Formulario II – Plan y Lugar de Trabajo

PLAN DE TRABAJO (*máximo 8 páginas*)

Del plan de trabajo

1- Denominación del Trabajo

Determinación de la presencia de endófitos y nivel cromosómico en poblaciones naturales de gramíneas relevadas en el sudeste bonaerense.

2- Definición del problema y estado actual del conocimiento sobre la cuestión

Numerosas especies de gramíneas forrajeras (*pastos*) de estación templado-fría forman simbiosis con hongos asexuales de la familia Clavicipitaceae (Ascomycota) del género *Neotyphodium* Glenn, Bacon & Hanlin, antes conocido como *Acremonium* Sección Albolanosa Morgan-Jones & Gams (Clay y Schardl, 2002).
Las especies del género *Neotyphodium* crecen de manera asintomática en los espacios intercelulares de los tejidos aéreos en las plantas hospedantes; colonizan las flores en desarrollo y son transmitidos verticalmente a través de las semillas de plantas madres infectadas a las plantas hijas (White, 1987; Siegel *et al.*, 1987; Clay y Schardl, 2002).
La asociación endófito-pasto parece ser un factor clave para la adaptabilidad de la planta huésped (De Battista y Perticari, 2010). Es así como la comprensión del impacto de la interacción entre pastos y hongos endófitos sobre los procesos fundamentales del ecosistema se transformó en una meta relevante de la investigación ecológica y agronómica en los últimos años ya que puede afectar la dinámica de materia y energía así como las relaciones tróficas y la biodiversidad de los agroecosistemas (Omacini *et al*., 2013).
La simbiosis entre *Neotyphodium* y sus hospedantes ha sido considerada un mutualismo, debido a que las plantas huéspedes infectadas con endófito (E+) se benefician por un aumento en la tasa de crecimiento y por presentar resistencia a patógenos, a herbívoros y a ciertos estreses abióticos (Arachevaleta *et al*., 1989; Malinowski y Belesky, 2000; Iannone y Cabral, 2006; Gundel *et al.*, 2008; Omacini *et al*., 2013). La asociación endófito-pasto incrementa, además, la capacidad de las plantas para invadir comunidades con alta diversidad de especies (Rudgers *et al*., 2005). Esta mayor habilidad competitiva, le permite a las plantas E+ expresar su máximo potencial genético (i.e. alta tasa de germinación y producción de semillas, así como mayor densidad y biomasa en los tejidos) respecto de las plantas libres de endófitos (E-) (Vila-Aiub *et al*., 2003; De Battista *et al*., 2006). También se han registrado efectos positivos en la competencia intra e interespecífica en plantas infectadas con *Neotyphodium* (Marks *et al*., 1991; Malinowski y Belesky, 2000). Es de destacar, que existen estudios que han revelado que existiría variabilidad en la efectividad del mutualismo (Saikkonen *et al*., 2004; Malinowski y Belesky, 2006).
Además de los beneficios recíprocos de la relación mutualista mencionada, en algunos casos, los endófitos producen alcaloides que causan intoxicación en el ganado cuando los animales son alimentados con festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) y raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) (Bacon *et al*, 1977; Fletcher y Harvey, 1981) ocasionando importantes pérdidas en la producción animal (Hoveland, 1993; De Battista *et al*., 1995; Strickland *et al.,* 2011).
Estas interacciones endófito-pasto son motivo de interés desde la perspectiva agropecuaria, no sólo por los riesgos toxicológicos para el ganado sino además por la posibilidad de su manipulación para la inducción de autodefensa del hospedante en programas de control integrado de plagas (Clement *et al*., 1994; Omacini *et al*, 2013). Del mismo modo, debido a los efectos beneficiosos en sus huéspedes, los endófitos se están utilizando en los programas de mejoramiento genético de forrajeras. Una de las estrategias utilizadas para obtener pastos mejorados no tóxicos es la inoculación de endófitos no tóxicos o "*endófitos safe"* en cultivares seleccionados (Funk y White, 1997) para lograr variedades forrajeras más persistentes, productivas y resistentes. De manera similar, la existencia de variabilidad natural en el perfil de alcaloides producidos por los endófitos según su genotipo, el del pasto hospedante y/o el

ambiente, ha llevado a considerar la inclusión de este simbionte en los planes de mejoramiento de gramíneas ornamentales y para césped (Easton, 2007).
La presencia de hongos endófitos en pastos nativos de Argentina se ha conocido desde el comienzo del siglo XX, cuando se asociaron con la toxicidad ganadera provocada por *Festuca hieronymi* Hack. (Rivas y Zanolli, 1909). En 25 especies nativas de gramíneas han sido registradas infecciones con endófitos (Bertoni *et al.,* 1993; Lugo *et al.,* 1998). Los endófitos de 10 especies de hospedantes fueron aislados y caracterizados (Cabral *et al.*, 1999; Gentile *et al.,* 2005; Iannone *et al*., 2009). Para la Argentina han sido descriptas dos especies de endófitos asexuales: *Neotyphodium tembladerae* Cabral y White, con un amplio rango de hospedantes en los géneros *Poa*, *Festuca*, *Bromus*, *Phleum* y *Melica* (Cabral *et al.,* 1999; Gentile *et al.,* 2005), y *N. pampeanum* Iannone y Cabral, asociada a algunas poblaciones de *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Iannone *et al*., 2009).
En otras partes del mundo (Saikkonen *et al*., 2000; Wei *et al*., 2006), la incidencia de endófitos varía entre las poblaciones de pastos. Del mismo modo, para Argentina, estudios realizados tanto en la región central de los Andes (White *et al*., 2001), como en el sur de la Patagonia (Novas *et al*., 2007) y en la región Pampeana (Cabral *et al*., 2007) determinaron que la incidencia de endófitos estaba correlacionada con diferentes factores tales como abundancia de insectos, condiciones ambientales (humedad, pH, fertilidad) y con la comunidad de las plantas existentes.
Hasta el presente, en nuestro país, se han detectado asociaciones endófito-pasto en regiones tanto templadas como áridas y semiáridas; en un total de 205 sitios del territorio argentino, de las 80 especies de gramíneas coleccionadas, 34 estaban asociadas a endófitos *Neotyphodium* spp. (Iannone *et al*., 2010). Varias áreas geográficas de Argentina aún no han sido relevadas, y a pesar del alto número de hospedantes establecidos, la diversidad de gramíneas nativas infectadas podría aumentar debido a que aún faltan diagnosticar nuevas poblaciones (Iannone *et al*., 2010).

Otro aspecto a tener en cuenta, es la posibilidad de que, como lo sugieren algunos autores (De Battista, com. pers.), exista asociación negativa entre el nivel de ploidía del hospedante y el beneficio neto de la relación mutualista pasto-endófito: a mayor número cromosómico la ventaja competitiva conferida por el endosimbionte podrá verse reducida y en tal caso, el balance neto de la simbiosis resultaría negativo en términos del balance energético y nutricional del hospedante.

Del mismo modo, si bien en estudios preliminares no se han registrado efectos de la presencia del endófito en la anatomía foliar del hospedante (Arachevaleta *et al*., 1989, en festuca), sería factible que las poblaciones E+ tengan consecuencias funcionales, como por ejemplo resistencia a estreses abióticos por mayor competitividad debido a una mayor densidad del mesófilo y de tricomas, mayor número de haces vasculares y variación en la proporción de fibras esclerenquimáticas. Hay vacíos de conocimiento respecto a estudios que relacionen características anatómicas con la presencia de endófitos *Neotyphodium* spp.

3- Trabajo previo realizado referente a este proyecto

La Unidad Integrada Balcarce -UIB- (Facultad de Ciencias Agrarias,UNMdP- INTA Balcarce) forma parte de una Red de Bancos de Germoplasma del INTA, que incluye la conservación y evaluación de recursos genéticos de importancia regional, tales como papa, ornamentales y forrajeras. A estos efectos, se colecciona germoplasma en distintas regiones agroecológicas del país y actualmente se dispone de germoplasma tanto nativo como introducido en la mencionada Red (Clausen *et al*., 2008). Es de interés de la Red Nacional de Bancos, en las etapas de caracterización del germoplasma forrajero, identificar poblaciones constituídas por fenotipos E+, a fin de conservar *in situ* germoplasma coleccionado con endosimbiontes. Colabelli *et al*., (2001; 2004; 2007) realizaron un amplio relevamiento de las entradas del Banco de Forrajeras de la UIB, como así también, de dos colecciones del Banco de INTA Pergamino: una colección de *Lolium multiflorum* Lam. -raigrás anual- (Colabelli *et al*., 2008), y otra de *Festuca arundinacea* (Colabelli *et al.,* 2010). La postulante María Fiorella Franco ha participado activamente desde el año 2008 en los análisis de semillas de diferentes especies forrajeras para la detección de la presencia del

endófito *Neotyphodium* spp. Asimismo, están pendientes de evaluación poblaciones de gramíneas con valor ornamental y la realización de nuevas colectas de poblaciones naturales de especies con valor forrajero.
Otro atributo de importancia a evaluar en las etapas de caracterización del germoplasma forrajero, es el número cromosómico. La Dra. Echeverría ha supervisado diferentes estudios del nivel de ploidía en especies forrajeras nativas y naturalizadas y en especies de valor ornamental. Muchos de estos estudios se han desarrollado en el marco de tesis de grado, (Leofanti, 2010 y Barcellini, 2010, en *Bromus* spp. (cebadillas); Devo, 2012 en raigrás anual, *L. multiflorum*) continuando estas investigaciones a nivel de posgrado, algunas finalizadas (Despósito, 2011) y otras en curso (Leofanti; Echeverría Alonso).
Por otro lado, un estudio preliminar realizado por Franco *et al*. (2012) en relación a la presencia del endófito *Neotyphodium* y el nivel cromosómico en cultivares comerciales diploides y tetraploides de raigrás anual, ha revelado que a mayor número cromosómico la ventaja competitiva conferida por el endófito podría verse reducida.

Con respecto a estudios anatómicos en relación a la presencia del endófito *Neotyphodium*, no se han registrado efectos de la presencia del endófito en la anatomía foliar del hospedante en raigrás perenne (Colabelli *et al*., 2000).

4- Hipótesis y Objetivos (*)

En base a los antecedentes mencionados, se establecen las siguientes hipótesis de estudio:

H1) Hay variabilidad inter e intraespecífica en la asociación con endófitos *Neotyphodium* en las poblaciones de siete especies nativas de gramíneas

a. Festuca pampeana Speg.
b. Festuca ventanicola Speg.
c. Lolium multiflorum Lam.
d. Poa iridifolia Hauman
e. Nasella trichotoma (Nees) Hack. ex Arechav. (=*Stipa trichotoma* Nees)
f. Nasella neesiana (Trin. & Rupr.) Barkworth (=*Stipa neesiana* Trin. & Rupr.)
*g. Nasella megapotamica (*Spreng. ex Trin.*)*Barkworth *(=Stipa megapotamica* Spreng. ex Trin.)

y en dos especies con poblaciones naturalizadas:

h. Lolium multiflorum Lam.
i. Thinopyrum ponticum (Podp.) Barkworth & Dewey (=*Agropyron elongatum* (Host) Beauv.)

H2) En las poblaciones E+ diploides de especies nativas y naturalizadas de gramíneas invierno-primaverales (C3) que crecen en el sudeste bonaerense, la infección con endófitos *Neotyphodium* es mayor que en las poblaciones poliploides.

H3) La presencia del endófito modifica la anatomía foliar de plantas infectadas.

H4) La presencia del endófito modifica el comportamiento de las plantas infectadas frente a factores abióticos.

Objetivo General

Determinar la variabilidad en el nivel de infección con *Neotyphodium* spp. en poblaciones naturales de gramíneas que crecen en el sudeste bonaerense y conocer su efecto sobre el número cromosómico (y sobre las características anatómicas foliares y comportamiento de plantas E+ frente a factores abióticos, para el proyecto de Doctorado).

Objetivos Particulares (*)

1- Evaluar el porcentaje de infección con hongos endófitos *Neotyphodium* spp. en distintas especies de los géneros *Nasella* (=*Stipa*) y *Festuca,* y en poblaciones de *Thinopyrum ponticum, Lolium multiflorum y Poa iridifolia* colectadas en el sudeste bonaerense.

2- Establecer el número cromosómico en las poblaciones estudiadas.

3- Determinar, en cortes histológicos foliares de las poblaciones que resulten infectadas (E+), el espesor del mesófilo, tipo y cantidad de tricomas, proporción de fibras y número de haces vasculares así como su relación con los obtenidos desde las poblaciones libres de endófito (E-).

4- Determinar bajo condiciones controladas el comportamiento de las poblaciones que resulten infectadas (E+) frente a diferentes condiciones de salinidad y/o sequía.

(*) Se presentan los objetivos e hipótesis que hacen al proyecto completo (4 años), para dar una idea más detallada de cómo se abordará la problemática. En el primer año de la presente Beca (BE14) se abordarán las **dos primeras hipótesis y los dos primeros objetivos particulares** y se iniciarán actividades previas a lo restante).

5- Métodos y técnicas a emplear

Colecta de plantas en estado reproductivo: Se coleccionarán las siguientes poblaciones nativas y naturalizadas que crecen en el sudeste bonaerense, con valor forrajero u ornamental:
Festuca pampeana, F. ventanicola; Lolium multiflorum; Poa iridifolia; Thinopyrum ponticum (=*Agropyron elongatum); Nasella trichotoma* (=*Stipa trichotoma*), *N. neesiana* (=*S. neesiana*), *N. megapotamica* (=*S. megapotamica*).
Se realizarán viajes de colecta a los partidos de la Costa, General Madariaga, Mar Chiquita, General Pueyrredón, General Alvarado, Rauch, Chascomús, Torquinst y Tandil para obtener entre 25-30 plantas/población/especie. Se muestrearán 2 – 4 poblaciones/especie, de manera de asegurar un mínimo de 20 poblaciones totales para este estudio. Las semillas (cariopses) obtenidas de las plantas se acondicionarán para sus posteriores análisis.

Diagnóstico de la presencia de hongo en semillas (Saha *et al*., 1988)**:** Las semillas previamente tratadas con NaOH, serán coloreadas con tinción directa (rosa de bengala), y observadas en forma individual bajo microscopio óptico (400x). Se considerarán semillas E+ aquellas que presenten hifas del hongo entre las células aleuroníferas del endosperma.

Recuento cromosómico: Al menos 50 semillas/población colectadas se sembrarán de manera individual, en bandejas plantineras. Cuando las plántulas alcancen un óptimo estado de desarrollo (±70 días posteriores a la siembra) se cortarán sus extremos radicales y se pre-tratarán con 8-hidroxiquinoleina 0,002M durante 4h, posteriormente se fijarán en una solución de etanol y ácido acético (3:1, v/v) 24h y se almacenarán en etanol 70%, a 4°C. Las raíces fijadas, se hidrolizarán en HCl 1N a 60ºC durante 10 min y se colorearán según el método de Feulgen (Núñez, 1968). La determinación del número cromosómico se realizará mediante la observación al microscopio óptico (400x y 1000x).

Multiplicación de semillas E+ y producción de líneas E+ y E-: Con el fin de proseguir la temática planteada en el Proyecto Doctoral (4 años) se inicia esta actividad en la presente convocatoria (BE14). A partir de las semillas colectadas y diagnosticadas E+, se sembrarán en el campo experimental de la UIB, parcelas para la obtención de plantas madres E+. Parte de las semillas provenientes de esas plantas madres, una vez corroborada su condición E+, serán tratadas con fungicida (Leyronas *et al*., 2006), para obtener semillas E- y posteriormente se obtendrán plantas madres E- con la misma metodología. Como mínimo, se mantendrán 10 plantas madres/población, E+ y E-.

Análisis de los datos: Los datos obtenidos se analizarán mediante el análisis de variancia (programa R) y multivariado (programa Infostat) para detectar variabilidad intra e interpoblacional.

6- Cronograma mensual de actividades a desarrollar en el período de la beca

	2014									2015		
Actividades	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M
Colecta de plantas en estado reproductivo(*)	X	X										
Diagnóstico del endófito en semillas	X	X	X	X	X							
Recuento cromosómico				X	X	X	X	X				
Multiplicación de semillas E+ y E- a campo.											X	X
Análisis e interpretación de los datos							X	X	X	X		
Escritura. Presentación a Congresos							X	X	X	X	X	X
Presentación del Informe Final												X

(*) Esta colecta se inicia en el ciclo agrícola 2013-2014.

7- Bibliografía

Arachavaleta M; Bacon CW; Hoveland CS; Radcliffe DE. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. Agron. J. 81:83-90.

Bacon CW, Porter, J.K, Robbins, J.D; Luttrell, ES. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. Appl. Environ. Microbiol. 34: 576-581.

Barcellini L. 2010. Evaluación de poblaciones de *Bromus* spp. (Sección Cerathocloa). II- Nivel de ploidía, fenología y persistencia. Tesis de grado, FCA-UNMdP. 34 p.

Bertoni MD; Cabral D; Romero N.; Dubcovsky J. 1993. Endófitos fúngicos en especies Sudamericanas de *Festuca* (Poaceae). Boletín Sociedad Argentina de Botánica 29: 25-34.

Cabral D; Cafaro MJ; Saidman BL; Reddy PV; White JFJr. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. Mycologia 91: 315-325.

Cabral D; Iannone LJ; Stewart A; Novas MV. 2007. The distribution and incidence of *Neotyphodium* endophytes in natives grasses from Argentina and its association with environmental factors. N.Z. Grassland Association: Endophyte Symposium. pp 79-82.

Clausen AM, Ferrer ME; Formica, MB. 2008. Situación de los Recursos Fitogenéticos en la Argentina. II Informe Nacional 1996-2006. INTA, CERBAS, EEA Balcarce. Argentina. 57 p.

Clay K.; Schardl, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. Am. Nat. 160 (Suppl.): 99-127.

Clement SL; Kaiser WJ; Eichenseer H. 1994. *Acremonium* endophytes in germplasms of major grasses and their utilization for insect resistance. In: Bacon CW; White J (eds.). Biotechnology of endophytic fungi of grasses. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 185-199.

Colabelli M; Torres M; Peretti A; San Martino S. 2000. Caracterización anatómica de *Lolium perenne* L. libre e infectado por *Neotyphodium lolii*. Gayana Bot. 57: 110.

Colabelli MN; Torres M; Peretti A; Clausen A. 2001. Relevamiento de endófitos en semillas de especies nativas y naturalizadas de los géneros *Avena*, *Bromus*, *Festuca* y *Poa* en la Argentina. Informativo ABRATES 11: 314.

Colabelli MN; Torres M; Fernández ON; Peretti, A. 2004. Semillas de gramíneas forrajeras nativas en relación a la incidencia de endófitos fúngicos. XIX Seminario Panamericano de Semillas. Asunción, Paraguay. 12-14/07/2004. p. 136.

Colabelli MN; Clausen A; De Battista J; Costa M; Torres M; Re A; González Wetzel V; Peretti A; Pinget D; Medvescigh J. 2007. Incidencia de endófitos tipo *Neotyphodium* en forrajeras nativas y naturalizadas e impacto agronómico en *Lolium multiflorum* Lam. en la Argentina. Avances de Investigación de Recursos Genéticos en el Cono Sur II. IICA-PROCISUR. Montevideo, Uruguay. pp. 45-55.

Colabelli MN; Clausen AM; Rosso B; Mirabella NE; Deperi S. 2008. Evaluación por la presencia de endófitos fúngicos en una colección de germoplasma de distintas procedencias. Congreso Latinoamericano de Micología, 6°, Mar del Plata, 10/13 nov. 2008. pp. 227.

Colabelli MN; Teves B; Franco MF; Sánchez G; Gorostidi M; García L; Rosso B**.** 2010. Evaluación de una colección de festuca alta por la presencia de un hongo endófito en semillas. Jornadas de Mejoramiento Genético de Forrajeras. Instituto Fitotécnico Santa Catalina, UNLP. Lavallol, 9-10/09/10. p. 123.

D'Ambrogio, A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Hemisferio Sur, Bs As. 83 p.

De Battista J; Fernández Osuna M; Medvescigh J; Costa M. 2006. Efecto del endófito fúngico *Neotyphodium occultans* sobre la producción de semilla de *Lolium multiflorum*. 29° Congreso AAPA. Trabajo PP 13.

De Battista J; Peretti A; Carletti S; Ramirez A; Costa M; Schultz I. 1995. Evolución de la incidencia de la infección de *Acremonium coenophialum* en la oferta de semilla de festuca alta en Argentina. Período 1987-1994. Rev. Arg. Prod. Anim. 15: 300-302.

De Battista JP y Perticari A. 2010. Impacto del hongo endófito *Neotyphodium* y de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) sobre el cultivo de festuca alta. En: XII Reunión Anual sobre Forrajeras. Pasturas base festuca alta: Producción y Manejo. Pergamino, Buenos Aires. 3-11-2010. pp. 19-32.

Despósito C. 2011. Afinidad interespecífica y componentes del área foliar y del número potencial de semillas en especies de *Bromus*. Tesis Maestría en Producción Animal, FCA-UNMdP.106 p.

Devo MA. 2012. Efecto de la duplicación cromosómica sobre caracteres vegetativos y reproductivos de una población naturalizada de *Lolium multiflorum* Lam. Tesis de grado, FCA-UNMdP. 32 p.

Easton HS. 2007. Grasses and *Neotyphodium* endophytes: co-adaptation and adaptive breeding. Euphytica 154 (3): 295-306.

Fletcher LR; Harvey IC. 1981. An association of *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. The N.Z. Vet. J. 29: 185-186.

Franco MF; Colabelli MN; Gorostidi M; Sánchez G; Pinchinatti J. 2012. Nivel de infección con endófito fúngico en semillas comerciales de raigrás anual con diferente número cromosómico. VII Encuentro de Biólogos en Red. FCEyN, UNMdP. Mar del Plata, 15-16/11/12. pp. 61.

Funk CR; White JF. 1997. Use of natural and transformed endophyte for turf improvement. In: Bacon CW, Hill NS (eds) *Neotyphodium*/Grass Interactions. Plenum, New York, pp 229-239.

Gentile A; Rossi MS; Cabral D; Craven KD; Schardl CL. 2005. Origin, divergence, and phylogeny of *Epichloë* endophytes of native Argentine grasses. Mol. Phylogenet. Evol. 35(1): 196-208.

Gundel PE; Batista WH; Texeira M; Martinez-Ghersa MA; Omacini M; Ghersa CM. 2008. *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. Proceedings of the Royal Society of London B. 275: 897-905.

Hoveland CS. 1993. Importance and economic significance on *Acremonium* endophytes to perfomance of animals and grass plants. Agric. Ecosyst. Environ. 44: 3-12.

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. Philogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium* endophyte species in the grass *Bromus auleticus* from South America. Mycologia 101: 336-347.

Iannone LJ ; White JF; Giussani LM ; Cabral D ; Novas MV. 2010. Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. Mycol. Progress DOI 10.1007/s11557-010-0669-2.
Leofanti GA. 2010. Evaluación de poblaciones de *Bromus* spp. (Secc. Ceratochloa). I - Variabilidad en tamaño foliar y número de macollos. Tesis de grado, FCA UNMdP 39 p.
Leyronas C; Mériaux B; Raynal G. 2006. Chemical control of *Neotyphodium* spp. endophytes in perennial ryegrass and tall fescue seeds. Crop Sci. 46: 98-104.
Lugo MA; Anton AM; Cabral D. 1998. Presencia y distribución de micofilas en gramíneas de Argentina. Anales Jardín Botánico 56: 15-22.
Malinowski DP; Belesky DP. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environm. stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. Crop Sci. 40:923-940.
Malinowski DP; Belesky DP. 2006. Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. Grassland Sci. 52:1-14.
Marks S; Clay K; Cheplick PG 1991. Effects of fungal endophytes on interspecific and intraspecific competition in the grasses *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. J. Appl. Ecol. 28:194-204.
Núñez O. 1968. An acetic-haematoxylin squash method for small chromosomes. Caryologia 21: 115-119.
Novas MV; Collantes M; Cabral D. 2007. Environmental effects on grass-endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. FEMS Microb. Ecol. 61: 164-173.
Omacini M; Gundel P; Semmartin MG. 2013. Huellas de la simbiosis pasto-endófito en el agroecosistema. En: Rizósfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable. García de Salamone IE; Cassan FD (eds.). División Microbiología Agrícola y Ambiental, AAM. Bs. As. pp. 73-88.
Rivas H; Zanolli M. 1909. La tembladera. Enfermedad propia de los animales herbívoros de las regiones andinas. Rev. Fac. Agron. Vet. La Plata 5: 5-35.
Rudgers JA; Mattingly WB; Koslow JM. 2005. Mutualistic fungus promotes plant invasion into diverse communities. Oecologia. 144: 463-471.
Saha DC; Jackson MA; Johnson-Cicalese JM. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. Phytophatol. 78: 237-239.
Saikkonen K; Ahlholm J; Helander M; Lehtimäki S; Niemeläinen O. 2000. Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. Ecography 23(3): 360-366.
Saikkonen K; Wali P; Helander M; Faeth S. 2004. Evolution of endophyte- plant symbioses. Trends Plant Sci. 9: 275-280.
Siegel MR; Latch GCM; Johnson MC. 1987. Fungal endophytes of grasses. Ann. Rev. Phytopathol. 25: 293-315.
Strickland JR; Looper ML; Matthews JC; Rosenkrans CF; Flythe MD; Brown K.R. 2011. St. Anthony's fire in livestock: causes, mechanisms, and potential solutions. J. Anim. Sci. 89: 1603-1626.
Vila-Aiub MM; Martínez-Ghersa M; Ghersa C. 2003. Evolution of herbicide resistance in weeds: vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities. Evol. Ecol. 17: 441-456.
Wei YK; Gao YB, Xu H; Su D; Zhang X; Wang YH; Lin F; Chan L; Nie LY; Ren AZ. 2006. Occurrence of endphytes in grasses native to northern China. Grass Forage Sci. 61: 422-429.
White JF. 1987. Widespread distribution of endophytes in the *Poaceae*. Plant Dis. 71: 340-342.
White JF; Sullivan RF; Balady GA; Gianfagna TJ; Yue Q; Meyer WA; Cabral D. 2001. A fungal endosymbiont of the grass *Bromus setifolius*: distribution in some Andean populations, identification and examination of beneficial properties. Symbiosis 31: 241-257.

8- Vinculación del plan de trabajo con otros proyectos de investigación en ejecución en el mismo lugar de trabajo

El presente trabajo se enmarca en el Proyecto acreditado de la UNMdP "Diagnóstico y dinámica de la incidencia de hongos endófitos transmitidos por semillas en gramíneas forrajeras de importancia agronómica" (AGR 410/13-15/A410, dirigido por la Ing. Agr. D.E.A. Mabel N. Colabelli) y articula con el Proyecto "Conservación, caracterización y uso de recursos genéticos nativos y naturalizados de valor agronómico" (AGR 384/12-15/A384, dirigido por la Dra. Mercedes Echeverría). Se destaca la formación de RRHH de la Directora y Codirectora en la temática relacionada con el presente estudio.

Del lugar de trabajo

9- Identificación del lugar donde se realizará el plan de trabajo

Se trabajará en la Facultad de Ciencias Agrarias de Balcarce (UNMdP), ubicada en la Ruta Nacional 226, Km. 73,5. Esta Institución se encuentra en el mismo predio que la Estación Experimental Balcarce del INTA, conformando ambas instituciones la Unidad Integrada Balcarce (UIB). Así, esta Unidad constituye un ámbito de trabajo excelente para el desarrollo de las actividades de la becaria.

10- Descripción de la infraestructura y servicios disponibles en relación a los requerimientos del plan de trabajo

Se cuenta con el equipamiento de las Cátedras de Genética y de Biología -Grupos de Investigación de Genética y de Tecnología de Semillas y sus respectivos Laboratorios de la Unidad Integrada Balcarce INTA-FCA). Asimismo se dispone de movilidad, para viajes de colecta, del Grupo de Genética de la UIB. Se dispondrá de servicios que se prestan en la UIB, como registros y estadísticas climatológicas, análisis estadístico de datos, telefonía y acceso a INTERNET, biblioteca y hemeroteca. La vinculación permanente con otros Grupos de investigación nacionales e internacionales cubren los requerimientos de actualización continua.