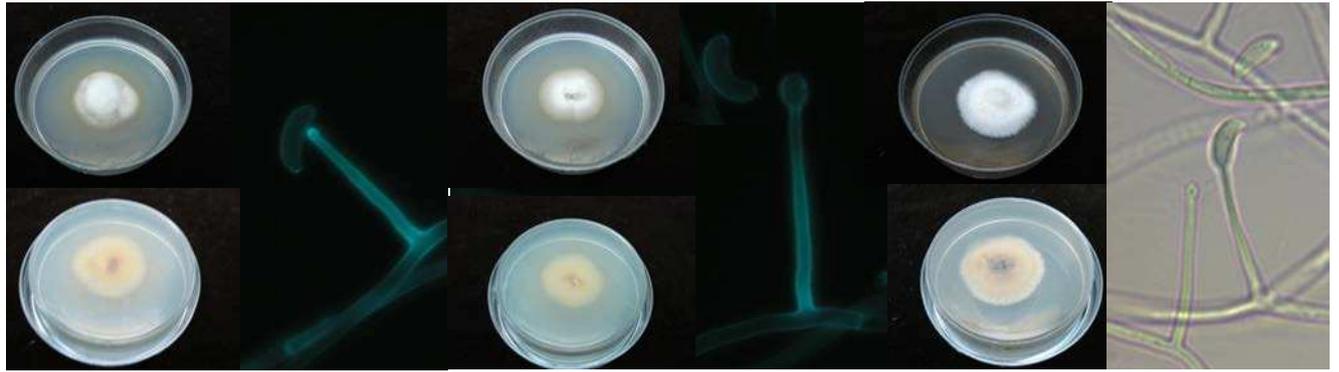
Presencia de genotipos en las comunidades estudiadas

Al analizar las comunidades que presentaron diferentes especies de gramíneas con endofitos, se evidencian ciertas similitudes y diferencias entre los endofitos de los hospedantes presentes (Tabla 3.5). Se observa un patrón general en el que en las comunidades que *B. auleticus* se asocia a *E. pampeana* las demás especies, normalmente hospedantes en otras comunidades, no tienen endofitos. También, que en todas las comunidades que se logró obtener aislamientos de más de un hospedante, alguna variante de *E. tembladerae* está presente. En aquellas comunidades donde *B. auleticus* se encuentra asociado al genotipo *E. platensis*, los otros hospedantes se asocian a alguna de las variantes de *E. tembladerae*. Por otro lado, en las comunidades que *B. auleticus* se asocia a *E. tembladerae*, los otros hospedantes se asocian a la misma u otra variante de esta especie. La comunidad de Villa General Belgrano es en la que se logró caracterizar endofitos de 4 géneros de hospedantes diferentes, encontrando que sólo *Briza paleapilifera* y *M. stuckertii* presentaron *E. tembladerae* con igual perfil de genes (C₄), mientras que *B. auleticus* presentó el genotipo D y *Festuca hieronymi* el endofito no híbrido de genotipo L (*E. typhina* subsp. *poae* var. *aonikenana*). En El Palmar, se pudo caracterizar a los endofitos de *B. auleticus* y *B. brachyanthera* junto con *P. lanigera*, encontrando que el aislamiento de ninguno de los hospedantes coincide con el de otro en la filogenia de *calM* e incluso *B. brachyanthera* presenta diferencias entre sus aislamientos en cuanto a la filogenia del alelo 2 asociándose a los genotipos J y K (Fig 3.2).

Localidad	Hospedantes	Endofito
Villa General Belgrano	<i>Bromus auleticus</i> <i>Festuca hieronymi</i> <i>Briza paleapilifera</i> <i>Melica stuckertii</i>	Genotipo D No híbrido L <i>E. tembladerae</i> C ₄ <i>E. tembladerae</i> C ₄
El Palmar	<i>Bromus auleticus</i> <i>Bromus brachyanthera</i> <i>Poa lanigera</i> <i>Calamagrostis alba</i>	<i>E. platensis</i> E Genotipo J y K <i>E. tembladerae</i> C ₁ E-
La Cumbre	<i>Bromus auleticus</i> <i>Poa lanigera</i> <i>Briza paleapilifera</i> <i>Calamagrostis alba</i>	<i>E. platensis</i> G <i>E. tembladerae</i> C ₁ <i>E. tembladerae</i> C ₁ E-
Punta Indio	<i>Bromus auleticus</i> <i>Poa bonariensis</i> <i>Polypogon elongatus</i>	<i>E. tembladerae</i> C ₂ <i>E. tembladerae</i> C ₁ <i>E. tembladerae</i> C ₁

Los Gigantes	<i>Bromus auleticus</i> <i>Briza paleopilifera</i> <i>Briza paleopilifera</i>	<i>E. platensis</i> G <i>E. tembladeraae</i> C ₄ <i>E. tembladeraae</i> C ₅
La Cumbrecita	<i>Bromus auleticus</i> <i>Briza paleopilifera</i> <i>Festuca hieronymi</i>	<i>E. platensis</i> G <i>E. tembladeraae</i> C ₁ <i>E. tembladeraae</i> C ₁
Dean Funes	<i>Bromus auleticus</i> <i>Poa lanigera</i>	<i>E. platensis</i> G <i>E. tembladeraae</i> C ₁
Mar Chiquita	<i>Bromus auleticus</i> <i>Poa lanuginosa</i>	<i>E. platensis</i> F <i>E. tembladeraae</i> C ₁
Mar Azul	<i>Bromus auleticus</i> <i>Poa lanuginosa</i>	<i>E. tembladeraae</i> C ₁ <i>E. tembladeraae</i> C ₁

Tabla 3.5 Hospedantes y genotipos de sus endofitos en las comunidades donde se detectaron hospedantes co-habitando.



C - *Briza paleopilifera*

C- *Calamagrostis alba*

C- *F. hieronymi*



C - *M. stuckertii*

C - *P. bergii*

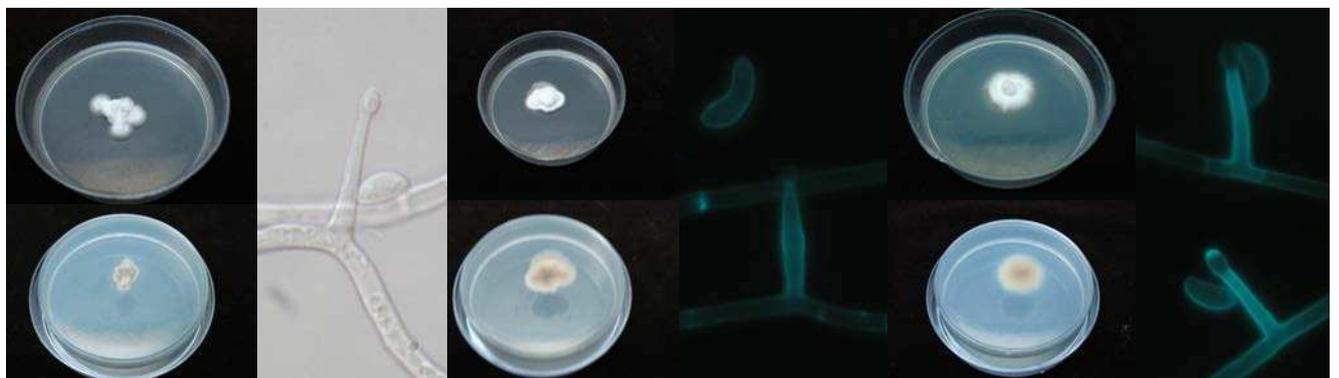
C - *P. bonariensis*



C - *P. Lanigera*

C - *P. lanuginosa*

C - *Polygomon elongatus*



J - *B. brachyanthera*

J - *P. lanigera*

L - *F. hieronymi*

Figura 3.5: Aspecto colonias, células conidiógenas y conidios de los endofitos de los diferentes hospedantes.

DISCUSIÓN

La búsqueda de comunidades habitadas por especies de gramíneas asociadas a endofitos *Epichloë* llevó al descubrimiento de dos especies hospedantes más para el territorio argentino, determinadas como *Calamagrostis alba* y *Polypogon elongatus*. Las poblaciones de estos dos hospedantes que resultaron E+ se encuentran en la mitad este de la provincia de Buenos Aires, encontrándose en simpatria en la localidad de Tandil. Todos los aislamientos caracterizados de ambos hospedantes pertenecen a la especie *E. tembladerae*, presentando el mismo idiomorfo de apareamiento (*mating type* A). En cuanto al perfil de genes de alcaloides, la mayoría coincide en el perfil, salvo el aislamiento de *C. alba* de Sierra de los Padres que carece del gen *idtQ*, llevando a la potencial producción de paspalina en lugar de terpendol C.

Otro hallazgo de interés es el aislamiento no híbrido derivado de *E. typhina* subsp. *poae* var. *aonikenkana* asociado a *F. hieronymi* de Villa General Belgrano (Córdoba), solo encontrado previamente en ciertas poblaciones de *B. setifolius* de la Patagonia Argentina, planteando la necesidad de contar con el perfil de alcaloides de este último para probar si comparten más similitudes genéticas.

Los análisis filogenéticos del gen *calM* y la genotipificación de genes de alcaloides revelaron la existencia de 12 genotipos en total. La mayoría de los aislamientos obtenidos de otros hospedantes de diferentes regiones geográficas de la Argentina se agruparon con el híbrido interespecífico *E. tembladerae*, que presentaría variabilidad intraespecífica, principalmente evidenciada en la ausencia de distintos genes de la ruta de síntesis de indol diterpenos, que muestra cinco variantes diferentes C₁-C₅. Esta diversidad genética en *E. tembladerae* se observa tanto entre como dentro de los distintos hospedantes, ya que *B. auleticus* se asociaría a 3 variantes diferentes (C₁-C₃) de este endofito, que pueden encontrarse también en otros hospedantes. Muchos de los otros hospedantes también se asocian con endofitos que presentan variabilidad genética. En la filogenia de *calM* se observa que *Bromus brachyanthera*, *F. hieronymi* y *P. lanigera* se asocian a endofitos diferentes (J y K, C y L, C y J, respectivamente), mientras que *Briza paleapilifera* y *C. alba* se asocian a diferentes variantes de *E. tembladerae* (C₁, C₄ y C₅, C₁ y C₂, respectivamente). Esta caracterización también indicó que el resto de los genotipos híbridos (A, B, D, E, F, G y H) sólo se encontrarían en *B. auleticus*, por lo que serían hospedante específicos.

De acuerdo con el conocimiento que se tiene sobre la función de cada uno de los genes de alcaloides es posible predecir los compuestos que podría producir un

endofito con un determinado perfil (Schardl et al. 2013c). Entre los alcaloides tóxicos para insectos, la predicción de los compuestos finales a obtener indica, que incluso tratándose de diversas especies hospedantes de orígenes biogeográficos diferentes, todos los aislamientos analizados serían productores de peramina (aún aquellos que presentan una delección en uno de los alelos detectada por los *primers* per-17, por ser híbridos y poseer el otro alelo completo). La producción de lolinas estaría restringida a genotipos fúngicos hallados en *B. auleticus* (*E. pampeana* y genotipo D) y endofitos de *P. lanigera* pertenecientes al genotipo híbrido J que podrían sintetizar como compuesto final la N-formillolina, y a *E. cabralii* que podría llegar a sintetizar N-metillolina. Respecto a los alcaloides del ergot, serían exclusivos de *E. platensis* que solo se encuentra en *B. auleticus* (E, F, G y H) solamente llegando a producir un precursor no tóxico, como la chanoclavina-I.

Los distintos endofitos se diferenciaron principalmente en cuanto a la vía de síntesis de los indol diterpenos, observándose 7 variantes de perfiles de estos genes. *Epichloë tembladera* presenta 5 perfiles diferentes de los genes IDT, pudiendo llegar a no producir ningún compuesto o sintetizar paspalina o terpendol C. El terpendol C, que es el compuesto más complejo que llegarían a producir los aislamientos analizados, sería producido por un grupo de aislamientos (C_1) asociados a una amplia diversidad de hospedantes como *Briza paleapilifera*, *B. auleticus*, *C. alba*, *F. hieronymi*, *P. bergii*, *P. bonariensis*, *P. lanigera*, *P. lanuginosa* y *Poa elongatus*. Como productores de terpendol I y paxilina, se registró al aislamiento no híbrido de *F. hieronymi* (genotipo L), de *B. brachyanthera* de El Palmar y de *Poa lanigera* pertenecientes al genotipo J, además de los ya descritos para *B. auleticus*. Por último, paspalina sería sintetizado por el aislamiento de *C. alba* de Sierra de los Padres además de los aislamientos de *B. auleticus* dentro del genotipo C (C_2 y C_3 , respectivamente).

La caracterización del perfil de genes de alcaloides y su potencialidad para producir distintos metabolitos tóxicos, por endofitos aislados de gramíneas tóxicas como *F. hieronymi* y *Poa huecu* indica que estos no son particularmente diferentes de los observados en endofitos de plantas no tóxicas. Por lo tanto, otros factores podrían estar relacionados con la toxicidad de estas plantas. Una posible explicación podría ser que, al igual que pasa con las lolinas, alguna enzima vegetal presente en estos hospedantes en el noroeste argentino y la Patagonia se viera involucrada en la modificación de los compuestos fúngicos y su transformación a formas tóxicas (Pan et al. 2014), por lo que la medición en planta es importante al desarrollar nuevas combinaciones endofito-gramínea.

Con respecto al estudio de relaciones filogenéticas entre endofitos de distintos hospedantes de una misma comunidad, el número de aislamientos obtenidos para

cada localidad fue bajo, debido en parte a la gran diversidad detectada. Sin embargo, cuando se logró caracterizar a endofitos de más de un hospedante de una misma localidad, se observó que en general *B. auleticus* se asocia a endofitos diferentes a los presentes en otros hospedantes. No obstante, en las comunidades en las que una especie hospedante se asoció a *E. tembladeraae* fue posible detectar otro hospedante asociado a esta especie, de igual o diferente perfil de IDT. Esto sugiere que es posible que existan o hayan existido eventos de transmisión horizontal de *E. tembladeraae* entre hospedantes cercanos geográficamente con posteriores modificaciones del *cluster* IDT, por su facilidad de sufrir modificaciones (pérdidas/ganancias) dadas las características de sus secuencias. Por lo tanto, el hecho de observar diferencias en estos genes entre distintos hospedantes de *E. tembladeraae*, no necesariamente serían indicativas de eventos de hibridación independientes. Ya que *E. tembladeraae* pudo haber sufrido las modificaciones al ir saltando entre hospedantes o al dispersarse a nuevas regiones geográficas. Por esto, se plantea la necesidad de realizar análisis a nivel poblacional con un mayor número de aislamientos de cada comunidad para seguir analizando las observaciones realizadas en este Capítulo.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Se reportan por primera vez a las especies *Calamagrostis alba* y *Polypogon elongatus* como hospedantes de endofitos del género *Epichloë*, aumentando a 20 especies de gramíneas de Argentina asociadas a *Epichloë tembladeraae*.
- Se obtuvieron 12 perfiles de genes de alcaloides y *mating type* diferentes entre los aislamientos analizados originarios de Argentina. El perfil de genes *idt* es el que presenta más variabilidad, tanto entre como dentro de especies endofíticas, siendo *E. tembladeraae* quien presenta 5 perfiles diferentes.
- Las relaciones filogenéticas no resueltas del gen *calM* para *E. tembladeraae* y la presencia de esta especie en distintos hospedantes que habitan en simpatria soportan la hipótesis de transmisión horizontal de esta especie, ya que sólo pueden diferenciarse algunos aislamientos por su perfil de genes *idt* el cual es particularmente propenso a sufrir modificaciones.
- *Bromus brachyanthera*, *Festuca hieronymi* y *Poa lanigera* presentan más de un genotipo endofítico *Epichloë*, además de los ya reportados *Bromus auleticus*, *Bromus setifolius*, *Hordeum comosum* y *Phleum alpinum*.
- Los endofitos asociados a diferentes hospedantes de una misma comunidad no necesariamente presentan el mismo genotipo, siendo necesarios muestreos con un mayor número de aislamientos por hospedante por comunidad para estudiar los factores como incompatibilidad endofito-gramínea y posibilidad de transmisión horizontal.

CAPÍTULO 4

En busca de los posibles mecanismos de transmisión horizontal
de los endofitos asexuales *Epichloë* spp.

INTRODUCCIÓN

El modo de diseminación de los simbioses *Epichloë* varía en función de la planta hospedante y la población y especie de endofito (Tadych et al. 2014). En las especies sexuales, las ascosporas o los conidios derivados de la germinación de éstas son responsables de la transmisión (Schardl et al. 2004). En endofitos asexuales, la transmisión vertical y su eficiencia han sido ampliamente estudiadas (Sugawara et al. 2004; Pérez 2008), pero la transmisión horizontal no se creía que existiera de forma natural, hasta que fue recientemente demostrada de forma empírica.

La inoculación de endofitos en plantas con interés agronómico ha sido ampliamente utilizada de forma artificial para obtener nuevos cultivares (Latches y Christensen 1985). A pesar de haber seleccionado al endofito basado en las propiedades que suele brindar a su hospedante natural, la nueva asociación puede dar como resultado un cultivar con las propiedades deseadas o algunas inesperadas (por ejemplo enanismo y menor o nula síntesis de alcaloides) (Simpson et al. 2012). La mayoría de las técnicas probadas que resultaron exitosas para lograr la transmisión de endofitos involucran realizar una incisión en alguna parte del potencial hospedante para luego inocular micelio del endofito. De esta forma, se han logrado inocular desde embriones somáticos hasta macollos maduros (Kearney et al. 1991; Johnson-Cicalese et al. 2000).

Las múltiples observaciones de linajes asexuales que son capaces de producir estructuras fúngicas externas, como ser redes de micelio con células conidiógenas y conidios que crecen sobre la planta y estromas de colores claros que no completan el ciclo sexual (White et al. 1996; Moy et al. 2000; Dugan et al. 2002; Iannone et al. 2009; Christensen et al. 2012; Oberhofer y Leuchtmann 2012; Tadych et al. 2012), han llevado a intensificar la búsqueda de sistemas donde se observe que la transmisión horizontal ocurre naturalmente. Sólo fue recientemente que los trabajos en el tema de Tadych et al. (2007) y Tadych et al. (2012) planteando el estudio de mecanismos de dispersión de conidios de *E. typhina* subsp. *poae*, tanto del filoplano como de los estromas asexuales que forma sobre *Poa secunda* subsp. *juncifolia*; concluyeron que este endofito sería capaz de propagarse facilitado por salpicaduras de agua e infectar las plántulas en desarrollo, para luego colonizar sistémicamente a la nueva planta hospedante. La misma técnica fue utilizada por Li et al. (2015) inoculando *E. gansuensis* en *Achnatherun sibiricum* obteniendo resultados positivos. También Oberhofer y Leuchtmann (2014), aunque sin intención de estudiarla, han observado la

existencia de transmisión horizontal en una cepa híbrida (*E. hordelymi*) de *Hordelymus europaeus*, planteando al agua como agente de dispersión al haber regado por aspersión. Por último, recientemente Wiewióra et al. (2015) han demostrado la transmisión horizontal de *E. festucae* var. *lolii* en *Lolium perenne*, siendo su éxito dependiente de la proximidad entre plantas E+ y E- así como del recorte de ellas en conjunto, como análogo al pastoreo entre ellas. Estos estudios demuestran que algunos sistemas de endofitos asexuales pueden incluir la transmisión horizontal en su ciclo de vida, y así han alentado la comprobación de su existencia en diferentes sistemas de estudio. La presencia de *E. tembladerae* en un amplio número de especies hospedantes y la presencia de conidios en cañas o en el filoplano de alguno de sus hospedantes (White et al. 1996; Iannone et al. 2009) sugiere la existencia de contagio entre distintos hospedantes, sin embargo no ha sido demostrada.

HIPÓTESIS PARCIALES

- La transmisión horizontal de endofitos asexuales puede producirse por diferentes mecanismos y ocurrir en varios estadios de la planta.
- La transmisión horizontal de endofitos *Epichloë* asexuales puede ocurrir a través del micelio que tiene la capacidad de infectar una nueva planta en su estadio de plántula, por si solo o por medio de una herida.
- La transmisión horizontal puede ocurrir a través de conidios capaces de infectar el ovario de las flores en desarrollo y alojarse en las semillas de plantas de igual o diferente especie hospedante.

OBJETIVOS PARCIALES

- Investigar los posibles mecanismos naturales de transmisión horizontal de endofitos asexuales entre plantas hospedantes, de una misma especie o de diferentes especies.
- Lograr inocular diferentes linajes de endofitos asociados a *B. auleticus* en plántulas de dicho hospedante pertenecientes a diferentes ecotipos.
- Lograr la inoculación cruzada de *Epichloë tembladera* aislado de *Poa lanigera* en *B. auleticus* naturalmente asociado a endofitos de otra especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se probaron tres técnicas de inoculación de endofitos asexuales *Epichloë*. En todos los casos se utilizó a *Bromus auleticus* como material libre de endofitos (E-) receptor del inóculo. El laboratorio cuenta con plantaciones para obtener semillas E- de *B. auleticus* de dos ecotipos diferentes en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Concepción del Uruguay. Estas plantaciones E- provienen de plantas originalmente E+ que perdieron el endofito durante el almacenamiento de las semillas. Uno de los ecotipos utilizados es originario de Intendente Alvear, provincia de La Pampa, ecotipo **LP**, naturalmente asociado a *E. pampeana* (ver Capítulo 1). El otro ecotipo es originario del P.N. El Palmar, ecotipo **EP**, que al inicio de esta tesis, cuando se comenzaron los ensayos de inoculación, se consideraba asociado a *E. tembladeraae* y la caracterización posterior indicó que se encuentra asociado a *E. platensis*. Además, se utilizaron semillas recolectadas de una población de Balcarce, Pcia. de Buenos Aires, ecotipo **BC**, caracterizada como naturalmente libre de endofitos en el Capítulo 1.

Como fuentes de inóculo se utilizaron 3 cepas de endofitos: ***E. tembladeraae* BAFC3329** aislada de *B. auleticus* (**EtBa**) de Arroyo Urquiza (Colón, Entre Ríos); ***E. tembladeraae* 2787** aislada de *Poa lanigera* (**EtPI**) del P.N. El Palmar; y ***E. pampeana* BAFC1623** aislada de *B. auleticus* (**EpBa**) de Intendente Alvear, La Pampa.

Las cepas BAFC3329 y BAFC1623 fueron elegidas para contar con un representante de las dos especies de endofitos de *B. auleticus* conocidas al inicio de esta tesis y cuyo origen geográfico fuera el mismo o el más próximo posible al de las semillas o plantas a inocular. La cepa 2787 se eligió como representante de *E. tembladeraae* de otro hospedante del mismo origen geográfico que *B. auleticus*. Además, ambas cepas de *E. tembladeraae* presentan el mismo genotipo en cuanto al perfil de genes de alcaloides y *mating type* (Fig 3.3). Hasta el momento no se conocen otros hospedantes de endofitos en cercanías de la población de Intendente Alvear. Estas tres cepas pueden diferenciarse morfológicamente por sus tasas de crecimiento en medio APG (EtPI > EtBa > EpBa).

A continuación se describen las tres técnicas de inoculación utilizadas (Fig. 4.1).

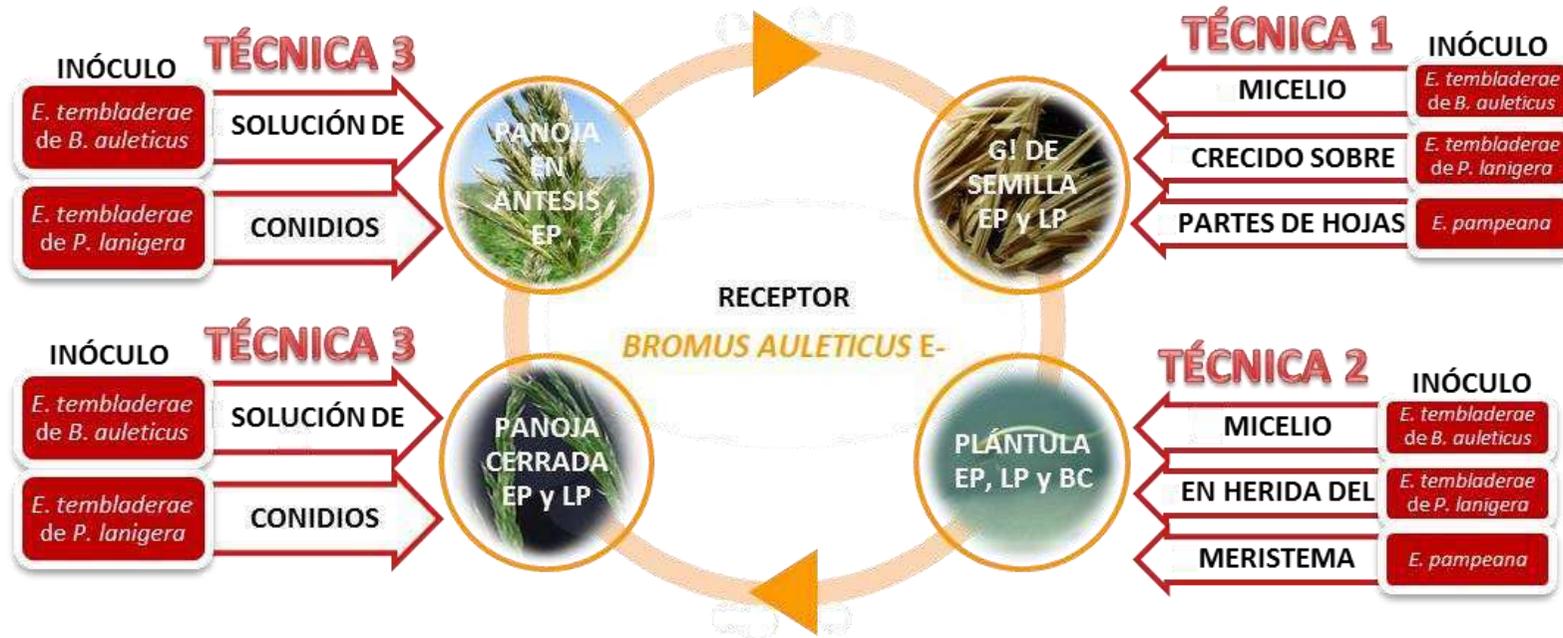


Figura 4.1: Esquema a modo de síntesis de los tratamientos de inoculación, reinoculación e inoculación cruzada realizados, señalando el estadio de *Bromus auleticus*, las cepas fúngicas inoculadas y la metodología utilizada. Material de *B. auleticus* originario de: El Palmar (EP), La Pampa (LP) y Balcarce (BC).

TÉCNICA 1: Esta técnica se basa en hacer crecer el micelio del endofito a inocular sobre fragmentos de hojas “para simular el micelio epifítico” entre los cuales se colocan las semillas a ser infectadas. Fue empleada exitosamente por Tadych et al. (2012) en *Poa secunda* subsp. *juncifolia* con *Epichloë typhina* subsp. *poae*. En este trabajo solo se modificaron los tiempos de crecimiento del inóculo para adaptarla a la menor velocidad de crecimiento que presentan las cepas fúngicas utilizadas.

Se trabajó con semillas de 2 de las poblaciones de *B. auleticus* (EP y LP) y las tres cepas de endofitos, realizando las siguientes inoculaciones EpBa+LP, EtBa+EP y EtPI+EP.

Para cada cepa, se autoclavaron 10 placas de Petri (9cm) con 5ml de agua destilada y 20 fragmentos de 2cm de largo de hojas de *B. auleticus* E- de EP o LP, según la procedencia del endofito a inocular. En este caso, se plantearon tratamientos para evaluar aquellas combinaciones que serían más probables de obtener resultados positivos, es decir, inocular el genotipo originalmente presente en el ecotipo de la semilla o aquel más cercano geográficamente. Una vez autoclavadas se les agregó suspensiones de conidios, obtenidas a partir de cultivos en césped, y se las incubó por 10 días a 24°C y oscuridad observando crecimiento de micelio sobre los fragmentos de hoja (Fig. 4.2). Por otro lado, se esterilizaron superficialmente semillas de *B. auleticus* de El Palmar y La Pampa las cuales se remojaron en agua destilada estéril por 48hrs. A continuación, se colocaron 10 de las semillas por caja de Petri con inóculo y se las incubó a 24°C y oscuridad para que germinen, manteniéndolas en estas condiciones hasta que las plántulas tuvieron aproximadamente 5cm de largo. Las cajas en las que se observaron semillas contaminadas por otros hongos fueron descartadas. Se partió de diez cajas (100 semillas) por tratamiento para poder contar con al menos 50 plantas en las que analizar el éxito de la inoculación al final del ensayo. Posteriormente, las plántulas se plantaron en germinadores con pocillos llenos de tierra y arena (1:1) y se mantuvieron en cámara de cultivo a 24°C y con fotoperiodo de 12hrs de luz/oscuridad hasta que produjeron varios macollos. Se realizó un tratamiento control en el que las semillas fueron germinadas entre los fragmentos de hojas sin el agregado de inóculo endofítico. El éxito de la inoculación se estableció mediante el análisis de la presencia de hifas de *Epichloë* en el parénquima de las vainas foliares.

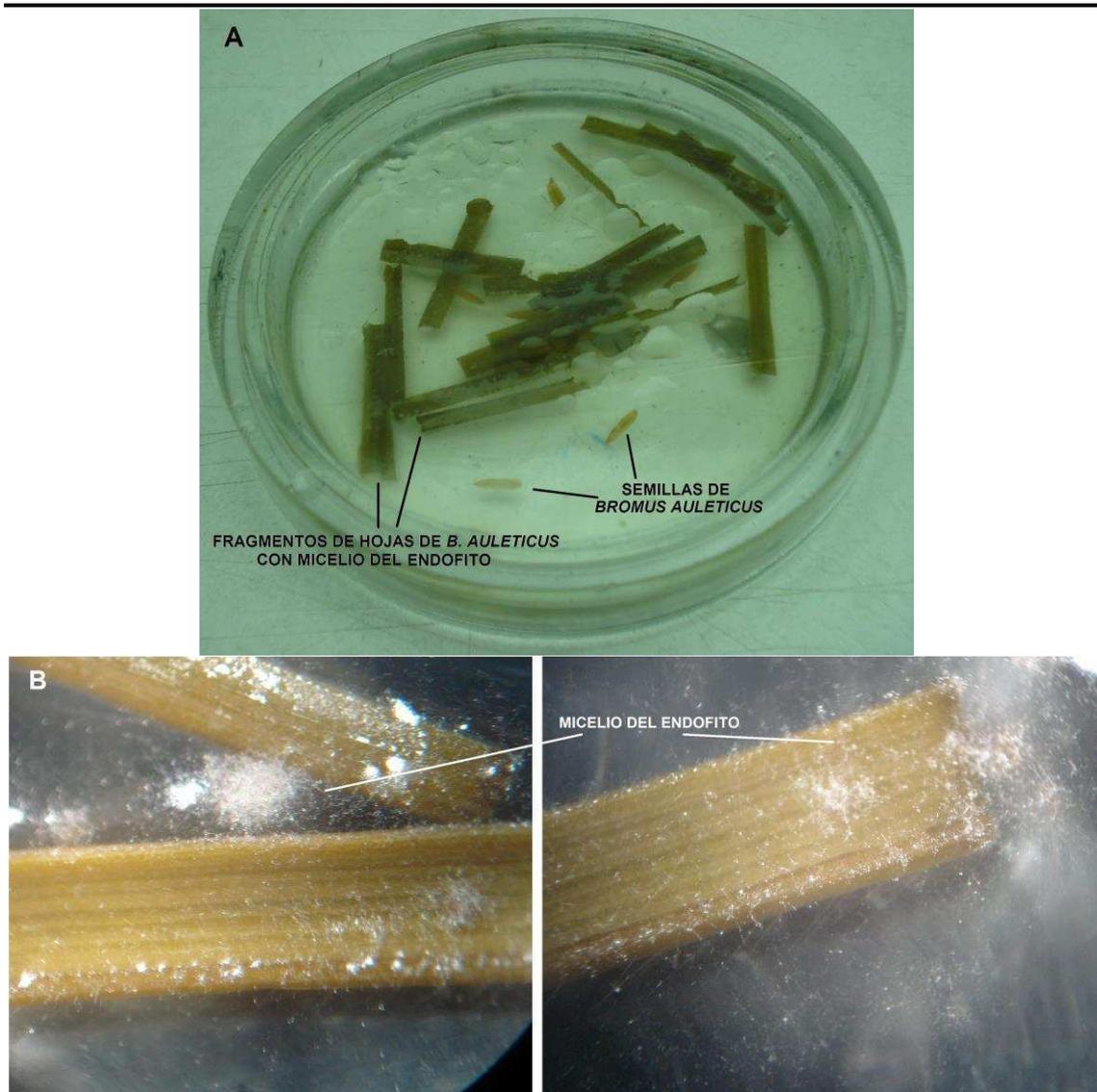


Figura 4.2: **A.** Inoculación de endofitos *Epichloë* durante la germinación de las semillas de *Bromus auleticus*. **B.** Micelio fúngico de *Epichloë* sobre fragmentos de hojas de *B. auleticus* a los 10 días de colocada la solución de conidios.

TÉCNICA 2: Esta técnica se basa en colocar micelio del endofito a inocular en una incisión realizada en la región meristemática de las plántulas a ser infectadas. Fue empleada exitosamente por Latches y Christensen (1985) y es la utilizada habitualmente para la obtención de cultivares con endofitos.

Se trabajó con semillas de las 3 poblaciones de *B. auleticus* y las tres cepas de endofitos, realizando todas las combinaciones de inoculación posibles.

Se desinfectaron superficialmente semillas de cada población, habiéndoles quitado previamente la lemma y la palea, mediante lavados sucesivos en etanol 70% 5 minutos, lavandina comercial 50% 20 minutos y etanol 50% 1 minuto. Inmediatamente después, las semillas se mantuvieron durante 48hrs en agua estéril a 5°C para

promover la germinación. Luego, se sembraron de a 10 semillas por placa de Petri (9cm) con 2,5% agar agua con cloranfenicol (AAC). Se las incubó en oscuridad en cámara a 24°C revisando periódicamente su germinación o contaminación. En este último caso, se traspasaron las semillas aún estériles a nuevas cajas de Petri con AAC. Cuando las plántulas alcanzaron aproximadamente 2cm de largo se insertó con una aguja micelio en activo crecimiento en la región meristemática de la plántula (Fig. 4.3A). Debido a que los ecotipos de *B. auleticus* presentaron diferentes porcentajes de germinación y carga fúngica contaminante en la semilla, se obtuvo diferente número de semillas inoculadas para los diferentes tratamientos del experimento, aunque se trató de esterilizar la cantidad suficiente de semillas para contar con al menos 50 plántulas de cada ecotipo por cepa a ser inoculada. Luego de unos 5 días de inoculadas (Fig 4.3B), se chequearon las plántulas inoculadas y se las plantó en germinadores con pocillos llenos de tierra y arena (1:1) que se mantuvieron en cámara de cultivo a 24°C con fotoperiodo de 12hrs de luz/oscuridad. Se realizó como control una mímica de inoculación mediante la incisión en la zona meristemática sin la inoculación de micelio.

El éxito de la inoculación se estableció mediante el análisis de la presencia de hifas de *Epichloë* en el parénquima de vainas foliares de las plantas inoculadas cuando contaban con más de un macollo (aprox. 3 meses después de la inoculación) (Clark et al. 1983). De las plantas que resultaron positivamente inoculadas se re-aisló el endofito para confirmar su identidad mediante identificación morfológica de la colonia y su tasa de crecimiento en APG.

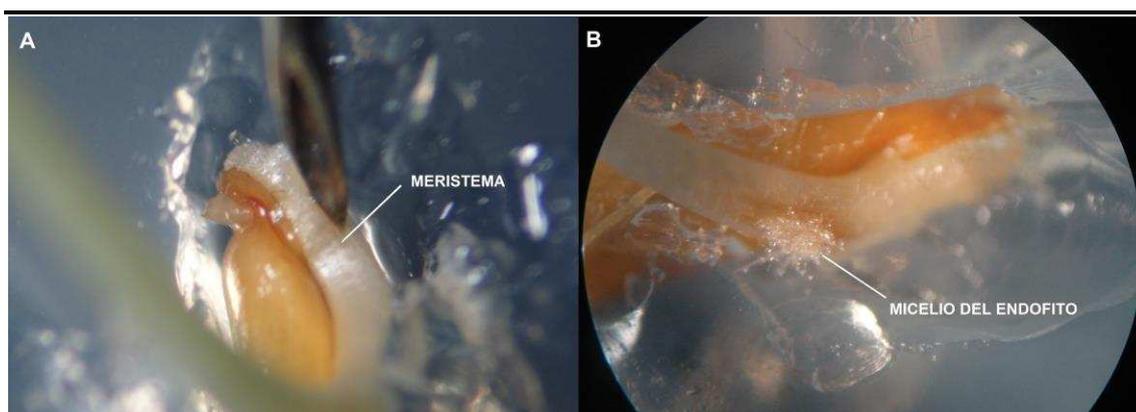


Figura 4.3: **A.** Inoculación de endofitos *Epichloë* en plántulas de *Bromus auleticus*. **B.** Micelio fúngico de *Epichloë* a los 5 días de inoculado en el meristema de la plántula.

TÉCNICA 3: Esta técnica se basa en inocular una solución de conidios del endofito sobre las flores de las plantas y evaluar su capacidad infectiva. Gillanders (2007) intentó inocular *E. uncinata* en flores de cultivares de *Festuca* spp. sin éxito

utilizando una metodología diferente. Sin embargo, dado que el endofito infecta el ovario, la floración podría ser una etapa susceptible a la infección por transmisión horizontal.

Se trabajó con las plantas adultas de 2 de las poblaciones de *B. auleticus* (EP y LP) y 2 de las cepas de endofitos (EtBa y EtPI). Las plantas de cada ecotipo se encuentran en sectores diferentes, plantadas en forma individual dejando un metro entre planta y planta. Se realizaron dos ensayos, uno en el año 2012 en el que se trabajó con 16 plantas de EP (inoculaciones realizadas EtBa+EP y EtPI+EP), y otro en el año 2013 en el que se inocularon 10 plantas de cada origen (inoculaciones realizadas EtBa+EP, EtPI+EP, EtBa+LP y EtPI+LP). No se utilizó la cepa de *E. pampeana* por su anormal y muy baja producción de conidios.

Con esta técnica se probó la inoculación en dos diferentes estadios de maduración de la panoja. En Octubre del 2012 se inoculó cuando las plantas se encontraban en anthesis (Fig. 4.4A), mientras que en Octubre del 2013 se inoculó cuando la panoja había terminado de surgir pero las flores estaban aún cerradas (Fig. 4.4B).

Aproximadamente 20 días antes de la inoculación en el campo se sembró cada cepa en placas de Petri (9cm) con APGc de forma tal de obtener un césped. El día anterior a la inoculación se realizó una suspensión de conidios para cada cepa lavando los cultivos con una solución de agua y tween 20 estéril. Luego de concentrarlas mediante centrifugación, se cuantificó ambas soluciones utilizando cámaras de Neubauer. En el ensayo del 2012 se partió de cultivos en 10 placas de Petri y se inocularon suspensiones de 4×10^4 conidios/ml, mientras que, en el ensayo del 2013 se partió de cultivos en 20 placas de Petri y se trabajó con concentraciones de 1×10^5 conidios/ml. Dichas suspensiones se llevaron refrigeradas al campo. La inoculación consistió en sumergir completamente dos panojas por cepa de cada planta inoculada (Fig. 4.5). Las semillas producidas por las panojas inoculadas fueron cosechadas en Diciembre del correspondiente año. El éxito de la inoculación se estableció mediante el análisis de la presencia de hifas de *Epichloë* en al menos 10 de las semillas, dependiendo de la disponibilidad, producidas por las panojas inoculadas mediante tinción con azul de anilina e inspección bajo microscopio óptico.



Figura 4.4: Inflorescencias de *Bromus auleticus* **A.** Estado de maduración en el que fueron inoculadas en el 2012. **B.** Estado de maduración en el que fueron inoculadas en el 2013.



Figura 4.5: Inoculación de una solución de conidios de endofitos *Epichloë* en una panoja de *Bromus auleticus*.

RESULTADOS

No se obtuvieron plantas infectadas por micelio epifítico utilizando la Técnica 1 (Tabla 4.1). La inoculación de conidios sobre flores (Técnica 3) tampoco produjo infecciones positivas (Tabla 4.1 y Fig. 4.6). Como este resultado podría deberse a que el tiempo requerido por los conidios para germinar y desarrollar un micelio infectivo era mayor al período que duró la antesis (Gutiérrez et al. 2006) se realizó el segundo ensayo en el que la inoculación se hizo al momento de la expansión de la panoja. Sin embargo, una vez más, los resultados fueron negativos.

Técnica de inoculación	Ecotipo	Inóculo	Plántulas o semillas observadas
1	EP	EtBa	63
		EtPI	59
	LP	EpBa	72
3 (2012)	EP	EtBa	235
		EtPI	243
3 (2013)	EP	EtBa	131
		EtPI	97
	LP	EtBa	114
		EtPI	152

Tabla 4.1: Tratamientos realizados con la técnica de inoculación en las semillas en germinación y en las inflorescencias de *Bromus auleticus* (técnicas 1 y 3 respectivamente) detallando el ecotipo de *B. auleticus* que recibió el inóculo, origen del inóculo, y material inspeccionado para cada tratamiento.

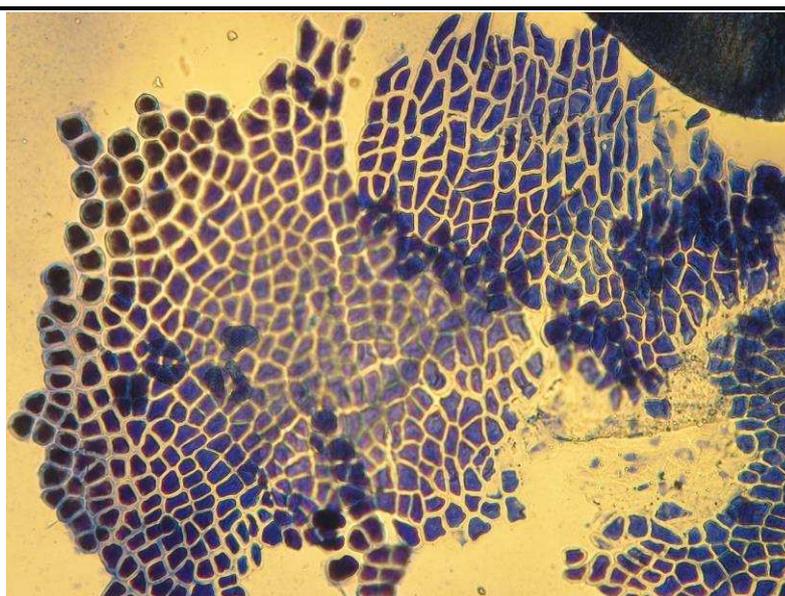


Figura 4.6: Capa de aleurona de *Bromus auleticus* sin endofito *Epichloë* (E-), resultado observado en las inoculaciones en las flores.

Sólo se obtuvieron plantas infectadas con endofito (E+) al utilizar la técnica de inoculación mediante herida en el meristema (Fig. 4.7). En la Tabla 4.2 se pueden observar los detalles de cada tratamiento y los 3 tratamientos que resultaron E+.

En la siguiente época de floración se quiso evaluar la estabilidad de las asociaciones pero no se obtuvieron semillas, por lo tanto, se decidió analizar las cañas florales. No todas las plantas E+ florecieron, pero en las que lo hicieron, se detectaron hifas características de endofitos *Epichloë* en todas sus cañas florales.

Ecotipo	Inóculo	Semillas esterilizadas	Plántulas inoculadas	Plantas sobrevivientes	Plantas E+	Cañas E+
EP	EtBa	254	104	41 (39%)	9 (22%)	20/6
	EtPI	200	82	6 (7,3%)	0 (0%)	-
	EpBa	432	141	48 (34%)	0 (0%)	-
	Control	100	35	18 (51,4%)	0 (0%)	-
Mortalidad				66,9%		
LP	EtBa	375	73	20 (27,4%)	2 (10%)	1/1
	EtPI	210	97	12 (12,3%)	4 (33%)	0/0
	EpBa	372	106	30 (28,3%)	0 (0%)	-
	Control	100	44	24 (54,5%)	0 (0%)	-
Mortalidad				69,3%		
BC	EtBa	609	128	9 (7,3%)	0 (0%)	-
	EtPI	200	52	10 (19%)	0 (0%)	-
	EpBa	579	118	21(17,7%)	0 (0%)	-
	Control	100	26	7 (26%)	0 (0%)	-
Mortalidad				82,5%		

Tabla 4.2: Tratamientos realizados al inocular el meristema de plántulas de *Bromus auleticus* (técnica 2), detallando el ecotipo de *B. auleticus* receptor, el origen del inóculo y el número de semillas esterilizadas, plántulas inoculadas y plantas sobrevivientes luego de 9 meses (en negrita el tratamiento con mayor porcentaje de mortalidad). También se indica el número de plantas que resultaron infectadas por *Epichloë* spp (E+) y cuantas cañas florales E+ produjeron las plantas que florecieron.

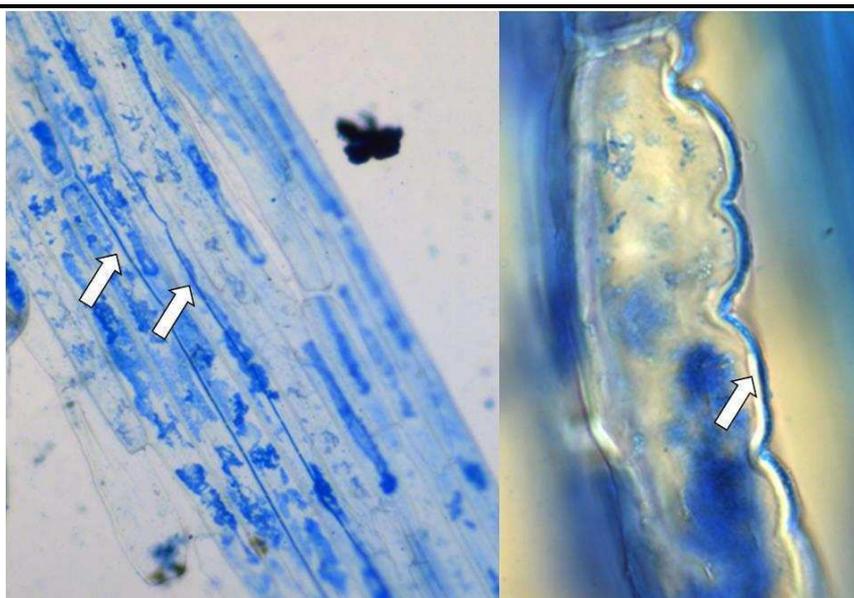


Figura 4.7: *Epichloë* en parénquima foliar, resultados E+ en las inoculaciones en el meristema.

Debido al bajo porcentaje de éxito obtenido, solo se realizaron análisis estadísticos de los resultados de la técnica 2 considerando las cepas de *E. tembladeraae*. Se comparó la eficiencia global de infección de las dos cepas de *E. tembladeraae* dando no significativa ($X_2=0,031$; $p=0,86$; $\alpha=0.05$). Además, en el ecotipo LP, el éxito de infección resultó independiente de la cepa de *E. tembladeraae* utilizada ($G/q=2.38 < X_2=3.84$). El análisis morfológico del reislamiento de endofitos de las plantas que resultaron E+ permitió establecer que los endofitos aislados presentaron las características morfológicas del aislamiento inoculado.

Las semillas de *B. auleticus* originarias de Balcarce presentaron dos inconvenientes. Por un lado, la carga fúngica de la cubierta seminal resultó ser más elevada que la de los otros dos ecotipos, y por lo tanto muchas semillas se perdieron al resultar insuficiente la esterilización superficial que se les realizó. Por otro lado, presentaron una muy baja tasa de germinación. Se observó una alta mortalidad de las plántulas inoculadas en todos los tratamientos de la inoculación por herida en el meristema (Fig 4.8).



Figura 4.8: Ejemplo de germinador con plantas inoculadas mediante herida en el meristema. Se puede observar la alta mortalidad, ya que hay pocas plantas sobrevivientes en un germinador donde había plántulas inoculadas en todos sus pocillos.

DISCUSIÓN

El uso de estas tres técnicas de inoculación tuvo como objetivo probar la posibilidad de transmisión horizontal de endofitos asexuales en diversas etapas de desarrollo de la planta. La única técnica efectiva fue la inoculación mediante una herida en el meristema, que si bien podría ser la menos “natural”, por su eficiencia es la utilizada habitualmente para obtener nuevas combinaciones de gramínea-endofito, por lo que se esperaba obtener algún resultado positivo.

La falta de éxito de inoculación a través de micelio epifítico indicaría la incapacidad del micelio de *E. tembladerae* y de *E. pampeana* para infectar plántulas sanas en las condiciones ensayadas. Es posible que no todas las cepas asexuales presenten transmisión horizontal o que posean diferentes eficiencias de dicha transmisión, siendo probablemente la razón por la cual su existencia sólo ha sido comprobada en el último tiempo para algunos sistemas. Cabe mencionar que Tadych et al. (2012) utilizó para el experimento una cepa capaz de desarrollar estromas inmaduros sobre el hospedante, al igual que Li et al. (2015).

La infección mediante la aplicación de conidios en suspensión a través de las flores simularía una alternativa más “natural” según el ciclo de vida de estos hongos. Los resultados negativos podrían deberse a que los conidios no son capaces de germinar sobre las flores en las condiciones ambientales al momento que fueron realizadas las inoculaciones o a que la infección podría estar facilitada también por moscas que habitualmente se observan en las inflorescencias de *B. auleticus*, no siendo en el caso de las cepas probadas el agua el medio de dispersión adecuado. Tampoco es posible descartar que el número de plantas y semillas analizadas no haya sido lo suficientemente alto para detectar un fenómeno que podría ser muy poco frecuente en términos estadísticos para ciertas especies de endofitos asexuales.

Con respecto a la inoculación mediante herida en meristema, sólo resultaron positivas las inoculaciones realizadas sobre plántulas que provenían de ecotipos que habían sido previamente E+ (EP y LP), y los porcentajes de efectividad obtenidos son consistentes o ligeramente inferiores con los reportados por otros autores (Simpson et al. 2012; Oberhofer y Leuchtman 2014). En cuanto a las plántulas originarias de Balcarce, no se obtuvieron resultados positivos para ninguno de los tratamientos planteados, sugiriendo que posiblemente haya algún tipo de incompatibilidad con los endofitos inoculados. Este ecotipo presentó la mayor mortalidad de plántulas inoculadas por cualquiera de los tres aislamientos (Tabla 4.2) y tampoco se encuentra

infectada en las poblaciones naturales. Este resultado podría deberse a diferencias a nivel genético entre las plantas de poblaciones naturalmente E+ vs. E- que hacen que la simbiosis sea incompatible en éstas últimas. Es interesante notar que las plántulas de *B. auleticus* de La Pampa resultaron compatibles para la infección por parte de *E. tembladeraae* aislada tanto de *B. auleticus* como de *P. lanigera*, siendo el mayor porcentaje aquel de la segunda combinación, que proviene de un hospedante diferente y distanciado geográficamente. Mientras que, en las plantas de El Palmar no fue posible inocular *E. tembladeraae* de una especie hospedante simpátrica. La caracterización realizada de estos endofitos en el Capítulo 1 indicó que las plantas de El Palmar no se asocian a *E. tembladeraae* y posiblemente esto explique la presencia de un endofito diferente en *B. auleticus* de esta localidad.

La cepa de *E. pampeana* (BAFC1623) no pudo ser inoculada con éxito con ninguna de las técnicas en las que se la utilizó. Esto indicaría que esta especie podría ser incapaz de transmitirse horizontalmente, y explicaría el motivo por el cual sólo se ha encontrado en una especie hospedante y en una región particular de su área de distribución. Una de las posibles causas de esta incapacidad podría ser que presenta velocidades de crecimiento muy bajas y produce pocos conidios que se separan con parte de la célula conidiógena, posiblemente dificultando su dispersión.

En cuanto a la metodología, se puede decir que *B. auleticus* presenta una baja tasa de germinación en las condiciones utilizadas para el ensayo, alcanzándose la mayor velocidad de germinación al mes de puestas a germinar. Además, a diferencia de los hospedantes evaluados en la mayoría de los ensayos (especies comerciales anuales o domesticadas) la germinación se dio a lo largo de un período extenso con pocas semillas germinando cada día, requiriendo de un continuo control para ser inoculadas. La tasa de germinación suele ser mayor al hacer germinar las semillas sin esterilizar en cajas de Petri con papel de filtro húmedo, a pesar de esto, no se disminuyó el tiempo de esterilización ya que al hacerlo hubo un considerable aumento de contaminación llevando a una mayor pérdida de material a inocular. En las semillas originarias de Balcarce, además de la baja tasa de germinación hubo una alta proporción de semillas descartadas por contaminación, planteando la necesidad de realizar diferentes protocolos de esterilización para ciertos ecotipos.

Sería interesante probar inoculaciones en diferentes hospedantes ya que el éxito depende del genotipo de ambos miembros de la asociación. Por ejemplo, hay casos en que las inoculaciones recíprocas se comportan diferencialmente. Brem & Leuchtman (2003) registraron que cepas asexuales de *Epichloë* de *Bromus benekenii* y *Bromus ramosus* no pudieron infectar a *Bromus erectus* mientras que la cepa de

este último hospedante (aunque sexual) si fue compatible con los tres hospedantes. Debido a los resultados obtenidos en la inoculación en meristema de plántulas, parecería no haber ninguna incompatibilidad entre el ecotipo de *B. auleticus* de La Pampa y la cepa de *E. tembladeraae* (2787) aislada de *Poa lanigera* de El Palmar, por lo que sería interesante probar la técnica utilizada por Tadych et al. (2012) para dicha combinación.

Estos resultados sugieren la posibilidad de transmisión horizontal de *E. tembladeraae*, como se espera por encontrar dicha especie asociada a diversas gramíneas. Sin embargo, debería evaluarse también la estabilidad de las nuevas asociaciones mediante la detección de endofitos en las semillas de la siguiente floración y las plántulas que surjan de ellas. En este trabajo se detectaron hifas de endofitos *Epichloë* en el parénquima de todas las cañas de las plantas que florecieron. Sin embargo, no todas las plantas florecieron y no se obtuvieron semillas. Por lo que estos resultados sólo sugieren que en las nuevas asociaciones los endofitos son capaces de colonizar macollos reproductivos, pero es necesario un ensayo con un mayor número de plantas inoculadas exitosamente y la obtención de semillas.

Considerando la diversidad de endofitos detectada en esta tesis, aún dentro de *E. tembladeraae*, resulta necesario plantear nuevos ensayos de inoculación donde se combinen los distintos genotipos de endofitos y poblaciones de *B. auleticus* y aún de otros hospedantes asociados a *E. tembladeraae*. Además, aún deberían evaluarse posibles mecanismos de dispersión alternativos en condiciones naturales y que no involucren herida artificial del meristema. Encontrar mecanismos de transmisión horizontal también puede ayudar a mejorar el rendimiento de las técnicas de inoculación *in vitro*. Sin embargo, no deja de ser importante recalcar que estos resultados demuestran el potencial de *B. auleticus* para hospedar endofitos aislados de otros hospedantes que sean de interés para el mejoramiento de dicha forrajera.

CONCLUSIONES PARCIALES

- Diferentes cepas de *E. tembladeraae* pudieron ser inoculadas con éxito a plántulas de *B. auleticus*. El ecotipo de *B. auleticus* de La Pampa logró ser infectado con cepas provenientes del mismo hospedante y de otro (*P. lanigera*), mientras que el ecotipo de El Palmar, sólo logró infectarse con aquella proveniente de *B. auleticus*.
- Estos resultados sugieren la posibilidad de transmisión horizontal de *E. tembladeraae*, como se espera por encontrar dicha especie asociada a diversas gramíneas.
- Aún deberían realizarse más estudios para evaluar posibles mecanismos de dispersión alternativos en condiciones naturales.

DISCUSIÓN GENERAL

Bromus auleticus se encuentra asociada a diferentes especies de endofitos *Epichloë*, habiéndose descrito hasta el momento dos especies: *E. pampeana* y *E. tembladeraae*. Dada la extensa área de distribución que presenta esta gramínea invernada, nativa de Argentina, Uruguay y Brasil, se esperaba encontrar variabilidad intraespecífica al analizar un mayor número de aislamientos. Los marcadores utilizados permitieron distinguir una mayor variabilidad a la esperada, que llevaron a proponer la descripción de nuevos taxones. La gran variabilidad detectada mediante el análisis filogenético de secuencias del gen *calM* demuestra su utilidad para estudios de diversidad.

Los 8 genotipos híbridos detectados en *B. auleticus* conformarían al menos 4 linajes bien establecidos, uno derivado de parentales *E. amarillans*/*E. baconii* x *E. typhina* y el resto de *E. festucae* x *E. typhina* subsp. *poae*. Las relaciones filogenéticas de estos linajes mostraron clados bien soportados determinando a *E. pampeana*, *E. tembladeraae*, *E. platensis* y el genotipo A.

La posición de los aislamientos del genotipo D en las filogenias de *calM* no permite determinar sus relaciones de ancestralidad con respecto a los linajes mencionados anteriormente. Sin embargo, el perfil de alcaloides y los genes de *mating type* (AB) de este genotipo indicarían una relación más cercana a *E. pampeana*. Entre los diferentes escenarios evolutivos posibles, podría plantearse como hipótesis de origen de estos endofitos la ocurrencia de 3 o 4 eventos de hibridación. Por un lado, el que da lugar al genotipo A. El segundo sería entre ancestros de *E. typhina* subsp. *poae* x *E. festucae* uno con *mating type* A y el otro con *mating type* B con posterior divergencia, obteniendo los genotipos D y *E. pampeana*. Finalmente, podrían plantearse dos escenarios posibles para el origen de *E. tembladeraae* y *E. platensis*, considerando 1 o 2 eventos de hibridación entre ancestros de *E. typhina* subsp. *poae* var. *aonikenkana* x *E. festucae*, ambos con *mating type* A. En un escenario, ambos linajes derivarían de un único evento de hibridación que sería seguido por la pérdida de *clusters* enteros de EAS en un linaje dando lugar a *E. tembladeraae*, que posteriormente podría haberse diversificado mediante la pérdida de algunos genes de IDT y la transmisión horizontal entre hospedantes de distintas especies. La otra línea evolutiva habría conservado parte de los genes EAS dando lugar al linaje *E. platensis* que luego podría haberse diversificado en los cuatro genotipos detectados actualmente. En otro escenario, se consideran 2 eventos de hibridación, uno se habría dado en *B. auleticus* originando a

E. platensis con posterior divergencia en los distintos genotipos que componen esta especie, posiblemente influenciados por las condiciones del área geográfica en donde se encuentran. Esto habría ocurrido paralelamente a un segundo evento de hibridación de esas especies parentales que originaría a *E. tembladeraae* seguido de la transmisión horizontal entre sus múltiples hospedantes acompañada de pérdida de algunos genes IDT. Análisis filogenéticos de otras regiones génicas conservadas de amplia aplicación, como ser *tefA* y *tubB*, podrían ayudar a resolver estas filogenias.

Los marcadores utilizados en el presente trabajo permitieron detectar variabilidad dentro de *E. platensis* y *E. tembladeraae*, pero no dentro de *E. pampeana* y el genotipo D, por lo que el análisis de un mayor número de aislamientos y marcadores como los microsatélites son necesarios para evaluar la diversidad intraespecífica en estos taxones.

Los genotipos fúngicos detectados en *B. auleticus* parecen encontrarse predominantemente en diferentes zonas geográficas, resultado esperable dada la importancia del ambiente en estas asociaciones simbióticas (Ahlholm et al. 2002; Davitt et al. 2011). Incluso los genotipos diferenciados dentro de *E. platensis* muestran un agrupamiento geográfico. Entre las poblaciones en las que se analizó más de un aislamiento, sólo la ubicada en el Arroyo Don Gonzalo (Entre Ríos) presentó dos genotipos fúngicos. Sin embargo, en pocas poblaciones se analizó más de dos aislamientos. La distribución potencial de estos genotipos mostró zonas altamente adecuadas diferentes para cada genotipo, pero con superposición de las áreas con menor potencial para encontrarlas. Estas observaciones remarcan la necesidad de plantear nuevos muestreos para análisis poblacionales y así poder afirmar cuáles son los límites de cada genotipo y si presentan distribuciones disyuntas. Esto también permitiría obtener los datos necesarios para fortalecer o cambiar la asociación encontrada con las variables climáticas, siendo de interés incorporar otras variables ambientales que trabajos previos relacionaron con la incidencia de los endofitos *Epichloë* en diferentes hospedantes (Iannone et al. 2012a; Novas et al. 2007). Dado que al incluir diferentes hospedantes la mayoría de los genotipos se encontró solamente en *B. auleticus*, sería ideal caracterizar a las poblaciones del hospedante conjuntamente con el endofito para estudiar el nivel de coevolución entre ambos simbiontes. Además, haber registrado poblaciones naturales libres de endofitos puede colaborar a futuros estudios fisiológicos que investiguen el efecto del endofito en el rendimiento de su hospedante y el delicado balance que mantienen en sus relaciones mutualistas, además de su interacción con el ambiente.

La continuidad de los muestreos también es de interés para el resto de las gramíneas. A medida que se logran relevar más hospedantes, la presencia de linajes con un ancestro común de *E. amarillans* y *E. baconii* comienza a tomar más relevancia en Sudamérica, encontrándose en *E. cabralii* de *Phleum alpinum*, un aislamiento de *Hordeum comosum* y un aislamiento de *B. auleticus* (el genotipo A de esta tesis), por lo que ampliar los muestreos de las zonas donde estos aislamientos únicos fueron encontrados ayudaría a establecer mejor las relaciones filogenéticas entre ellos. La caracterización de los endofitos de Uruguay está todavía en sus comienzos, pero muestra claras señales de que también son diversos.

Una vez más la caracterización de la diversidad de endofitos de Argentina muestra la ubicuidad de *Epichloë tembladerae*. Esta especie se encuentra asociada a por lo menos 18 especies de gramíneas diferentes, agregando a *Calamagrostis alba* y *Polypongon elongatus* a la lista por los muestreos realizados en el marco de esta tesis. Cabral et al. (1999) fueron quienes la describieron por primera vez reportando su toxicidad en 4 especies hospedantes, sin embargo, no se ha encontrado tal efecto en grandes herbívoros para el resto de los hospedantes. El perfil de genes de alcaloides de *E. tembladerae* muestra que ningún aislamiento analizado, incluso los de hospedantes tóxicos como *Poa huecu* y *Festuca hieronymi*, presenta genes pertenecientes a la síntesis de alcaloides del ergot. Además, aunque variable, el perfil para los genes de indol diterpenos indica que algunas cepas podrían producir TDC como compuesto más complejo de la ruta de los indol diterpenos, que sólo puede afectar a pequeños herbívoros.

Las relaciones filogenéticas y las similitudes observadas en genotipos de endofitos de hospedantes simpátricos asociados a *E. tembladerae* permite plantear a la transmisión horizontal como mecanismo de propagación y diversificación de esta especie. Sumado a esto, *E. tembladerae* reúne características que apoyan dicha hipótesis: i. presenta estructuras de reproducción en el epifilo del hospedante; ii. presenta un amplio rango de hospedantes simpátricos y iii. puede ser inoculada en otras plantas de la misma u otra especie hospedante, aunque sólo se logró mediante la manipulación en el laboratorio. Los estudios donde se comprobó la transmisión horizontal son recientes y más mecanismos que los descritos hasta el momento podrían estar involucrados en este proceso. Se considera al agua y a los herbívoros como factores involucrados en la dispersión, tanto por salpicaduras de lluvia como por pastoreo entre plantas infectadas y no infectadas con endofitos (Oberhofer y Leuchtman 2014; Wiewióra et al. 2015), siendo ambas posibles en el caso de *E. tembladerae* con la intensa historia ganadera de Argentina y Uruguay. Los resultados

obtenidos en esta tesis podrán ser utilizados en futuros análisis de diversidad genética y distancia geográfica para intentar establecer patrones distribución y diversificación entre los genotipos detectados. Además, sugieren que un estudio que abarque un número más acotado de localidades con hospedantes simpátricos y que incluya una mayor cantidad de aislamientos de cada hospedante y mediante el uso de otros marcadores más variables como los microsátélites, permitirá clarificar o complicar aún más nuestro conocimiento de las relaciones filogenéticas entre endofitos de un hospedante y la de sus vecinos.

La gran diversidad de endofitos que se evidenció al estudiar un número considerable de aislamientos de un solo hospedante, plantea el interrogante de cuánta diversidad de endofitos existirá en otras gramíneas hospedantes de las que en general no se han estudiado más de diez aislamientos y en muchos casos parecen presentar más de un endofito como se ha detectado en *Ph. alpinum*, *B. setifolius* y *Hordeum comosum* (Mc Cargo et al. 2014; Iannone et al. 2015) o en *Poa lanigera*, *Briza paleopilifera* y *F. hieronymi* en esta tesis.

De acuerdo con el perfil de genes de alcaloides de los aislamientos analizados, Argentina cuenta con una amplia diversidad de cepas con potencial para ser aplicadas en el mejoramiento de forrajeras, incluyendo a nativas como *B. auleticus*, por producir alcaloides con actividad anti-insectos pero ser inocuas para el ganado. Todas las cepas serían capaces de sintetizar peramina, pero se destacan los genotipos D, J y *E. pampeana* por ser potenciales productores de lolinas (ya comprobado en plantas asociadas a *E. pampeana*). Lograr completar la caracterización en cuanto a las rutas de síntesis de alcaloides de todos los aislamientos existentes y los que se obtendrán en un futuro, así como el análisis en la planta, sería de gran utilidad para la selección de cepas con gran potencial agronómico.

CONCLUSIONES GENERALES

- *Bromus auleticus* presenta una alta diversidad de endofitos *Epichloë*, estando asociada al menos a 8 genotipos híbridos interespecíficos, cuatro de los cuales fueron agrupados en la nueva especie propuesta *Epichloë platensis*.
- Los distintos endofitos de *B. auleticus* se encuentran predominantemente en diferentes zonas geográficas.
- Los resultados obtenidos en cuanto a análisis filogenéticos, presencia de genes de rutas de síntesis de alcaloides y *mating type* demuestran que *E. tembladerae* no es el endofito predominante en este hospedante y que *E. tembladerae* y *E. pampeana* serían el resultado de diferentes eventos de hibridación.
- *Bromus auleticus* habita en simpatría con otras gramíneas hospedantes de endofitos, sin embargo, no se detecta una clara asociación entre cada comunidad y una especie de endofito predominante.
- Nuevas evidencias apoyan la hipótesis que *Epichloë tembladerae* puede potencialmente transmitirse de forma horizontal. Además de incluir dos especies más a su rango de hospedantes (*Calamagrostis alba* y *Polypogon elongatus*), aislamientos obtenidos de *B. auleticus* o *Poa lanigera* pudieron ser inoculados en plantas libres de ellos. Sin embargo, no se detectó un mecanismo natural de dispersión.
- Todos los aislamientos de endofitos de Argentina analizados, incluyendo los diferentes genotipos detectados en *B. auleticus*, no poseen los genes necesarios para la síntesis de alcaloides tóxicos para el ganado pero sí para la producción de peramina (alcaloide anti-insectos).
- *Epichloë platensis*, es la única especie que podría producir chanoclavina I, un alcaloide del ergot, que demostró ser tóxica para pequeños herbívoros. Los genotipos endofíticos D, J y *E. cabralii* asociados a *B. auleticus*, *Poa lanigera* y *Phleum alpinum*, respectivamente, serían productores de lolinas, además de *E. pampeana* cuya capacidad para producir este alcaloide fue previamente comprobada en plantas.

REFERENCIAS

- Afkhami ME, Rudgers JA (2008) Symbiosis lost: imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. *The American Naturalist* 172 (3):405-416.
- Afkhami ME, McIntyre PJ, Strauss SY (2014) Mutualist-mediated effects on species' range limits across large geographic scales. *Ecology Letters* 17 (10):1265-1273.
- Ahlholm JU, Helander M, Lehtimäki S, Wäli P, Saikkonen K (2002) Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. *Oikos* 99 (1):173-183.
- Arachevaleta M, Bacon CW, Hoveland CS, Radcliffe DE (1989) Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal* 81 (1):83-90.
- Araujo MB, Guisan A (2006) Five (or so) challenges for species distribution modelling. *Journal of Biogeography* 33 (10):1677-1688.
- Bacetty AA, Snook ME, Glenn AE, Noe JP, Hill N, Culbreath A, Timper P, Nagabhyru P, Bacon CW (2009) Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *Phytopathology* 99 (12):1336-1345.
- Bec S, Liu J, Schardl CL (2013) Molecular and genetic basis guiding the establishment of a mutualistic relationship between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. En: *Proceedings of the APS-MSA Joint Meeting 2013*, American Phytopathological Society, pp 13.
- Benavente CA, Kurina-Sanz M, Lugo MA (2008) Micofilas, endófitos fúngicos y alcaloides en poblaciones de *Melica stuckertii* (Poaceae) del Centro de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 43 (3-4):189-195.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2013) GenBank. *Nucleic Acids Research* 41 (D1):D36-D42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Bertoni M, Cabral D, Romero N, Dubcovsky J (1993) Endofitos fúngicos en especies sudamericanas de *Festuca* (Poaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 29 (1-2):25-34.
- Bouton JH, Latch G, Hill NS, Hoveland CS, McCann MA, Watson RH, Parish JA, Hawkins LL, Thompson FN (2002) Reinfection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agronomy Journal* 94 (3):567-574.
- Brem D, Leuchtman A (2003) Molecular evidence for host-adapted races of the fungal endophyte *Epichloë bromicola* after presumed host shifts. *Evolution* 57 (1):37-51.
- Bultman TL, Aguilera A, Sullivan TJ (2012) Influence of fungal isolates infecting tall fescue on multitrophic interactions. *Fungal Ecology* 5 (3):372-378.

- Bustamante E, Ruiz M, Morici E, Babinec F, Pordomingo A (2012) Accumulated biomass and nutritional quality indicators in chaco bromegrass (*Bromus auleticus* Trinius ex Nees). *Revista de Investigaciones Agropecuarias - INTA* 38: 3.
- Cabral D, Cafaro MJ, Saidman B, Lugo M, Reddy PV, White Jr JF (1999) Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia* (2):315-325.
- Cabrera AL (1971) Fitogeografía de la república Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 14 (1-2):1-42.
- Cabrera AL (1976) Las Regiones Fitogeográficas Argentinas. En: *Enciclopedia Argentina de Agricultura, Jardinería y Horticultura*.
- Casas C, Omacini M, Montecchia MS, Correa OS (2010) Soil microbial community responses to the fungal endophyte *Neotyphodium* in Italian ryegrass. *Plant and Soil* 340 (1-2):347-355.
- Charlton ND, Craven KD, Mittal S, Hopkins AA, Young CA (2012) *Epichloë canadensis*, a new interspecific epichloid hybrid symbiotic with Canada wildrye (*Elymus canadensis*). *Mycologia* 104 (5):1187-1199.
- Charlton ND, Craven KD, Afkhami ME, Hall BA, Ghimire SR, Young CA (2014) Interspecific hybridization and bioactive alkaloid variation increases diversity in endophytic *Epichloë* species of *Bromus laevipes*. *FEMS Microbiology Ecology* 90 (1):276-289.
- Chin D, Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology* 10 (8):322-328.
- Christensen MJ, Bennett RJ, Schmid J (2002) Growth of *Epichloë/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycological Research* 106 (1):93-106.
- Christensen MJ, Bennett RJ, Ansari HA, Koga H, Johnson RD, Bryan GT, Simpson WR, Koolaard JP, Nickless EM, Voisey CR (2008) *Epichloë* endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. *Fungal Genetics and Biology* 45 (2):84-93.
- Christensen MJ, Saulsbury K, Simpson WR (2012) Conspicuous epiphytic growth of an interspecific hybrid *Neotyphodium* sp. endophyte on distorted host inflorescences. *Fungal Biology* 116 (1):42-48.
- Chu-Chou M, Guo B, An Z-Q, Hendrix J, Ferriss R, Siegel M, Dougherty C, Burrus P (1992) Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the *Acremonium coenophialum* endophyte. *Soil Biology and Biochemistry* 24 (7):633-637.
- Chung K-R, Hollin W, Siegel MR, Schardl CL (1997) Genetics of host specificity in *Epichloë typhina*. *Phytopathology* 87 (6):599-605.
- Clark E, White JF, Patterson R (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 (3):149-155.

- Clarke BB, White Jr JF, Hurley RH, Torres MS, Sun S, Huff DR (2006) Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease* 90 (8):994-998.
- Clay K (1988) Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69 (1):10-16.
- Clay K (1990) Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:275-297.
- Clay K, Schardl CL (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160 (S4):S99-S127.
- Conde-Ferrández L (2007) El locus MAT (mating-type) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Revista Iberoamericana de Micología* 24 (2):95-99.
- Davitt AJ, Chen C, Rudgers JA (2011) Understanding context-dependency in plant-microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. *Environmental and Experimental Botany* 71 (2):137-145.
- Dugan FM, Sitton JW, Sullivan RF, White Jr JF (2002) The *Neotyphodium* endophyte of wild barley (*Hordeum brevisubulatum* subsp. *violaceum*) grows and sporulates on leaf surfaces of the host. *Symbiosis* 32 (2):147-160.
- Eaton CJ, Cox MP, Scott B (2011) What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Science* 180 (2):190-195.
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudík M, Ferrier S, Guisan A, Hijmans RJ, Huettmann F, Leathwick JR, Lehmann A, Li J, Lohmann LG, Loiselle BA, Manion G, Moritz C, Nakamura M, Nakazawa Y, McC. Overton J, Townsend Peterson A, Phillips SJ, Richardson K, Scachetti-Pereira R, Schapire RE, Soberón J, Williams S, Wisz MS, Zimmermann NE (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29 (2):129-151.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4):783-791.
- Fleetwood DJ, Khan AK, Johnson RD, Young CA, Mittal S, Wrenn RE, Hesse U, Foster SJ, Schardl CL, Scott B (2011) Abundant degenerate miniature inverted-repeat transposable elements in genomes of epichloid fungal endophytes of grasses. *Genome Biology and Evolution* 3:1253-1264.
- Fungorum I (2008) CABI bioscience databases. URL: <http://www.indexfungorum.org/>.
- Gallagher RT, White EP, Mortimer PH (1981) Ryegrass staggers: isolation of potent neurotoxins lolitrem A and lolitrem B from staggers-producing pastures. *New Zealand Veterinary Journal* 29 (10):189-190.
- Gentile A, Rossi MS, Cabral D, Craven KD, Schardl CL (2005) Origin, divergence, and phylogeny of *Epichloë* endophytes of native Argentine grasses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35 (1):196-208.

- Gillanders TJ (2007) The development of new inoculation techniques and viability tests for *Neotyphodium* endophytes. Tesis Doctoral.
- Glenn AE, Bacon CW, Price R, Hanlin RT (1996) Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88 (3):369-383.
- Gundel PE, Maseda PH, Vila-Aiub MM, Ghersa CM, Benech-Arnold R (2006) Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany* 97 (4):571-577.
- Gundel PE, Omacini M, Sadras VO, Ghersa CM (2010) The interplay between the effectiveness of the grass-endophyte mutualism and the genetic variability of the host plant. *Evolutionary Applications* 3 (5-6):538-546.
- Gutiérrez HF, Pensiero JF (1998) Sinopsis de las especies argentinas del género *Bromus* (Poaceae). *Darwiniana* 35 (1-4):75-114.
- Gutiérrez HF, Medan D, Pensiero JF (2006) Limiting factors of reproductive success in *Bromus auleticus* (Poaceae). 1. Flowering phenology, sexual expression, and pollen production. *New Zealand Journal of Botany* 44 (1):47-55.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. En: *Nucleic Acids Symposium Series*, pp 95-98.
- Hamilton CE, Faeth SH, Dowling TE (2009) Distribution of hybrid fungal symbionts and environmental stress. *Microbial Ecology* 58 (2):408-413.
- Hesse U, Schöberlein W, Wittenmayer L, Förster K, Warnstorff K, Diepenbrock W, Merbach W (2003) Effects of *Neotyphodium* endophytes on growth, reproduction and drought-stress tolerance of three *Lolium perenne* L. genotypes. *Grass and Forage Science* 58 (4):407-415.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International journal of climatology* 25 (15):1965-1978. URL: <http://www.worldclim.org/>.
- Hill NS, Stringer WC, Rottinghaus GE, Belesky DP, Parrott WA, Pope DD (1990) Growth, morphological, and chemical component responses of Tall Fescue to *Acremonium coenophialum*. *Crop Science* 30 (1):156-161.
- Hoffman GD, Rao S (2014) Fertilization of *Epichloë typhina* stromata by mycophagous slugs. *Mycologia* 106 (1):1-7.
- Holt RD (2009) Bringing the Hutchinsonian niche into the 21st century: ecological and evolutionary perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (S2):19659-19665
- Hutchinson G (1957) Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 22:415-427.

- Iannone LJ, Cabral D (2006) Effects of the *Neotyphodium* endophyte status on plant performance of *Bromus auleticus*, a wild native grass from South America. *Symbiosis* 41 (2):61-69.
- Iannone LJ, Cabral D, Schardl CL, Rossi MS (2009) Phylogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium* endophyte species in the grass *Bromus auleticus* from South America. *Mycologia* 101 (3):340-351.
- Iannone LJ, White JF, Giussani LM, Cabral D, Novas MV (2011) Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycological Progress* 10 (1):9-19.
- Iannone LJ, Mc Cargo PD, Giussani LM, Schardl CL (2012a) Geographic distribution patterns of vertically transmitted endophytes in two native grasses in Argentina. *Symbiosis* 59 (2):99-110.
- Iannone LJ, Novas MV, Young CA, De Battista JP, Schardl CL (2012b) Endophytes of native grasses from South America: Biodiversity and ecology. *Fungal Ecology* 5 (3):357-363.
- Iannone LJ, Pinget AD, Nagabhyru P, Schardl CL, De Battista JP (2012c) Beneficial effects of *Neotyphodium tembladerae* and *Neotyphodium pampeanum* on a wild forage grass. *Grass and Forage Science* 67 (3):382-390.
- Iannone LJ, Irisarri JGN, Mc Cargo PD, Pérez LI, Gundel PE (2015) Occurrence of *Epichloë* fungal endophytes in the sheep-preferred grass *Hordeum comosum* from Patagonia. *Journal of Arid Environments* 115:19-26.
- Johnson-Cicalese J, Secks ME, Lam CK, Meyer WA, Murphy JA, Belanger FC (2000) Cross species inoculation of chewings and strong creeping red fescues with fungal endophytes. *Crop Science* 40 (5):1485-1489.
- Karimi S, Mirlohi A, Sabzalian MR, Tabatabaei BES, Sharifnabi B (2012) Molecular evidence for *Neotyphodium* fungal endophyte variation and specificity within host grass species. *Mycologia* 104 (6):1281-1290.
- Kearney JF, Parrott WA, Hill NS (1991) Infection of somatic embryos of Tall Fescue with *Acremonium coenophialum*. *Crop Science* 31 (4):979-984.
- Kuldau GA, Tsai H-F, Schardl CL (1999) Genome sizes of *Epichloë* species and anamorphic hybrids. *Mycologia* 91 (5):776-782.
- Kuldau GA, Bacon CW (2008) Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control* 46 (1):57-71.
- Kusari S, Hertweck C, Spiteller M (2012) Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology* 19 (7):792-798.
- Latches GCM, Christensen MJ (1985) Artificial infection of grasses with endophytes. *Annals of Applied Biology* 107 (1):17-24.

- Lehtonen P, Helander M, Wink M, Sporer F, Saikkonen K (2005) Transfer of endophyte-origin defensive alkaloids from a grass to a hemiparasitic plant. *Ecology Letters* 8 (12):1256-1263.
- Lemons A, Clay K, Rudgers JA (2005) Connecting plant–microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. *Oecologia* 145 (4):595-604.
- Leuchtman A (1993) Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins* 1 (3):150-162.
- Leuchtman A, Schmidt D, Bush L (2000) Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *Journal of Chemical Ecology* 26 (4):1025-1036.
- Leuchtman A, Schardl CL, White Jr JF, Tadych M (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia* 106 (2): 202-215.
- Li X, Zhou Y, Zhu M, Qin J, Ren A, Gao Y (2015) Stroma-bearing endophyte and its potential horizontal transmission ability in *Achnatherum sibiricum*. *Mycologia* 107 (1):21-31.
- Lugo MA, Cabral D, Antón AM (1998) Presencia y distribución de micofilas en gramíneas de Argentina. En: *Anales del Jardín Botánico de Madrid, Real Jardín Botánico*, pp 15-22.
- Mack KML, Rudgers JA (2008) Balancing multiple mutualists: asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi, and fungal endophytes. *Oikos* 117 (2):310-320.
- Malinowski D, Leuchtman A, Schmidt D, Nösberger J (1997) Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* endophyte may increase the competitive ability of meadow fescue. *Agronomy Journal* 89 (5):833-839.
- Malinowski DP, Belesky DP (2000) Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40 (4):923-940.
- Matthews JW, Clay K (2001) Influence of fungal endophyte infection on plant-soil feedback and community interactions. *Ecology* 82 (2):500-509.
- Mc Cargo PD, Iannone LJ, Vignale MV, Schardl CL, Rossi MS (2014) Species diversity of *Epichloë* symbiotic with two grasses from southern Argentinean Patagonia. *Mycologia* 106 (2):339-352.
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'Homme Van Reine WF, Smith GF, Wiersema JH (2012) International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code). En: *Regnum Vegetabile* 154. Koeltz Scientific Books.
- Millot JC (2001) *Bromus auleticus*: una nueva especie domesticada. Documento de recursos fitogenéticos PROCISUR, Diálogo LVI, Montevideo:3-6.

- Moon CD, Tapper BA, Scott B (1999) Identification of *Epichloë* endophytes in planta by a microsatellite-based PCR fingerprinting assay with automated analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3):1268-1279.
- Moon CD, Miles CO, Järlfors U, Schardl CL (2002) The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. *Mycologia* 94 (4):694-711.
- Moon CD, Craven KD, Leuchtman A, Clement SL, Schardl CL (2004) Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. *Molecular Ecology* 13 (6):1455-1467.
- Moy M, Belanger F, Duncan R, Freehoff A, Leary C, Meyer W, Sullivan R, White Jr JF (2000) Identification of epiphyllous mycelial nets on leaves of grasses infected by clavicipitaceous endophytes. *Symbiosis* 28 (4):291-302.
- Moy M, Li HM, Sullivan R, White Jr JF, Belanger FC (2002) Endophytic fungal β -1, 6-glucanase expression in the infected host grass. *Plant Physiology* 130 (3):1298-1308.
- Nixon K (2002) WinClada ver. 1.00.08. Published by the author, Ithaca, NY. URL: <http://www.cladistics.com/aboutWinc.htm>.
- Novas MV, Cabral D, Godeas AM (2005) Interaction between grass endophytes and mycorrhizas in *Bromus setifolius* from Patagonia, Argentina. *Symbiosis* 40 (1):23-30.
- Novas MV, Collantes M, Cabral D (2007) Environmental effects on grass-endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. *FEMS Microbiology Ecology* 61 (1):164-173.
- Novas MV, Iannone LJ, Godeas AM, Cabral D (2009) Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycological Progress* 8 (1):75-81.
- Novas MV, Iannone LJ, Godeas AM, Scervino JM (2011) Evidence for leaf endophyte regulation of root symbionts: effect of *Neotyphodium* endophytes on the pre-infective state of mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 55 (1):19-28.
- Oberhofer M, Leuchtman A (2012) Genetic diversity in epichloid endophytes of *Hordelymus europaeus* suggests repeated host jumps and interspecific hybridizations. *Molecular Ecology* 21 (11):2713-2726.
- Oberhofer M, Güsewell S, Leuchtman A (2013) Effects of natural hybrid and non-hybrid *Epichloë* endophytes on the response of *Hordelymus europaeus* to drought stress. *New Phytologist* 201 (1):242-253.
- Oberhofer M, Leuchtman A (2014) Horizontal transmission, persistence and competition capabilities of *Epichloë* endophytes in *Hordelymus europaeus* grass hosts using dual endophyte inocula. *Fungal Ecology* 11:37-49.
- Omacini M, Chaneton EJ, Ghersa CM, Müller CB (2001) Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* 409 (6816):78-81.

- Omacini M, Chaneton EJ, Ghera CM, Otero P (2004) Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos* 104 (3):581-590.
- Omacini M, Eggers T, Bonkowski M, Gange AC, Jones TH (2006) Leaf endophytes affect mycorrhizal status and growth of co-infected and neighbouring plants. *Functional Ecology* 20 (2):226-232.
- Omacini M, Semmartin M, Pérez LI, Gundel PE (2012) Grass–endophyte symbiosis: A neglected aboveground interaction with multiple belowground consequences. *Applied Soil Ecology* 61:273-279.
- Pan J, Bhardwaj M, Nagabhyru P, Grossman RB, Schardl CL (2014) Enzymes from fungal and plant origin required for chemical diversification of insecticidal loline alkaloids in grass-epichloë symbiotes. *PloS One* 9 (12):e115590.
- Panaccione DG (2005) Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. *FEMS Microbiology Letters* 251 (1):9-17.
- Paruelo JM, Piñeiro G, Altesor AI, Rodríguez C, Oesterheld M (2004) Cambios estructurales y funcionales asociados al pastoreo en los pastizales del Río de la Plata. En: XX Reunión Del Grupo Técnico Regional del Cono Sur en Mejoramiento y Utilización de los recursos Forrajeros del Area Tropical y Subtropical – Grupo Campos.
- Paruelo JM, Jobbágy EG, Oesterheld M, Golluscio RA, Aguiar MR (2007) The grasslands and steppes of Patagonia and the Rio de la Plata plains. En: *The physical geography of South America*, Oxford University Press: 232-248.
- Pearson RG, Raxworthy CJ, Nakamura M, Townsend Peterson A (2007) Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography* 34 (1):102-117
- Pérez LI (2008) Efecto de las condiciones de almacenaje en la viabilidad del endofito y semillas de *Bromus auleticus*. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas.
- Pérez LI, Gundel PE, Ghera CM, Omacini M (2013) Family issues: fungal endophyte protects host grass from the closely related pathogen *Claviceps purpurea*. *Fungal Ecology* 6 (5):379-386.
- Petrini O (1991) Fungal endophytes of tree leaves. En: *Microbial Ecology of Leaves*. Springer, pp 179-197.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190 (3):231-259.
- Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31 (2): 161-175.
- Philipson MN, Christey MC (1986) The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*. *New Zealand Journal of Botany* 24 (1):125-134.

- Rasmussen S, Lane GA, Mace W, Parsons AJ, Fraser K, Xue H (2012) The use of genomics and metabolomics methods to quantify fungal endosymbionts and alkaloids in grasses. En: *Plant Metabolomics*. Springer, pp 213-226.
- 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.
- Rodriguez RJ, White JrJF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New Phytologist* 182 (2):314-330.
- Rolston MP, Hare MD, Moore KK, Christensen MJ (1986) Viability of *Lolium* endophyte fungus in seed stored at different moisture contents and temperatures. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 14 (3):297-300.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61 (3):539-542.
- Roscioni F, Rebelo H, Russo D, Carranza ML, Di Febbraro M, Loy A (2014) A modelling approach to infer the effects of wind farms on landscape connectivity for bats. *Landscape Ecology* 29 (5):891-903.
- Rudgers JA, Koslow JM, Clay K (2004) Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters* 7 (1):42-51.
- Rudgers JA, Fischer S, Clay K (2010) Managing plant symbiosis: fungal endophyte genotype alters plant community composition. *Journal of Applied Ecology* 47 (2):468-477.
- Saikia S, Nicholson MJ, Young CA, Parker EJ, Scott B (2008) The genetic basis for indole-diterpene chemical diversity in filamentous fungi. *Mycological Research* 112 (2):184-199.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ (1998) Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:319-343.
- Saikkonen K, Wäli PR, Helander M (2010) Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PloSOne* 5 (6):e11395.
- Schardl CL, Chung ALK-R, Siegel MR, Penny D (1997) Coevolution by common descent of fungal symbionts grass hosts. *Molecular Biology and Evolution* 14 (2):133-143.
- Schardl CL, Phillips TD (1997) Protective grass endophytes: where are they from and where are they going? *Plant Disease* 81 (5):430-438.
- Schardl CL, Leuchtman A, Spiering MJ (2004) Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* 55:315-340.

- Schardl CL, Grossman RB, Nagabhyru P, Faulkner JR, Mallik UP (2007) Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry* 68 (7):980-996.
- Schardl CL (2010) The epichloae, symbionts of the grass subfamily Pooideae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97 (4):646-665.
- Schardl CL, Young CA, Faulkner JR, Florea S, Pan J (2012) Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology* 5 (3):331-344
- Schardl CL, Young CA, Hesse U, Amyotte SG, Andreeva K, Calie PJ, Fleetwood DJ, Haws DC, Moore N, Oeser B (2013a) Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *PLoS Genetics* 9 (2):e1003323.
- Schardl CL, Young CA, Pan J, Florea S, Takach JE, Panaccione DG, Farman ML, Webb JS, Jaromczyk J, Charlton ND (2013b) Currencies of mutualisms: sources of alkaloid genes in vertically transmitted epichloae. *Toxins* 5 (6):1064-1088.
- Schardl CL, Florea S, Pan J, Nagabhyru P, Bec S, Calie PJ (2013c) The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology* 16 (4):480-488
- Schirrmann MK, Zoller S, Fior S, Leuchtman A (2014) Genetic evidence for reproductive isolation among sympatric *epichloë* endophytes as inferred from newly developed microsatellite markers. *Microbial Ecology* (en prensa):1-10.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16):6241-6246.
- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K (2002) Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106 (9):996-1004.
- Selosse MA, Schardl CL (2007) Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* 173 (3):452-458.
- Shymanovich T, Saari S, Lovin ME, Jarmusch AK, Jarmusch SA, Musso AM, Charlton ND, Young CA, Cech NB, Faeth SH (2014) Alkaloid variation among epichloid endophytes of sleepygrass (*Achnatherum robustum*) and consequences for resistance to insect herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 41 (1):93-104.
- Simpson W, Mace W, Young CA, Aiken G, McCulley R, Strickland J, Schardl CL (2012) Novel associations between epichloid endophytes and grasses: possibilities and outcomes. En: *Epichloae, endophytes of cool season grasses: implications, utilization and biology*. Proceedings of the 7th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses. Samuel Roberts Noble Foundation, pp 35-39.
- Soberón J (2005) Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics* 2: 1-10.

- Soberón J, Nakamura M (2009) Niches and distributional areas: concepts, methods, and assumptions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (S2):S19644-S19650.
- Soberón J, Peterson AT (2011) Ecological niche shifts and environmental space anisotropy: a cautionary note. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82 (4):1384-1355.
- Soleimani M, Hajabbasi MA, Afyuni M, Mirlohi A, Borggaard OK, Holm PE (2010) Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. *International Journal of Phytoremediation* 12 (6):535-549.
- Song M, Li X, Saikkonen K, Li C, Nan Z (2015) An asexual *Epichloë* endophyte enhances waterlogging tolerance of *Hordeum brevisubulatum*. *Fungal Ecology* 13:44-52.
- Spatafora J, Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones N, White J (2007) Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology* 16 (8):1701-1711.
- Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (4):491-502.
- Sugawara K, Ohkubo H, Yamashita M, Mikoshiba Y (2004) Flowers for *Neotyphodium* endophytes detection: a new observation method using flowers of host grasses. *Mycoscience* 45 (3):222-226.
- Swets JA (1988). Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240 (4857):1285-1293.
- Tadych M, Bergen M, Dugan FM, White Jr JF (2007) Evaluation of the potential role of water in spread of conidia of the *Neotyphodium* endophyte of *Poa ampla*. *Mycological research* 111 (4):466-472.
- Tadych M, Ambrose KV, Bergen MS, Belanger FC, White Jr JF (2012) Taxonomic placement of *Epichloë poae* sp. nov. and horizontal dissemination to seedlings via conidia. *Fungal Diversity* 54 (1):117-131.
- Tadych M, Bergen MS, White Jr JF (2014) *Epichloë* spp. associated with grasses: new insights on life cycles, dissemination and evolution. *Mycologia* 106 (2):181-201.
- Takach JE, Mittal S, Swoboda GA, Bright SK, Trammell MA, Hopkins AA, Young CA (2012) Genotypic and chemotypic diversity of *Neotyphodium* endophytes in tall fescue from Greece. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (16):5501-5510.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12):2725-2729.
- Tanaka A, Tapper BA, Popay A, Parker EJ, Scott B (2005) A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology* 57 (4):1036-1050.

- Tanaka A, Christensen MJ, Takemoto D, Park P, Scott B (2006) Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus–perennial ryegrass mutualistic interaction. *The Plant Cell* 18 (4):1052-1066.
- TePaske MR, Powell RG, Clement SL (1993) Analyses of selected endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (12):2299-2303.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22):4673-4680.
- Tian P, Nan Z, Li C, Spangenberg G (2008) Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 122 (4):593-602.
- Van Zijll De Jong E, Guthridge KM, Spangenberg GC, Forster JW (2003) Development and characterization of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers for pasture grass endophytes. *Genome* 46 (2):277-290.
- Vienne DM, Refrégier G, López-Villavicencio M, Tellier A, Hood ME, Giraud T (2013) Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytologist* 198 (2):347-385.
- Vignale MV, Astiz-Gassó MM, Novas MV, Iannone LJ (2013) Epichloid endophytes confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus* (Trin.). *Biological Control* 67 (1):1-7.
- Vignale MV, Iannone LJ, Scervino JM, Novas MV (2014) Efecto de los exudados de endofitos *Epichloë* sobre el desarrollo in vitro de hongos micorrízicos arbusculares. XIII Congreso Argentino de Micología. Lilloa S51:S183.
- White Jr JF (1988) Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. *Mycologia* 80 (4):442-446.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-322.
- White Jr JF, Martin TI, Cabral D (1996) Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia* 88 (2):174-178.
- Wilson D (1995) Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73 (2):274-276.
- Wiewióra B, Żurek G, Pańka D (2015) Is the vertical transmission of *Neotyphodium lolii* in perennial ryegrass the only possible way to the spread of endophytes? *PloS One* 10 (2):e0117231.
- Young CA, Felitti S, Shields K, Spangenberg G, Johnson RD, Bryan GT, Saikia S, Scott B (2006) A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genetics and Biology* 43 (10):679-693.

- Young CA, Tapper BA, May K, Moon CD, Schardl CL, Scott B (2009) Indole-diterpene biosynthetic capability of *Epichloë* endophytes as predicted by ltm gene analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (7):2200-2211.
- Yue Q, Miller CJ, White JrJF, Richardson MD (2000) Isolation and characterization of Fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (10):4687-4692.
- Zaurov DE, Bonos S, Murphy JA, Richardson M, Belanger FC (2001) Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. *Crop Science* 41 (6):1981-1984.
- Zhang XX, Xia C, Nan ZB (2015) Effects of symbiotic *Epichloë gansuensis* endophyte on drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) growth and seed production. *New Zealand Journal of Agricultural Research* (en prensa):1-7.
- Zuloaga FO, Rúgolo ZE, Anton AM (2012) Flora vascular de la República Argentina. Monocotyledoneae. Poaceae: Pooideae. Volumen 3 Tomo II. Gráficamente Ediciones.

ANEXO

Endofito	GB Accession
<i>E. amarillans</i> E57 <i>Arrhenantherum elatius</i>	KF533986
<i>E. amarillans</i> 2732 <i>Arrhenantherum elatius</i>	KF533987
<i>E. amarillans</i> E4668 <i>Agrostis hyemalis</i>	GCA_000223075.2
<i>E. baconii</i> 1031 <i>Calamagrostis villosus</i>	KF533988
<i>E. cabralii</i> BAFC3998-1 <i>Phleum alpinum</i>	KF533941
<i>E. cabralii</i> BAFC3991-1 <i>Phleum alpinum</i>	KF533941
<i>E. cabralii</i> BAFC3998-2 <i>Phleum alpinum</i>	KF533978
<i>E. cabralii</i> BAFC3991-2 <i>Phleum alpinum</i>	KF533981
<i>E. festucae</i> 90661 <i>Festuca rubra</i>	KF533914
<i>E. festucae</i> 894 <i>Festuca trachyphylla</i>	GCA_000226195.1
<i>E. festucae</i> 2368 <i>Festuca rubra</i>	KF533913
<i>E. gansuensis</i> 7083 <i>Achnatherum inebrians</i>	PRJNA67299
<i>E. gansuensis</i> var. <i>inebrians</i> E818 <i>Achnatherum inebrians</i>	PRJNA174039
<i>E. pampeana</i> BAFC1623-1 <i>Bromus auleticus</i>	KF533915
<i>E. pampeana</i> BAFC3333-1 <i>Bromus auleticus</i>	KF533916
<i>E. pampeana</i> BAFC1623-2 <i>Bromus auleticus</i>	KF533954
<i>E. pampeana</i> BAFC3333-2 <i>Bromus auleticus</i>	KF533955
<i>E. tembladerae</i> 1211 -1 <i>Poa huecu</i>	KF533919
<i>E. tembladerae</i> 1213 -1 <i>Poa huecu</i>	KF533918
<i>E. tembladerae</i> 1211 -2 <i>Poa huecu</i>	KF533958
<i>E. tembladerae</i> 1213 -2 <i>Poa huecu</i>	KF533957
<i>E. tembladerae</i> BAFC3330-1 <i>B. auleticus</i>	KF533920
<i>E. tembladerae</i> BAFC3330-2 <i>B. auleticus</i>	KF533959
<i>E. tembladerae</i> BAFC4002-1 <i>Phleum alpinum</i>	KF533935
<i>E. tembladerae</i> BAFC4002-2 <i>Phleum alpinum</i>	KF533974
<i>E. typhina</i> 200740 <i>Dactylis glomerata</i>	KF533947
<i>E. typhina</i> subsp. <i>poae</i> 5819 <i>Poa nemoralis</i>	AFSE01000156.1
<i>E. typhina</i> subsp. <i>poae</i> var. <i>aonikenkana</i> BAFC420 <i>B. setifolius</i>	KF533990
<i>E. sylvatica</i> ATCC200748 <i>Brachypodium sylvaticum</i>	KF533951
<i>Epichloe festucae</i> strain F11 <i>Festuca trachyphylla</i>	AY742905
<i>E. festucae</i> var. <i>lolii</i> Lp19	AY742903
<i>Epichloe typhina</i> x <i>Neotyphodium lolii</i> strain Lp1	KC970583

Anexo Tabla1.1: Número de GenBank de las secuencias de referencia utilizadas. Aquellas no incluidas fueron directamente sacadas de proyectos genoma.

1-VII 0.000
1-II 0.000
1-V 0.000
1-IV 0.000
1-III 0.000
1-VI 0.000
2-IV 0.000
2-IV2 0.000
2-III 0.000
2-II 0.000
2-I2 0.000
2-I3 0.000
2-I1 0.000

Table. Estimates of Average Evolutionary Divergence over Sequence Pairs within Groups

The number of base substitutions per site from averaging over all sequence pairs within each group are shown. Analyses were conducted using the Maximum Composite Likelihood model [1]. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 [2].

1. Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

2. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Anexo Tabla 1.2: Distancia dentro de grupos

Title: fasta file
 Description
 Analysis
 Analysis ----- Distance Estimation
 Scope ----- Between group average
 Estimate Variance
 Variance Estimation Method ---- None
 Substitution Model
 Substitutions Type ----- Nucleotide
 Model/Method ----- Maximum Composite Likelihood
 Substitutions to Include ----- d: Transitions + Transversions
 Rates and Patterns
 Rates among Sites ----- Uniform rates
 Pattern among Lineages ----- Same (Homogeneous)
 Data Subset to Use
 Gaps/Missing Data Treatment --- Pairwise deletion
 No. of Sites : 936
 d : Estimate

[1] #Egan
 [2] #Eama
 [3] #Ebac
 [4] #1-I
 [5] #EF
 [6] #1-VII
 [7] #1-II
 [8] #1-V
 [9] #1-IV
 [10] #1-III
 [11] #1-VI
 [12] #Ety
 [13] #Etypoaonik
 [14] #Etypoae
 [15] #2-I-1
 [16] #2-IV
 [17] #2-IV-2
 [18] #2-III
 [19] #2-II
 [20] #2-I-3
 [21] #2-I-4
 [22] #2-I-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
[1]																							
[2]	0.040																						
[3]	0.038	0.004																					
[4]	0.037	0.003	0.001																				
[5]	0.040	0.015	0.012	0.011																			
[6]	0.041	0.015	0.013	0.012	0.001																		
[7]	0.040	0.015	0.012	0.011	0.000	0.001																	
[8]	0.041	0.016	0.013	0.013	0.001	0.002	0.001																
[9]	0.041	0.015	0.013	0.012	0.001	0.001	0.001	0.001															
[10]	0.042	0.016	0.013	0.013	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001														
[11]	0.041	0.015	0.013	0.012	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002													
[12]	0.048	0.030	0.027	0.026	0.028	0.029	0.028	0.030	0.029	0.030	0.029												
[13]	0.044	0.025	0.022	0.022	0.025	0.026	0.025	0.027	0.026	0.027	0.026	0.016											
[14]	0.042	0.025	0.022	0.021	0.025	0.025	0.025	0.026	0.025	0.026	0.025	0.013	0.003										
[15]	0.044	0.025	0.022	0.022	0.025	0.026	0.025	0.027	0.026	0.027	0.026	0.016	0.000	0.003									
[16]	0.044	0.026	0.023	0.022	0.026	0.027	0.026	0.028	0.027	0.028	0.027	0.014	0.001	0.001	0.001								
[17]	0.044	0.026	0.023	0.022	0.026	0.027	0.026	0.028	0.027	0.028	0.027	0.014	0.002	0.002	0.002	0.000							
[18]	0.045	0.027	0.024	0.023	0.027	0.028	0.027	0.028	0.028	0.029	0.028	0.016	0.001	0.003	0.001	0.001	0.002						
[19]	0.043	0.025	0.022	0.021	0.025	0.026	0.025	0.026	0.026	0.027	0.026	0.017	0.001	0.004	0.001	0.002	0.002	0.002					
[20]	0.044	0.025	0.022	0.022	0.025	0.026	0.025	0.027	0.026	0.027	0.026	0.016	0.000	0.003	0.000	0.001	0.002	0.001	0.001				
[21]	0.044	0.026	0.023	0.022	0.026	0.026	0.026	0.027	0.026	0.027	0.026	0.016	0.000	0.003	0.000	0.002	0.002	0.002	0.001				
[22]	0.044	0.025	0.022	0.022	0.025	0.026	0.025	0.027	0.026	0.027	0.026	0.016	0.000	0.003	0.000	0.001	0.002	0.001	0.001				
	0.000	0.000																					

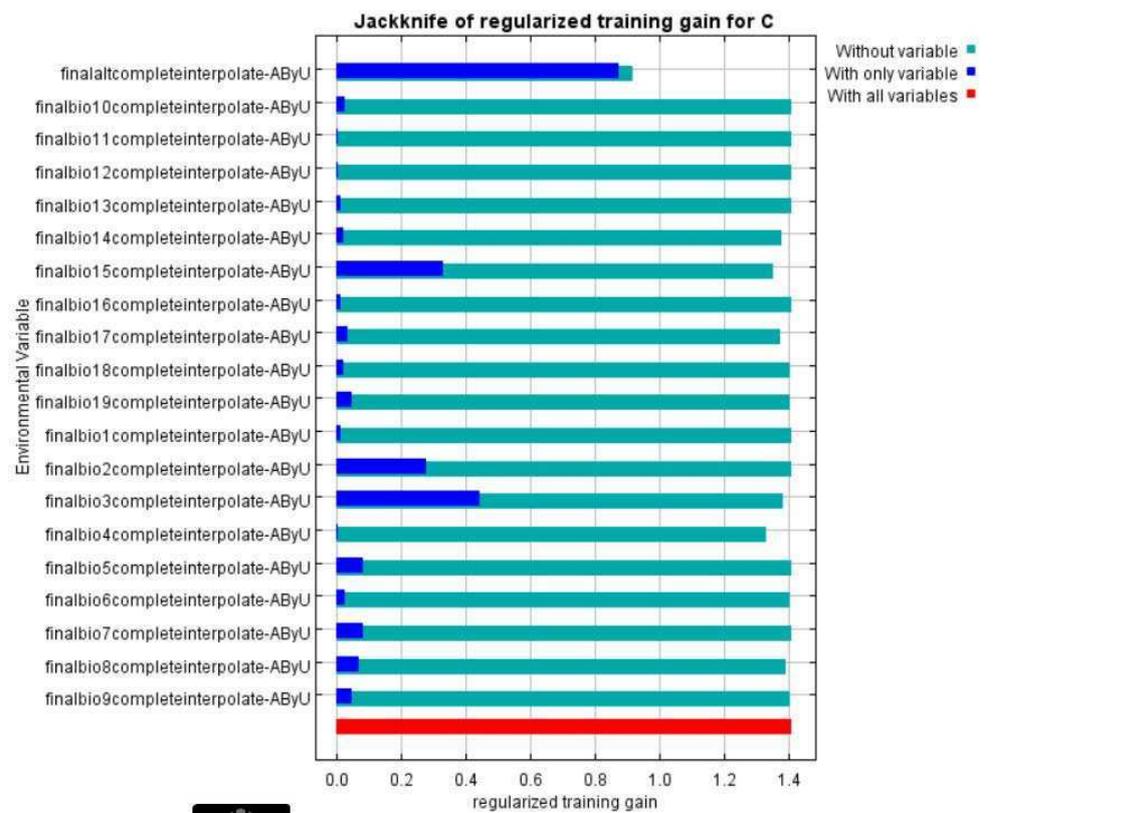
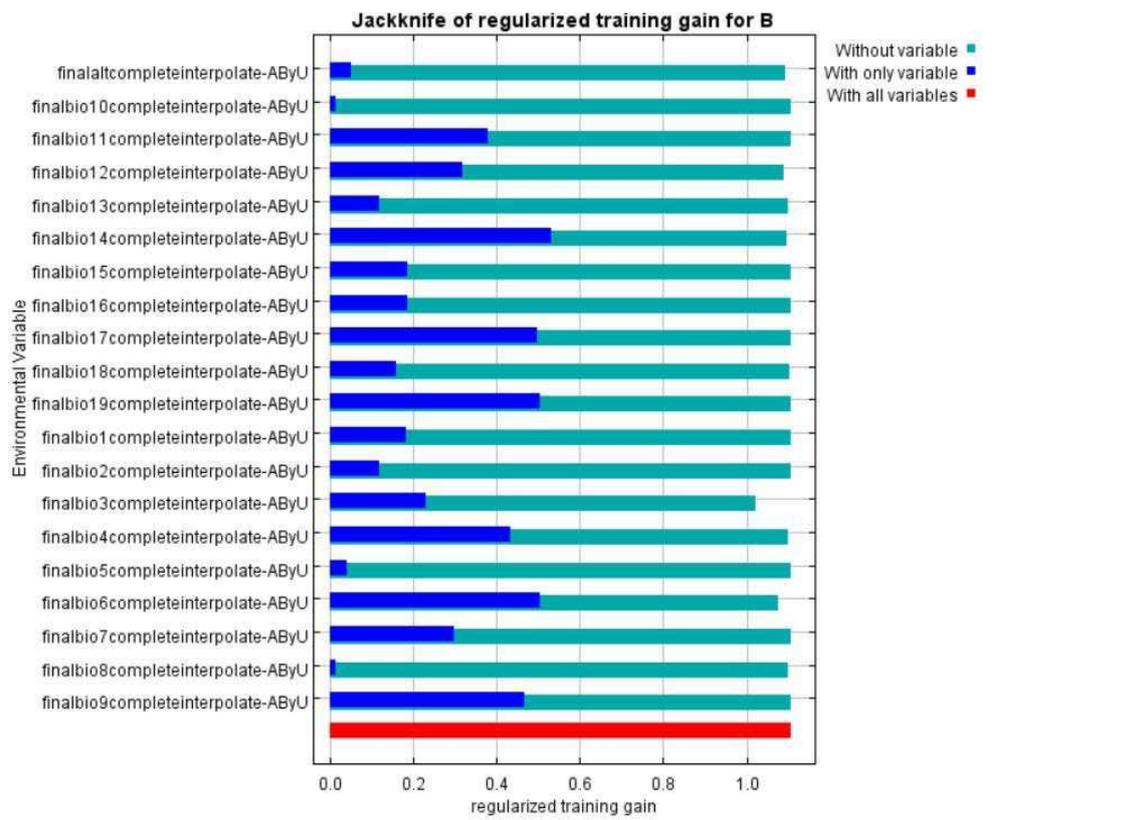
Table. Estimates of Evolutionary Divergence over Sequence Pairs between Groups

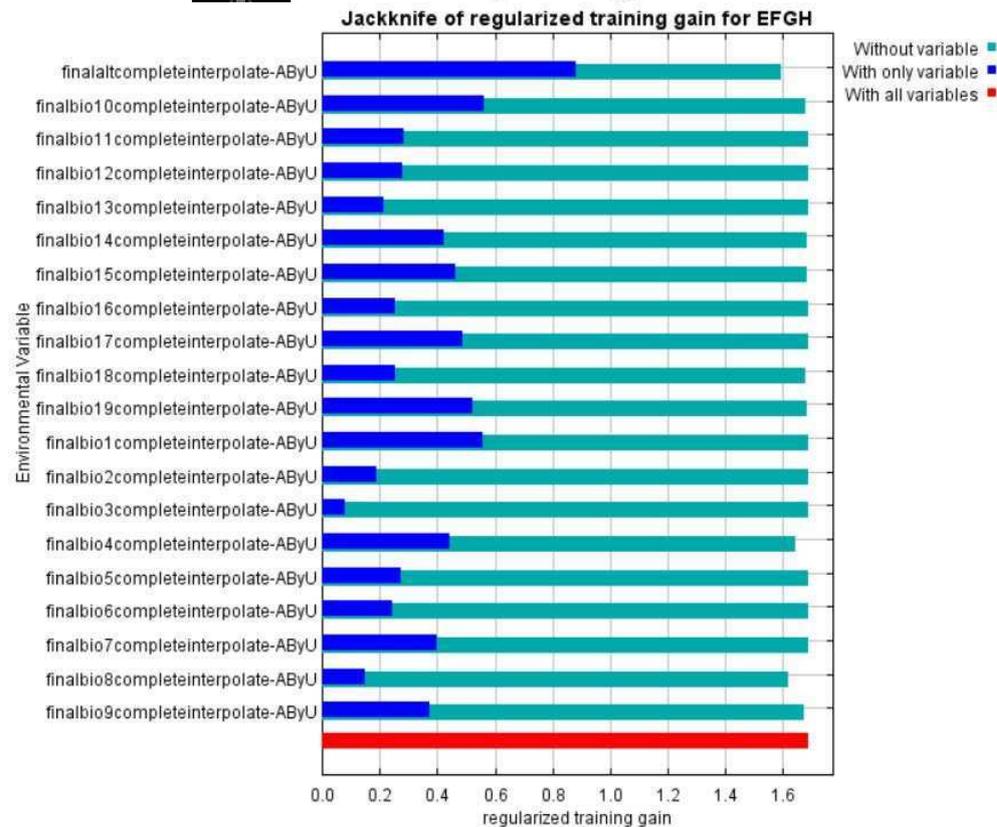
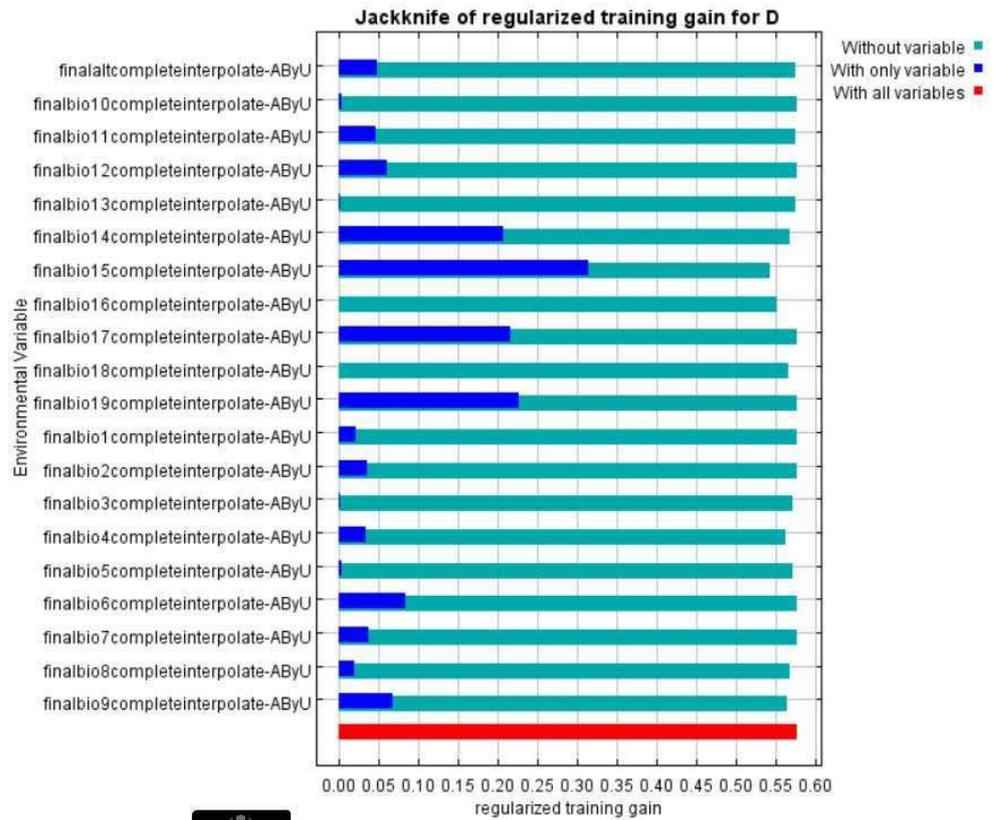
The number of base substitutions per site from averaging over all sequence pairs between groups are shown. Analyses were conducted using the Maximum Composite Likelihood model [1]. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 [2].

1. Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

2. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Anexo Tabla 1.3: Distancia entre grupos





Anexo Tabla 2.1: Resultados de Jacknife para cada linaje de endofitos de *B. auleticus* al que se le modeló su distribución potencial.