

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Rol de las Micorrizas Arbusculares en la protección de la
soja [*Glycine max* (L.) Merr.] contra el Síndrome de la
Muerte Súbita causada por *Fusarium virguliforme***

por

Microbióloga

María Lorena Giachero

Director: Dr. Daniel Adrian Ducasse

Co-Directora: Dra. Celina Mercedes Luna

Lugar de Trabajo

IPAVE-CIAP-INTA



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

- Dr. Daniel Adrian Ducasse, IPAVE-CIAP-INTA
- Dra. Celina Mercedes Luna, IFRGV-CIAP-INTA
- Dra. Sofía Noemí Chulze, Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales, UNRC
- Dr. Leonardo Daniel Ploper, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

*Dedicado a los que confiaron y siguen confiando
que en la vida todo es posible.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, PhD. Daniel Ducasse y Dra. Celina Luna, por la dedicación y apoyo que han brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, por confiar en mí y darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el aval de una institución como el INTA. Especialmente quiero agradecer a la dirección del CIAP, Dr. Sergio Lenardon, y a la dirección del IPAVE, Mgs. Ing. Agr. Alejandro Rago, por la confianza y estímulo constante.

Asimismo, agradezco a los miembros mi Comisión Asesora, Dr. Lonardo Daniel Ploper y Dra. Sofía Chulze, por los valiosos aportes y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Silvina Vargas Gil, por aceptar ser parte de la Comisión Evaluadora. No solo por sus importantes aportes y sugerencias, sino también por el estímulo brindado en esta última instancia.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso, mi más sincero agradecimiento a Marina Bressano, por compartir su experiencia y conocimientos, que fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis. Gracias Mari por todo!!!

*Me gustaría también agradecer a la Dra. Mercedes Scandiani por ceder la cepa de *F. virguliforme*, indispensable para la realización de este trabajo. Gracias por la generosidad.*

Al Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, del Departamento de Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola-Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Brasil, por recibirme en su laboratorio y darme la posibilidad de aprender la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos a partir de ADN copia (ADNc-AFLP).

*A Eliane Dumas Gaudot, Plante-Microbe-Enviromental, Dijon, Francia (INRA), por ceder la cepa de *R. irregularis* en raíces transformadas de zanahoria, fundamentales para el desarrollo de la metodología de micorrización de soja in vitro.*

Al Profesor Stéphane Declerck, Université Catholique de Louvain (UCL), Bélgica, por su confianza, dedicación y generosidad. Sus aportes en la construcción de un sistema experimental para micorrizar soja in vitro fueron fundamentales para finalizar esta tesis.

Al PhD Adrien Gallou, del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Méjico, por brindar todos sus conocimientos y hacer que la pasantía en la Université Catholique de Louvain (UCL) fuese más amena.

Pero este trabajo de investigación es también fruto del apoyo incondicional y vital de todas las personas que, día a día me han brindado todo su cariño y apoyo, sin el cual no hubiera tenido la fuerza y energía para crecer, como persona y como profesional.

Gracias a mis padres, Gladys y Oscar, por enseñarme, desde el ejemplo, a valorar el esfuerzo y el trabajo, por estimularme siempre a crecer como profesional sin descuidar la importancia de ser primero mejor persona. Son y seguirán siendo mi mejor ejemplo de vida.

A mis hermanos, Anto, Emi, Sole y Seba, por el aguante!!! Porque sé que entienden mi sinuoso estado anímico más que nadie.

A mis hermosas sobrinas, Francesca y Carmela, por hacerme valorar la vida, la risa y el juego... porque ellas alimentan a mi niña interior. Las amo!!!

A Vero y Noe, por estar y ser parte de mi hermosa familia.

A mis amigos incondicionales, Nathy y Gastón, por tantos momentos felices compartidos, fundamentalmente por el apoyo en esos casos de “emergencia emocional” necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y profesión.

A Fanny (mechita querida) porque me enseñas con tu ejemplo a alimentar siempre a la mejor persona que llevamos dentro.

A Beti por estar siempre!!!

A Vero Ranieri y Nati Puyané por su colaboración constante. Por estar siempre al pie del cañón.

A mi becario del fondo, en donde siempre me sentiré como en casa.

A las hormiguitas viajeras, Flor Asinari y Vero Trucco., que desde aquel Bs As pasaron a formar parte de mi círculo más querido.

Gracias a todos los que hacen que mis días grises no sean tan grises y mis días soleados sean aún más brillantes... a mis chiquitas de ritmos (Euge, Lu, Lore, Caro, Vicky), a Franco, Lean, Evi, Ana, Fer M., Tiki, Vani, Vero B., Pablo, Marcos, Javi, Sole B., Gaby, Paulita, Kari, Tomi, Carla, Keli, Miriam,...

A todos los que estuvieron y que ya no lo están, a los que siempre van a estar, y a los que estarán... A todos... todos. GRACIAS!!!!!!!!!!!!

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Bressano, M., Giachero, M. L., Luna, C. M., Ducasse, D. A. (2010). An *in vitro* method for examining infection of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74 (3-4): 201-204.

Bressano, M., Curetti, M., Giachero, M. L., Vargas Gil, S., Cabello, M., March, G., Ducasse, D. A., Luna, C. M. (2010). Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. *Journal Plant Physiol* 167 (18): 1622-1626.

Giachero, M. L., Ducasse, D. A. (2012). El Síndrome de Muerte Súbita en soja. Editorial Académica Española ISBN 978-3-8454-8192-0.

***Rol de las Micorrizas Arbusculares en la protección de la soja [Glycine max (L.) Merr.]
contra el Síndrome de la Muerte Súbita causada por Fusarium virguliforme..... 1***

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
1. Cultivo de soja	7
Características generales del cultivo.....	7
Origen y distribución del cultivo	8
2. El síndrome de muerte súbita de la soja	10
Ciclo de la enfermedad.....	11
Síntomas	12
3. Micorrizas	14
Hongos Micorrícicos Arbusculares	15
Ciclo de vida de los Hongos Micorrícicos Arbusculares.....	18
4. El estrés oxidativo como mecanismo de mitigación del estrés biótico en la simbiosis HMA-soja	19
5. La respuesta inmune de las plantas	21
Resistencia sistémica adquirida (SAR) inducida por patógeno	22
Resistencia sistémica inducida (ISR) por microorganismos benéficos	22
Resistencia inducida por micorrizas (MIR).....	23
BIBLIOGRAFÍA	25
OBJETIVO GENERAL.....	34
HIPÓTESIS GENERAL	34
Capítulo 1.....	35
Análisis in vivo del efecto de los hongos micorrícicos arbusculares en plantas de soja inoculadas con F. virguliforme: caracterización del estrés oxidativo y la defensa antioxidante	35
INTRODUCCIÓN	36
MATERIALES Y MÉTODOS	39
RESULTADOS	43
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXO I.....	64
Capítulo 2.....	66
Desarrollo de metodologías de inoculación de plantas de soja in vitro con F. virguliforme y evaluación de la interacción.	66
INTRODUCCIÓN	67
Rol de la pared celular de las plantas en la protección contra patógenos.....	70
Cambios transcripcionales en plantas frente a la invasión de patógenos de suelo	72
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS	74
RESULTADOS	79
DISCUSIÓN.....	86
CONCLUSIÓN.....	90
BIBLIOGRAFÍA	91
Capítulo 3.....	96
Desarrollo de metodologías para obtener plantas de soja micorrizadas in vitro	96
INTRODUCCIÓN	97
Cultivo in vitro de micorrizas.....	97
Obtención de cultivos puros de hongos micorrícicos arbusculares	97
Selección del inóculo fúngico	99
OBJETIVO ESPECÍFICO	102
MATERIALES Y MÉTODOS	103
Método 1. Inoculación directa con hifas y esporas de R. irregularis.....	106

Método 2. Raíces transformadas de zanahoria micorrizadas con <i>R. irregularis</i> como donante de micelio.....	107
Método 3. Plantas donadoras de micelio.....	109
RESULTADOS	111
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIÓN.....	114
BIBLIOGRAFÍA	115
Capítulo 4.....	118
Análisis del efecto de los hongos micorrícicos arbusculares en plantas de soja inoculadas con <i>F. virguliforme</i> en un sistema in vitro.....	118
INTRODUCCIÓN	119
OBJETIVO ESPECÍFICO	123
MATERIALES Y MÉTODOS	124
RESULTADOS	130
DISCUSIÓN	135
CONCLUSIÓN.....	138
BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXO II.....	143
Discusión y conclusiones generales.....	160
DISCUSIÓN GENERAL.....	160
CONCLUSIONES GENERALES.....	163
BIBLIOGRAFÍA	164
Anexo III.....	166
ANEXO III. 1: MANEJO DEL RIEGO.....	166
ANEXO III. 2: ESTIMACIÓN VISUAL DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN MÉTODO DE LA INTERSECCIÓN EN PLACA CUADRICULADA (GRIDLINE INTERSECTION METHOD)	166
ANEXO III. 3: TINCIÓN DE MICORRIZAS CON AZUL TRIPÁN	168
ANEXO III. 4: ESTIMACIÓN DE LOS PERÓXIDOS DE LÍPIDOS EVALUADOS COMO CONTENIDO DE MALONDIALDEHIDO (MDA)	169
ANEXO III. 5: EXTRACCIÓN DE MATERIAL PARA LA MEDICIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	171
ANEXO III. 6: TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	172
ANEXO III. 7: TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).....	174
ANEXO III. 8: TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE CATALASA (CAT).....	177
ANEXO III. 9: TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE ASCORBATO PEROXIDASA (APX).....	178
ANEXO III. 10: PROTOCOLO GELES DISCONTINUOS-NO DESNATURALIZANTES	181
ANEXO III. 11: SUPERÓXIDO DISMUTASA-GELES NO DESNATURALIZANTES	184
ANEXO III. 12: GEL APX -GELES NO DESNATURALIZANTES.....	188
Anexo IV.....	192
ANEXO IV. 1: EXTRACCIÓN DE ARN- TRIZOL-INVITROGEN	192
ANEXO IV. 2: GEL ARN	193
ANEXO IV. 3: POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE ADNC (ADNC AFLP).....	195
ANEXO IV. 4: GEL DE POLIACRILAMIDA	202
ANEXO IV. 5: PCR EN TIEMPO REAL	208
ANEXO IV. 6: R.A.C.E. (RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS).....	209
ANEXO IV. 7: TÉCNICA DE CLONADO TOPO-TA	210

LISTADO DE ABREVIATURAS

- %:** Por ciento
- %A:** Porcentaje de arbusculos
- %H:** Porcentaje de hifas
- %V:** Porcentaje de vesículas
- °C:** Grados centígrados
- µg:** Microgramos
- µm:** Micrómetro
- 5' RACE:** Rápida Amplificación de los Extremos de ADNc
- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- ANOVA:** Análisis de la varianza
- APX:** Ascorbato peroxidasa
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- Avr:** Factores de avirulencia.
- BLAST:** Del inglés Basic Local Alignment Search Tool
- C:** Carbono
- C:** Plantas sanas sin micorrizar
- CAT:** Catalasa
- cDNA:** Ácido Desoxirribonucleico complementario
- cDNA-AFLP:** Polimorfismos de fragmentos de restricción a partir de ADN complementario.
- CR:** Compartimento de la raíz
- CRA:** Contenido relativo de agua
- Ct:** del inglés cycle threshold (ciclo umbral)
- CWI:** Del inglés Cell Wall Integrity (integridad de la pared celular).
- CH:** Compartimento de la hifa
- DAMPs:** Del inglés Damage Associated Molecular Patterns (Patrones Moleculares Asociados al Daño).
- diam:** Diámetro.
- EcoRI:** Endonucleasa de restricción de corte poco frecuente
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- EF-1α:** Factor de elongación 1-α
- EROs:** Especies Reactivas del Oxígeno
- ETI:** Del inglés Effector Triggered Immunity (inmunidad desencadenada por efectores).
- ETS:** Susceptibilidad desencadenada por efectores.
- Fv:** Plantas inoculadas con *F. virguliforme*.
- Genes R:** Genes de resistencia
- gr/l:** gramos por litro
- gr:** Gramos
- H:** Riego continuo
- H₂O₂:** Peróxido de Hidrógeno

HAM-P: Sistema de cultivo *in vitro* parcialmente cerrado
HCl: Ácido clorhídrico
HG: Homogalacturona.
HindIII: Endonucleasa de restricción de corte poco frecuente
HMA: Hongo Micorrótico Arbuscular
hs: Horas
ISR: resistencia sistémica inducida
JA: Del inglés Jasmonic acid (ácido jasmónico)
K+: Potasio
KOH: Hidróxido de potasio
LB: Medio Luria-Bertani
Long.: Longitud
LPS: Lipopolisacáridos.
LRR: Dominio repetido en leucina carboxilo terminal
M: Medio mínimo
MAMPs: Del inglés Microbe-Associated Molecular Pattern (moléculas patrón, moléculas tipo, asociadas a microbios).
MDA: Malondialdehído
MER: Micelio extra radical
mg: Miligramo
min: Minutos
MIR: Del inglés Mycorrhiza Induced Resistance (resistencia inducida por micorrizas)
ml: Mililitro
mm: Milímetro.
MSR: Medio Strullu-Romand modificado
N: Nitrógeno
NB: Dominio central de unión a nucleótidos.
NB-LRR: Proteínas con un dominio central de unión a nucleótidos y dominios repetidos en Lucina carboxilo terminal.
NCBI: National Center for Biotechnology Information
O₂^{-•}: Radical superóxido
OGs: Oligogalacturónidos.
P: Fósforo
PAMPs: Del inglés Pathogen-Associated Molecular Pattern (moléculas asociadas a patógenos).
pb: Pares de bases
PCR: Del inglés Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDA: Potato Dextrosa Agar
PDM: Planta donadora de micelio
PGIPs: Proteínas inhibidoras de las poligalacturonasas de la pared celular.
PGs: Poligalacturonasas.
PK: proteínas quinasas
PNG: Peptidoglicanos.
ppm: Partes por millón

PR: Proteínas de resistencia.

PRR: Receptores específicos de PAMPS.

PRRs: Del inglés Pattern Recognition Receptor (receptores de reconocimiento de patrones o estructuras).

PTI: Del inglés Pattern Triggered immunity (inmunidad desencadenada por PAMPs/MAMPs).

RAFv: Raíces Adyacentes a la entrada de *Fusarium virguliforme*

RBPG1: Receptor del tipo LRR-RPK, denominado Botrytis PolyGalacturonase 1

RH: Respuesta Hipersensible.

Ri/Fv: Plantas micorrizadas e inoculadas con *F. virguliforme*.

Ri: Plantas micorrizadas con *R. irregularis*

RLFv: Raíces Lejanas a la entrada de *Fusarium virguliforme*

RLK: Del inglés receptor like kinase (receptores tipo kinasas)

RNA-seq: Secuenciación de RNA

ROC: del inglés: root organ culture (cultivo de órganos de raíz)

RPK: receptor proteína quinasa

rpm: revoluciones por minuto

RT: Reverso transcriptasa

RT-PCR: del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa)

S: Sequía

SA: Ácido salicílico

SAR: Resistencia sistémica adquirida

seg: Segundo

SOD: Superóxido dismutasa

T1: Tiempo 1

T2: Tiempo 2

μmol: Micromolar

RESUMEN

La superficie dedicada al cultivo de la soja ha manifestado un constante incremento durante los últimos 15 años en la Argentina lo cual significó que nuestro país se posicione como el principal exportador mundial de aceite y harina de soja, y el tercer exportador de grano de esta oleaginosa. Entre las enfermedades que pueden causar pérdidas importantes de rendimiento, el “Síndrome de la Muerte Súbita” de la soja, causada por al menos cuatro especies del género *Fusarium* se destaca a nivel mundial. La simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) puede proteger a las plantas frente a condiciones de estrés (biótico o abiótico). El objetivo de esta tesis doctoral fue comprobar la existencia de un efecto atenuador de las micorrizas (*Rhizophagus irregularis* MUCL 41833.) sobre el patosistema soja/*Fusarium virguliforme* y analizar sus posibles mecanismos. Para lograr este objetivo, se realizaron estudios de larga duración (en condiciones controladas de invernadero) y de corta duración (en condiciones controladas *in vitro*). Se evaluó la capacidad de las micorrizas de mejorar el estado nutricional de la planta hospedante y de mitigar el estrés hídrico como mecanismos de protección contra *F. virguliforme*, en plantas de 4 y 12 semanas de crecimiento. Se comprobó que la simbiosis micorrícica disminuyó el daño oxidativo causado por *F. virguliforme*, tanto en condiciones de riego continuo como de sequía. Se evidenció un aumento de la actividad superóxido dismutasa en plantas micorrizadas, sugiriendo un posible mecanismo de regulación por parte de la micorriza durante el estrés causado por el patógeno. Aplicando una metodología experimental *in vitro* fue posible monitorear la llegada de *F. virguliforme* a la raíz, pudiéndose evaluar, mediante técnicas moleculares, los cambios ocurridos a nivel transcripcional de los genes involucrados en la defensa contra patógenos durante los primeros momentos de la interacción en plantas micorrizadas y sin micorrizar. Se analizaron en mayor profundidad los cambios transcripcionales de un gen que codifica una proteína quinasa con motivos repetidos ricos en leucina (LRR-PK). Los resultados generados permiten afirmar que existe una activación de la reacción de defensa inducida en las plantas de soja micorrizadas (MIR, del inglés mycorrhizal induced resistance) que permite a la planta una más rápida y efectiva respuesta defensiva a la invasión del patógeno. Con los resultados obtenidos pudo demostrarse que las plantas con buen nivel de micorrización pueden responder mejor ante la invasión de un patógeno fúngico como *F. virguliforme* y que probablemente esa mejor capacidad de respuesta se deba a que mantienen un estado de alerta (priming) inducido por la simbiosis micorrícica.

SUMMARY

The soybean cropping area has increased over the last 15 years in Argentina, positioning our country as the world's leading exporter of soybean oil and flour, and the third largest exporter of soy grain. One of the most important diseases worldwide that can cause significant yield losses, is "sudden death syndrome" of soybeans, caused by at least four species of the genus *Fusarium*. The symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can protect plants from stress conditions (biotic or abiotic). The objective of this thesis was to prove the existence of an attenuating effect from mycorrhizae (*Rhizophagus irregularis* MUCL 41833) on the soybean/*Fusarium virguliforme* pathosystem. To achieve this objective, long and short-term studies were conducted (under controlled greenhouse and *in vitro* conditions respectively). The capacity of mycorrhizae of improving soybean nutritional status and of mitigating water stress as the main protecting mechanisms of *F. virguliforme* in plants of 4 and 12 week was evaluated. It was found that the mycorrhizal symbiosis reduced the oxidative damage caused by *F. virguliforme* both under continuous irrigation and under drought conditions. An increased superoxide dismutase activity was evidenced in mycorrhizal plants, suggesting a possible mechanism of regulation by mycorrhiza during stress caused by the pathogen. Applying an *in vitro* methodology, it was possible to observe *F. virguliforme* arriving to the root. This allowed us to evaluate, using molecular techniques, the changes at the transcriptional level of genes involved in the plant defense during the first moments of the interaction, comparing mycorrhizal and non mycorrhizal plants. Transcriptional changes of a gene encoding a kinase protein with leucine-rich repeat motif (LRR-PK) were further analyzed. The results confirm that there is an activation of the plant defense reaction induced in mycorrhizal soybean plants (MIR: mycorrhizal induced resistance) that allows faster and more effective plant defense response to pathogen invasion. Our results showed that a plant with good mycorrhization level can respond better to infection by pathogenic fungi like *F. virguliforme*, and probably this capacity of response is due to a priming status induced by the mycorrhiza.

Rol de las Micorrizas Arbusculares en la protección de la soja [*Glycine max* (L.) Merr.] contra el Síndrome de la Muerte Súbita causada por *Fusarium virguliforme*

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Cultivo de soja

Características generales del cultivo

La soja [*Glycine max* (L.) Merr.] es una planta herbácea anual, de primavera-verano, cuyo ciclo vegetativo oscila de tres a siete meses. Esta planta posee un sistema radicular potente, con una raíz principal y raíces secundarias, la longitud total de la misma puede alcanzar los 50 cm. Las hojas, los tallos y las vainas son pubescentes, variando el color de los pelos de rubio a pardo más o menos grisáceo. El tallo es rígido, adquiere alturas variables, de 0,4 a 1,5 metros, según variedades y condiciones de cultivo, suele ser ramificado. Las hojas son alternas, compuestas, excepto las basales, que son simples. Son trifoliadas, con los folíolos oval-lanceolados (Figura 1A) de color verde característico que se torna amarillo en la madurez, quedando las plantas sin hojas. Las flores se encuentran en inflorescencias racemosas axilares en número variable, son de color blanquecino o púrpura, según la variedad (Figura 1B). El fruto es una vaina dehiscente por ambas suturas (Figura 1C). La longitud de la vaina es de dos a siete centímetros. Cada fruto contiene de tres a cuatro semillas, las cuales son generalmente esféricas y de color amarillo. Algunas variedades presentan una mancha negra que corresponde al hilo de la semilla. Su tamaño es mediano (100 semillas pesan de 5 a 40 gramos, aunque en las variedades comerciales oscila de 10 a 20 gramos). La semilla es rica en proteínas y en aceites. En algunas variedades mejoradas presenta alrededor del 40-42% de proteína y del 20-22% en aceite, respecto a su peso seco. En la proteína de soja hay un buen balance de aminoácidos esenciales, destacando lisina y leucina.

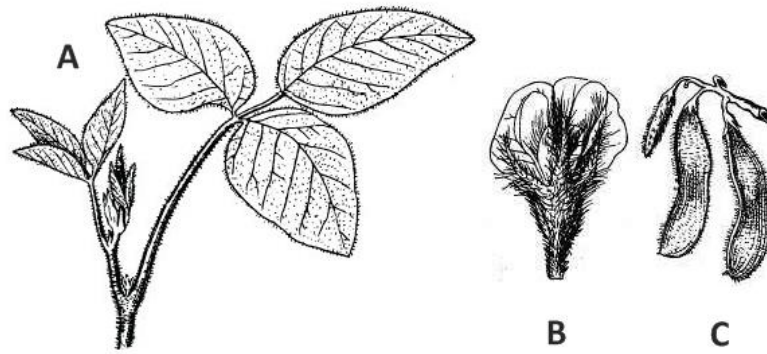


Figura 1: Dibujo de las partes de una planta de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]. A: hojas trifoliadas de una planta de soja, donde se observa la forma oval-lanceolada de los folíolos. **B:** dibujo de una flor. **C:** Fruto de soja, vaina o chaucha. Imágenes tomadas de la web.

Esta planta pertenece a las Dicotiledóneas, Familia *Fabaceae*. El género *Glycine* Willd está dividido de acuerdo a Hymowitz y Newell (1980) en los subgéneros *Glycine* y *Soja*. Dentro del subgénero *Soja* (Moench) FJ Herm se incluye la soja cultivada, *Glycine max* (L.) Merr. (INTA, 1997).

Origen y distribución del cultivo

El cultivo de soja es originario del sudeste asiático. Estados Unidos de Norteamérica es considerado el primer país en introducir el cultivo en el continente americano. El desarrollo de la investigación en este país arrojó como resultado las primeras variedades americanas, y fueron estas variedades, las que se utilizaron por primera vez en nuestro país. A partir de entonces, se ha trabajado para obtener materiales genéticamente adaptados a las condiciones de producción argentinas. Es a partir de la década de 1980 cuando comienzan a registrarse masivamente variedades desarrolladas localmente, lo que acompañó y tuvo como consecuencia la expansión del cultivo. A mediados de los 90 comienzan a evaluarse las primeras variedades transformadas genéticamente que manifestaban resistencia a un herbicida no selectivo, el glifosato. Esta nueva tecnología amplió las fronteras del cultivo, incrementando la superficie cultivada (Figura 2), pasando de las 6 millones de hectáreas en 1996 a 20,64 millones de hectáreas que se esperan terminar de implantar en la campaña 2014/2015 (Informe especial sobre cultivos GEA – Guía Estratégica para el Agro. AÑO VII - N° 060 - 14/01/2015 https://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/Informe%20especial%20060%202015_14_01.pdf).

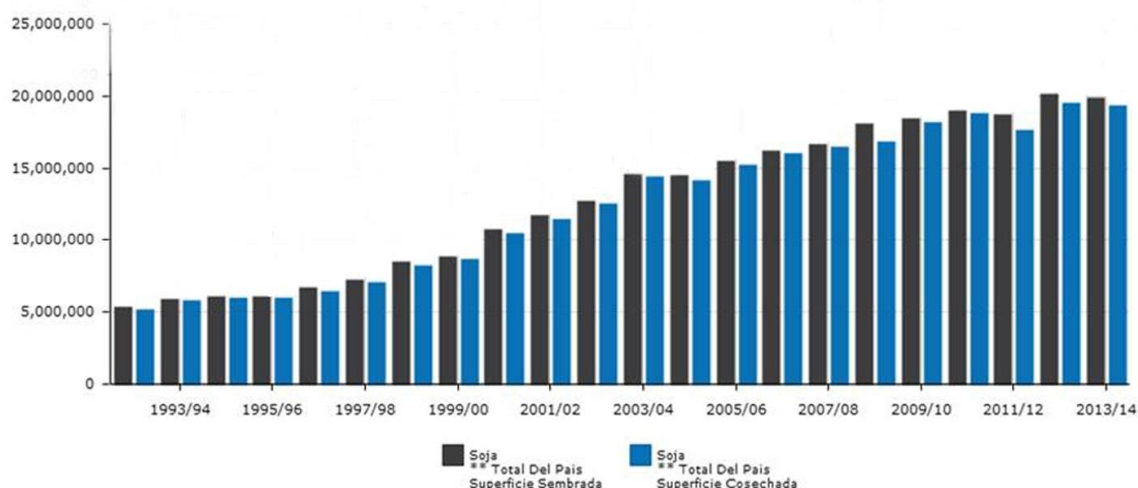


Figura 2: Superficie implantada y cosechada de soja total en Argentina desde la campaña 1991/92 a la campaña 2013/14. Cifras en hectáreas anuales. Fuente: MAGyP, Sistema Integrado de Información Agropecuaria (SIIA). http://www.sii.gov.ar/sst_pcias/estima/estima_1b.php

Si bien los rendimientos han sido fluctuantes, debido principalmente a las condiciones climáticas, fueron crecientes desde el inicio del cultivo, posicionando a la Argentina como el mayor exportador mundial de aceite y harina de soja, y el tercer exportador de grano de esta oleaginosa. Según el Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (MAGyP), la producción de soja en nuestro país fue de 53,4 millones de toneladas en la campaña 2013/14, manteniéndolo como tercer país productor a nivel mundial (Tabla 1).

Tabla 1: principales países productores de soja del mundo

	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	Oct 2015/16	Nov 2015/16
Estados Unidos	84,291	82,791	91,389	106,878	105,806	108,354
Brasil	66,5	82	86,7	96,2	100	100
Argentina	40,1	49,3	53,5	60,8	57	57
China	14,485	13,05	12,2	12,35	11,5	11,5
India	11,7	12,2	9,5	9	11	9,5
Paraguay	4,043	8,202	8,19	8,1	8,8	8,8
Canada	4,467	5,086	5,359	6,049	5,95	5,95
Otros	14,841	16,195	16,307	19,302	20,436	19,911
Total	240,427	268,824	283,145	318,679	320,492	321,015

Cifras en Millones de Toneladas - Fuente: USDA 11/10/2015

En Argentina, el 95% de los cultivos de soja se ubican en una amplia zona de la región pampeana norte (provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Buenos Aires, La Pampa y San Luís). El 5% restante se encuentra en la región Norte del país: provincias de Tucumán, Salta, Santiago del Estero, Catamarca, Jujuy, Chaco, Formosa, Misiones y norte de Santa Fe (Ploper, 1999).

2. El síndrome de muerte súbita de la soja

El síndrome de muerte súbita de la soja (SMS) es causada por cuatro especies de *Fusarium*: *F. tucumaniae*, *F. virguliforme*, *F. brasiliense*, y *F. crassistipitatum* (Aoki *et al.*, 2005, 2012; O'Donnell *et al.*, 2010), siendo *Fusarium virguliforme*, formalmente conocido como *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* (Roy *et al.*, 1997; Rupe *et al.*, 1989), uno de los más prevalentes.

La enfermedad fue descubierta por primera vez en Arkansas en 1972 (Rupe and Hartman, 1999) pero no fue hasta 1983 que Hirrel le dio el nombre de SMS por la rapidez con la que se desarrollan los síntomas (Hirrel, 1983). Para el año 1984, fue detectada en los estados de Mississippi, Missouri, Kentucky y Tennessee, y en 1986 en Indiana e Illinois.

La enfermedad fue reportada por primera vez en Sudamérica 20 años después que en Estados Unidos. En Argentina, fue detectada por primera vez en cultivos del área de Pergamino (región pampeana norte) durante la campaña 1991/92 (Ivancovich, *et al.*, 1992) y en el noroeste argentino (NOA) en la campaña siguiente (Ploper, 1993). Actualmente se encuentra en todas las regiones sojeras del país (Distéfano *et al.*, 2006). En 1993 se informó la presencia de la enfermedad en Brasil (Nakayima *et al.*, 1996; Yorinori, 2002), en 1999 en Paraguay (Yorinori, 1999), en 2002 en Bolivia (Yorinori, 2002) y en 2003 en Uruguay (Ploper *et al.*, 2003).

Las pérdidas económicas ocasionadas por esta enfermedad, han hecho que se la considere una de las principales tanto en América del Norte como en América del Sur, especialmente en Estados Unidos, Argentina y Brasil, dado que son los principales países productores de soja en el mundo. Las pérdidas anuales son del orden los cientos de millones de dólares.

Las pérdidas de rendimiento dependen en gran medida del momento de inicio y de la severidad de la enfermedad. Pueden ser pérdidas insignificantes o casi totales. En 2011 se reportaron pérdidas que variaron de 4% a 59% en diferentes regiones de Argentina (Scandiani, comunicación personal). Las mayores pérdidas se producen cuanto más temprano se presenta la enfermedad.

La disminución de los rendimientos se debe a la disminución del área fotosintéticamente activa, defoliación, aborto de flores y vainas y reducción del tamaño y peso de 1000 semillas (Costamilan, 2000; Ploper, *et al.*, 1995; Rupe, 1989a; Rupe, 1989b; Rupe, 1991; Rupe and Hartman, 1999).

Ciclo de la enfermedad

Se cree que *Fusarium virguliforme* (Fv) pasa el invierno principalmente como clamidosporas, ya sea libres en el suelo o en restos de cultivos. Las clamidosporas son esporas de resistencia; cuando la semilla de soja germina y las temperaturas del suelo aumentan, las mismas son capaces de germinar, dando inicio al ciclo de infección. Las raíces emergentes son particularmente susceptibles al ataque del patógeno. El ciclo de la enfermedad comienza cuando el inóculo del patógeno (hifas, macro y microconidios), presente en el suelo, penetra en la raíz de la soja. Esto, en cultivos a campo, ocurre durante el estadio de plántulas, 14 días luego de la plantación (Njiti *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 2006; Rupe and Gbur, 1995; Roy *et al.*, 1989; Huang and Hartman, 1998). La penetración conidial en semillas pregerminadas fue detectada a las 6 hs post inoculación (Navi and Yang, 2008), y los síntomas de podredumbre de raíz fueron observados 3 días posteriores a la plantación en suelos infectados con Fv (Huang and Hartman, 1998).

El proceso de infección ha sido descrito en base a estudios de microscopía. Navi y Yang (2008) observaron tubo germinativo, apresorio y el gancho de penetración del hongo en las radículas de semillas pre-germinadas inoculadas con macroconidios. Los autores observaron que las zonas de mayor penetración de Fv fueron la punta de raíz y la base de los pelos radicales (Navi and Yang, 2008).

Luego de la penetración, la colonización de la hifa es mayormente intracelular, aunque ocasionalmente se ha observado crecimiento intercelular (Melgar *et al.*, 1994). Además de la colonización de los tejidos corticales, el hongo también es capaz de colonizar el tejido vascular (Navi and Yang, 2008). La infección en etapas tempranas del desarrollo de la plántula, permite que el patógeno se establezca efectivamente en los tejidos xilemáticos, dando lugar a los síntomas foliares (Yang and Navi, 2003). En cambio, si la infección ocurre en una etapa tardía del crecimiento, el patógeno no es capaz de colonizar el tejido xilemático, por lo que no ocurre movimiento de la toxina que produce los síntomas foliares (Navi and Yang, 2008). La forma en cómo el patógeno llega a penetrar en el xilema es desconocida (Navi and Yang, 2008). La habilidad de Fv para colonizar los tejidos vasculares (xilema y floema) depende del genotipo (Navi and Yang, 2008) y de la

edad de la planta (Gongora-Canul and Leandro, 2011a; 2011b). Las plantas adultas han mostrado ser menos susceptibles a la colonización vascular con Fv (Gongora-Canul and Leandro, 2011a; 2011b), posiblemente debido a una mayor deposición de compuestos fenólicos, tales como lignina y suberina. Estos compuestos sirven como mecanismo de defensa para algunos patógenos; sin embargo, Fv tiene la capacidad de degradar lignina, porque produce 2 enzimas, lacasa y lignina peroxidasa (Lozovaya *et al.*; 2006), las cuales juegan un rol importante en la penetración del patógeno en el tejido vascular.

Una vez establecida la infección, el hongo en sí no invade más allá de unos pocos centímetros por encima de la línea del suelo, colonizando el tejido vascular. Cuando el patógeno se establece en el xilema, produce toxinas que se transfieren sistémicamente a lo largo de la planta. Dichas toxinas son las responsables de producir síntomas foliares, que no suelen verse hasta la etapa de floración. La producción y el posterior transporte de esta toxina se incrementan bajo condiciones de humedad. Esto, sumado a la aparición de otras enfermedades asociadas con dichas condiciones, puede aumentar el potencial de infección y, por consiguiente, la gravedad de la enfermedad.

Síntomas

Las raíces infectadas por Fv desarrollan una coloración marrón-rojiza (Rupe and Hartman 1999; Roy *et al.*, 1997), que es aparente en las plántulas y puede ser menos evidente en cultivo a campo. Sin embargo, si se realiza un corte longitudinal de la raíz primaria, el tejido cortical mostrará una coloración marrón-rojiza (Figura 3B). Esta coloración de la raíz puede, algunas veces, alcanzar la base del tallo, pero la médula permanece blanca. Las raíces severamente infectadas pueden mostrar reducida la masa radicular (incluyendo raíces laterales) (Rupe, 1989; Li *et al.*, 2009; Gray *et al.*, 1999; Gongora-Canul *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2006). Cuando la humedad del suelo es buena, las plantas en condiciones de campo pueden mostrar masas azuladas de conidios en la superficie de la raíz (Roy *et al.*, 1997), una señal útil para el diagnóstico de la enfermedad (Figura 3B).

Los síntomas foliares típicos aparecen durante los estados reproductivos del cultivo de soja. Se observa un manchado clorótico, que luego se extiende entre las nervaduras de las hojas desarrollando necrosis, causante de la clorosis y necrosis típica de SMS (Figura 3C). Si la enfermedad progresa, las hojas comienzan a enrullarse y eventualmente se caen, quedando los pecíolos unidos al vástago. Este proceso de secado y defoliación ocurre más rápido en la parte superior de la planta, y es a menudo, el síntoma más evidente en un

campo con plantas infectadas. En los casos más graves, las plantas pierden por completo las hojas, quedando solo los tallos de pie (Figura 3D).

Aunque la colonización del hongo se limita a la raíz, los daños ocurridos en el SMS se producen en toda la planta, incluyendo las vainas, siendo los síntomas más llamativos los que ocurren en las hojas. Dado que el patógeno no ha podido ser aislado de hojas ni tallos de plantas con síntomas, es que se considera que una o más toxinas son las responsables de causar los síntomas foliares. Estas toxinas son transportadas por los conductos xilemáticos desde las raíces hasta las hojas, causando los síntomas típicos de SMS (Figura 3D) (Nickell and Widholm, 1996; Jin *et al.*, 1996). Hasta el momento se han identificado dos fitotoxinas en *F. virguliforme* que están asociadas a los síntomas de SMS en hoja (Jin *et al.*, 1996a; Jin *et al.*, 1996b; Brar *et al.*, 2011). La primera fitotoxina identificada es una proteína de 17 KDa, purificada de cultivos filtrados del patógeno (Jin *et al.*, 1996b). La segunda toxina es un péptido de 13.5 KDa producido por un gen de copia única llamado FvTox1 (Brar *et al.*, 2011).

En cultivos a campo, los síntomas foliares de la enfermedad se desarrollan durante el estado reproductivo del cultivo (Rupe and Hartman, 1999; Roy *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1999), aunque, a veces los síntomas pueden ocurrir en el estadio de plántula (Roy *et al.*, 1997, Gongora-Canul and Leandro, 2011a). La razón de la diferencia temporal entre la infección de la raíz durante el estadio de plántula y el desarrollo de los síntomas foliares durante el estado reproductivo no se conoce, pero puede deberse a los cambios fisiológicos durante el estado reproductivo (Rupe and Gbur, 1995).

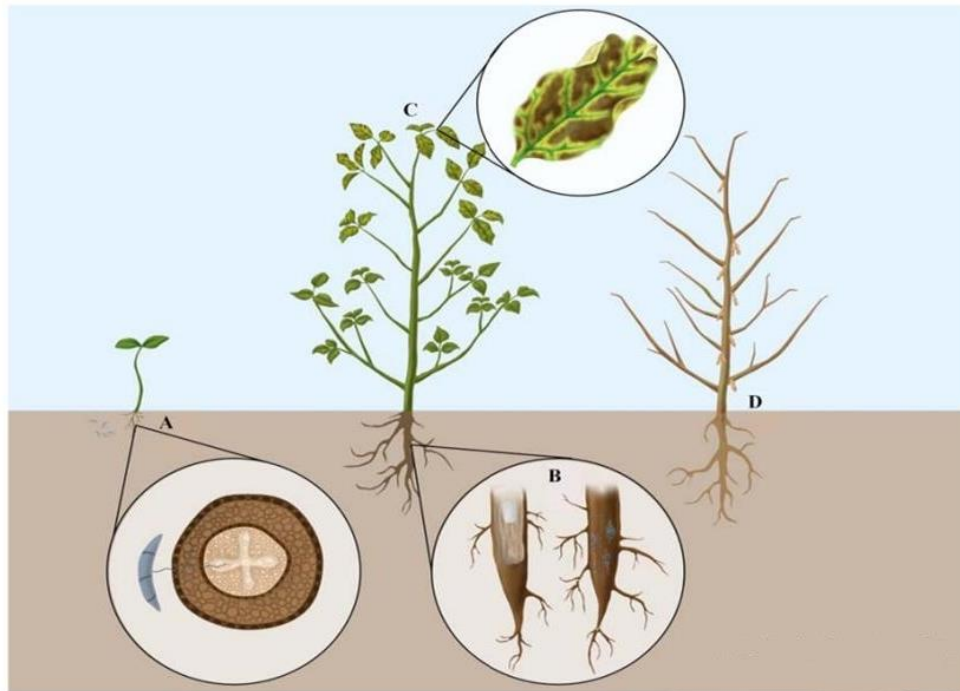


Figura 3: Estados claves del ciclo del síndrome de muerte súbita en soja. A: Infección de plantas jóvenes de soja y colonización de la hifa en el tejido cortical y vascular de la raíz. B: coloración marron del tejido cortical de la raíz y masas azuladas de esporas en la superficie de la raíz. C: típica clorosis internerval y necrosis de las hojas. D: planta deshojada con pecíolos secos unidos al tallo. Ilustrado por Hannah M. Vetter. Tomado de Leandro *et al.* (2013).

3. Micorrizas

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas establecidas entre las plantas y algunos hongos del suelo. Probablemente se trate del tipo de simbiosis más distribuido en la biosfera, ya que aproximadamente el 80% de las plantas terrestres son capaces de establecer algún tipo de micorrizas (Smith and Read, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que hay plantas libres de micorrizas, como las de las familias *Proteacea* (Nicholson, 1967; Brundrett *et al.*, 1996), *Cruciferae*, *Zygophyllaceae* (Varma, 1998) *Dipterocaraceae*, *Betulaceae*, *Myrtaceae* y *Fagaceae* (Nicholson, 1967). Aunque se piensa que especies de *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cyperaceae*, *Amarantaceae* y *Juncaceae* no micorrizan, se comprobó que la mayoría de estas especies estaban infectadas en condiciones de pastizales naturalmente estresados (Shanker *et al.*, 1991). La razón por la cual algunas plantas no forman micorrizas no se conoce completamente, pero puede estar

relacionado con la presencia de compuestos antifúngicos en el tejido cortical de la raíz o en los exudados radiculares. También se podría deber a las interacciones entre el hongo y la planta a nivel de pared celular o de la lámina media (Tester *et al.*, 1987).

El término micorrizas hace referencia a la interacción específica entre el suelo, la raíz de las plantas, y ciertos hongos del suelo (Figura 4); y se clasifican en base a las estructuras y al tipo de hongo y planta implicados en la interacción. De esta manera, podemos encontrar Ectomicorrizas, Ectendomicorrizas y Endomicorrizas o Micorrizas Arbusculares. Este último grupo, son considerados el tipo más común y ampliamente distribuido. Dado que esta tesis tiene como principal objetivo el estudio de los hongos formadores de micorrizas arbusculares, a partir de aquí nos vamos a centrar exclusivamente en el estudio de los hechos más relevantes en relación a los hongos micorrícicos arbusculares, a los que nos referiremos como HMA.

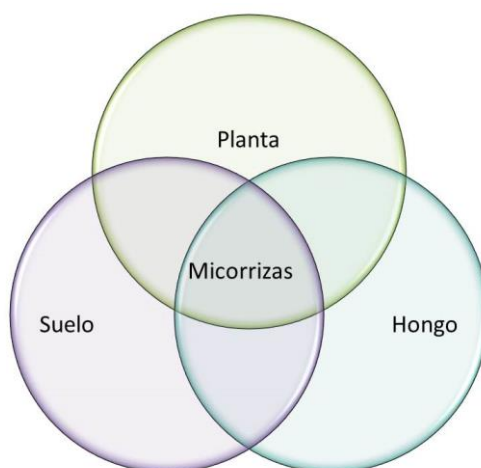


Figura 4: Asociación micorrítica, mostrando la interacción entre hongos, plantas y suelo. Tomado de Brundrett *et al.* (1996).

Hongos Micorrícicos Arbusculares

Inicialmente, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) fueron clasificados como *Zygomycetes* y las características morfológicas de sus esporas, si son producidas dentro o fuera de la raíz de la planta huésped, y la forma en que se agrupan (si forman o no esporocarpos), fueron usadas como marcadores taxonómicos (Morton and Benny, 1990). Morton y col. (1998) argumentaron consistentemente que las esporas podrían ser independientes de las otras partes del organismo, y si esto es así, una diferencia en la espora no refleja necesariamente la verdadera filogenia. Esto ha quedado demostrado con las nuevas técnicas moleculares. De hecho, esto quedó evidenciado en algunos casos en los que la morfología de las esporas no mostraba diferencias entre organismos de diferentes

especies, familias e incluso ordenes (Morton and Redecker, 2001; Walker *et al.*, 2007; Walker, 2008; Gamper *et al.*, 2009).

Recientemente, análisis basados en las secuencias de la subunidad pequeña del rRNA llevaron a una reclasificación y a la creación de un nuevo phylum, el Phylum *Glomeromycota*, próximos a los *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Figura 5 A), con los que compartiría un ancestro común (Schüßler *et al.*, 2001).

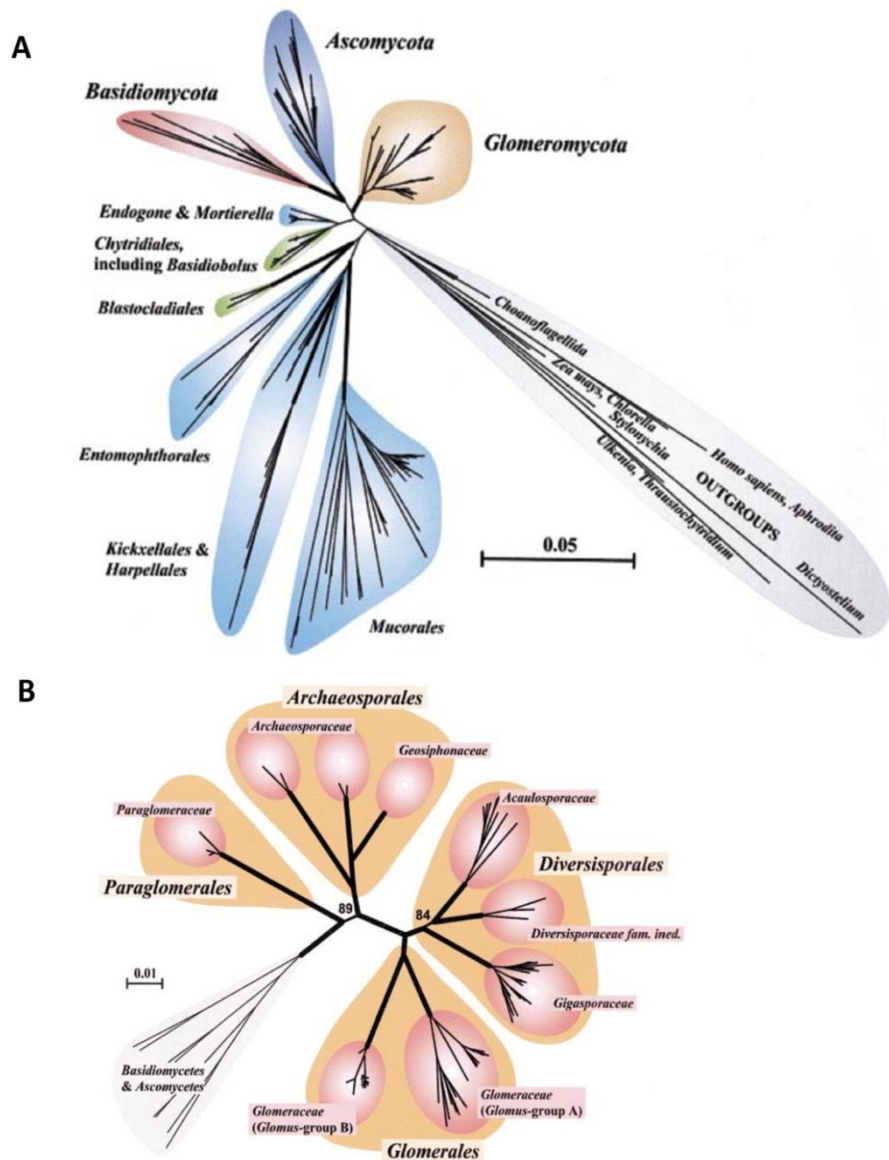


Figura 5: A: Filogenia de hongos basados en secuencias de la subunidad pequeña (SSU) del rRNA. B: Estructura taxonómica general propuesta para las micorrizas arbusculares y hongos relacionados (*Glomeromycota*). Tomado de Schüßler *et al.* (2001).

La clasificación taxonómica de los HMA, basada en Redecker y col. (2013) y Schüßler y Walker (2010) se muestra a continuación:

phylum *Glomeromycota*

class *Glomeromycetes*

orders (4)

families (11)

genera (25)

Glomerales

Glomeraceae

Glomus

Funneliformis (former *Glomus* Group Aa, '*Glomus mosseae* clade')

Rhizophagus (former *Glomus* Group Ab, '*Glomus intraradices* clade')

Sclerocystis (basal in former *Glomus* Group Ab)

Septoglomus

Claroideoglomeraceae *Claroideoglomus* (former *Glomus* Group B, '*Glomus claroideum* clade')

Diversisporales

Gigasporaceae

Cetraspora

Dentiscutata

Gigaspora

Intraornatospora (insufficient evidence, but no formal action was taken)

Paradentiscutata (insufficient evidence, but no formal action was taken)

Racocetra

Scutellospora

Acaulosporaceae *Acaulospora* (including the former *Kuklospora*)

Pacisporaceae

Pacispora

Diversisporaceae

Corymbiglomus (insufficient evidence, but no formal action was taken)

Diversispora (former *Glomus* Group C)

Otospora (insufficient evidence, but no formal action was taken)

Redeckera

Tricispora (insufficient evidence, but no formal action was taken)

Sacculosporaceae

Sacculospora (insufficient evidence, but no formal action was taken)

Paraglomerales

Paraglomeraceae

Paraglomus

Archaeosporales

Geosiphonaceae

Geosiphon

Ambisporaceae

Ambispora

Archaeosporaceae

Archaeospora (including the former *Intraspora*)

(Tomado de <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>)

El phylum *Glomeromycota* incluye una sola clase, los *Glomeromycetes* y cuatro órdenes: *Glomerales*, *Diversisporales*, *Paraglomerales* y *Archaesporales* (Figura 5B). Un aspecto clave de esta nueva clasificación es que el género *Glomus* sp., antes clasificado en base a criterios morfológicos y estructurales, se ha escindido en al menos tres grupos distintos: *Glomus* A, B y C. Los dos primeros grupos están englobados en el orden *Glomerales*, mientras que *Glomus* C pertenece a los *Diversisporales*. La especie *Glomus intraradices*, utilizada en este trabajo de tesis pertenece al Grupo A (Schüßler *et al.*, 2001). Esta especie ha sido recientemente renombrada como *G. irregulare* y luego como *Rhizophagus irregularis* Błaszk., Wubet, Renker & Buscot C. Walker & A. Schüßler comb. nov. (Stockinger *et al.*, 2009).

Ciclo de vida de los Hongos Micorrícicos Arbusculares

Los hongos de este phylum son considerados generalmente como simbioses obligados (Schüßler and Walker, 2010) por lo que no son capaces de crecer en ausencia de una planta hospedera (Azcon-Aguilar and Barea, 1996); necesitan colonizar la raíz de una planta susceptible de formar micorrizas para completar su ciclo de vida. Vierheilig y Bago (2005) sugieren la existencia de distintas fase durante la interacción entre las plantas y los HMA. Entre ellas tenemos:

- Fase asimbiótica, cuando el hongo germina y crece en ausencia de señales de la planta.
- Fase pre-simbiótica, cuando el hongo germina y crece en presencia de señales (exudados).
- Fase simbiótica, cuando el hongo ha penetrado en la raíz, dando lugar a estructuras intraradicales típicas (arbúsculos).

El ciclo de vida se inicia con la germinación de las esporas, la cual se evidencia por la formación de uno o varios tubos de germinación. El micelio que se produce luego de la germinación, es decir a partir del tubo germinativo, alcanza un desarrollo limitado en ausencia de una planta hospedadora. Pero, en presencia de raíces capaces de ser micorrizadas o de los exudados que estas producen, el micelio alcanza un mayor desarrollo, aumentando especialmente su grado de ramificación (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Tamasloukht *et al.*, 2003), con lo que aumentan sus posibilidades de contacto con la raíz (Giovannetti *et al.*, 1993). Cuando una hifa contacta con la superficie de la raíz, se adhiere a ella y forma un apresorio, estructura de pre-colonización a partir de la cual, dos o

tres días después, se iniciará la penetración en la raíz de la planta (Giovannetti *et al.*, 1993; Jolicoeur *et al.*, 1998). El proceso y la tasa de colonización determinan la efectividad de un HMA.

Al mismo tiempo que la infección se esparce dentro de las células corticales de la raíz, un micelio de hifas extraradicales crece afuera, hacia el suelo. Este micelio extraradical cumple un papel fundamental en la incorporación de nutrientes y forma una fuente de colonización secundaria a lo largo de las raíces y entre ellas (Harley and Smith, 1983; Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988; Smith *et al.*, 1992). Normalmente, se forman esporas a partir del micelio externo, y también en algunos casos, se forman en el interior de la raíz a partir del micelio interno. Las esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo colapsan tras una permanencia en el suelo de 2 a 4 semanas si no encuentran una raíz hospedadora (Bolan and Abbott, 1983). La espora tiene la capacidad de germinar varias veces, y de hecho, lo hará cada vez que encuentre las condiciones favorables (Bago *et al.*, 1998; Azcon-Aguilar *et al.*, 1999).

4. El estrés oxidativo como mecanismo de mitigación del estrés biótico en la simbiosis HMA-soja

La generación de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) es un hecho inevitable en la vida en aerobiosis. Las EROs se producen normalmente a partir de procesos fisiológicos básicos, como fotosíntesis, respiración, fotorrespiración y lignificación. Cuando hablamos de EROs, hacemos referencia tanto a los radicales libres del oxígeno [como son el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) y el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$ -)], así como a otras moléculas que no son radicales, [como el oxígeno singulete y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)]. El término también incluye al óxido nítrico (ON), una molécula de señalización importante en animales y plantas (Halliwell *et al.*, 1999).

Bajo condiciones fisiológicas normales, una serie de complejos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos son capaces de eliminar de manera equilibrada la producción de EROs (Tabla 2). Pero cuando el equilibrio entre la producción y la capacidad de detoxificación se rompe, es decir, cuando la generación de EROs supera la capacidad de los sistemas antioxidantes ocurre lo que se conoce como “estrés oxidativo”. Las EROs producidas pueden reaccionar con casi todos los componentes celulares, dañando lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Bailey-Serres and Mittler, 2006; Halliwell and Gutteridge, 2007; del Río and Puppo, 2009; Sies, 2014).

Tabla 2: Principales antioxidantes de las plantas

Enzimático	No-enzimático o de bajo peso molecular
Catalasa	Glutation (GSH)
Superoxido dismutasa (SOD)	Ácido ascórbico (vitamina C)
Enzimas del ciclo ascorbato-glutation	Tocoferoles (vitamina E)
Peroxidasas	Polifenoles (flavonoides)
NADP-dehidrogenasas	
Peroxiredoxina (Prx)	

Entre los factores de estrés capaces de producir daños por acumulación de EROs se encuentran las infecciones fúngicas, bacterianas y virales y la sequía, entre muchas otras tales como la alta irradiación, hiperoxia, anoxia, deficiencia mineral, bajas y altas temperaturas, herbicidas redox-cíclicos (paraquat, diquat), contaminantes atmosféricos (SO₂, NO₂, ozono) y metales pesados. Existen muchas fuentes de EROs que pueden ser activadas dentro de una especie vegetal, en diferentes situaciones en función del tipo de estrés (Bolwell *et al.*, 2002; Lamb and Dixon, 1997). Una variedad de sistemas de enzimas han sido implicados en la generación de EROs tras el reconocimiento de patógenos, entre ellas, la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Bedard *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2007; Grant *et al.*, 2000), SOD (Auh y Murphy, 1995; Deepak *et al.*, 2006), oxalato oxidasas (Hu *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2006), peroxidasas (Bindschedler *et al.*, 2006; Bolwell *et al.*, 2002), lipoxigenasas (Babitha *et al.*, 2004) y las amino oxidasas (Allan y Fluhr 1997; Cona *et al.*, 2006; Walters 2003). La generación de EROs es una de las respuestas más tempranas al ataque de un patógeno; a menudo, es la primera respuesta que se activa en las interacciones incompatibles. La acumulación excesiva de estos compuestos durante las primeras horas de la infección se conoce como “estallido oxidativo”. La interacción planta-patógeno activa una NADPH-oxidasa del plasmalema, que produce superóxido; a partir de éste, espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (SOD), se puede formar peróxido de hidrógeno. El H₂O₂ juega un papel central en la respuesta hipersensible. Se ha visto que: (1) interviene en el reforzamiento de la pared celular impidiendo de esta manera que el patógeno avance por las células vecinas, quedando atrapado en las células destinadas a la muerte celular programada; (2) Actúa como disparador de la muerte de las células en problema, y (3) es

capaz de difundir entre las células e inducir genes de defensa de la planta (Tenhaken *et al.*, 1995; Daub *et al.*, 2013).

Está ampliamente aceptado que las EROs no solo participan de procesos perjudiciales para la célula, sino que juegan un importante papel en la señalización de las plantas. En los últimos años se ha prestado especial interés al estudio de las señales redox como parte de la respuesta de las plantas a los cambios del entorno. Esto introduce un nuevo concepto, el de “señalización oxidativa” o “señalización redox” (Foyer and Noctor, 2005).

Se ha reportado que la interacción planta-microorganismos benéficos del suelo permite a las primeras incrementar la tolerancia a diferentes condiciones limitantes del crecimiento y de la producción (Ruiz-Lozano *et al.*, 1996; Freire-Cruz *et al.*, 2000). La interacción entre las plantas y micorrizas o las bacterias fijadoras de nitrógeno deben evocar una respuesta rápida de modo de establecer enlaces que faciliten el beneficio mutuo. Se ha visto que las raíces micorrizadas acumulan EROs y enzimas hidrolíticas (como quitinasas y glucanasas). Esta acumulación de compuestos fue asociado tanto al establecimiento y control de la simbiosis, como a la protección de la planta (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000). También se ha sugerido que la producción de EROs en raíces micorrizadas incluyó aumento de jasmonatos durante la fase tardía de la simbiosis (Hause *et al.*, 2002) y la inducción de diversas enzimas antioxidantes sobre la micorrización (Arines *et al.*, 1994; Blilou *et al.*, 2000; Lambais *et al.*, 2003).

5. La respuesta inmune de las plantas

La percepción de las señales del ambiente y la habilidad para responder de manera acorde son esenciales para que los organismos puedan sobrevivir. Si bien las plantas carecen de células especializadas para defenderse de potenciales organismos patógenos, son capaces de reconocer moléculas de origen microbiano a través de proteínas receptoras (PRR: del inglés pattern-recognition receptors). Este reconocimiento conduce a la activación de un nivel basal de resistencia a las enfermedades. La aparición de estas reacciones de inmunidad local a menudo desencadena una resistencia sistémica adquirida (SAR) en los tejidos distantes del sitio de reconocimiento de la infección. Muchos microorganismos benéficos que están presentes en la rizosfera estimulan una resistencia sistémica inducida (ISR) que es fenotípicamente similar y que, como SAR, es eficaz para un amplio espectro de patógenos (Pieterse and Van Wees, 2015). Las vías de señalización

de la resistencia inducida que son desencadenadas por patógenos, microorganismos beneficiosos, e insectos se superponen parcialmente y comparten componentes de señalización comunes (Pieterse *et al.*, 2014). Esto le proporciona a las plantas un enorme potencial de regulación para adaptarse rápidamente a su entorno biótico y utilizar sus limitados recursos para el crecimiento y la supervivencia de una manera más eficiente.

Resistencia sistémica adquirida (SAR) inducida por patógeno

El término SAR fue definido por primera vez por Ross (1961) para describir el fenómeno de resistencia sistémica en partes no infectadas de la planta como respuesta a una infección previa. SAR se desencadena luego del reconocimiento tanto de efectores como de patrones moleculares patogénicos (Shah and Zeier, 2013). En los tejidos sistémicos, SAR se caracteriza tanto por incrementar los niveles de ácido salicílico (SA) (Vlot *et al.*, 2009), como de activar de manera coordinada genes relacionados con la patogénesis. Muchos de estos genes codifican proteínas PR con actividad antimicrobiana (Van Loon *et al.*, 2006).

Una vez que SAR se activó, la señal de SA es traducida por la proteína reguladora redox NPR-1, que funciona como un co-activador de la transcripción de un gran complejo de genes PR (Fu and Dong, 2013). Con la acumulación de SA, ocurren cambios en el estado redox celular que permiten que NPR-1 se transloque al núcleo. Una vez en el núcleo, NPR-1 interactúa con factores de transcripción TGA que, junto con los factores de transcripción WRKY activan genes PR.

Resistencia sistémica inducida (ISR) por microorganismos benéficos

Además de los microorganismos patógenos, también hay grandes comunidades de microorganismos comensales y mutualistas que interactúan con las plantas proporcionándoles mejor nutrición mineral, fijación de nitrógeno, promoción del crecimiento y protección contra patógenos (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Zamioudis and Pieterse, 2012; Pieterse *et al.*, 2014). Estas comunidades de microbios se asocian al sistema radicular, y forman parte de la rizosfera. Numerosos estudios han demostrado que la colonización de las raíces por cepas seleccionadas de rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) puede estimular el sistema inmune en las partes aéreas de las plantas, dando como resultado resistencia a un amplio espectro de patógenos. A este tipo de resistencia se la denominó resistencia sistémica inducida por rizobacterias (Van Peer *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991; Alström, 1991). Desde entonces, cientos de estudios en mono y dicotiledóneas han informado la habilidad de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs: plant growth-promoting rhizobacteria) de promover la salud de las plantas

a través de ISR. Estos estudios involucran mayormente cepas PGPR de *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Serratia*. Además, cepas no patogénicas de hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF) han demostrado activar ISR. Entre ellas podemos nombrar *Trichoderma* spp., *Piriformospora indica*, y los hongos micorrícicos arbusculares (Pieterse *et al.*, 2014).

Para estimular ISR, los microorganismos benéficos producen elicitores que son los responsables de iniciar la inmunidad sistémica. Algunos elicitores microbianos de ISR incluyen antibióticos, como 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) y piocianina, flagelos, N-acil homoserina lactonas, sideróforos y biosurfactantes (De Vleeschauwer and Höfte, 2009). También se ha demostrado que algunos compuestos orgánicos volátiles pueden actuar como elicitores (Ryu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012).

Inicialmente se creía que la resistencia inducida por organismos benéficos compartía la misma mecánica con la resistencia producida por patógenos (SAR). Sin embargo, se comprobó que el desarrollo de ISR no producía acumulación de proteínas PR (que son características de SAR) (Hoffland *et al.*, 1995; Pieterse *et al.*, 1996). Evidencias genéticas demostraron que ISR puede ser mediada por vías de señalización independientes de SA (Pieterse *et al.*, 1996). Por lo tanto, ISR y SAR son reguladas por diferentes vías de señalización. Sin embargo, se ha reportado que ciertas cepas de microorganismos benéficos son capaces de desencadenar ISR por la vía dependiente de SA, de la misma manera que ocurre con organismos patógenos (De Vleeschauwer and Höfte, 2009; Van de Mortel *et al.*, 2012). En este caso, las especies reactivas de oxígeno que se acumulan en el sitio de colonización actuarían como elicitores (De Vleeschauwer and Höfte, 2009).

En muchos casos, la colonización de la raíz por microorganismos benéficos no provoca grandes cambios en la expresión de genes relacionados con la defensa en las partes aéreas de la planta. Pero, si se comparan plantas controles con plantas expresando ISR, la infección posterior con patógenos a menudo conduce a la expresión acelerada de genes relacionados con la defensa en aquellas plantas que expresan ISR (VanWees *et al.*, 1999; Van Oosten *et al.*, 2008). Esta preparación de toda la planta para combatir mejor al organismo patógeno se conoce como “priming”, y se caracteriza por una activación más rápida y/o más fuerte de la defensa celular a la invasión (Conrath, 2011).

Resistencia inducida por micorrizas (MIR)

Muchos son los beneficios atribuidos a la colonización de las plantas por HMA, principalmente la captación de nutrientes (Smith and Read, 2008) y la competencia en la

rizosfera. Los HMA son capaces de suprimir enfermedades y pestes a través de la inducción de un sistema de resistencia (Jung *et al.*, 2012; Pineda *et al.*, 2010). Esta resistencia inducida por micorrizas (MIR) comparte características tanto con la SAR inducida por patógeno como con la ISR inducida por rizobacterias. La resistencia inducida por micorrizas ha sido asociada con la SAR por el sensibilizado de genes dependientes de SA, pero a menudo coincide con el sensibilizado de la defensa dependiente de ácido jasmónico y la defensa de la pared celular. Se han asociado altas concentraciones de JA endógeno a raíces de plantas micorrizadas. Este incremento de JA ocurre cuando la simbiosis micorrícica está bien establecida (Hause *et al.*, 2002), y podría ser la responsable de la resistencia mediada por HMA. Al igual que en la interacción entre *Rhizobium*-leguminosas, se ha visto que los HMA suprimen parcialmente la respuesta de defensa dependiente de SA para establecer una interacción compatible. En este sentido, Pozo y Azcon-Aguilar (2007) han propuesto que cuando la micorrización es funcional, hay una supresión parcial de la respuesta dependiente de SA en la planta, que se compensa con la activación de la respuesta regulada con JA. Basados en estos resultados es que este tipo de resistencia (MIR) se ha sugerido que es similar a ISR que incluye la señalización de jasmonato y el fenómeno de “priming” (Pozo and Azcon-Aguilar, 2007; Jung *et al.*, 2012). En este sentido, se ha visto que MIR confiere protección contra un amplio rango de atacantes, incluyendo patógenos biótrofos, necrótrofos, nematodos, y artrópodos herbívoros. Muchos de los estudios de protección mediada por micorrizas, que muestran reducción de la incidencia y/o severidad a enfermedades han sido compilados por Whipps (2004).

BIBLIOGRAFÍA

- Allan, A. C., & Fluhr, R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The Plant Cell*, 9(9), 1559-1572.
- Alström, S. (1991). Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 37(6), 495-501.
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Scandiani, M. M. (2005). Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, 46(3), 162-183.
- Aoki, T., Scandiani, M. M., & O'Donnell, K. (2012). Phenotypic, molecular phylogenetic, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassistipitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. *Mycoscience*, 53(3), 167-186.
- Arines, J., Quintela, M., Vilariño, A., & Palma, J. M. (1994). Protein patterns and superoxide dismutase activity in non-mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal *Pisum sativum* L. plants. *Plant and Soil*, 166(1), 37-45.
- Auh, C. K., & Murphy, T. M. (1995). Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂-and H₂O₂ by Phytophthora elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiology*, 107(4), 1241-1247.
- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens—an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6(6), 457-464.
- Azcón-Aguilar, C., Bago, B., & Barea, J. M. (1999). Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 391–407
- Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega, M. C., & Calvet, C. (2002) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens; In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds). *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhäuser, Switzerland, pp 187–197.
- Babitha, M. P., Prakash, H. S., & Shetty, H. S. (2004). Purification and properties of lipoxygenase induced in downy mildew resistant pearl millet seedlings due to infection with *Sclerospora graminicola*. *Plant Science*, 166(1), 31-39.
- Bedard, K., Lardy, B., & Krause, K. H. (2007). NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie*, 89(9), 1107-1112.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., & Piché, Y. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 375-388.
- Bailey-Serres, J., & Mittler, R. (2006). The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*, 141(2), 311-311.

- Bindschedler, L. V., Dewdney, J., Blee, K. A., Stone, J. M., Asai, T., Plotnikov, J., *et al.* (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, 47(6), 851-863.
- Blilou, I., Bueno, P., Ocampo, J. A., & García-Garrido, J. M. (2000). Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological Research*, 104(06), 722-725.
- Bolan, N. S., & Abbott, L. K. (1983). Seasonal variation in infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to plant response to applied phosphorus. *Soil Research*, 21(2), 207-210.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., *et al.* (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1367-1376.
- Brar, H. K., Swaminathan, S., Bhattacharyya, M. K. (2011) The *Fusarium virguliforme* toxin FvTox1 causes foliar sudden death syndrome-like symptoms in soybean. *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 24(10):1179–88.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Carter, C., Healy, R., O'Tool, N. M., Naqvi, S. M. S., Ren, G., Park, S., *et al.* (2007). Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganisms. *Plant Physiology*, 143(1), 389-399.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., & Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11(2), 80-88.
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16(10), 524-531.
- Costamilan, L. M. (2000) Estresses ocasionados por doenças e por nematóides. Estresses em soja. E. Rizzo Bonato, ed. EMBRAPA Trigo. 145-200.
- Daub, M. E., Herrero, S., & Chung, K. R. (2013). Reactive oxygen species in plant pathogenesis: the role of perylenequinone photosensitizers. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(9), 970-989.
- del Río, L. A., & Puppo, A. (2009). Reactive oxygen species in plant signaling. Berlin: Springer.
- De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2009). Rhizobacteria-induced systemic resistance. *Advances in Botanical Research*, 51, 223-281
- Deepak, S. A., Ishii, H., & Park, P. (2006). Acibenzolar-Smethyl primes cell wall strengthening genes and reactive oxygen species forming/scavenging enzymes in cucumber after fungal pathogen attack. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(1), 52-61.
- Distéfano, S., Gadban, L. (2006) Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2005 – 2006. Informe de actualización técnica n° 3. EEA Marcos Juárez INTA:13-18.

- Dumas-Gaudot E., Gollotte A., Cordier C., Gianinazzi S. & Gianinazzi-Pearson V. (2000). Modulation of host defence systems. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Academic Publishers. 173-200.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1056-1071.
- Freire-Cruz, A., Ishii, T., Kadoya, K. (2000) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potential, and levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress conditions. *Mycorrhiza* 10(3), 121-123.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 839-863.
- Gamper, H. A., Walker, C., & Schüßler, A. (2009). *Diversispora celata* sp. nov: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 182(2), 495-506.
- Gao, X., Hartman, G., & Niblack, T. (2006) Early infection of soybean roots by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Phytopathology*, 96(6), S38.
- Gao, X., Jackson, T. A., Hartman, G. L., & Niblack, T. L. (2006). Interactions between the soybean cyst nematode and *Fusarium solani* f. sp. *glycines* based on greenhouse factorial experiments. *Phytopathology*, 96(12), 1409-1415.
- Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B., & Gianinazzi, S. (1989). *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*, 7(3), 243-255.
- Giovannetti, M., Avio, L., Sbrana, C., & Citernesi, A.S. (1993) Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytologist*, 115-122.
- Gongora-Canul, C., Nutter Jr, F. W., & Leandro, L. F. S. (2012). Temporal dynamics of root and foliar severity of soybean sudden death syndrome at different inoculum densities. *European Journal of Plant Pathology*, 132(1), 71-79.
- Gongora-Canul, C.C., & Leandro, L.F.S. (2011a). Plant age affects root infection and development of foliar symptoms of soybean sudden death syndrome. *Plant Disease*, 95(3), 242-247.
- Gongora-Canul, C.C., & Leandro, L.F.S. (2011b). Effect of soil temperature and plant age at time of inoculation on progress of root rot and foliar symptoms of soybean sudden death syndrome. *Plant Disease*, 95(4), 436-440.
- Grant, J. J., Yun, B.-W., & Loake, G. J. (2000). Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: Identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *The Plant Journal*, 24(5), 569-582.
- Gray, L. E., Achenbach, L. A., Duff, R. J., & Lightfoot, D. (1999) Pathogenicity of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* isolates on soybean and green bean plants. *Journal of Phytopathology*, 147(5), 281-284.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (Vol. 3, pp. 1-543). Oxford: Oxford university press.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2007). Reactive species can pose special problems needing special solutions: some examples. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 392-394.
- Harley, J. L., & Smith, S. E. (1985). *Mycorrhizal symbiosis*. London, etc.: Academic Press 483pp. Review by B. Mosse in: *J. exp. Bot*, 36, 1019. Ch. textbk, General article Review article, Mycorrhiza.
- Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R., & Strack, D. (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology*, 130(3), 1213-1220.
- Hirrel, M. C. (1983). Sudden death syndrome of soybean: A disease of unknown etiology. (Abstr.) *Phytopathology* 73(3), 501-502.
- Hoffland, E., Pieterse, C. M. J., Bik, L., & Van Pelt, J. A. (1995). Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46(4), 309-320.
- Hu, X., Bidney, D. L., Yalpani, N., Duvick, J. P., & Crasta, O. (2003). Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*, 133(1), 170-181.
- Huang, Y. H., Hartman, G. L. (1998). Reaction of selected soybean genotypes to isolates of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and their culture filtrates. *Plant Disease*, 82(9), 999-1002.
- Hymowitz, T., Newell, C. (1980). Taxonomy, speciation, domestication, dissemination, germplasm resources and variation in the genus *Glycine*. *Advances in Legume Research*. R Summerfield y A Bunting. Kew, United Kingdom, Royal Bot. Gardens: 251-264.
- Información N° 94. Tomo XI, Soja.
- INTA (1997). *El cultivo de la soja en Argentina*. San Juan, EDITAR.
- Ishii, T., Kirino, S., & Kadoya, K. (2000). Sustainable citriculture using vesiculararbuscular mycorrhizal fungi: Introduction of new soil management techniques. In *Proc. Int. Soc. Citriculture* (pp. 1026-1029).
- Ivancovich, A., Botta, G., & Annone, J. (1992). Síndrome de la muerte repentina en cultivos de soja en el área de la EEA Pergamino, Carpeta de Producción Vegetal.
- Jin, H., Hartman, G. L., Nickell, C. D., & Widholm, J. M. (1996a) Phytotoxicity of culture filtrates from *Fusarium solani*, the causal agent of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*; 80(8), 922-7.
- Jin, H., Hartman, G. L., Nickell, C. D., & Widholm, J. M. (1996b). Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Phytopathology*, 86(3), 277-282.
- Jolicoeur, M., Germette, S., Gaudette, M., Perrier, M., & Bécard, G. (1998). Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi a symbiotic physiological marker. *Plant Physiology*, 116(4), 1279-1288
- Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 651-664.

- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., & Schüßler, A. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from *phylum* to species level. *New Phytologist*, 193(4), 970-984.
- Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), 251-275.
- Lambais, M. R., Ríos-Ruiz, W. F., Andrade, R. M. (2003). Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 160(2), 421-428.
- Leandro, L. F., Tatalovic, N., & Luckew, A. (2013). Soybean sudden death syndrome—advances in knowledge and disease management. *Plant Sciences Reviews* 2012, 215.
- Lee B, Farag MA, Park HB, Kloepper JW, Lee SH, *et al.* (2012). Induced Resistance by a Long-Chain Bacterial Volatile: Elicitation of Plant Systemic Defense by a C13 Volatile Produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS ONE* 7(11), e48744. doi: 10.1371/journal.pone.0048744
- Li, S., Hartman, G. L., & Chen, Y. (2009). Evaluation of aggressiveness of *Fusarium virguliforme* isolates that cause soybean sudden death syndrome. *Journal of Plant Pathology*, 77-86.
- Lozovaya, V. V., Lygin, A. V., Zernova, O. V., Li, S., Widholm, J. M., & Hartman, G. L. (2006). Lignin degradation by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease*, 90(1), 77-82.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Luo, Y., Myers, O., Lightfoot, D. A., & Schmidt, M. E. (1999). Root colonization of soybean cultivars in the field by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease*; 83(12):1155–9.
- Melgar, J., Roy, K. W., & Abney, T. S. (1994). Sudden death syndrome of soybean: etiology, symptomatology, and effects of irrigation and *Heterodera glycines* on incidence and severity under field conditions. *Canadian Journal of Botany*, 72(11), 1647-1653. Doi: 10.1139/b94-202.
- Morton, J. B., & Benny, G. L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an amendment of *Glomaceae*. *Mycotaxon* XXXVII:471–91.
- Morton, J. B., Franke, M., & Bentivenga, S. P. (1998). Developmental foundations for morphological diversity among endomycorrhizal fungi in *Glomales* (*Zygomycetes*) In: Varma, A., Hock, B. (eds). *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology* (2nd edn.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Morton, J. B., & Redecker, D. (2001). Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, 181-195.
- Nakajima, T., Mitsueda, T., & Charchar, M. D. A. (1996). First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. *JARQ, Japan Agricultural Research Quarterly*, 30(1), 31-34.

- Navi, S. S., & Yang, X. B. (2008). Foliar symptom expression in association with early infection and xylem colonization by *Fusarium virguliforme* (formerly *F. solani f. sp. glycines*), the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Health Progress* doi, 10.1094/PHP-2008-0222-01-RS.
- Nicholson, T. H. (1967). Vesicular-arbuscular mycorrhiza a universal plant symbiosis. *Science Progress*, 55, 561-81.
- Nickell, D., & Widholm, J. M. (1996). Phytotoxicity of Culture Filtrate from *Fusarium solani*, the Causal Agent of Sudden Death Syndrome of Soybean. *Plant Disease*, 80(8).
- Njiti, V. N., Suttner, R. J., Gray, L. E., Gibson, P. T., & Lightfoot, D. A. (1997) Rate reducing resistance to *Fusarium solani f. sp. phaseoli* underlies field resistance to soybean sudden death syndrome. *Crop Science*, 37(1), 132-138.
- O'Donnell, K., Sink, S., Scandiani, M. M., Luque, A., Colletto, A., Biasoli, M., Lenzi, L., Salas, G., González, V., Ploper, L. D., Formento, N., Pioli, R. N., Aoki, T., Yang, X. B., & Sarver, B. A. (2010). Soybean sudden death syndrome species diversity within North and South America revealed by multilocus genotyping. *Phytopathology*, 100(1), 58-71.
- Pieterse, C. M., & Van Wees, S. C. (2015). Induced disease resistance. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 123-133). Springer International Publishing.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., & Van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, 8(8), 1225-1237.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375.
- Pineda, A., Zheng, S. J., van Loon, J. J., Pieterse, C. M., & Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science*, 15(9), 507-514.
- Ploper, D. (1993). Síndrome de la muerte súbita: Nueva enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial*, 13(54), 5-9.
- Ploper, L.; Chavarría, A.; Zarzosa, I.; Díaz, C., & Ramallo, J. (1995). Efectos del sistema de labranza, la rotación de cultivos, y la fertilización fosforada sobre las principales enfermedades de la soja en Tucumán, Argentina. *RIAT* 72(1-2), 87-98.
- Ploper, L. D. (1999). Management of economically important diseases of soybean in Argentina. Pág. 269-280 in: *Proceedings of the World Soybean Research Conference VI. Chicago, II-USA*. 746pp
- Ploper, L. D., Yoriniri, J. T., & Morel Paiva, W. (2003). Importancia de las enfermedades de la soja en el Mercosur. *Simposio Internacional sobre Soja XI Congreso de AAPRESID*. Rosario, Argentina. 163-174.
- Pozo, M. J., & Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 393-398.

- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S. L., Morton, J. B., & Walker, C. (2013). An evidence based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza*, 23(7), 515-531.
- Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14(3), 340-358.
- Roy, K. W. (1997). *Fusarium solani* on Soybean Roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. *Plant Disease* 81(3), 259-266.
- Roy, K. W., Lawrence, G. W., Hodges, H. H., McLean, K. S., & Killebrew, J. F. (1989). Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant and relation of Heterodera glycines to disease severity. *Phytopathology*, 79(2), 191-197.
- Roy, K. W., Rupe, J. C., Hershman, D. E., Abney, T. S. (1997). Sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, 81(10), 1100-1111.
- Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6), 309-317.
- Ruiz-Lozano, J. M., Azcon R., & Palma J. M. (1996). Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytologist*, 134(2), 327-333.
- Rupe, J. (1989a). Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. *Plant Disease* 73: (7) 581-584.
- Rupe, J. (1989b). Epidemiology of sudden death syndrome of soybeans. in: Proc. World Soybean Conference IV. Buenos Aires, Argentina. A.J. Pascale, ed. Westview Press, Boulder, CO. 2085-2090.
- Rupe, J. (1991). Cultivar response to sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, 75(1), 47-50.
- Rupe, J. C., & Gbur, E. E. (1995). Effect of plant age, maturity group, and the environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, 79(2), 139-143.
- Rupe, J., & Hartman, G. (1999). Sudden Death Syndrome. *Compendium of Soybean Diseases*. 4^o Ed. APS Press. St. Paul, (MN), USA. 37-39. en: Scandiani, M.M., Wright, R., Luque, A., Leiva, M., Bottai, H., Ivancovich, J.J., Ruberti, D. T83 - Inoculación de *Fusarium virguliforme*, uno de los patógenos causante del síndrome de la muerte repentina de la soja, en condiciones de campo.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 134(3), 1017-1026.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal *phylum*, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological research*, 105(12), 1413-1421. doi:10.1017/S0953756201005196.
- Schüßler, A., & Walker, C. (2010). A species list with new families and new genera. Gloucester: vol. Published in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. ISBN: 978- 1466388048. Available: <http://www.amf-phylogeny.com>.

- Shah, J., & Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4, 30. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00030>
- Shanker, A., Mathew, J., & Varma, A. (1991). Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizae with Amaranthaceae in soils of the Indian semi-arid region. *Biology and Fertility of Soils*, 11(2), 140-144.
- Sies, H. (2014). Role of Metabolic H₂O₂ Generation redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 8735-8741.
- Smith, S. E., & Gianinazzi-Pearson, V. (1988). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 221-244.
- Smith, S. E., Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. New York: Academic Press. 800p.
- Stockinger, H., Walker, C., & Schuessler, A. (2009). *Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 183(4), 1176-1187.
- Tamasloukht, M. B., Séjalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Bécard, G., & Franken, P. (2003). Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant physiology*, 131(3), 1468-1478.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L. F., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4158-4163.
- Tester, M., Smith, S. E., & Smith, F. A. (1987). The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Canadian journal of botany*, 65(3), 419-431.
- van de Mortel, J. E., de Vos, R. C., Dekkers, E., Pineda, A., Guillod, L., Bouwmeester, K., ... & Raaijmakers, J. M. (2012). Metabolic and transcriptomic changes induced in *Arabidopsis* by the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SS101. *Plant Physiology*, pp-112.
- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135-162.
- Van Oosten, V. R., Bodenhausen, N., Reymond, P., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., Dicke, M., & Pieterse, C. M. (2008). Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7), 919-930.
- Van Peer, R., Niemann, G. J., & Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, 81(7), 728-734.
- Van Wees, S. C., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41(4), 537-549.

- Varma, A. (1998). Mycorrhizae, the friendly fungi: what we know, what should we know and how do we know? In: Varma A (ed) Mycorrhiza manual. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1-24.
- Vierheilig, H., & Bago, B. (2005). Host and Non-Host Impact on the Physiology of the AM Symbiosis. *In Vitro Culture of Mycorrhizas Soil Biology*. Volume 4, pp 139-158. Doi: 10.1007/3-540-27331-X_8.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177-206
- Walker, C., Vestberg, M., Demircik, F., Stockinger, H., Saito, M., Sawaki, H., *et. al.* & Schüßler, A. (2007). Molecular phylogeny and new taxa in the *Archaeosporales* (*Glomeromycota*): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research*, 111(2), 137-153.
- Walker, C. (2008). *Ambispora* and *Ambisporaceae* resurrected. *Mycological Research* 112: 297-298.
- Walters, D. R. (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64(1), 97-107.
- Wei, G., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81(11), 1508-1512.
- Whipps, J. M., 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82(8), 1198-1227.
- Yang, X. B., & Navi, S. S. (2003). Fungal colonization in phloem/xylem tissues of taproots in relation to foliar symptoms expression of soybean sudden death syndrome. *Phytopathology* 93:S92.
- Yorinori, J.T. (1999). Situação atual das enfermidades de soja na Bolívia, Brasil e Paraguai. *Resúmenes Mercosoja* 99. Rosario 40-43.
- Yorinori, J. T. (2002). Situação atual das doenças potenciais no cone sul. *Anais do Congresso Brasileiro de Soja*, 3.; *Congresso Brasileiro de Soja e Mercosoja*, 2, 171–186.
- Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 139-150.
- Zimmermann, G., Baumlein, H., Mock, H. P., Himmelbach, A., & Schweizer, P. (2006). The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiology*, 142(1), 181-192.

OBJETIVO GENERAL

Comprobar el posible efecto atenuador de las micorrizas sobre el patosistema soja/*F. virguliforme* y analizar sus posibles mecanismos.

HIPÓTESIS GENERAL

Los Hongos Micorrícicos Arbusculares ejercen un rol protector en plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) frente al ataque del hongo patógeno *Fusarium virguliforme*, uno de los agentes causales del síndrome de la muerte súbita.

Capítulo 1

Análisis in vivo del efecto de los hongos micorrizicos arbusculares en plantas de soja inoculadas con F. virguliforme: caracterización del estrés oxidativo y la defensa antioxidante

Sistema Soja / Hongos Micorrizicos Arbusculares / Fusarium virguliforme

Condiciones de invernadero

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Muerte súbita (SMS) es una importante enfermedad que afecta al cultivo de soja, cuyo grado de pérdidas en el rendimiento depende de las condiciones del ambiente, de la severidad y del momento de desarrollo en el que se encuentre la planta durante la infección.

Las tendencias actuales hacia una agricultura sustentable involucran tanto cambios en las prácticas de manejo, así como la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Los microorganismos benéficos mejoran el estado general de las plantas porque pueden, directa o indirectamente, disminuir los factores de estrés (Pozo *et al.*, 2015).

Entre las interacciones benéficas entre plantas y microorganismos del suelo, la simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) es la más extendida en la naturaleza. El carácter mutualista de esta simbiosis supone que ambos simbiosntes resulten beneficiados en esta relación, lo que generalmente se traduce como un mejor estado nutricional para ambos. Se ha reportado que la presencia de HMA en las raíces de sus hospedantes, reducen la incidencia de enfermedades causadas por patógenos del suelo (Azcón-Aguilar y Barea, 1996).

La mayoría de los estudios de protección mediada por micorrizas reportan reducción de la incidencia y/o severidad de enfermedades transmitidas por el suelo principalmente pudrición de la raíz o marchitamiento causado por hongos (como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, o *Verticillium*) y pudrición de la raíz causada por oomicetos (incluyendo *Phytophthora*, *Pythium* y *Aphanomyces*). En la revisión hecha por Whipps (2004), se mencionaron trece especies de *Glomales* y siete especies de hongos ectomicorrícicos capaces de controlar patógenos fúngicos (*Fusarium moniliforme* Sheldon, *Fusarium oxysporum* Schlecht.: Fr., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten, y *Phytophthora species*). Por su parte, las conclusiones del trabajo de tesis doctoral de Bressano (2012) mostraron que la inoculación con *Glomus intraradices* en soja atenuó la patogenicidad de *M. phaseolina*. Tal efecto, fue acompañado por una regulación diferencial de las enzimas del complejo antioxidante, con la consecuente disminución del daño oxidativo.

La interacción específica entre las micorrizas y *F. virguliforme* en soja ha sido poco estudiada. Entre la escasa información se encuentra la generada por Zambolin y Schenck (1983). Ellos observaron que, aunque las plantas de soja micorrizadas con *Glomus mosseae*

no mostraron diferencias en la incidencia de infección por patógenos fúngicos en comparación con las plantas no micorrizadas, las plantas micorrizadas parecían tolerar mejor la infección. La presencia de micorrizas en combinación con *F. solani* aumentó el crecimiento de la soja en comparación con las plantas sin micorrizar e infectadas con *F. solani* solamente, sugiriendo que las micorrizas compensan el efecto deletéreo generado por el patógeno, aunque sin afectar la incidencia del mismo a nivel radicular. Estudios más recientes en plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) inoculadas con HMA o en combinación con *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceris (FOC), presentaron un menor índice de severidad de la enfermedad, sugiriendo que los HMA actúan como bioprotectores contra *Fusarium* (Shukla *et al.*, 2015).

Muchos son los mecanismos que se han propuesto para explicar cómo las micorrizas reducen la incidencia de enfermedades, y el estudio de estos mecanismos ha sido el objetivo central de muchas investigaciones. Se ha sugerido, por ejemplo, que el establecimiento del hongo en la corteza radical produce cambios fisiológicos en la planta, incluyendo cambios en la composición química de los exudados, que afectan directamente la comunidad microbiana en la rizósfera (Barea *et al.*, 2005; Hodge, 2000). Por lo tanto, la rizósfera de la planta micorrizada tiene características diferentes en comparación con una planta no micorrizada (Johansson *et al.*, 2004). Además, las interacciones directas e indirectas se han sugerido como mecanismos por los que los HMA puede reducir la abundancia de patógenos fúngicos en las raíces (Wehner *et al.*, 2010). Posiblemente, los patógenos y los HMA compiten por los mismos recursos, incluyendo el sitio de infección, el espacio y los fotosintatos dentro de la raíz (Whipps, 2004). También se ha propuesto que, la colonización por HMA influye en la arquitectura de la raíz de la planta huésped, produciendo raíces más gruesas y ramificadas. Estos cambios en la raíz, sumado a la activación de mecanismos de resistencia sistémica inducida (Sylvia y Chellemi, 2001; Whipps, 2004; Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Auge, 2001) han sido demostrados para muchas especies de micorrizas. En los últimos años, está recibiendo creciente interés, el estudio de la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante como mecanismos relacionados con las micorrizas y su capacidad para la mitigación del estrés. Cuando la planta se enfrenta a un organismo agresor, como respuesta temprana ocurre una “explosión oxidativa” caracterizada por la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Bolwell and Wojtaszek, 1997; Bolwell, 1999). Las principales EROs detectadas son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo. Un aumento de los niveles de EROs produce peroxidación de lípidos y destrucción de membranas,

inicio de reacciones en cadena, destrucción de pigmentos fotosintéticos, inactivación de enzimas, daños al ADN, y, en suma, una destrucción generalizada de todas las estructuras celulares (Apel and Hirt, 2004).

Las plantas, han desarrollado una dinámica red de defensa antioxidante, formada principalmente por superóxido dismutasas (SOD), ascorbato peroxidasas (APX), catalasas (CAT) y ácido ascórbico y glutatión (Niyogi, 1999). La mejora de la resistencia al estrés por HMA suele estar relacionada con la mejora de los niveles de actividad antioxidante (Wu *et al.*, 2006a, 2006b; Wu and Zou, 2009; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010; Baslam and Goicoechea, 2012).

Muchos estudios sugieren que la simbiosis con HMA ayuda a las plantas a superar el estrés por sequía mediante la mejora de las actividades de las enzimas antioxidantes, tales como SOD, peroxidasas y CAT (Ruiz-Lozano *et al.*, 1996; Wu and Zou, 2009).

En este capítulo se plantea analizar el efecto de las micorrizas en el sistema soja/*F. virguliforme*. Para esto se propone hacer una caracterización de los niveles de estrés oxidativo y defensa antioxidante en soja micorrizada y no micorrizada frente a la invasión de *F. virguliforme*, y evaluar dicha interacción en condiciones de riego continuo y de sequía. Ambas condiciones fueron comparadas dado que, la humedad del suelo tiene un importante rol en la ocurrencia y severidad del SMS (Scherer *et al.*, 1996), se han visto síntomas foliares más severos en campos regados y durante estaciones húmedas, cuando los suelos están saturados (Melgar *et al.*, 1994; Neto *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 1989). Leandro y col. (2013) sugieren que ningún factor climático por sí solo determina el desarrollo de la enfermedad y que la siembra en suelos fríos puede no ser problemática si el resto de la temporada de cultivo permanece en sequía. Los años con menores precipitaciones durante la época de crecimiento del cultivo no favorecen el desarrollo de la enfermedad.

Finalmente, en este capítulo de tesis doctoral también nos enfocaremos en analizar la mejora nutricional y la capacidad de mitigar el estrés hídrico en la planta como mecanismos de protección contra *F. virguliforme*, dado que también se ha propuesto, y que se conoce que los HMA mejoran el estado nutricional de las plantas hospedantes (Smith and Read, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Se utilizaron semillas de soja (*Glycine max* cv Don Mario 4800), las que fueron esterilizadas superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio 1%, durante 30 segundos y colocadas en algodón y papel de filtro a 25°C para su germinación. Tres días después, fueron transferidas a macetas conteniendo sustrato estéril. Se usó como sustrato una mezcla de suelo, perlita, vermiculita y arena (1:1:1:1). Las plantas fueron mantenidas en invernadero a 20-25°C, bajo condiciones controladas de luz (16 hs luz/8 hs oscuridad). Las características del suelo utilizado fueron las siguientes: pH de 6.46, % materia orgánica, 7.94; N total, 0.659%; P, 84.1 (ppm); capacidad de intercambio catiónico (meq/100 gr) K⁺, 2.1; C orgánico, 4.61%.

Se plantearon los siguientes tratamientos de inoculación de plantas de soja

1. Control (C): plantas sanas sin micorrizar
2. *Fusarium virguliforme* (Fv): plantas inoculadas con *F. virguliforme*.
3. *Rhizophagus irregularis* (Ri): plantas micorrizadas con *R. irregularis*
4. *R. irregularis* y *Fusarium virguliforme* (RiFv): Plantas micorrizadas e inoculadas con *F. virguliforme*.

Se realizó un ensayo de 3 meses, en condiciones controladas de invernadero, con el fin de obtener un ensayo de infección con *Fusarium virguliforme*, de larga duración.

Material biológico: La inoculación de las plantas con Fv se realizó por medio de granos de sorgo colonizados por el hongo en condiciones controladas (Scandiani *et al.*, 2004). Para ello, los granos de sorgo fueron distribuidos en recipientes de 500 ml con 150 ml de agua destilada y se autoclavaron a 121°C durante 60 min en dos días consecutivos. Una vez enfriado, se sembraron 5 tacos de agar papa con micelio fúngico de Fv. Los recipientes se incubaron a 25°C durante 15 días hasta completar la colonización del sustrato.

Los granos de sorgo infectados fueron distribuidos en el sustrato, dentro de cada maceta, con una concentración de 6×10^6 macroconidios/gr. Los mismos se determinaron por medio del conteo de esporas mediante cámara de Neubauer.

R. irregularis fue multiplicado en macetas conteniendo *Trifolium repens*, bajo condiciones controladas de invernadero. Se utilizó como inoculo micorrícico 2 gr de raíces de *Trifolium repens* micorrizadas al 50%, 150 gr de suelo conteniendo esporas de Ri,

micelio y fragmentos de raíces colonizadas, las cuales fueron colocadas al momento de la siembra a las macetas Ri y RiFv.

Con el fin de proveer las poblaciones microbianas que acompañan el inóculo micorrícico, las plantas no micorrizadas (Control y Fv) recibieron una alícuota del líquido resultante de sumergir una porción de raíces micorrizadas en agua destilada estéril. Posteriormente, esta solución fue filtrada para eliminar los propágulos fúngicos dejando pasar el resto de la microflora. Las plantas no micorrizadas recibieron, además, la misma cantidad de raíces de *T. repens* que las plantas micorrizadas, pero luego de someterlas a un ciclo de esterilización mediante autoclave.

Luego de la siembra de las semillas de soja pre-germinadas, todas las macetas fueron regadas con agua destilada hasta saturación. Se dejaron escurrir 24 horas y posteriormente se midió el peso total, representando el peso de capacidad de campo. A la mitad de las plantas se les restringió el riego desde el inicio y el resto fueron regadas regularmente (ver Anexo III.1, manejo del riego). De esta manera se lograron 8 tratamientos:

1. Plantas sanas sin micorrizar (C H), riego continuo.
2. Plantas infectadas con *Fusarium virguliforme*, riego continuo (Fv H).
3. Plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis*, riego continuo (Ri H).
4. Plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e infectadas con *Fusarium virguliforme*, riego continuo (RiFv H).
5. Plantas sanas sin micorrizar (C S), régimen de sequía.
6. Plantas infectadas con *Fusarium virguliforme*, régimen de sequía (Fv S).
7. Plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis*, régimen de sequía (Ri S).
8. Plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e infectadas con *Fusarium virguliforme*, régimen de sequía (RiFv S).

Por cada maceta fueron colocadas 2 plantas, de las cuales una de ellas se cosechó completa en el primer muestreo a las 4 semanas pos siembra, y la segunda planta se cosechó completa en el 2° muestreo a las 12 semanas. Los datos de peso fresco (PF), peso seco (PS) y superficie foliar, como así también, daño oxidativo y defensa antioxidante fueron evaluados en la primer hoja trifoliada. Los datos de cinco réplicas, de los 8 tratamientos fueron sujetos a análisis de la varianza mediante INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2008) seguidas por el test LSD Fisher (Fisher, 1936).

Evaluación de caracteres de crecimiento: En cada muestreo se evaluaron comparativamente longitud de raíz y de tallo, peso seco y peso fresco de raíz, tallo y hoja. La relación raíz/tallo fue utilizada como indicadora del nivel de nutrición vegetal (Asimi *et al.*, 1980). Esta relación es interpretada como los gramos de raíz que sustentan 1 gramo de parte aérea, y por lo tanto, menores relaciones raíz/tallo son generalmente asociadas a una mejor nutrición vegetal y generalmente ligados con la colonización por HMA (Asimi *et al.*, 1980; Khalil *et al.*, 1999).

El porcentaje de micorrización fue estimado de acuerdo al método “Gridline intersect method” (Giovannetti and Mosse, 1980) luego de la tinción de las raíces mediante el protocolo de Phillips y Hayman (1970) (Anexo III.2 y 3).

Evaluación de los síntomas causados por F. virguliforme: Se observaron los niveles de necrosis de raíz de plantas infectadas con Fv en presencia o no de micorrizas (Fv, RiFv). El daño fue evaluado siguiendo la escala de severidad definida por Roy *et al.* (1989). Estos autores establecen las siguientes tasas de severidad: 0 = sin necrosis, 1 = leve necrosis, 2 = necrosis moderada, 3 = necrosis extensa, 4 = necrosis muy grave.

Evaluación de daño oxidativo y defensa antioxidante: Para la estimación del daño oxidativo se calcularon los peróxidos de lípidos medidos como malondialdehído (MDA), de acuerdo a Heath y Packer (1968) y Hodges *et al.* (1999) (Ver Anexo III.4). Se determinaron las actividades enzimáticas como se detalla en el Anexo 5 y luego se llevaron a cabo las siguientes técnicas: para el contenido de proteínas la técnica descrita por Bradford (1976) (ver Anexo III.6), para determinar las actividades enzimáticas: SOD (EC 1.15.1.1) de acuerdo a Beauchamp y Fridovich (1971) (ver Anexo III.7); CAT (EC 1.11.1.6) de acuerdo a Aebi (1984) (Anexo III.8) y APX (EC 1.11.1.11) siguiendo a Nakano and Asada (1981) (Anexo III.9). Además se realizaron geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 11% de acuerdo a Davis (1962) (detalles en Anexo III.10), para revelar la actividad de la enzima SOD, tal como lo describió originalmente Beauchamp y Fridovich (1971) (Anexo III.11). Las isoenzimas SOD fueron identificadas de acuerdo a Sandalio *et al.* (1987) por ensayos de inhibición específica (Anexo III.11). La actividad APX fue revelada de acuerdo al método de Mittler y Zilinskas (1993) (Anexo III.12). Para obtener una medida de la actividad enzimática, se calcularon las áreas de las bandas obtenidas para cada tratamiento. En cada gel se midió además, un control positivo de la enzima analizada. Se usó el programa JImage (Rasband). Los datos de áreas se expresaron como unidades de enzima/mg proteína.

Para cada enzima se realizaron 3 repeticiones y los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) mediante INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2008) seguidas por el test LSD Fisher (Fisher, 1936).

RESULTADOS

En general, las plantas bajo riego continuo mostraron mayor porcentaje de micorrización comparadas con las mantenidas en sequía. Este efecto se mantuvo a lo largo del tiempo (Tabla 3). Bajo condiciones de sequía, se pudo observar que solo hubo diferencias significativas entre los tratamientos a las 12 semanas. En esta condición, el porcentaje de micorrización disminuyó afectado por la presencia de *F. virguliforme* (RiFv).

Tabla 3: Porcentaje de micorrización a las 4 y 12 semanas de tratamiento.

	4 Semanas		12 Semanas	
	Ri	RiFv	Ri	RiFv
Riego continuo	9,39 a	5,11 a	70,19 a	66,25 a
Sequía	5,23 a	4,82 a	53,51 b	31,35 a

Ri: plantas micorrizadas con *R. irregularis*, **RiFv:** plantas micorrizadas con *R. irregularis* e infectadas con *F. virguliforme*. LSD Fisher Alfa=0,05. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuando se evaluaron los niveles de necrosis de raíz, tanto en condiciones de riego continuo como de sequía, la infección con *F. virguliforme* causó niveles leves de necrosis: Tasa de gravedad 1, sin observarse, diferencias entre los tratamientos con y sin micorrizas.

La inoculación con *F. virguliforme* aumentó la relación raíz/tallo con respecto al control (Fv H: 2.79) (Tabla 4). Cuando comparamos las plantas inoculadas con *F. virguliforme* bajo condiciones de riego continuo con las mantenidas en sequía, a las 4 semanas (Tabla 4), las plantas que mostraron mayor relación raíz/tallo fueron aquellas que se mantuvieron bajo riego continuo. A las 12 semanas (T2), la presencia de *F. virguliforme* siguió incrementando la relación raíz/tallo en condiciones de riego continuo (Fv H: 3.19), mostrando una disminución en la eficiencia radicular a largo tiempo Tanto a las 4 como a las 12 semanas, las plantas micorrizadas (Ri) mantenidas bajo riego continuo y/o en sequía, mostraron una menor relación raíz/tallo, comparado con las plantas controles.

Por su parte en el tratamiento RiFv, cuando se compararon los resultados luego de 4 semanas de tratamiento tanto bajo riego continuo como en sequía, se pudo observar que la presencia de micorrizas mejoró el estado general de las plantas de soja, ya que disminuyó la relación raíz/tallo, sugiriendo un efecto mitigador en ambas condiciones. Sin embargo, a

las 12 semanas las diferencias no fueron significativas si se comparan las plantas RiFv con Fv, pero si se vio una tendencia a disminuir la relación raíz/tallo bajo condiciones de sequía. En condiciones de riego continuo, la presencia de HMA no logró mitigar el efecto Fv.

Tabla 4: Evaluación de parámetros de crecimiento de plantas de soja de 4 y 12 semanas de tratamiento, tanto en condiciones de riego continuo como en sequía.

	4 semanas				12 semanas				
	Raíz/Tallo		CRA (%)		Raíz/Tallo		CRA (%)	N° de Brotes post sequía	PF Hojas de rebrote (mg)
	riego	sequía	riego	sequía	riego	sequía	riego	sequía	sequía
C	1,52 b	0,44 a	93,18 a	92,81 a	2,49 a	7,49 a	82,43 a	5,25 a	235,00 a
Fv	2,79 c	1,29 b	96,36 a	91,6 a	3,19 a	6,3 a	84,02 a	9,25 b	573,33 ab
Ri	0,78 a	0,44 a	91,43 a	95,2 a	2,3 a	5,05 a	88,35 b	8,75 b	982,00 b
RiFv	1,11 ab	0,52 a	93,74 a	96,86 a	3,17 a	5,56 a	84,62 a	9,25 b	917,50 ab

C: Control, **Fv:** plantas inoculadas con *Fusarium virguliforme*, **Ri:** inoculadas con *Rhizophagus irregularis* **RiFv:** inoculadas con ambos (*Rhizophagus/Fusarium*). Los valores corresponden a la media de 5 plantas. LSD Fisher Alfa=0,05. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). CRA: Contenido relativo de agua.

A las 4 semanas de tratamiento, si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas en el Contenido Relativo de Agua (CRA) en hojas, las plantas inoculadas con Fv mantuvieron el contenido hídrico similar a C bajo condiciones de sequía (Tabla 4). Por el contrario, las plantas micorrizadas (Ri) y mantenidas en régimen de sequía, presentaron un porcentaje de agua superior a C. Este comportamiento se mantuvo en las plantas micorrizadas e inoculadas con Fv (RiFv), y además se observó un mayor contenido hídrico en RiFv sequía, comparado con Fv en sequía y sin micorrizar (Tabla 4). Sin embargo, bajo condiciones de riego continuo esta tendencia no se mantuvo.

A las 12 semanas de tratamiento, en condiciones de riego continuo, Fv no afectó el contenido de agua con respecto al control. Y tal efecto se mantuvo en las plantas RiFv. El CRA aumentó y solo mostró diferencias significativas en las plantas micorrizadas con Ri. Tal efecto se correlacionó con una mejor relación raíz/tallo (2,3).

Cuando se calculó el número de brotes luego de la recuperación de las plantas, las plantas inoculadas con Fv mostraron significativamente mayor número de brotes respecto al control. No se observaron diferencias entre los tratamientos con patógeno solo y en presencia de micorriza y Fv. Sin embargo, si se comparan los tratamientos de plantas no

micorrizadas con las micorrizadas, la presencia de HMA estimuló un mayor número de brotes nuevos. Para tener una idea del contenido hídrico a las 12 semanas, se calculó el peso fresco (mg) de las hojas rebrotadas. Los resultados mostraron que la presencia del patógeno no afectó de manera significativa el peso fresco de las hojas rebrotadas. Sin embargo, si se comparan las plantas micorrizadas con las no micorrizadas se vio un aumento en presencia de HMA, observándose una tendencia al incremento del peso fresco de hoja cuando la planta estuvo micorrizada e infectada con Fv.

Enzimas antioxidantes del estrés oxidativo

Luego de 4 semanas de tratamiento, se evaluó el contenido de MDA como una medida del daño oxidativo. Bajo condiciones de riego continuo, se vio diferencia significativa entre los tratamientos (con un p-valor de 0,0341), observándose un claro efecto patógeno (p-valor: 0,0111) (Figura 6). En este sentido, las plantas inoculadas con Fv mostraron un significativo aumento de este parámetro con respecto al control sin inocular. Si bien no hubo un efecto micorrícico (p-valor: 0,4781), la inoculación con HMA mostró una tendencia a disminuir el contenido de MDA.

Cuando analizamos el daño oxidativo en sequía (Figura 7), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, con un p-valor de 0,0261, donde la presencia de Fv provocó un marcado aumento del MDA. Sin embargo, las plantas micorrizadas (RiFv) mantuvieron estos valores inferiores a las plantas sin micorrizar (Fv). Se vio un claro efecto micorriza (p-valor: 0,0007). El tratamiento con Fv incrementó en un 160% el daño oxidativo en riego en comparación con el control, mientras que este efecto fue menor en sequía (54%). El agregado de micorrizas a Fv mitigó en un 27% en riego y en sequía un 65%.

Luego de 12 semanas post emergencia, no se observaron diferencias significativas para MDA (los datos se muestran en el Anexo I, Tabla 1 al final del capítulo).

MDA- 4 semanas Riego Continuo

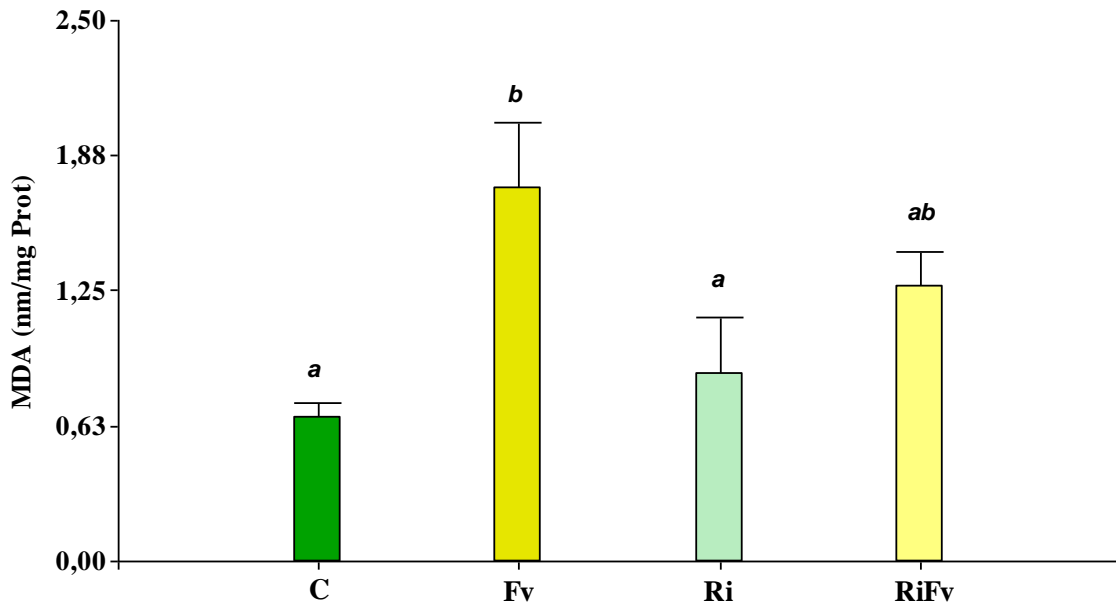


Figura 6: Daño oxidativo a lípidos medido como MDA (nm/mg proteína). Datos correspondientes a los tratamientos mantenidos 4 semanas bajo riego continuo. C: plantas control, Fv: inoculadas con *Fusarium virguliforme*, Ri: inoculadas con *Rhizophagus irregularis* RiFv: inoculadas con ambos (*Rhizophagus/Fusarium*). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba T (α : 0.05).

MDA - 4 semanas Sequía

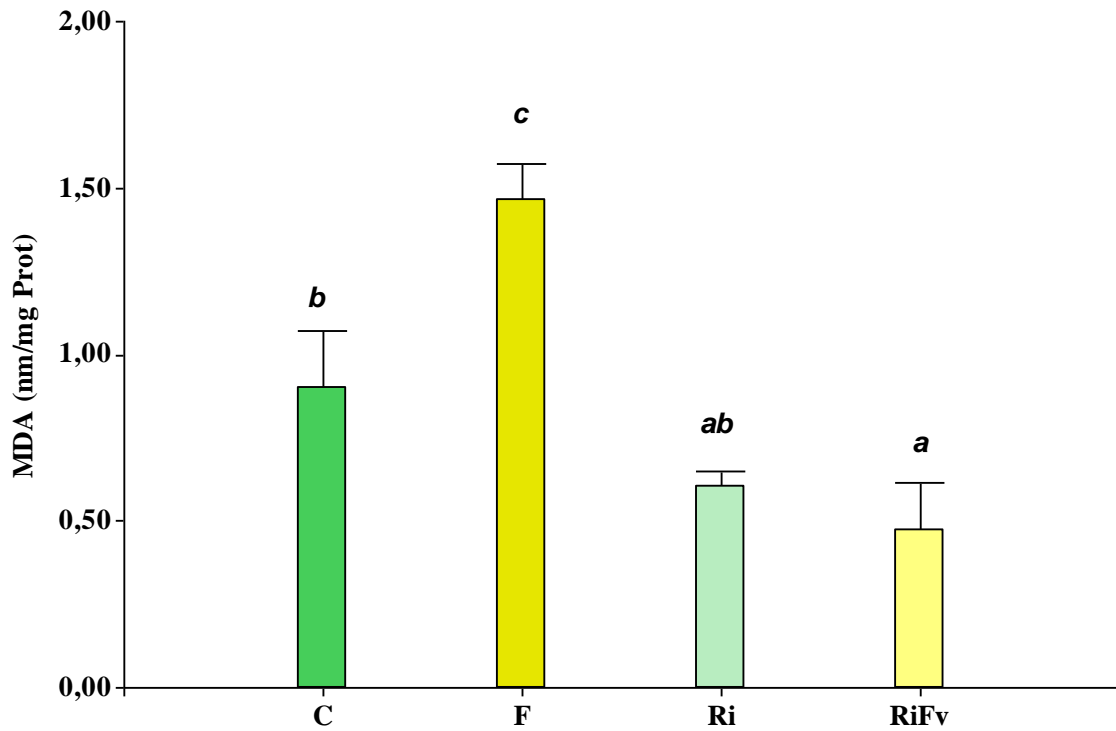


Figura 7: Daño oxidativo a lípidos medido como MDA (nm/mg proteínas). Datos obtenidos en los tratamientos mantenidos 4 semanas bajo condiciones de sequía. **C:** plantas control, **Fv:** inoculadas con *Fusarium virguliforme*, **Ri:** inoculadas con *Rhizophagus irregularis* **RiFv:** inoculadas con ambos (*Rhizophagus/Fusarium*). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba T (α : 0.05).

Al evaluar la actividad enzimática, a las 4 semanas de riego continuo, se pudo observar que las plantas con Fv presentaban disminuida la actividad total SOD un 46% con respecto al control (p- valor: 0,0433) mientras que tal efecto fue revertido por el agregado de Ri en el tratamiento RiFv (Figura 8). Este efecto también se observó bajo condiciones de sequía (p-valor: 0,0429) (Figura 9), en donde la actividad SOD disminuyó un 31% respecto a C.

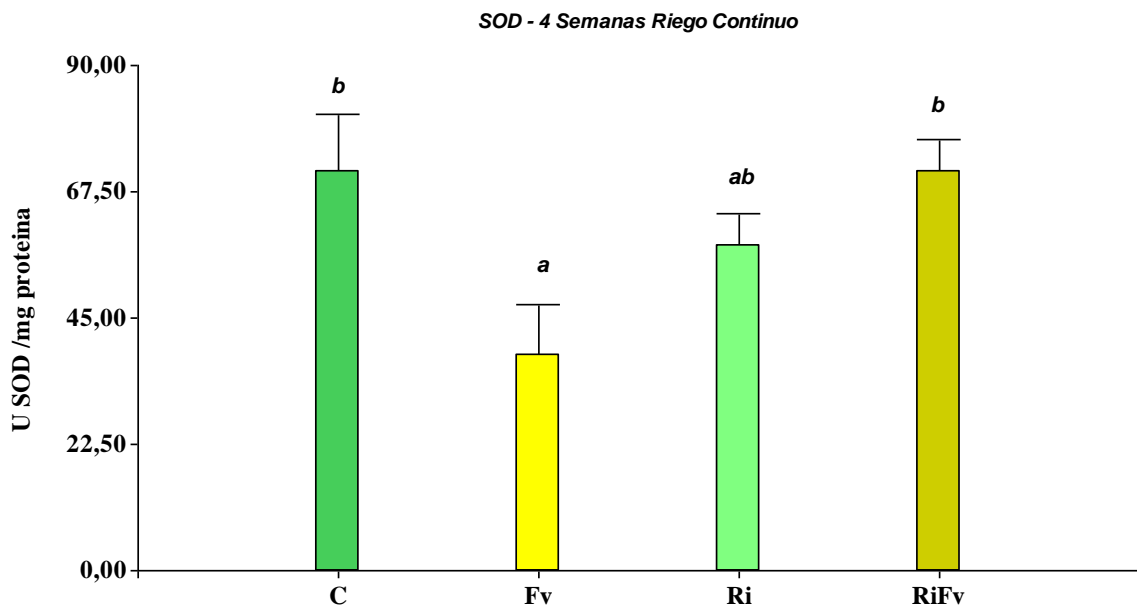


Figura 8: Actividad total SOD (Unidades SOD /mg proteína) en condiciones de riego continuo a las 4 semanas (expresada en unidades de SOD por mg de proteínas) C: plantas control, Fv: inoculadas con *Fusarium virguliforme*, Ri: inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e RiFv: inoculadas con ambos (*Rhizophagus /Fusarium*). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba T (α : 0.05).

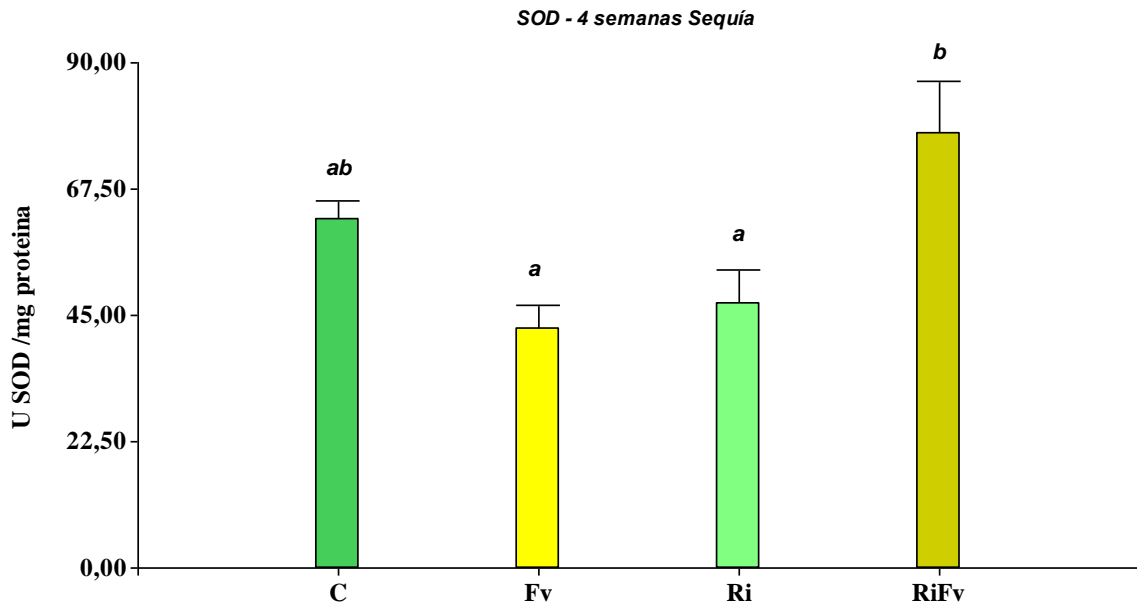


Figura 9: Actividad total SOD (Unidades SOD /mg proteína) luego de 4 semanas bajo condiciones de sequía (expresada en unidades de SOD por mg de proteínas) C: plantas control, Fv: inoculadas con *Fusarium virguliforme*, Ri: inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e RiFv: inoculadas con ambos (*Rhizophagus /Fusarium*). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba T (α : 0.05).

Cuando se evaluó la actividad total CAT a las 4 semanas de tratamiento, en condición de riego continuo, el tratamiento con Fv mostró una tendencia a disminuir la actividad enzimática (un 24% menos actividad), aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con el control.

Por el contrario, esta disminución fue significativa en RiFv, que mostró casi un 40% menos de actividad si se la compara con Ri. El tratamiento Ri mantuvo la actividad CAT similar a C (Figura 10). La actividad CAT no mostró diferencias significativas para los tratamientos mantenidos bajo condiciones de sequía (datos mostrados en el Anexo I, Tabla 3).

Tampoco mostró diferencias la actividad APX en condiciones de riego continuo (Anexo I, Tabla 2). La actividad enzimática APX solo mostró diferencias significativas para los tratamientos sometidos a un período de sequía, en donde se vio aumentada significativamente en RiFv (Figura 11). En este sentido, la actividad APX en RiFv fue 200% superior al C.

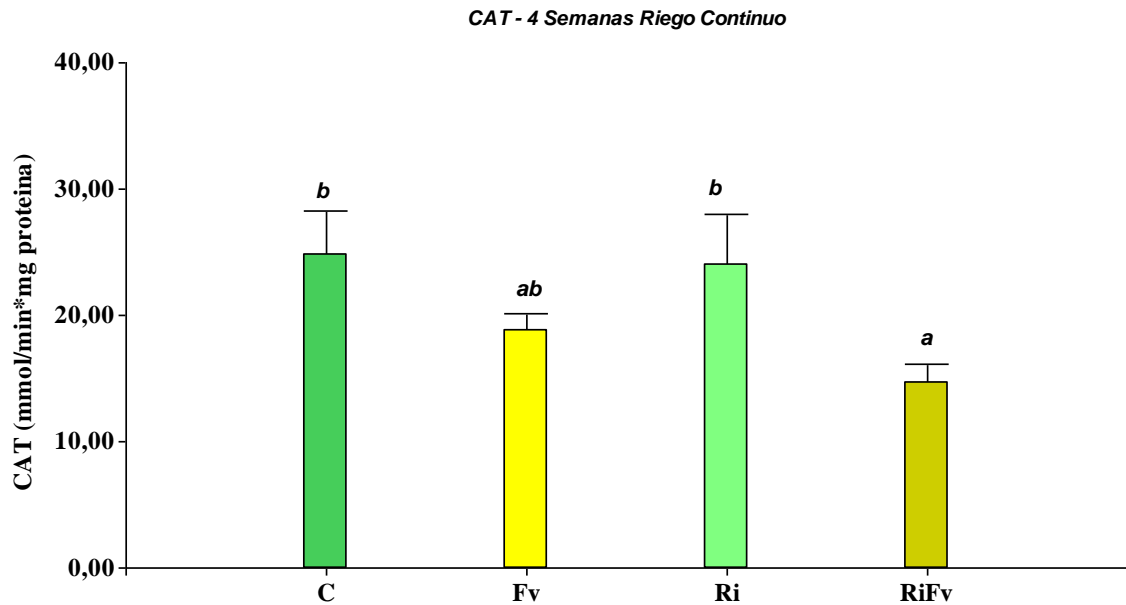


Figura 10: Actividad CAT (mmol/min*mg proteína) luego de 4 semanas bajo riego continuo (CC). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba T (α : 0.05). **C:** plantas control, **Fv:** inoculadas con *Fusarium virguliforme*, **Ri:** inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e **RiFv:** inoculadas con ambos (*Rhizophagus /Fusarium*).

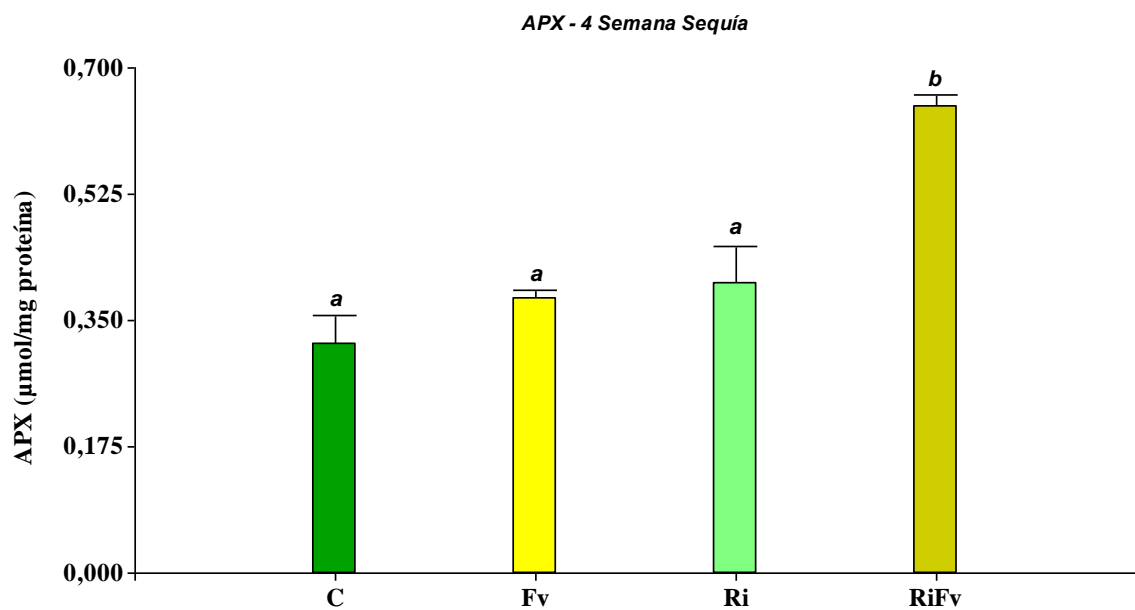


Figura 11: Actividad APX (µmol/mg proteína) luego de 4 semanas bajo condiciones de sequía. **C:** plantas control, **Fv:** inoculadas con *Fusarium virguliforme*, **Ri:** inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e **RiFv:** inoculadas con ambos (*Rhizophagus /Fusarium*). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba T (α : 0.05).

A tiempos más largos (12 semanas), se observó un aumento significativo de la actividad SOD en las plantas RiFv bajo condiciones de riego continuo. Para el resto de los tratamientos la actividad se mantuvo igual a los controles (Figura 12A). En regímenes de sequía, la actividad SOD no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, (Figura 13A).

La identificación de las diferentes isoformas se muestra en la Figura 12C. Los geles de actividad revelaron una marcada disminución de la MnSOD y de la FeSOD en presencia de Fv, en condiciones de riego continuo (Figura 12B). Sin embargo, en presencia de micorrizas (Ri y RiFv) se observa una recuperación de estas mismas isoformas, con un marcado aumento de la intensidad en general.

En condiciones de sequía, la presencia del patógeno disminuyó las formas MnSOD y FeSOD. Cuando las plantas fueron micorrizadas, se vio una recuperación de estas formas, aunque en menor intensidad que el resto de las isoformas SOD (Figura 13B).

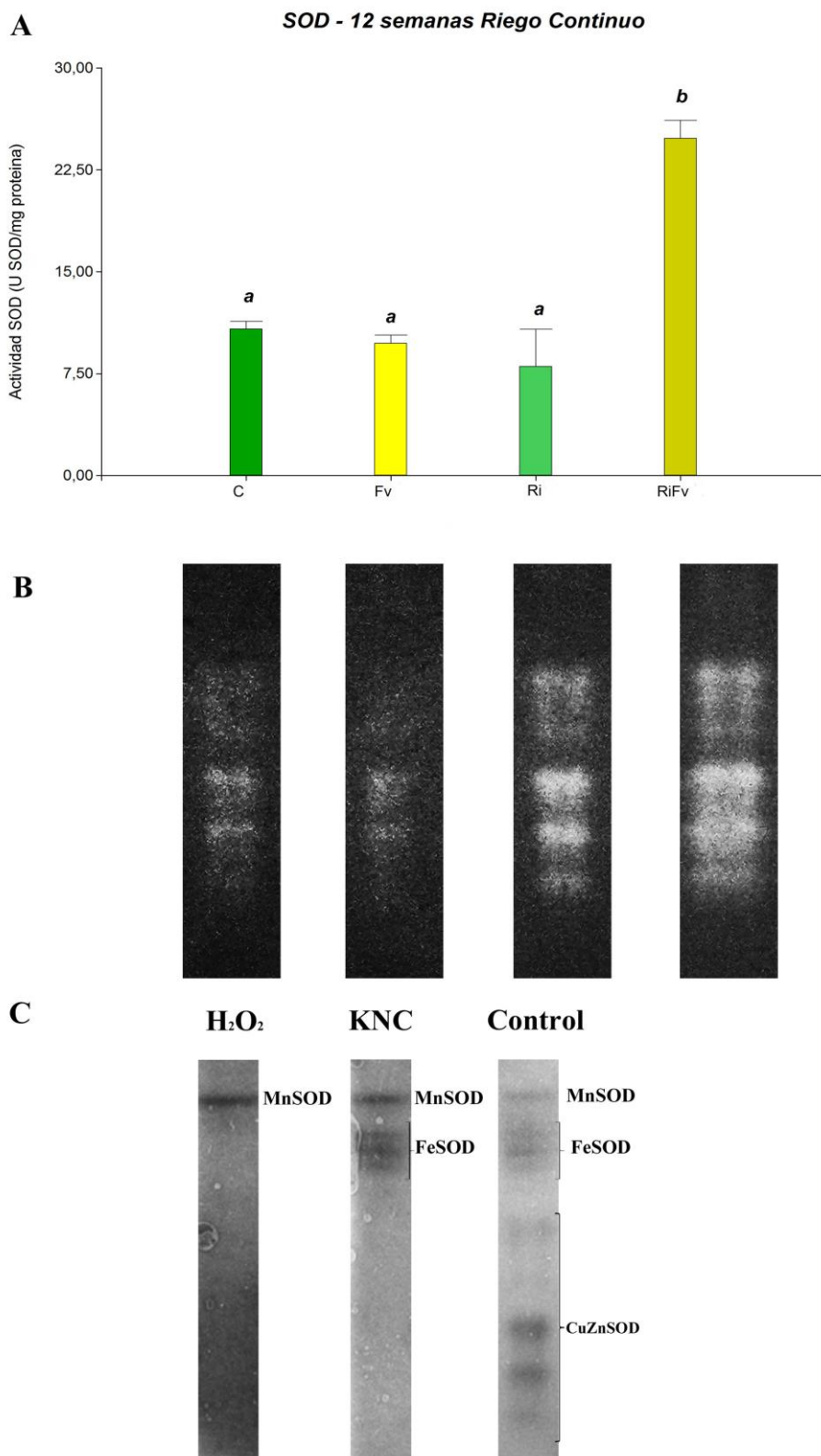


Figura 12: Actividad SOD a las 12 semanas de tratamiento bajo condiciones de riego continuo. **A:** Actividad SOD expresada como actividad medida en geles no desnaturizantes (unidades SOD/mg proteínas). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba T (α : 0.05). **B:** Geles de actividad SOD representativos del segundo muestreo. Los tratamientos fueron: C: Controles, inoculadas con *Fusarium virguliforme* (Fv), inoculadas con

Ri: inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e RiFv: inoculadas con ambos (*Rhizophagus* /*Fusarium*). **C:** Gel de inhibición para la enzima SOD. Se sembraron 70 µg de proteínas en cada calle. En el primer gel se puede ver la isoforma MnSOD que no es inhibida por H₂O₂ (5 mM). En el segundo gel se observan las isoformas FeSOD y MnSOD, las cuales no son inhibidas por KNC (2 mM). Finalmente, en el tercer gel, las formas CuZnSOD, FeSOD y MnSOD.

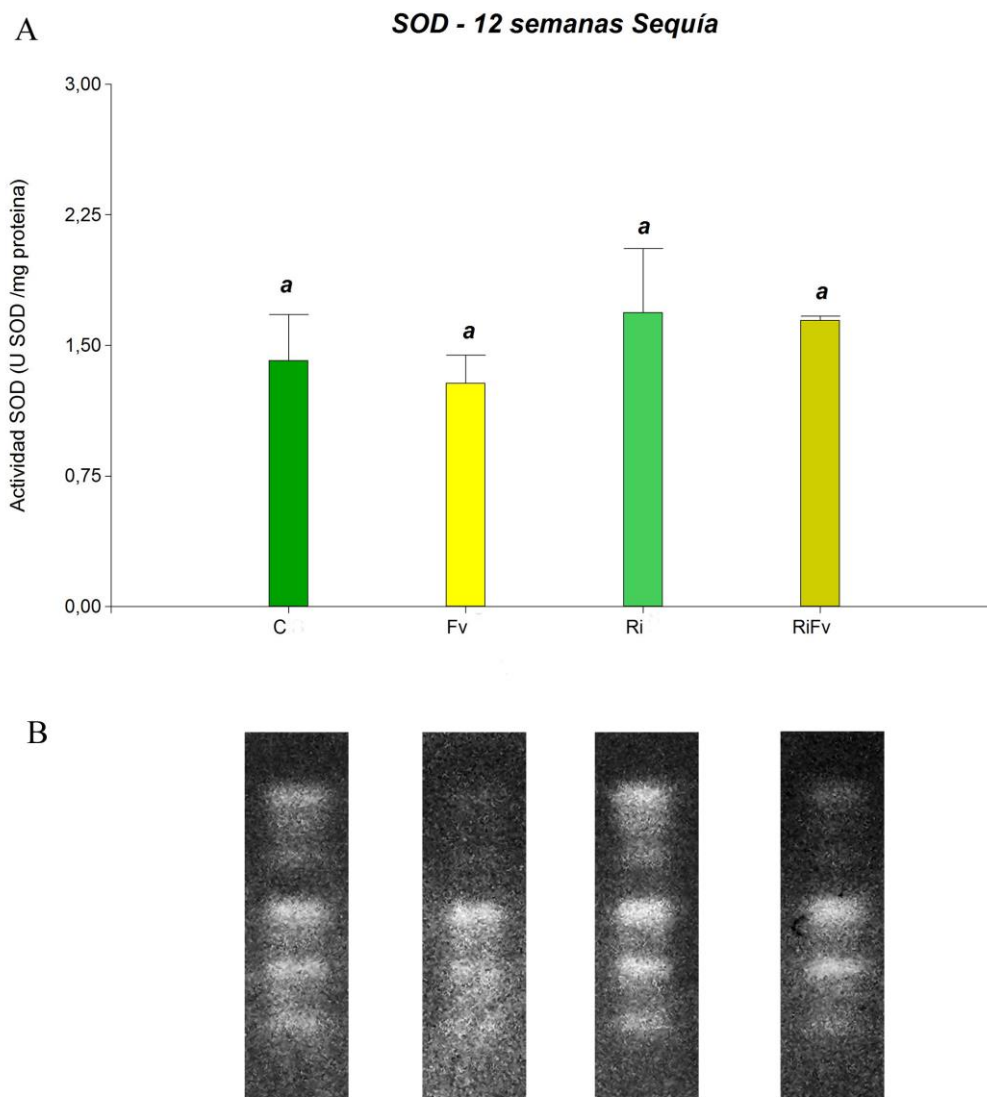


Figura 13: Actividad SOD a las 12 semanas de tratamiento bajo condiciones de sequía. **A:** las actividad enzimática SOD es expresada como actividad medida en geles no desnaturizantes (U SOD/mg proteínas). **B:** Geles de actividad SOD. Los tratamientos fueron: C: controles, Fv: inoculadas con *Fusarium virguliforme*, inoculadas con Ri: inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e RiFv: inoculadas con ambos (*Rhizophagus* /*Fusarium*). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba T (α : 0.05).

La actividad CAT no mostró diferencias significativas para los tratamientos mantenidos bajo condiciones de sequía (datos no mostrados). A las 12 semanas, se midió

actividad CAT en geles no desnaturalizantes pero no se logró observar actividad en las muestras correspondientes a los diferentes tratamientos. Cuando se evaluó la actividad APX no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, tanto para los mantenidos en condiciones de riego continuo como los de sequía (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

La interacción específica entre las micorrizas y *F. virguliforme* en soja ha sido poco estudiada. Zambolin y Schenck (1983) observaron que, las plantas micorrizadas toleraban mejor la infección, evaluada como un mayor crecimiento. Estudios más recientes en plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) mostraron que los HMA actuaron como bioprotectores contra el patógeno (Shukla *et al.*, 2015). En esta tesis doctoral, se complementa la escasa información sobre esta triple interacción, presentando datos que involucren la mitigación del estrés oxidativo por HMA, como uno de los mecanismos relacionados con la regulación del daño causado por *F. virguliforme* en soja.

Los resultados mostraron que *F. virguliforme* no causó necrosis severa de la raíz. Si bien no se evaluó el porcentaje de patógeno en la raíz, si pudo observarse que, en presencia de *F. virguliforme* el porcentaje de micorrización disminuye. Esta tendencia se mantuvo en condiciones de sequía, que siempre mostró menor micorrización comparado con el riego continuo. En este sentido, algunos autores (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995) encontraron, que trabajando con diferentes cepas de *Glomus* en cultivos de lechuga, el estrés por sequía disminuyó el porcentaje de infección en *G. fasciculatum*, *G. caledonium*, y *G. occultum*, manteniéndose igual en *G. intraradices* e incrementando en *G. desertícola*, *G. etunicatum* y *G. mosseae*. Sin embargo, los autores no asociaron la capacidad colonizadora con los diferentes efectos protectores de los aislamientos de hongos micorrícicos.

En tal sentido, nuestros resultados mostraron que la micorrización permitió una mejor recuperación cuando las plantas de soja sufrieron un período de sequía prolongado, mostrando mayor número de brotes nuevos. Se ha demostrado que la simbiosis con HMA puede proteger a las plantas frente a efectos perjudiciales de déficit de agua (Auge, 2001, 2004; Ruiz-Lozano, 2003; Ruiz-Lozano *et al.*, 2008). Sin embargo, la presencia de *F. virguliforme* en ausencia de micorrizas no disminuyó el número de brotes nuevos, sugiriendo que el patógeno bajo condiciones de riego restringido no provocó daños mayores.

Cuanto más temprano se inicia la infección del patógeno, mayores son las pérdidas que ocasiona en el cultivo. (Scandiani, 2004). Además, la infección y el desarrollo de los síntomas de SMS dependen principalmente de factores ambientales, particularmente de la temperatura y la humedad. Se considera que los ambientes frescos, las estaciones húmedas, la compactación y la alta fertilidad del suelo favorecen al SMS. La relación raíz/tallo, o sea, los gramos de raíz que sustentan 1 gramo de parte aérea, son generalmente asociadas a una mejor nutrición vegetal (Asimi *et al.*, 1980). Si comparamos la relación raíz/tallo en el tratamiento inoculado con el patógeno en condiciones de riego continuo con el causado en condiciones de estrés por sequía, fue bajo riego continuo cuando *F. virguliforme* provocó mayor relación raíz/tallo de las plantas de soja. Esto posiblemente pudo deberse a que, en general, la enfermedad causada por *F. virguliforme* está asociada a condiciones óptimas para el crecimiento del cultivo, como la alta humedad edáfica y la alta fertilidad (Schermer and Yang, 1996). Los mecanismos por los cuales este síndrome (SMS) aparece más en condiciones de humedad no están claros, pero pueden estar asociados con la necesidad de altas tasas de transpiración para la translocación de las toxinas generadas por el patógeno a las hojas (Leandro, 2012).

Sin embargo, cuando las plantas estuvieron micorrizadas y en presencia de Fv, la relación raíz/tallo fue similar al control, tanto en condiciones de riego como en sequía. Esto nos sugiere que las micorrizas podrían estar atenuando el efecto generado por el patógeno, ya que generalmente la mejora nutricional está ligada a la colonización por HMA (Asimi *et al.*, 1980; Khalil *et al.*, 1999).

El estrés por sequía es considerado a nivel mundial como el factor más importante en limitar el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Boyer, 1982). Este tipo de estrés abiótico puede afectar el rendimiento a través de la disminución en la acumulación de materia seca y por los efectos negativos sobre el crecimiento celular, la expansión foliar y la fijación biológica de nitrógeno (N₂) que es especialmente vulnerable a las deficiencias de agua (Sinclair y Serraj, 1995; Serraj *et al.*, 1999). Los resultados mostraron que, si bien las plantas mantenidas bajo sequía presentaron menor porcentaje de micorrización en presencia del patógeno que las mantenidas bajo riego continuo, fue posible observar no solo una mitigación del daño causado por Fv, sino también un mejor estado hídrico en condiciones de sequía. Posiblemente esto pueda deberse a que las plantas micorrizadas tienen la capacidad de aumentar la absorción de agua (Bago *et al.*, 2000). Una forma de caracterizar el estado hídrico de una planta es a través del contenido relativo de agua (Turner, 1988). En este sentido, y luego de 4 semanas de tratamiento, la micorrización

mostró una tendencia a incrementar el contenido de agua, especialmente bajo condiciones de sequía.

Es sabido que la producción de estrés oxidativo puede ser caracterizada a través del daño oxidativo con un incremento en la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas (Cruz de Carvalho, 2008). Malondialdehído (MDA) es generalmente considerado como el producto y un indicador del grado de peroxidación de los lípidos de membrana. Los resultados aquí presentados mostraron que Fv incrementó el contenido de MDA, tanto en riego como en sequía, aunque el incremento fue mayor en riego. Interesantemente, la simbiosis con HMA disminuyó el daño oxidativo causado por el patógeno, tanto en condiciones de riego continuo como en sequía. Es conocido que la simbiosis con HMA disminuye el daño oxidativo tanto en riego como en sequía (Auge, 2001, 2004; Ruiz-Lozano, 2003; Ruiz-Lozano *et al.*, 2008). Asimismo se ha mencionado el efecto de mitigación por HMA en la inoculación con algunos patógenos (Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Nuestros resultados muestran por primera vez, el efecto de las micorrizas mitigando el daño oxidativo ante la inoculación con Fv en soja.

Uno de los mecanismos de reacción bioquímica más importante con que una planta cuenta para defenderse ante diversos cambios dañinos del ambiente, es el complejo enzimático de defensa, el cual incluye a las enzimas SOD, CAT y APX. Las enzimas CAT y APX, son las encargadas de eliminar el H₂O₂. Por su parte, SOD es la primera enzima en el proceso de detoxificación que convierte los radicales superóxido (O₂⁻) en H₂O₂. Se ha propuesto que una de las vías que las plantas tienen para aumentar la tolerancia a la falta de agua es incrementando la actividad de las enzimas implicadas en la eliminación de EROs (Bray, 1997).

Bajo las condiciones de ensayo evaluadas en este trabajo, se encontró que la inoculación con *F. virguliforme* mostró una disminución de la actividad SOD, tanto en sequía como en condiciones de riego continuo. Por otra parte, las plantas micorrizadas e inoculadas con Fv (RiFv H y RiFv S) presentaron aumentada la actividad de las enzimas SOD y APX, si se las compara con las plantas inoculadas con el patógeno (Fv H y Fv S). Sin embargo, no hubo diferencias para la enzima CAT en condiciones de sequía.

A diferencia de lo encontrado por García-Limones *et al.* (2002) y Ye *et al.* (2006), que observaron un incremento tanto en la actividad de las enzimas antioxidantes como en el contenido de ROS durante la interacción con *Fusarium*, nuestros resultados, por el contrario, indicaron una marcada disminución de la actividad SOD y CAT bajo riego continuo en presencia de Fv (luego de 4 semanas de tratamiento), sugiriendo una

disminución en la regulación del ión superóxido y del peróxido de hidrógeno, lo cual se vio reflejado en un aumento del daño oxidativo evaluado como MDA.

Interesantemente, el agregado de HMA en riego continuo aumentó significativamente la actividad SOD, sugiriendo la regulación del ion superóxido. De este modo, la inducción de SOD en RiFv, podría estar asociada con el reconocimiento de HMA y la consecuente activación del sistema de defensa de la planta frente al patógeno. En tal sentido, se ha informado que una fuerte inducción de enzimas antioxidantes durante el período de colonización da como resultado la detoxificación de EROs (generado durante la colonización) jugando un papel protector en la interacción entre las plantas y hongos (Alguacil *et al.*, 2003).

El aumento de la actividad SOD se mantuvo luego de 12 semanas de tratamiento solo bajo condiciones de riego continuo en presencia de *R. irregularis* y *F. virguliforme* simultáneamente. La identificación de isoenzimas SOD por gel de actividad mostró que el patógeno disminuyó particularmente la actividad de las isoformas Mn y Fe SOD. Ambas isoformas, una de mitocondria y la otra de cloroplasto, han sido mencionadas por su capacidad antioxidante en dichos orgánulos. Interesantemente, ambas isoformas se incrementaron con el agregado de *R. irregularis*, tanto en presencia o no del patógeno (RiFv y Ri) apoyando la idea que ambas isoformas serían claves en la defensa antioxidante contra el patógeno.

Las actividades CAT y APX no mostraron cambios en el tratamiento con RiFv, sugiriendo una posible acumulación del H₂O₂. El H₂O₂ es considerado una molécula señal y un regulador de la expresión de algunos genes en las células. Cuando se acumula en las plantas, activa factores de transcripción que regulan diferentes procesos fisiológicos, inhibe el crecimiento y desarrollo vegetal y estimula los mecanismos de defensa a estrés biótico y abiótico (Yu *et al.*, 2003; Pnueli *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

- La presencia de hongos micorrícicos, aun en bajo porcentaje de colonización de la raíz, podría ser suficiente para atenuar los síntomas causados por *Fusarium*, tanto en riego como en sequía.
- La disminución del daño oxidativo en plantas inoculadas con Ri/Fv, se sugieren como mecanismos implicados en la tolerancia a Fv tanto bajo condiciones de riego continuo como de sequía, durante los primeros momentos de la infección con Fv (4 semanas).
- En los primeros momentos del estrés biótico las micorrizas regularían la defensa antioxidante para generar señales de estrés relacionadas con la acumulación del H₂O₂ y la regulación del ion superóxido tanto en mitocondria como en cloroplastos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*, 105: 121-126.
- Alguacil, M. M., Hernández, J. A., Caravaca, F., Portillo, B., & Roldan, A. (2003). Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semiarid soil. *Physiologia Plantarum*, 118(4), 562-570.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology*, 55: 373-399
- Asimi, S., Gianinazzi-Pearson, V., & Gianinazzi, S (1980). Influence of increasing soil-phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* in soybean. *Canadian Journal of Botany*, (58), 2200-2205.
- Augé, R. M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11(1), 3-42.
- Augé, R. M. (2004). Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science*, 84(4), 373-381.
- Azcon-Aguilar C, & Barea JM. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6, 457–464.
- Bago, B., Pfeffer, P. E., & Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124(3), 949-958.
- Barea, J., Pozo, M., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Baslam, M., & Goicoechea, N. (2012). Water deficit improved the capacity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of antioxidant compounds in lettuce leaves. *Mycorrhiza*, 22(5), 347-359.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Bolwell, G. P., & Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence, a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51, 347–366.
- Bolwell, G. P. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(4), 287-294.
- Boyer, J. (1982). Plant productivity and environments. *Science* 218, 443.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Brar, H. K., Swaminathan, S., & Bhattacharyya, M. K. (2011). The *Fusarium virguliforme* toxin FvTox1 causes foliar sudden death syndrome-like symptoms in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(10), 1179-1188.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2), 48-54.

- Bressano, M. (2012). Efectos del estrés hídrico y la micorrización sobre la interacción soja-*macrophomina phaseolina*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales Universidad Nacional De Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 156-165.
- Davis, BJ (1962). "Disc electrophoresis II—Method and application to human serum proteins." *Annals New York Academy of Sciences* 121, 404-427.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Distéfano, S., & Gadban, L. (2006). Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2005 – 2006. Informe de actualización técnica n° 3. EEA Marcos Juárez INTA:13-18.
- Fisher, R. A. (1936). The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics*, 7(2), 179-188.
- García-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M., & Tena, M. (2002). Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum L.*) and *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(6), 325-337.
- Gibson, P. T., Shenaut, M. A., Njiti, V. N., Suttner, R. J., & Myers Jr, O. (1994). Soybean varietal response to sudden death syndrome. In: Proc 24th Soybean Seed Res Conf, Chicago, Illinois (pp. 6-7).
- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist*, 84(3), 489-500.
- Gongora-Canul, C. C., & Leandro, L. F. S. (2011). Effect of soil temperature and plant age at time of inoculation on progress of root rot and foliar symptoms of soybean sudden death syndrome. *Plant Disease* . 95:436-440.
- Heath, R., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast.I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189-198.
- Hodges, D, Delong, J, Forney, C y Prange, R (2000). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611.
- Hymowitz, T., & Newell, C. (1980). Taxonomy, speciation, domestication, dissemination, germplasm resources and variation in the *genus Glycine*. *Advances in Legume Research*. R Summerfield y A Bunting. Kew, United Kingdom, Royal Bot. Gardens: 251-264.
- INTA (1997). El cultivo de la soja en Argentina. San Juan, EDITAR.
- Ivancovich, A., Botta, G., & Annone, J. (1992) Síndrome de la muerte repentina en cultivos de soja en el área de la EEA Pergamino, Carpeta de Producción Vegetal. Información N° 94. Tomo XI, Soja

- Jin, H., Hartman, G. L., Nickell, C. D., & Widholm, J. M. (1996). Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Phytopathology*, 86(3), 277-282.
- Jin, H., Hartman, G. L., Nickell, C. D., Widholm, J. M. (1996). Phytotoxicity of culture filtrates from *Fusarium solani*, the causal agent of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, 80:922-7.
- Johansson, J. F., Paul, L. R., & Finlay, R. D. (2004). Minireview. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *Federation of European Microbiological Societies-Microbiology Ecology*, 48: 1-13.
- Khalil, S., Loynachan, T. E., & Tabatabai, M. A. (1999). Plant Determinants of Mycorrhizal Dependency in Soybean. *Agronomy Journal*, 91, 135-141.
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., & Schüßler, A. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from *phylum* to species level. *New Phytologist*, 193(4), 970-984.
- Leandro, L., Robertson, A., Mueller, D., & Yang, X. B. (2013). Climatic and environmental trends observed during epidemic and non-epidemic years of soybean sudden death syndrome in Iowa. *Plant Health Progress*.
- Luo, Y., Myers, O., Lightfoot, D.A., & Schmidt, M.E. (1999). Root colonization of soybean cultivars in the field by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Plant Disease*, 83(12), 1155-9.
- Melgar, J., Roy, K. W., & Abney, T. S. (1994). Sudden death syndrome of soybean etiology, symptomatology, and effects of irrigation and *Heterodera glycines* on incidence and severity under field conditions. *Canadian Journal of Botany*, 72,1647-1653.
- Mittler, R y Zilinskas, BA (1993). Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 212(2), 540-546.
- Morton, J. B., & Benny, G. L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an amendment of *Glomaceae*. *Mycotaxon* XXXVII:471-91.
- Morton, J. B., Franke, M., & Bentivenga, S. P. (1998). Developmental foundations for morphological diversity among endomycorrhizal fungi in *Glomales* (*Zygomycetes*) In: Varma A, Hock B (eds). *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology* (2nd edn.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
- Navi, S. S., & Yang, X. B. (2008). Foliar symptom expression in association with early infection and xylem colonization by *Fusarium virguliforme* (formerly *F. solani* f. sp. *glycines*), the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2008-0222-01-RS.
- Neto, A. L. D. F., Hartman, G. L., Pedersen, W. L., Li, S. X., Bollero, G. A., & Diers, B. W. (2006). Irrigation and inoculation treatments that increase the severity of soybean sudden death syndrome in the field. *Crop Science*, 46, 2547-2554.

- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual review of plant biology*, 50(1), 333-359.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and VA mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158-161.
- Ploper, D. (1993). Síndrome de la muerte súbita: Nueva enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial*, 13(54), 5-9.
- Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M., & Mittler, R. (2003). Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *The Plant Journal*, 34(2), 187-203.
- Pozo, M. J., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., & García-Garrido, J. M. (2015). Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 205(4), 1431-1436.
- Roy, K. W., Lawrence, G. W., Hodges, H. H., McLean, K. S., & Killebrew, J. F. (1989). Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant and relation of *Heterodera glycines* to disease severity. *Phytopathology*, 79, 191-197.
- Roy, K. W., Rupe, J. C., Hershman, D. E., & Abney, T. S. (1997). Sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, 81(10), 1100-11.
- Roy, K.W. (1997). *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. Solani* form B. *Plant Disease*, 1997 81:3, 259-266
- Ruiz-Lozano, J. M., Azcón, R., Palma, J. M. (1996). Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytologist*, 134(2), 327-333.
- Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6), 309-317.
- Ruiz-Lozano, J. M., Azcón, R., & Gomez, M. (1995). Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 456-460.
- Ruiz-Lozano, J. M., Porcel, R., & Aroca, R. (2008). Evaluation of the possible participation of drought-induced genes in the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit. In *Mycorrhiza* (pp. 185-205). Springer Berlin Heidelberg.
- Ruiz-Sanchez M, Aroca R, Munoz Y, Polon R, Ruíz-Lozano JM (2010) The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 167, 862-869.
- Rupe, J. C., & Gbur, E. E. (1995). Effect of plant age, maturity group, and the environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, 79(2), 139-143.
- Rupe, J. C., & Hartman, G. L. (1999). Sudden death syndrome. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC, editors. *Compendium of Soybean Diseases*. 4th ed. APS Press, St. Paul, MN, USA; pp. 37-9.

- Rupe, J. C., Robbins, R. T., & Gbur, E. E. (1997). Effect of crop rotation on soil population densities of *Fusarium solani* and *Heterodera glycines* and on the development of sudden death syndrome of soybean. *Crop Protection*, 16, 575-580. 26.
- Sandalio, L. M., Palma, J. M. & Rio, L. A. D. (1987). Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science*, 51, 1-8.
- Scandiani, M. (2004). Caracterización de la interacción *Glycine max* (L.) Merr.-*Fusarium solani* f. sp. *Glycine sensu lato*, causante del síndrome de la muerte repentina de la soja (SMR), en la zona núcleo de producción argentina. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- Scandiani, M., Ruberti, D., O'Donnell, K., Aoki, T., Pioli, R., Giorda, L., ... & Biasoli, M. (2004). Recent outbreak of soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium virguliforme* and *F. tucumaniae* in Argentina. *Plant Disease*, 88(9), 1044-1044.
- Scherm, H., & Yang, X. B. (1996). Development of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potential. *Phytopathology*, 86, 642-649
- Schüßler, A., & Walker, C. (2010) A species list with new families and new genera. ISBN: 978-1466388048. Available: <http://www.amf-phylogeny.com>.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker C. (2001). A new fungal *phylum*, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413-1421. doi:10.1017/S0953756201005196.
- Serraj, R., Sinclair, T. R., & Purcell, L. C. (1999). Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 50(331), 143-155.
- Shukla, A., Dehariya, K., Vyas, D., & Jha, A. (2015). Interactions between arbuscular mycorrhizae and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: effects on fungal development, seedling growth and wilt disease suppression in *Cicer arietinum* L. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(3), 240-252.
- Sinclair, T. R., & Serraj, R. (1995). Legume nitrogen-fixation and drought. *Nature*, 378(6555), 344-344.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edition. Academic Press, New York.
- Stockinger, H., Walker, C., & Schuessler, A. (2009). 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 183(4), 1176-1187.
- Sylvia, D., Alagely, A., Chellemi, D., & Demchenko, L. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungi influence tomato competition with bahiagrass. *Biology and Fertility of Soils*, 34(6), 448-452.
- Turner, N. C. (1988). Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science*, 9(4), 289-308.
- Vierheilig, H., & Bago, B. (2005). Host and non-host impact on the physiology of the AM Symbiosis. *In Vitro Culture of Mycorrhizas*. S. Declerck, J. A. Fortin and D.-G. Strullu, Springer Berlin Heidelberg, 4: 139-158. Doi 10.1007/3-540-27331-X_8

- Wehner, J., Antunes, P.M., Powell, J.R., Mazukatow, J., & Rillig, M.C. (2010). Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia*, 53, 197–201.
- Westphal, A., Abney, T. S., Xing, L. J., & Shaner, G. E. (2008). Sudden Death Syndrome of Soybean. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094. PHI-I-2008-0102-01.
- Whipps, J. M., (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1198–1227.
- Wu, Q. S., Xia, R. X., Zou, Y. N. (2006a). Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. *Journal of Plant Physiology*, 163, 1101–1110.
- Wu, Q. S., Zou, Y. N. (2009). Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. *Plant, Soil and Environment*, 55(10), 436-442.
- Wu, Q. S., Zou, Y. N., Xia, R. X. (2006b). Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *European Journal of Soil Biology*, 42, 166–172.
- Yang, X. B., & Navi, S. S. (2003). Fungal colonization in phloem/xylem tissues of taproots in relation to foliar symptoms expression of soybean sudden death syndrome. *Phytopathology*, 93, S92.
- Ye, S. F., Zhou, Y. H., Sun, Y., Zou, L. Y., & Yu, J. Q. (2006). Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt. *Environmental and Experimental Botany*, 56(3), 255-262.
- Yu, C. W., Murphy, T. M., & Lin, C. H. (2003). Hydrogen peroxide-induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Functional Plant Biology*, 30(9), 955-963.
- Zambolim, L., & Schenck, N. C. (1983). Reduction of the effects of pathogenic, root-infecting fungi on soybean by the mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *Phytopathology*, 73(10), 1402-1405.

ANEXO I

Tabla 1: Valores de MDA de plantas de soja luego de 4 y 12 semanas mantenidas en condiciones de riego continuo y/sequía.

Tratamiento	MDA (nm/g PF)			
	4 semanas		12 semanas	
	CC	Sequía	CC	Sequía
C	25,90 ab	19,66 a	32,33 a	35,41 a
Fv	31,61 b	29,36 b	36,69 a	28,76 a
Ri	16,79 a	11,39 a	40,10 a	26,64 a
RiFv	19,51 a	15,29 a	43,09 a	27,42 a

MDA: malondialdehído. **C:** Control, **Fv:** plantas inoculadas con *Fusarium virguliforme*, **Ri:** inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e **RiFv:** inoculadas con ambos (*Rhizophagus /Fusarium*). Los valores corresponden a la media de 5 plantas. Letras distintas indican diferencias significativas entre los valores. LSD Fisher (α : 0.05). MDA: Malondialdehído (nm/gr peso fresco).

Tabla 2: Actividad enzimática antioxidante de plantas de soja de 4 semanas de tratamiento bajo riego continuo

Tratamientos	SOD (U/ mg Proteína)	APX (umol/mg Proteína)	CAT (umol/mg Proteína)
C	70,96 b	0,47 a	24,75 b
Fv	38,54 a	0,46 a	18,75 ab
Ri	58,01 ab	0,48 a	24 b
RiFv	73,69 b	0,32 a	14,67 a

SOD: superóxido dismutasa; **APX:** ascorbatoperoxidasa; **CAT:** catalasa. **C:** Controles, **Fv:** plantas inoculadas con *Fusarium virguliforme*, **Ri:** inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e **RiFv:** inoculadas con ambos (*Rhizophagus /Fusarium*). Los valores corresponden a la media de 5 plantas. Letras distintas indican diferencias significativas entre los valores. LSD Fisher (α : 0.05).

Tabla 3: Actividad enzimática antioxidante de plantas de soja de 4 semanas de tratamiento sometidos a un período de sequía

Tratamientos	SOD (U/mg Proteína) ₁	APX (umol/mg Proteína) ₁	CAT (umol/mg Proteína)
C	62,25 ab	0,32 a	18,59 a
Fv	42,74 a	0,38 a	18,56 a
Ri	46,97 a	0,40 a	16,53 a
RiFv	77,38 b	0,65 b	12,88 a

SOD: superóxido dismutasa; APX: ascorbatoperoxidasa; CAT: catalasa. C: Controles, Fv: plantas inoculadas con *Fusarium virguliforme*, **Ri:** inoculadas con *Rhizophagus irregularis* e **RiFv:** inoculadas con ambos (*Rhizophagus /Fusarium*). Los valores corresponden a la media de 5 plantas. Letras distintas indican diferencias significativas entre los valores. LSD Fisher (α : 0.05).

Capítulo 2

Desarrollo de metodologías de inoculación de plantas de soja in vitro con F. virguliforme y evaluación de la interacción.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento y la productividad de las plantas se ve muy afectado por las condiciones de estrés ambiental (Zhou *et al.*, 2010). La exposición de las plantas al estrés, tanto biótico como abiótico, da como resultado numerosos cambios bioquímicos, fisiológicos y moleculares. En general, los genes regulados durante el estrés juegan un papel fundamental en la tolerancia o resistencia de las plantas a las diversas condiciones desfavorables (Guo *et al.*, 2014).

En todo proceso infeccioso, independientemente de que éste termine siendo exitoso o no, se produce un diálogo o intercambio de señales entre el eventual patógeno y el futuro potencial hospedante. Esta interacción terminará definiendo una relación *compatible*, si el proceso infeccioso es exitoso y se manifiesta la enfermedad, o *incompatible*, cuando el patógeno es incapaz de invadir a su potencial hospedante por algún factor de resistencia. Entre estos dos extremos existe un sinnúmero de gamas de interacciones que representan diferentes niveles de tolerancia (Dangl *et al.*, 2013). Sea cual fuera el resultado de este diálogo o interacción, especialmente en el caso de patógenos de suelo, el intercambio de señales comienza aún antes de hacer contacto directo patógeno y hospedante (Dodds and Rathjen, 2010).

Numerosos estudios recientes han expandido nuestros conocimientos sobre el sistema inmune de las plantas y han llevado a la identificación de nuevos componentes. Tanto las plantas como los patógenos han desarrollado “armas moleculares” para defenderse. Las plantas están equipadas con un sofisticado sistema inmune, el cual les permite reconocer al patógeno invasor, transmitir señales de alarma, y activar una rápida y eficiente respuesta de defensa que limita la infección. Por su parte, los patógenos han desarrollado estrategias para disminuir o inclusive anular el sistema inmune de la planta logrando establecer una interacción compatible, es decir, desarrollar la enfermedad. Entender los mecanismos moleculares del sistema inmune de la planta y la patogenicidad microbiana es de suma importancia a la hora de elaborar estrategias que limiten las pérdidas en los rendimientos de un cultivo debido a la enfermedad.

La resistencia natural de las plantas a patógenos depende tanto de mecanismos de defensa pasivos como activos o inducidos (Jones and Dangl, 2006). Dentro de los mecanismos pasivos, es decir aquellos componentes que están presentes en la planta independientemente de la presencia o no del patógeno, podemos nombrar como ejemplos

las barreras físicas y bioquímicas como tricomas, la deposición de capas de cera en la epidermis, la pared celular y la producción de compuestos antimicrobianos (Heath, 2000; Chisholm *et al.*, 2006). Aquellos patógenos adaptados que han adquirido la capacidad de vulnerar estas barreras, se enfrentan con la respuesta de defensa inducida. Esta defensa es regulada en varios niveles (Segonzac and Zipfel, 2011). En el primer nivel, encontramos los “receptores de reconocimiento de patrones o estructuras” localizados en la membrana (PRRs: Pattern Recognition Receptor), que censan moléculas patrón, moléculas tipo, asociadas a microbios (MAMPs, microbe-associated molecular pattern) o moléculas asociadas a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular pattern). El reconocimiento de estas moléculas por los PRRs inicia la inmunidad desencadenada por PAMPs/MAMPs (PTI: Pattern Triggered immunity) (Tsuda and Katagiri, 2010). Ciertos patógenos han desarrollado estrategias para superar la PTI, como la producción de proteínas efectoras. Como segunda barrera génica para limitar el avance de aquellos patógenos que superan la PTI, las plantas han desarrollado proteínas de resistencia (PR). Estas proteínas R son el componente clave del segundo nivel del sistema inmune inducido. La mayoría de las proteínas R poseen un dominio central de unión a nucleótidos (NB), junto con un dominio repetido en leucina carboxilo terminal (LRR) y por lo tanto son llamadas proteínas NB-LRR (Kim *et al.*, 2005).

Cuando los efectores microbianos son reconocidos por las PR, se inicia una respuesta de defensa que, a menudo culmina en una respuesta hipersensible (RH), con la consecuente muerte celular programada alrededor del sitio de infección (Heath, 2000; Thommas *et al.*, 2011). A los efectores reconocidos por las PR se los denomina factores de avirulencia (Avr), y la reacción de resistencia iniciada es conocida como inmunidad desencadenada por efectores (ETI: Effector Triggered Immunity) (Jones and Dangl, 2006; Dodds and Rathjen, 2010). Este fenómeno de reconocimiento específico fue descrito por primera vez por Flor en 1942, y se lo conoce como la hipótesis de “gen por gen” (Flor, 1971). Desde entonces, numerosos genes Avr han sido clonados, y en 1992 fue aislado el primer gene R: el Hm1 de maíz que le confiere resistencia a *Cochliobolus carbonum* (Johal and Briggs, 1992).

En la actualidad, el sistema inmune de las plantas está representado por el modelo del Zig-Zag de cuatro etapas (Figura 14) (Jones and Dangl, 2006). En la primera etapa, los PAMPs/MAMPs son reconocidos por los receptores de reconocimiento (PRR) en la membrana, dando como resultado la inmunidad activada por PAMPs (PTI), que puede

detener la infección. En una segunda etapa, los patógenos exitosos despliegan efectores que contribuyen a su virulencia. Estos efectores pueden interferir con PTI. Esto genera una susceptibilidad desencadenada por efector (ETS). En una tercera etapa, el efector es específicamente reconocido por una proteína tipo NB-LRR, activando la inmunidad desencadenada por efectores (ETI). El reconocimiento puede ser directo o indirecto. ETI es una respuesta amplificada y acelerada de PTI, dando como resultado la resistencia a la enfermedad y, usualmente, una respuesta de muerte celular hipersensible (HR) en el sitio de la infección. Está claro que los patógenos pueden desarrollar estrategias para evadir esta respuesta de la planta (ganando o modificando efectores por ejemplo) así como las plantas pueden desarrollar nuevos genes R. Ambos procesos se dan a lo largo de la selección natural mediante procesos evolutivos que llevan enormes lapsos.

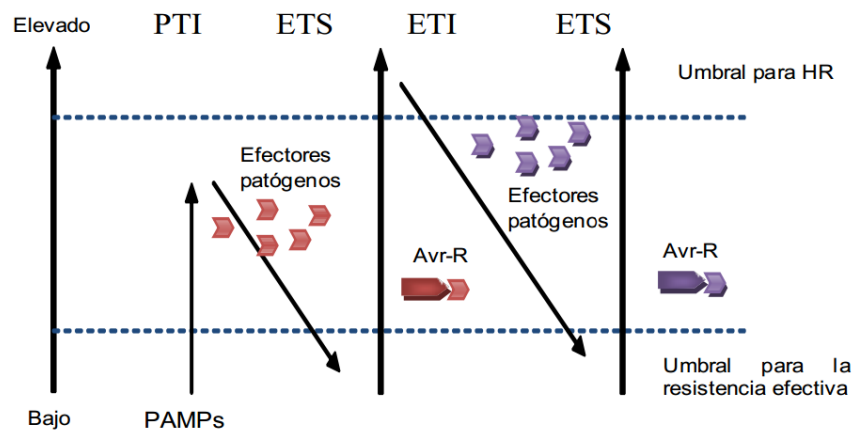


Figura 14: El modelo del zig-zag ilustra la respuesta de la planta al ataque de un patógeno (Jones and Dangl, 2006 modificado). En este esquema, la susceptibilidad a un patógeno determinado es proporcional a $PTI - ETS + ETI$. La respuesta por parte de la planta se da en cuatro etapas. En una primera etapa, las moléculas asociadas a patógenos (PAMPs/MAMPs) son reconocidos por los receptores específicos de PAMPs (PRR) y desencadenan la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI). En una segunda etapa, los patógenos exitosos exponen sus efectores, los cuales interfieren con PTI o permiten la dispersión y nutrición del patógeno, dando como resultado una susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS). En una tercera etapa, un efector (indicado en rojo) es reconocido por una proteína del tipo NB-LRR, y se desencadena la respuesta ETI o inmunidad desencadenada por efector, una respuesta amplificada de PTI, que a menudo supera un umbral y desencadena respuesta hipersensible (HR). En una cuarta etapa, cepas del patógeno que han perdido la capacidad de virulencia, y han ganado nuevos efectores (indicados en lila) pueden ayudar al patógeno a superar ETI. La selección favorece nuevos alelos de NB-LRR de la planta, que pueden reconocer uno de los efectores de reciente adquisición, resultando en una nueva ETI.

Rol de la pared celular de las plantas en la protección contra patógenos

Todas las células vegetales que se encuentran en desarrollo necesitan remover constantemente los componentes de la pared celular primaria, que mayormente está compuesta de polímeros de carbohidratos (como celulosa, hemicelulosa y pectinas) y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, como son las extensinas y las proteínas arabinogalactonas (Carpita and McCann, 2000). Además, las células que han completado la expansión celular y necesitan reforzar su estructura por razones funcionales (esto es, para formar células de vasos o fibras) generan una pared celular secundaria que está compuesta mayormente de celulosa, hemicelulosa (mayormente xylanos) y lignina (Cosgrove, 2005; Sarkar *et al.*, 2009).

La pared celular es, además de todo lo anterior, un importante elemento de defensa común en todas las plantas (Bellincampi *et al.*, 2014; Lionetti and Métraux, 2014).

En primer lugar, la pared celular actúa como barrera física (pasiva) y por lo tanto, para que la infección del patógeno progrese, es necesario que exista una ruptura local o extensiva de la matriz de la pared (Cantu *et al.*, 2008; Hematy *et al.*, 2009). En segundo lugar, la pared celular es un reservorio de compuestos antimicrobianos, los cuales son liberados durante su degradación (García-Olmedo *et al.*, 2001; Schulze-Lefert, 2004; Vorwerk *et al.*, 2004). Por otra parte, las plantas tienen un mecanismo para mantener la integridad de la pared celular (CWI, del inglés: Cell Wall Integrity). Este mecanismo, es capaz de regular la integridad de la pared durante el desarrollo de la planta y en respuesta a estímulos externos (Wolf *et al.*, 2012; Engelsdorf and Hamann, 2014). Notablemente, además de cumplir con el rol en la protección de la planta contra la infección, la pared celular puede también actuar como fuente de nutrientes para los patógenos, promoviendo su crecimiento y desarrollo (Cantu *et al.*, 2008; Hematy *et al.*, 2009).

Los patógenos de plantas son, a menudo, divididos según su tipo de vida, en biótropos y necrótrofos. Los biótropos se alimentan de tejido vivo del huésped, mientras que los necrótrofos matan el tejido del huésped para alimentarse de los restos (Glazebrook, 2005; van Kan, 2006). Mientras que, los hongos necrótrofos destruyen la integridad de la pared celular, a través de la acción combinada de enzimas de degradación, los hongos biótropos requieren una degradación más localizada y controlada de la pared celular, con el fin de mantener viva a la célula huésped (Bellincampi *et al.*, 2014). De esta manera, la planta puede liberar moléculas señales, conocidas como DAMPs, por patrones moleculares asociados al daño (Damage Associated Molecular Patterns: DAMPs) (Vorwerk *et al.*,

2004; Cantu *et al.*, 2008). Los DAMPs pueden modular la respuesta inmune por reconocimiento por PRRs, muchos de estos mecanismos son similares a la regulación de la activación del sistema inmune en respuesta a PAMPs (Dodds and Rathjen, 2010; Macho and Zipfel, 2014; Malinovsky *et al.*, 2014).

El reconocimiento de DAMPs y PAMPs por PRR activa una cascada de proteínas quinasas que regulan, río abajo, la respuesta inmune dando como resultado, entre otros, el reforzamiento de la pared celular (Ringli, 2010; Ferrari *et al.*, 2013; Engelsdorf and Hamann, 2014; Malinovsky *et al.*, 2014). Estas interacciones PAMP/DAMP-PRR son importantes independientemente de la forma de vida patógeno, aunque la importancia relativa de ciertos PAMPs/DAMPs puede variar significativamente. Por ejemplo, fragmentos de quitina, cutina y oligogalacturónidos (OGs) pueden ser más relevantes en patosistemas en donde hay enzimas que degradan la pared celular y la cutícula (Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker *et al.*, 2011). Dentro de los PAMPs, podemos nombrar como ejemplos moléculas derivadas de la pared celular de bacterias u hongos, como peptidoglicanos (PNG), lipopolisacáridos (LPS), fragmentos de quitina y la flagelina de muchas bacterias; como ejemplos de DAMPs encontramos aquellos péptidos, OGs y monómeros de cutina, que se liberan después de la lesión provocada por el organismo invasor, o por acción de enzimas derivadas del patógeno (Bellincampi *et al.*, 2014).

En *Arabidopsis*, se ha observado que la proteína receptora con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK) ERECTA (ER) y la proteína G heterotrimérica están involucradas en la remodelación de la pared celular durante la respuesta de defensa contra *Plectosphaerella cucumerina*, y probablemente controlan la CWI. Una de las estrategias más utilizadas por las plantas para limitar la degradación de los componentes de la pared celular, es la producción de inhibidores enzimáticos. Las poligalacturonasas (PGs) son factores de patogenicidad producidos durante la etapa temprana de la interacción microbiana, que despolimeriza la homogalacturona (HG), el principal componente de la pectina en dicotiledoneas, pero también presente en monocotiledoneas (Caprari *et al.*, 1993; D'Ovidio *et al.*, 2004). Las plantas son capaces de producir proteínas inhibidoras de las poligalacturonasas de la pared celular (PGIPs) contra los PGs de microbios e insectos (Spadoni *et al.*, 2006). Se ha visto que la sobreexpresión de PGIPs mejora la resistencia contra bacterias y hongos necrótrofos en diferentes plantas (Aguero *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2012). La interacción PG-PGIP da como resultado la acumulación de OGs (elicitor activo) que, en *Arabidopsis*, son percibidos por un receptor de pared asociado a quinasa 1 (WAK1, Brutus *et al.*, 2010), activando la respuesta inmune de la planta (Ferrari *et al.*,

2013). Recientemente se ha identificado en *Arabidopsis* un receptor del tipo LRR-RPK, denominado RBPG1 (Botrytis PolyGalacturonase 1), que reconoce endopoligalacturonasas fúngicas (PGs). A estas PGs fúngicas se las ha propuesto como PAMPs (Zhang *et al.*, 2014).

Cambios transcripcionales en plantas frente a la invasión de patógenos de suelo

Uno de los principales inconvenientes para estudiar los eventos tempranos del proceso infeccioso de patógenos de suelo, es la dificultad para determinar el momento preciso en el que el patógeno entra en contacto con la raíz de la planta. En este capítulo se describe una metodología que permite infectar plantas de soja con un patógeno fúngico de raíz, *Fusarium virguliforme*, y determinar el momento exacto en que las hifas del hongo entran en contacto con su hospedante.

El uso de nuevas metodologías para el estudio de los sistemas biológicos permite comprender la respuesta de las plantas al estrés. Estas respuestas son, a menudo, controladas por vías de transducción de señales, que puede involucrar decenas o incluso cientos de genes (Lee *et al.*, 2011).

Existen hoy una serie de metodologías para efectuar un análisis detallado de los cambios transcripcionales en plantas frente a diferentes situaciones como estrés biótico, abiótico, cambios luminicos, etapas de desarrollo etc. Entre otras metodologías pueden citarse la secuenciación de RNA (RNA-seq) (Wang, *et al.*, 2009); la tecnología de microarreglos de cDNA (Schena *et al.*, 1995) y la técnica de análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción a partir de ADN copia (cDNA-AFLP) (Vos *et al.*, 1995).

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos mediante la técnica de cDNA-AFLP. La misma fue seleccionada por su relativamente bajo costo y porque para su realización no se requieren conocimientos previos del genoma de la planta hospedante (Vuylsteke *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2009). Esta tecnología ha sido ampliamente utilizada por ser una de las tecnologías más robustas, sensibles y atractivas para el descubrimiento de genes en base a la detección de fragmentos diferenciales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ajustar un método *in vitro* de inoculación e infección de plantas de soja con *Fusarium virguliforme*.
- Evaluar cambios en los niveles de transcripción de genes involucrados en defensa en plantas frente a la infección de *F. virguliforme*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Semillas de soja (*Glycine max*) cultivar Don Mario 4800, fueron desinfectadas superficialmente por inmersión en hipoclorito de sodio al 1% durante 30 segundos, y germinadas en grupos de 6 semillas por placa de Petri estériles (145 mm de diam) conteniendo agar agua (0,8%). Las placas de Petri fueron incubadas a 27°C en oscuridad durante 4 días.

Material fúngico: Como inóculo para los experimentos se utilizó una cepa de *Fusarium virguliforme* (Fv), originalmente aislada de la zona de Buenos Aires (Aoki *et al.*, 2005), mantenida en medio de cultivo sintético (SNA: Synthetic low nutrient agar, Nirenberg, 1976). Un taco de este cultivo, conteniendo micelio y macroconidios de Fv, fue puesto en placas de Petri (90 mm diam) con 50 ml de Potato Dextrosa Agar (PDA) (Scharlau Chemie S.A, Barcelona, Spain), e incubadas a 25°C en oscuridad por 7 días.

Diseño del sistema: Se utilizó el sistema *in vitro* desarrollado por Bressano y col. (Bressano *et al.*, 2010). El diseño del mismo consistió en colocar una plántula de soja de 4 días de crecimiento dentro de una placa de *Petri* (145 mm diam.) conteniendo medio Hoagland (concentración 1X) gelificado con Phytigel™ (SIGMA). Para lograr un correcto desarrollo de las plantas, los cotiledones se mantuvieron fuera de la placa, quedando solo las raíces creciendo en el medio de cultivo. Los sistemas fueron colocados en condiciones controladas de luz y temperatura (16 hs luz/8 hs oscuridad, a 24°C).

Proceso de inoculación y muestreo: Una vez que las plantas alcanzaron el estadio V2 (primeras hojas trifoliadas totalmente expandidas), los sistemas fueron divididos al azar en dos grupos, cada uno con tres réplicas: plantas sanas (Control) y Plantas inoculadas con *Fusarium virguliforme* (Fv); los tratamientos Fv fueron inoculados con un taco de PDA (25 mm²) cubierto con el patógeno y observados con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800), a través de la tapa de la placa de *Petri*. Las raíces fueron cosechadas a diferentes tiempos, según el momento de infección. Se consideró como tiempo 1 (T1), el momento en el que las hifas del patógeno entraban en contacto con la raíz, y Tiempo 2, 48 hs posteriores al momento T1. A su vez, se eligieron dos zonas de muestreo, una zona adyacente y una zona lejana al punto de infección (Figura 15). También se tomaron muestras de raíces de plantas controles, sin inocular. Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su utilización.

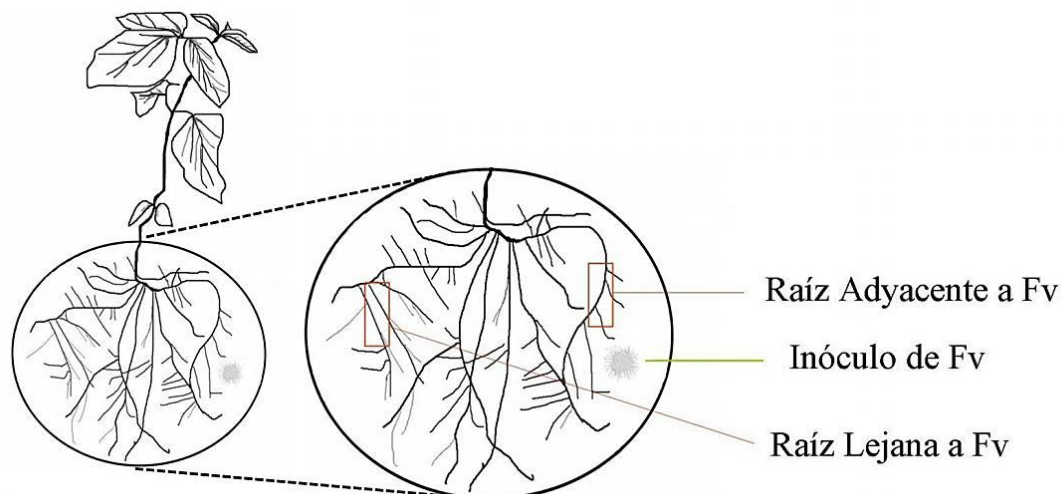


Figura 15: Representación esquemática de las zonas de la raíz de las plantas de soja muestreadas post-infección con *F. virguliforme*. Planta completa *in vitro* inoculada con el patógeno. Detalle de la raíz de la planta de soja creciendo en medio Hoagland gelificado con Phytigel TM (SIGMA). Se muestran el punto de inoculación con Fv y las zonas de muestreo.

Extracción de RNA: A partir de las muestras de raíces se extrajo ARN total mediante el método de TRIzol, (Chomczynski and Sacchi, 1987) según protocolo del fabricante (TRIzol® Plus RNA Purification System Thermo Fisher Scientific Inc.), utilizando materiales libres de RNAasas (Anexo IV.1). Se utilizó 0,1gr de muestra por cada ml de TRIzol. El pellet final se resuspendió en 30 μ l de agua tratada con DEPC. El RNA extraído se mantuvo a -80°C hasta su utilización. Las muestras de RNA fueron corridas en gel desnaturalizante de agarosa al 1,2% (Anexo IV.2) para comprobar su integridad. Se realizó un tratamiento con DNAasas con el fin de eliminar restos de ADN de las muestras de ARN mediante columnas del kit RNAeasy (QIAGEN), según protocolo del producto. La ausencia de ADN contaminante en las muestras extraídas se comprobó mediante reacciones de PCR del ARN obtenido.

PCR reverso (RT-PCR): La primera hebra de ADN copia (cDNA) se sintetizó con el kit RT PCR KIT IMPROM (PROMEGA) usando como molde 1 μ g de ARN de cada muestra problema. La verificación de la reacción de la transcriptasa reversa se realizó mediante PCR utilizando un juego de cebadores diseñados para un exón de la secuencia de la enzima antioxidante Catalasa, el cual genera un amplicón de 427 pb (Cebador CAT exón 3 up-5': GTC CGC GAT GGC CTC AAG TT/ Cebador CAT exón 3 low-3': GGG GGT CAA AGT CAA GCC TGT C).

Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados a partir del ADN copia (ADNc) (ADNc-AFLP): Con el objetivo de estudiar los genes cuya transcripción se altera frente a la infección de *F. virguliforme*, se realizó la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos a partir de ADN copia (ADNc-AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism a partir de ADNc)¹.

La Técnica de ADNc-AFLP consiste en la combinación de los métodos de RT-PCR, PCR y análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en la expresión de genes (Anexo IV.3). Este cambio se percibe como un patrón diferente en las bandas generadas. Las diferencias observadas en la intensidad de las bandas entre las muestras proporcionan una buena medida de las diferencias relativas en los niveles de expresión génica.

En esencia, el método de cDNA-AFLP implicó la transcripción inversa de ARNm en ADNc de doble hebra, seguido por la digestión con enzimas de restricción, la ligación de adaptadores y la amplificación por PCR selectiva de los fragmentos de restricción con cebadores extendidos en 1 o más bases específicas. De esta manera, se obtuvieron subconjuntos más pequeños de una mezcla de fragmentos de ADNc. Los fragmentos de cDNA-AFLP resultantes fueron separados en geles de alta resolución.

Gel de poliacrilamida: Los productos de amplificación selectiva obtenidos mediante la técnica de cDNA-AFLP fueron separados en geles de poliacrilamida al 6%, y fueron reveladas con nitrato de plata 0,2% (Anexo IV.4). Posteriormente, fueron analizados cuidadosamente, con la ayuda de un transiluminador de luz blanca. Allí se reconocieron los fragmentos candidatos de ser expresados diferencialmente, ya sea por activación o supresión de la transcripción de una determinada secuencia génica. Luego se extrajeron las bandas elegidas para determinar su identidad por medio de secuenciación². Las secuencias obtenidas fueron procesadas con el programa Chromas lite 2.01 y SeqMan Pro (DNASTAR Lasergene versión 8.0.2) para determinar el consenso de las cadena sentido y antisentido.

Para poder corroborar la expresión diferencial observada en los geles de poliacrilamida de las secuencias seleccionadas, se diseñaron cebadores específicos para las

¹ Dicho estudio fue llevado a cabo en Brasil, en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola-Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, bajo la supervisión del Dr Luis Eduardo Aranha Camargo.

² La secuenciación fue realizada en el laboratorio a cargo del Dr Luis Eduardo Aranha Camargo, Universidad de São Paulo, Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Fitopatología.

mismas. Al mismo tiempo, se diseñó un juego de cebadores que amplifican la secuencia de un gen calibrador, para lo cual se utilizó la del Factor de elongación 1- α Glycine max elongation factor-1 α (EF-1 α) (NCBI accession N° AK285433). Este gen se utiliza para homogeneizar los valores de cada muestra, ya que su expresión no varía ante los tratamientos aplicados. Las propiedades de los cebadores desarrollados se calcularon con la herramienta Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculador (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

PCR en tiempo real: Para realizar los ensayos de PCR en tiempo real se siguió el protocolo del Kit de Invitrogen “EXPRESS One-Step SYBR® GreenER™”(Thermo Fisher Scientific Inc.), usando EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal, EXPRESS SuperScriptR Mix for One-Step SYBR® GreenER, 0.1 μ g de molde de RNA y 0.2 μ M de Cebadores específicos (Anexo IV.5). Para cada muestra se corrieron reacciones con el cebador específico para el Factor de Elongación 1 α , como un control interno.

Además de las muestras problema, se incluyó un control sin enzima RT, para corroborar la inexistencia de ADN genómico y un control sin ARN para cada cebador utilizado para descartar contaminaciones.

El experimento fue llevado a cabo en un termociclador Rotor Gene 6000. El programa utilizado fue el siguiente: 53°C, 5 min/ 95°C, 2 min/ (95°C, 15 seg/ 53°C, 60 seg/ 74°C, 10 seg) x45 ciclos. Curva de melting (60°C to 95°C).

Antes de analizar las muestras problema se procedió a la generación de curvas estándar para para deducir la eficiencia de amplificación de cebador a utilizar. Es imprescindible que las eficiencias de amplificación de los cebadores específicos sean equiparable a la eficiencia del gen calibrador para el cálculo relativo del “delta ct” (Livak y Schmittgen, 2001).

Las secuencias de los genes que mostraron una regulación diferencial se compararon en la base de datos de nucleótidos (NCBI). En los casos en los que se generaron resultados ambiguos y con el fin de obtener secuencias de mayor longitud, se procedió a la elongación de los fragmentos elegidos utilizando la técnica 5´ RACE (*Rápida Amplificación de los Extremos de ADNc*) (Nature Methods, 2005, Schramm, et al., 2000). Esta técnica utiliza la enzima reverso transcriptasa, el RNA extraído y un cebador universal poli T que contiene en el extremo 5´ una secuencia al azar (Anexo IV.6). Este cebador hibrida en la secuencia poli A de los RNA mensajeros y a partir de allí, mediante la enzima

reverso transcriptasa, se genera una hebra de ADN copia, que será amplificada mediante el uso de los cebadores específicos de cada gen buscado y un cebador que reconoce la secuencia agregada a la cola poli T (Anexo IV.6).

Preparación de Muestras para Secuenciar: Las muestras fueron corridas en geles preparativos de agarosa al 2%, y luego fueron teñidas durante 30 min en SYBR Green®. Las bandas fueron extraídas del gel con ayuda de un transiluminador Quantity One®. Las mismas fueron purificadas siguiendo el protocolo de purificación del kit comercial GFX.

El producto obtenido después de la purificación se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop ND-1000®).

Clonado de secuencias: Las secuencias amplificadas por RACE fueron clonadas en el plásmido vector, el pCR®4-TOPO®, que permite clonar directamente productos generados por PCR. Para ello se usó el kit de invitrogen TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo IV.7). Se usaron células electrocompetentes One Shot® TOP10 Electrocomp™ E. coli de Invitrogen. Una vez transformadas las mismas se hicieron crecer en medio selectivo LB suplementado con Ampicilina (100 µg/ml).

El análisis de los transformantes positivos, se realizó mediante una reacción PCR a partir de colonia, usando los cebadores M13 Forward y M13 Reverse (Anexo IV.7).

Se seleccionaron los clones que presentaron un inserto superior al esperado en el vector autoligado. Las colonias seleccionadas fueron repicadas en medio líquido LB + Ampicilina. A los cultivos con 16 hs de crecimiento a 37°C se los centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos. El plásmido fue purificado siguiendo el protocolo de Fermentas (“GeneJET Plasmid Miniprep Kit - Life Technologies”); se midió la concentración en NanoDrop ND-1000® y se llevó a cabo una digestión con la enzima EcoRI (1U de enzima/1 µg de DNA) para verificar los clones positivos. Las digestiones fueron corridas en geles de agarosa al 1%.

Análisis de secuencias: Las secuencias nucleotídicas de los clones generados fue determinada usando los servicios de la empresa Macrogen. Todas las secuencias nucleotídicas obtenidas se procesaron con los programas Chromas lite 2.01 y SeqMan Pro (DNASTAR lasergene version 8.0.2). La identificación molecular de la secuencia

consenso se realizó usando el programa MegaBlastn de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

RESULTADOS

El sistema *in vitro* descrito en materiales y métodos permitió que, luego de la inoculación de *F. virguliforme*, sea posible observar con microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800) a través de la tapa de la placa de *Petri* la llegada del hongo. De esta manera, se determinó que las hifas llegaron a tocar la superficie de la raíz luego de cuatro días de haber colocado el inóculo (Figura 16A), dado el lento crecimiento de *F. virguliforme* en medio Hoagland.

La Figura 16A muestra el momento en el que el patógeno entra en contacto con la raíz de las plantas de soja, considerado como tiempo 1. En este momento, se tomaron muestras tanto de raíces adyacentes como lejanas al sitio de infección (denominados como RAFv T1 y RLFv T1, respectivamente).

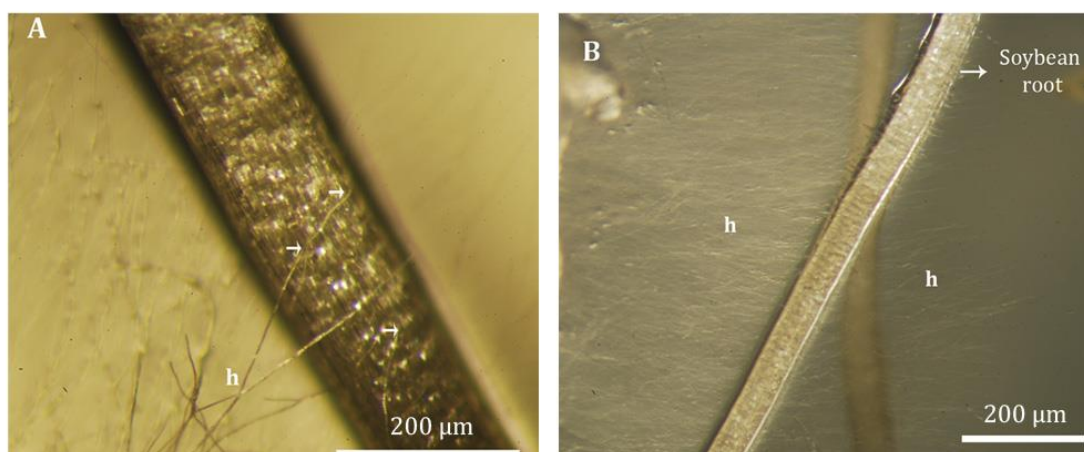


Figura 16: A: Zona en la que el hongo patógeno (*Fusarium virguliforme*) entra en contacto con la raíz de soja. A este momento se lo consideró como tiempo 1. Las flechas indican las zonas de entrada de Fv. **B: La Figura muestra al hongo patógeno luego de 48 hs de haber entrado en contacto con las raíces de soja.** A este momento se lo consideró como tiempo 2.

Una vez establecido el T1, se dejaron transcurrir 48 hs y se tomaron las muestras T2, tal como se mencionó en la metodología (Figura 16B). Aquí también se tomaron muestras adyacentes y lejanas al sitio de infección denominando a cada una como RAFv T2 y RLFv T2, respectivamente. También se tomaron muestras de plantas controles sin inocular con *Fv*.

El ARN obtenido mediante el método del TRIzol fue cuantificado, luego de eliminar el ADN contaminante se midió el rendimiento y se obtuvo un promedio de 0,2 a 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se evaluó su pureza mediante la relación de absorbancias obtenidas a las longitudes de onda 260 y 280. Además, se observó la integridad y calidad de las muestras de ARN, mediante la estimación visual en un gel de agarosa desnaturalizante, comprobándose que la banda del RNA 25S comparada con la del 18S fue más intensa (Figura 17).

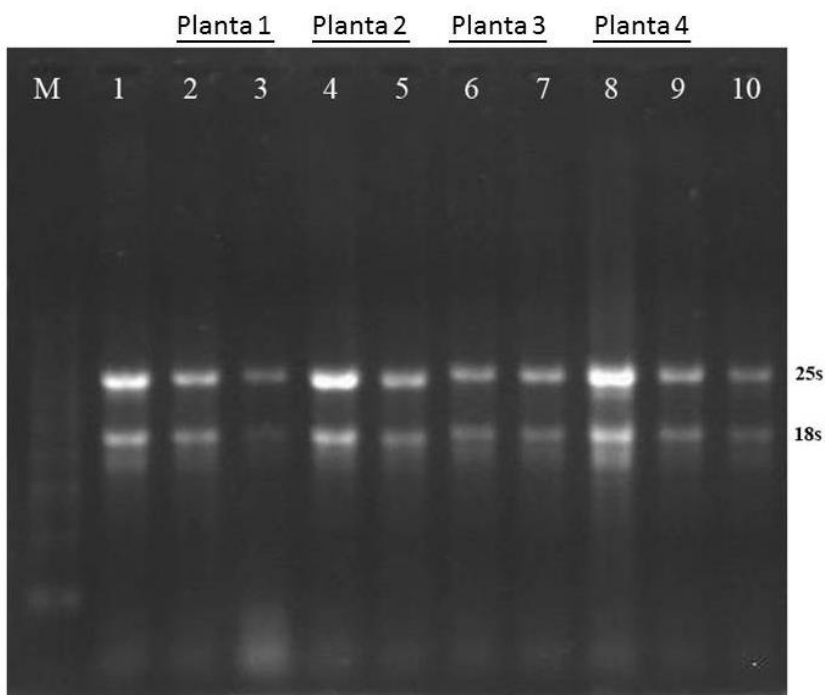


Figura 17: Gel desnaturalizante de agarosa 1.2% en donde se observa la integridad y calidad de los ARNs extraídos de las raíces de los diferentes tratamientos cultivados *in vitro*. Las calles 1-10 corresponden a las diferentes muestras. La calle 1 corresponde al C, las calles 2 y 3 a la planta 1, RLFv y RAFv Tiempo 1, respectivamente. Las calles 4 y 5 corresponden a la planta 2, RLFv y RAFv Tiempo 2, la 6 y 7 a la planta 3, RLFv y RAFv Tiempo 1, las calles 8 y 9 a la planta 4, RLFv y RAFv Tiempo 2. La calle 10 es el C Tiempo 2 y M el marcador molecular.

Una vez corroborada la integridad del RNA obtenido, se realizaron las amplificaciones siguiendo la técnica de ADNc-AFLP. Los productos obtenidos fueron separados en geles de poliacrilamida (Figura 18) y se reconocieron los fragmentos polimórficos, eventualmente pertenecientes a genes con transcripción diferencial, ya sea por activación o supresión, para los tratamientos control e inoculado con *F. virguliforme*, al momento de la llegada del hongo y 48 h posteriores a la llegada del patógeno. Se

detectaron 75 fragmentos diferencialmente expresados, según las distintas combinaciones de cebadores utilizados durante la técnica cDNA-AFLP. Para este trabajo de tesis fueron elegidas tres secuencias para su comprobación por PCR en tiempo real, las secuencias 22, 23 y 25. Como criterio para la selección de los fragmentos consideramos la evidente diferencia en la expresión, como así también, la calidad en la secuenciación.

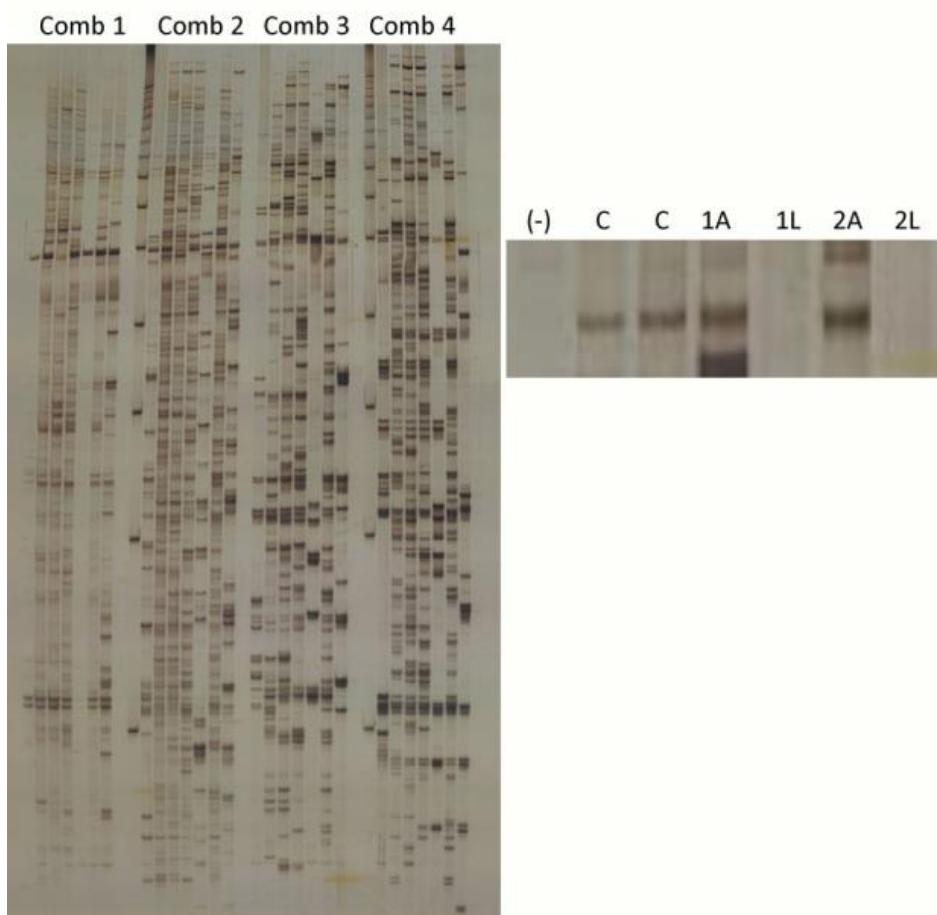


Figura 18: Gel de poliacrilamida en donde se muestran 4 combinaciones de cebadores específicos. La Figura ampliada muestra en detalle y a modo de ejemplo, un polimorfismo diferencial encontrado, donde (-): negativo; C: control 1A: raíz adyacente inoculada con Fv tiempo uno; 1L: raíz lejana inoculada con Fv tiempo uno; 2A: raíz adyacente inoculada con Fv tiempo dos; 2 L: raíz lejana inoculada con Fv tiempo dos.

Las secuencias nucleotídicas para cada gen elegido (22, 23 y 25), se muestran en la Tabla 5. A partir de ellas, se hizo el diseño de los cebadores, que se usaron para confirmar por PCR en tiempo real (Tabla 6).

Tabla 5: Secuencia de nucleótidos consenso obtenida para cada gen elegido previamente por cDNA-AFLP.

Secuencia consenso del Gen 22	ATAGCAGAGGATAGAAAGTAAAGCTTACAGGTTTTTATTTTTGAAATACATG AAAAACATTAGTATAAGAAAAGTGTGTGACAATACAAGAAAACATAAAAAA GAACTAAGTAGAACTGGAGCATGTTTATGGTTTAGTATGTTCAGTCTTTCATC TCTGTGTGTGTCTGTGGTGACATTGAAGATGACCTCGATGACATTGCAAGCTT TGACAGAAATCCGACATYGTAACATTGTAAGTTACATGGGTTTTGTTCAC
Secuencia consenso del Gen 23	GTAATAACAAGTGGGCTCCTATATGGTATTTGTGCCTGGCAGTAATTCATGCC CCTTGCTATGGCGTGTATTATCTGATAGTGCAAGCCAAAATACGATTCTCCC CAGATTGTTCCCTCAAGCATTGTTGTCATAGGAAGTTCCAGACTATGAAGGA ATCCTCAGACTATGAAGCATGTTGAGAAAAGGAAAATGCCGGTGGAAATTATA CCCAAGGTGATGGAGACAATATTCAAGAGGGTTCAGACTATGAAGGAATCCT CAGAGTTTTTGATTAGGGTATCTTTTATCGAGGTAAACAATAATGCTTGGTG
Secuencia consenso del Gen 25	CACCAACAACAGTCTTTACAGCTTCCCTTCTTTGTTTCCTCGTTCATTGGAGCT GATCTTCCATTTGTAACATCTGCTACTTGGGCCACGAATCCCTTATCCACCCG AAAGAAATGGTTAGTGTTATAGCCTCCAAGTCGCACAAGCTTATAAATGTGG TCCACAGTTTTAGGTGCAACAGTTGGATAGAAACCAAATTCAATATCTCCAT ACTTTGTCTGAAAGACGACGCGGGTCGATCCCAGTTCGGGTTCCAGAGCGGA AATTACAGATAT

Tabla 6: Secuencias de cebadores nucleotídicos específicos diseñados para validar los resultados por PCR en tiempo real.

Nombre	Orientación	Secuencia (5'-3')	Amplificación (pb)
Primer 22	Left Primer	AGAACTAAGTAGAACTGGAG	105
	Right Primer	GCTTGCAATGTCATCGAG	
Primer 25	Left Primer	CAGCTTCCCTTCTTTGTTC	121
	Right Primer	CGACTTGGAGGCTATAAC	
Factor de Elong. 1α	Left Primer	CTGTAACAAAATGGATGCTA	106
	Right Primer	GTCAGGGTTGTATCCTACTT	
Primer 23	Left Primer	ACGATTCTCCCCAGATTG	147
	Right Primer	ACCCTCTTGAATATTGTCTC	

Los resultados se calcularon relativos al control sin inocular, y se calibraron mediante los valores de Ct del gen del factor de elongación 1 α . Los niveles de concentración relativa de los transcritos obtenidos para los genes evaluados (22, 25 y 23) se detallan en la Tabla 7. Los datos se expresaron como RAFv, para muestras extraídas a partir de raíz adyacente al sitio de infección, en el momento en que *F. virguliforme* contactó la raíz de soja (T1) y a las 48 hs (T2). RLFv representa muestras de raíces lejanas al sitio de infección, tomadas a T1 y a T2.

Tabla 7: Concentraciones relativas de los transcritos de los tres genes evaluados (Gen 22, 25 y 23) en raíces de soja durante la interacción con *Fusarium virguliforme*

Gen Evaluado	Control	RAFv T1	RLFv T1	RAFv T2	RLFv T2
<i>Gen 22</i>	1	2.86	1.01	0.48	2.09
<i>Gen 25</i>	1	1.14	0.63	0.93	0.79
<i>Gen 23</i>	1	1.25	1.07	0.8	1.08

RAFv T1: raíz adyacente inoculada con Fv tiempo uno; **RAFv T2:** raíz adyacente inoculada con Fv tiempo dos; **RLFv T1:** raíz lejana inoculada con Fv tiempo uno; **RLFv T2:** raíz lejana inoculada con Fv tiempo dos

De los tres genes analizados en nuestro sistema experimental, el *Gen 22* mostró diferencias significativas en sus niveles de expresión relativa con respecto al control sin inocular.

Este gen fue inicialmente seleccionado (cDNA-AFLP) por ausencia de banda en plantas infectadas con Fv. Estos primeros resultados nos hicieron pensar que, el *Gen 22* se comporta de manera diferencial con respecto a las plantas sanas (C), es decir, que estaría inhibido en presencia de Fv en ambos tiempos.

Cuando se repitieron los ensayos para corroborar estos resultados, y se analizó su comportamiento (Figura 19), se pudo observar un incremento de 186% respecto al control durante el tiempo 1 en la zona adyacente a la entrada de Fv, con una caída notable en su expresión luego de 48 horas (-52%). Para las zonas alejadas a la entrada del patógeno, durante las primeras horas de interacción no hubo diferencias con los controles. Sin embargo, este mismo gen se mostró sobre-expresado respecto al control (109%) luego de 48 horas (Figura 19).

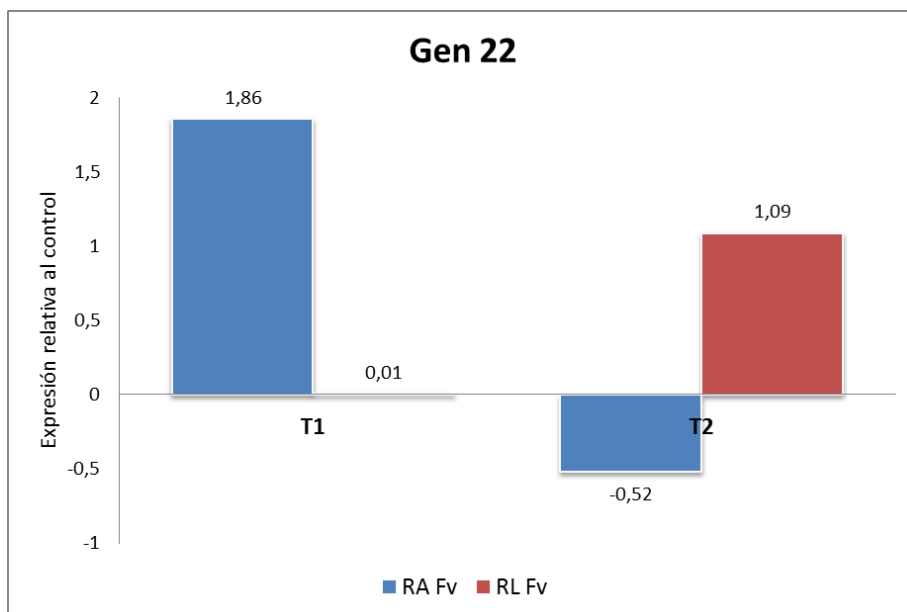


Figura 19: Expresión relativa al control de los transcritos correspondientes al *Gen 22*. En el grafico están representados T1: momento en el que Fv entra en contacto con la raíz y T2: 48 hs posteriores a la llegada de Fv. **RA Fv:** Raíz Adyacente al punto de inóculo Fv y **RL Fv:** Raíz Lejana al punto de inóculo Fv. El Control sin inocular se grafica como 0.

La identidad de la secuencia amplificada como *Gen 22* fue determinada mediante el programa MegaBlastn de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Se determinó un 100% de identidad con un receptor rico en dominio repetitivo de leucinas con características de serina/treonina kinasa (*Glycine max probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase*) (Tabla 8).

Tabla 8: Resultados obtenidos a partir de la comparación de la secuencia 22 contra la base de datos del Genbank (según el programa blastn)

Descripción	Max core	Total Score	Query cover	e-value	Ident	Accession
Glycine max probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	385	489	100%	1,00E-105	100%	XM_006599002.1
Glycine max probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	257	362	100%	3,00E-67	90%	XM_003555102.2
Glycine max probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	99.0	99.0	22%	2,00E-19	97%	XM_003548498.2

DISCUSIÓN

El desarrollo de un método *in vitro* nos permitió obtener plantas de soja jóvenes y saludables, poder infectarlas con *F. virguliforme* y hacer un seguimiento del proceso infeccioso en tiempo real. Este sistema es muy adecuado para el estudio de los eventos tempranos de la interacción con patógenos de raíces, ya que es posible hacer un seguimiento minucioso de la llegada del hongo a la raíz de la planta.

La posibilidad de comprender qué ocurre durante la interacción soja/ *F. virguliforme*, nos permite caracterizar el tipo de respuesta de defensa que se establece luego de una interacción compatible entre ambos organismos; en especial, durante las primeras etapas de esta interacción huésped-patógeno.

Los resultados obtenidos muestran que, en raíces de soja con 7 días de crecimiento en condiciones *in vitro*, la presencia de micelio de *F. virguliforme* provoca cambios en la expresión de un importante número de genes, tanto durante el período comprendido entre la llegada del patógeno a la raíz como 48 hs posteriores al primer contacto. También se ha comprobado que estos cambios no sólo ocurren en zonas próximas a la entrada del patógeno, observándose un comportamiento de expresión diferencial en zonas de la raíz que no están en íntima relación con *F. virguliforme*.

Cuando se analizaron los resultados de validación mediante PCR en tiempo real, se pudo observar que, cuando el patógeno entra en contacto con la planta (T1), la expresión del gen 22, mostró un marcado aumento en la transcripción en las zonas adyacentes al punto de infección con *F. virguliforme* (RA Fv: 182%), sin evidencias de cambios en las zonas distantes (RL Fv). Notablemente, luego de 48 hs de ocurrida la infección, la cantidad de transcriptos en RA Fv disminuyó significativamente pero aumentó en las zonas lejanas a la infección llegando a niveles que duplican el nivel de expresión normal del gen.

El gen que aquí denominamos 22 tiene una identidad del 100% con un receptor LRR treonina/serina quinasa. Ha sido demostrado que muchos miembros de la familia de receptores ricos en leucina (LRR) tipo quinasa (RPK), tienen función de proteínas receptoras (PRR) (Gomez-Gomez et al., 2001; Shiu et al., 2004; Song et al., 1995; Zipfel et al., 2006). Dada la estructura molecular del Gen 22, es decir su identidad con un RPK, no es sorprendente que se active tempranamente frente a la presencia de *F. virguliforme*.

Las plantas han evolucionado diferentes tipos de estrategias para combatir tanto a razas particulares de patógenos como a cambios en sus poblaciones. Actualmente se estima

que los receptores tipo quinasas (receptor like kinase, RLK), que conforman una familia de genes en expansión, han permitido una acelerada evolución entre dominios implicados en el reconocimiento o recepción de señales, típicamente mediante un dominio rico en repeticiones de leucinas (LRR) (Shiu and Bleecker, 2003).

En este modelo, la familia de RLKs representa una adaptación específica de las plantas que conduce a la producción de un variado menú de receptores en la superficie de las células y receptores citoplásmicos.

Más recientemente se ha postulado la teoría de que los dominios LRR de los RLK pueden interactuar con un diverso grupo de proteínas que determinan señales de respuesta específica. De allí que los RLK parecen tener un papel fundamental en la etapa de reconocimiento del patógenos y la subsecuente activación de los mecanismos de defensa de las plantas (Afzal *et al.*, 2008)

El proceso por el cual se da esta cascada de señales ha sido estudiada intensamente y se conoce hoy que los RPKs constituyen los primeros eslabones en la denominada inmunidad innata de las plantas que está basada en el reconocimiento de patrones (plant pattern recognition receptor, PRRs) (Lacombe *et al.*, 2010) Estos receptores captan diversos patrones moleculares asociados a microbios (microbe associated molecular patterns (MAMPs), a patógenos (pathogen associated molecular patterns (PAMPs) e inclusive a daño en pared celular (damage associated molecular patterns, DAMPs). La respuesta gatillada por los RPKs es inmediata y converge con señales controladas por PKs activadas por Ca⁺ y por proteínas quinasas con propiedad mitógena (mitogen-activated PK, MAPK). Toda esta red de señalización actúa controlando la actividad y síntesis de una cantidad de factores de transcripción, enzimas, hormonas, péptidos antimicrobianos, etc. que finalmente contribuyen a la resistencia contra bacterias, oomicetes y hongos (Tena *et al.*, 2011).

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo han mostrado que, durante la interacción *in vitro* soja/ *F. virguliforme*, la presencia de *F. virguliforme* provoca un aumento de los transcritos de un gen homólogo a la enzima UDP-Glucosa dehidrogenasa (Giachero and Ducasse, 2012), la cual se ha sugerido que es la reguladora de la expansión de la pared celular (Robertson *et al.*, 1995). En este trabajo se observó además que, esta regulación es más fuerte en las zonas adyacentes a la entrada del patógeno, comparados con los cambios ocurridos en los sitios distantes. En aquel momento, se sugirió que habría una respuesta espacial relacionada con la reacción de defensa inducida; ya que, como se ha explicitado más arriba, cuando la célula detecta la

presencia de un organismo patógeno, se activan una serie de mecanismos de defensa, y que esta reacción es más inmediata a nivel local, en el tejido que está más próximo o directamente en contacto con el patógeno. Consecuentemente, es más débil a nivel sistémico, en los tejidos no infectados de la planta (Benezer-Benezer *et al.*, 2008).

En base a lo observado en esta tesis y, con los datos obtenidos previamente (Giachero and Ducasse, 2012), se propone que la interacción planta patógeno comienza antes de que este último entre en contacto físico con el hospedante. Existen factores difusibles que alertan al hospedante de la llegada del patógeno activando su respuesta de defensa. Esa activación de la respuesta se aprecia en un incremento de la transcripción de genes que codifican para las RLKs que actúan como PRRs.

De esta manera, para el momento en que la pared celular de las células de la raíz han sido alteradas y liberados los denominados DAMPs, ya existen otras moléculas (los factores difusibles) que le estarían indicando a la planta que está siendo atacada por un patógeno.

Seguido de la esporulación del hongo, ocurre lesión con ruptura de tejidos, permitiendo la expansión del mismo dentro del hospedante (Prins *et al.*, 2000). El proceso de penetración ocurre por degradación de la cutícula externa, por acción de cutinasas y lipasas (Laluk and Mengiste, 2010). Una vez que penetran la cutícula, los hongos necrótrofos tienen una estrategia espacial y temporal para atacar la pared celular vegetal, mediante la producción de varias enzimas que degradan la pared celular (CWDEs, del inglés: Cell Wall Degrading Enzymes).

Como se planteó antes, las proteínas (LRR-RPK), pueden reconocer tanto DAMPs (Vorwerk *et al.*, 2004; Cantu *et al.*, 2008) como PAMPs (Miedes *et al.*, 2014). En ambos casos, los RPK disparan rápidamente señales de defensa convergentes que determinan un amplio repertorio de acciones para detener el avance del patógeno.

Sánchez-Rodríguez sugiere que algunas PRK pueden estar involucradas en la detección de patógenos o en perturbaciones inducidas por el desarrollo de la integridad de la pared celular (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2009). Los autores observaron que la PRK ERECTA (ER) en *Arabidopsis*, actúa como sensor de la integridad de la pared celular en respuesta a fragmentos de pared liberados a causa del daño generado por patógenos. Dado que la naturaleza de estos restos de pared son desconocidas, ellos sugieren que los oligogalacturonidos, que han demostrado activar el sistema inmune de las plantas (Denoux *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2008), podrían ser potenciales candidatos. De esta manera,

proponen que la función específica de la PRK ER durante la regulación de la resistencia a enfermedades mediadas por la pared celular es distinta de su papel en el desarrollo.

CONCLUSIÓN

Aunque muchas otras interpretaciones son posible, los datos presentados aquí, sugieren que el hongo necrótrofo *Fusarium virguliforme* es capaz de activar una reacción de defensa inducida, durante los primeros momentos del proceso infeccioso en plantas de soja, incluso antes de entrar en contacto físico con el futuro hospedante. Como mecanismo se propone que, es posible que ocurra una activación temprana por factores difusibles del hongo (PAMPs) que alertan a la planta de su presencia. Estos PAMPs serían los responsables del incremento en la transcripción de genes codificantes de PRRs (como la LRR-PK llamada *Gen 22* en esta tesis). Además, estas respuestas defensivas se sinergizarían poco más tarde como respuesta a la acción de enzimas hidrolíticas del patógeno, las cuales producen compuestos elicitores de la planta (DAMPs), que pueden actuar de dos maneras. Tanto los PAMPs como los DAMPs serían capaces de activar de manera directa una cascada de señales mediante las MAPKs, lo cual se vería reflejado primero en un aumento de los PRRs y luego en un incremento en la expresión del gen UDP-Glucosa dehidrogenasa de manera temprana. Este aumento es indicativo de una reorganización de la pared celular, como mecanismo de defensa basal.

BIBLIOGRAFÍA

- Afzal, A. J, Wood, A. J., & Lightfoot, D. A. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5), 507-517.
- Aoki, T., O'Donnell, K. & Scandiani, M. M. (2005). Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, 46,162–183.
- Aguero, C.B.; Uratsu, S.L.; Greve, C.; Powell, A.L.T.; Labavitch, J.M.; Meredith, C. P., *et al.* (2005). Evaluation of tolerance to pierce's disease and *botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology*. 6, 43–51. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00262.x
- Bellincampi, D., Cervone, F., & Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5, 228. doi: 10.3389/fpls.2014.00228.
- Benezer-Benezer, M.,Castro-Mercado, E. & García-Pineda, E. (2008). La producción de Especies Reactivas de Oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26, (1) 56-61.
- Bressano M.; Giachero M. L.; Luna C.M.; Ducasse D.A. (2010). An *in vitro* method for examining infection of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 201-204.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., & De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall associated kinase1(WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 9452–9457. doi: 10.1073/pnas.1000675107
- Cantu, D., Vicente, A. R., Labavitch, J. M., Bennett, A. B., & Powell, A. L. (2008). Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends Plant Sci.* 13, 610–617.doi:10.1016/j.tplants.2008.09.002
- Cantu, D., Vicente, A. R., Labavitch, J. M., Bennett, A. B., & Powell, A. L. (2008). Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in Plant Science*, 13, 610–617.doi:10.1016/j.tplants.2008.09.002.
- Caprari, C., Bergmann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., *et al.* (1993). *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43, 453–462 10.1006/pmpp.1993.1073.
- Carpita, N., & McCann, M. (2000). The cell wall in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds B. B. Buchanan, G. Wilhelm, and R. L. Jones (Rockville, IL: American Society of Plant Physiologists), 52–108.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124, 803-814.

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156–159.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 850–861. doi:10.1038/nrm1746.
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341(6147), 746-751.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., de Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F. M. & Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Molecular Plant*, 1, 423-445.
- D'Ovidio R., Mattei B., Roberti S., & Bellincampi D. (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1696237–244 10.1016/j.bbapap.2003.08.012
- Dodds, P.N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11, 539–548. doi: 10.1038/nrg2812.
- Engelsdorf, T., & Hamann, T. (2014). An update on receptor-like kinase involvement in plant cell wall integrity maintenance. *Annals of Botany*, doi: 10.1093/aob/mcu043.
- Ferrari S., Savatin D. V., Sicilia F., Gramegna G., Cervone F., & De Lorenzo G. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 4, 49. doi:10.3389/fpls.2013.00049.
- Ferrari, S.; Sella, L.; Janni, M.; Favaron, F., & D'Ovidio, R. (2012). Transgenic expression of polygalacturonase inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Biology* (Stuttgart, Germany), 14, 31–38. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00449.x.
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275-296 (Volume publication date September 1971) DOI: 10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., *et al.* (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defence. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 498, 219–222. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02456-5
- Giachero, M. L., & Ducasse, D. A. (2012) *El Síndrome de Muerte Súbita en soja*. Editorial Académica Española ISBN 978-3-8454-8192-0.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–27 doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., & Boller, T. (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:1155-1163.
- Guo, M., Zhai, Y. F., Lu, J. P., Chai, L., Chai, W. G., Gong, Z. H., & Lu, M. H. (2014). Characterization of CaHsp70-1, a pepper heat-shock protein gene in response to

- heat stress and some regulation exogenous substances in *Capsicum annuum* L. International Journal of Molecular Sciences, 15(11), 19741-19759.
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. Plant Molecular Biology, 44, 321-334.
- Hematy, K., Cherk, C., & Somerville, S. (2009). Host–pathogen warfare at the plant cell wall. Current Opinion in Plant Biology, 12, 406-413.doi:10.1016/j.pbi.2009.
- Huffaker, A.; Dafoe, N.J.; & Schmelz, E.A. (2011). ZmPep1, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. Plant Physiology, 155, 1325-1338.
- Huffaker, A., Pearce, G., & Ryan, C. A. (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103, 10098-10103.
- Johal, G. S., & Briggs, S. P. (1992). Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. Science, 258(5084), 985-7.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. Nature, 444, 323-329.
- Kim, M. G., da Cunha, L., McFall, A. J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J. L., & Mackey, D. (2005). Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4 Regulated Basal Defense in *Arabidopsis*. Cell, 121(5), 749-759, ISSN 0092-8674, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.025>.
- Lacombe S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E., Peeters N., Dahlbeck D., van Esse H.P., Smoker M., Rallapalli G., Thomma B.P.H.J., Staskawicz B., Jones J.D.G. & Zipfel, C. (2010). Inter-family transfer of a plant pattern recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nature Biotechnology, 4, 365-369.
- Laluk, K.; Mengiste T. (2010). Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? The *Arabidopsis* book/American Society of Plant Biologists, 8. doi: 10.1199/tab.0136. PMC3244965.
- Lee, I., Seo, Y. S., Coltrane, D., Hwang, S., Oh, T., Marcotte, E. M., & Ronald, P. C. (2011). Genetic dissection of the biotic stress response using a genome-scale gene network for rice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(45), 18548-18553.
- Lionetti, V., & Métraux, J. P. (2014). Plant cell wall in pathogenesis, parasitism and symbiosis. Frontiers in Plant Science, 5, 612. doi:10.3389/fpls.2014.00612
- Macho, A. P., & Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. Molecular Cell, 54, 263–272. doi:10.1016/j.molcel.2014. 03.028
- Malinovskiy, F. G., Fangel, J. U., & Willats, W. G. T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. Frontiers in Plant Science, 5, 178. doi:10.3389/fpls.2014. 00178
- Miedes, E., Wout Boerjan, R., & Molina, A. (2014) The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. Frontiers in Plant Science, 5, 358. doi: 10.3389/fpls.2014.00358
- Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M. A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G. J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M. A., & Valpuesta, V. (2008). Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). Plant Journal, 54, 43-55.

- Prins, T. W., Tudzynski, P., von Tiedemann, A., Tudzynski, B., Ten Have, A., Hansen, M. E., ... & van Kan, J. A. (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. *Fungal Pathology*, 33-64. Springer Netherlands.
- Ringli, C. (2010). Monitoring the outside: cell wall-sensing mechanisms. *Plant Physiology*, 153, 1445–1452. doi:10.1104/pp.110.154518.
- Robertson, D., McCormack, B. A., & Bolwell, G. P. (1995). Cell wall polysaccharide biosynthesis and related metabolism in elicitor-stressed cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biochemical Journal*, 306, 745-50. (Printed in Great Britain)
- Sánchez-Rodríguez, C., Estévez J. M., Llorente, F., Hernández-Blanco, C., Jordá, L., Pagán, I., Berrocal, M., Marco, Y., Somerville, S., & Molina, A. (2009). The ERECTA Receptor-Like Kinase Regulates Cell Wall-Mediated Resistance to Pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22,8, 953-963
- Sarkar, P., Bosneaga, E., & Auer, M. (2009). Plant cell wall sthroughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3615–3635. doi:10.1093/jxb/erp245.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., & Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470.
- Schulze-Lefert, P. (2004). Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 377-383. doi: 10.1016/j.pbi.2004.05.004
- Segonzac, C., & Zipfel, C. (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 14,54-61, ISSN 1369-5274
- Shiu, S. H., & Bleecker, A. B. (2003). Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene-family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132, 530-543
- Shiu, S. H.; Karlowski, W. M.; Pan, R.; Tzeng, Y. H.; Mayer, K. F.; Li, & W. H. (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, 16, 1220-1234.
- Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., ... & Ronald, P. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, 270(5243), 1804-1806.
- Tena G.; Boudsocq, M.; Sheen J. (2011). Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 14(5), 519-529, ISSN 1369-5266.
- Thomma, B. P., Nürnberger, T., & Joosten, M. H. (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, 23(1), 4-15. doi: 10.1105/tpc.110.082602.
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current opinion in plant biology*, 13(4), 459-465.
- van Kan, J. A. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247-253.

- Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in plant disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9, 203-209. doi:10.1016/j.tplants.2004.02.005.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., ... & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.
- Vuylsteke M., Peleman J. D., & van Eijk, M. J. (2007). AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols*, 2(6), 1399-413
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
- Wolf, S., Hématy, K., & Höfte, H. (2012). Growth control and cell wall signalling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 381-407. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105449.
- Xiao, X., Li, H., & Tang, C. (2009). A silver-staining cDNA-AFLP protocol suitable for transcript profiling in the latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Molecular Biotechnology*, 42,91–99
- Zhang L., Kars I., Essenstam, B., Liebrand, T.W., Wagemakers, L., Elberse, J., Tagkalaki, P., Tjoitang, D., van den Ackerveken, G., & van Kan, J.A. (2014). Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the *Arabidopsis* receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiology*, 164(1):352-64. doi: 10.1104/pp.113.230698.
- Zhou, M. L., Ma, J. T., Pang, J. F., Zhang, Z. L., Tang, Y. X., & Wu, Y. M. (2010). Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors. *African Journal of Biotechnology*, 9(54), 9255-9279.
- Zipfel, C.; Kunze, G.; Chinchilla, D.; Caniard, A.; Jones, J. D.; Boller, T.; Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125, 749-760

Capítulo 3

Desarrollo de metodologías para obtener plantas de soja micorrizadas in vitro

Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA): R. irregularis

INTRODUCCIÓN

Cultivo in vitro de micorrizas

A lo largo de la evolución, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se han tornado en organismos completamente dependientes de su huésped desarrollando una relación de simbiosis obligada. Existen evidencias de la asociación simbiótica de los HMA y las plantas, que data de 450 millones de años (Redecker *et al.*, 2000). Por ello, esta simbiosis en particular, considerada ancestral es probablemente la que ha permitido la transición de las plantas desde el agua a la tierra firme (Selosse and Le Tacon, 1998). Este grado extremo de dependencia que presentan los HMA con sus plantas hospedante, ha dificultado el estudio de muchos aspectos de la biología de los mismos.

Hasta el momento es imposible cultivar un HMA independientemente de su planta hospedante, por lo que el desarrollo de metodologías de cultivo *in vitro* para hongos formadores de micorrizas ha revolucionado la forma de estudiar esta compleja simbiosis, y ha proporcionado un poderoso modelo para estudiar cómo se relacionan los socios en esta interacción. Desde mediados de los años 70, tres grandes avances se han logrado en el campo de cultivo *in vitro* de HMA. Mosse y Hepper (1975) obtuvieron por primera vez cultivos puros de HMA, es decir, cultivos monoaxénicos. En 1986, Strullu and Romand lograron el primer subcultivo de un HMA en un sistema de aislamientos sucesivos de raíces micorrizadas, pudiendo re-asociarlo con diversos sistemas de raíces. Esto fue un paso fundamental para la conservación en el tiempo de cultivos puros de HMA. Posteriormente, Bécard y Fortin (1988), adaptaron la tecnología de raíces transformadas mediante *Agrobacterium rhizogenes* para el crecimiento y desarrollo de HMA. La combinación de todos estos hallazgos ha permitido obtener colecciones de cultivos puros.

Obtención de cultivos puros de hongos micorrícicos arbusculares

El proceso para obtener y mantener cultivos monoaxenicos de HMA puede ser dividido en cuatro etapas. Estas son, (1) la selección de un inóculo de HMA, (2) el muestreo y la desinfección e incubación de los inóculos en un medio de crecimiento adecuado, (3) la asociación de los inóculos con una raíz hospedante, y (4) el subcultivo de los HMA.

Previo a estos cuatro pasos, están (a) la selección de un sistema de cultivo apropiado, (b) la preparación de un medio de cultivo sintético, y (c) el manejo de la raíz hospedante, esto es transformación y subcultivo.

a. En cuanto a los sistemas de cultivos, básicamente se utilizan dos: el sistema mono-compartimentado y el sistema bi-compartimentado. El primero consiste en una placa de *Petri* de un solo compartimento con medio de crecimiento adecuado, libre de contaminantes, donde se coloca una raíz junto con el inóculo del HMA. Este sistema fue desarrollado a mediados de la década de 1970 (Mosse and Hepper, 1975) y desde entonces ha sido aplicado con éxito en numerosas especies de *Glomus*. También ha sido utilizado con otros HMA como *Scutellospora reticulata* (de Souza and Declerck, 2003) and *Acaulospora rehmi* (Dalpé and Declerck, 2002). Luego, este sistema fue sutilmente modificado para especies de *Gigaspora* (*G. margarita*, *G. roseae*, *G. gigantea*) (Bécard and Fortin, 1988; Bécard and Piché, 1992; Diop *et al.*, 1992).

El segundo sistema de cultivo consiste en una placa de *Petri* dividida en dos compartimentos, en uno de ellos se pone a crecer la raíz micorrizada en medio de crecimiento sintético. En el otro compartimento se permite el crecimiento del micelio en un medio sintético similar, pero sin fuente de carbono. Ambos compartimentos son físicamente separados por una pared plástica. Este sistema fue desarrollado en 1996 por St-Arnaud y colaboradores.

En el sistema bi compartimentado, la densidad de micelio y esporas producidas en el compartimento distante es marcadamente superior que el producido en el compartimento próximo a la raíz, y esto está relacionado probablemente a la ausencia de raíz y a la diferencia en la disponibilidad de carbono (Fortin *et al.*, 2002), haciendo a este sistema más productivo que el mono-campartimentado.

b. Los medios más ampliamente utilizados para cultivo monoaxénico de HMA son el medio mínimo (M) (Bécard and Fortin, 1988) y el medio Strullu-Romand modificado (MSR) (Declerck *et al.*, 1996, de Diop, 1995, modificado de Strullu and Romand, 1986). Ambos medios son una modificación empírica de los medios usualmente utilizados para cultivo *in vitro* de plantas y se aplican con éxito para un amplio rango de HMA.

c. Las transformaciones genéticas de raíces con *Agrobacterium rhizogenes* Conn. fueron logradas hace décadas (Riker *et al.*, 1930; Ark and Thompson, 1961), pero recién a mediados de 1980 se comenzó a utilizar para el estudio de micorrizas (Mugnier and Mosse, 1987).

El desarrollo de líneas de raíces de zanahoria (*Daucus carota* L.) transformadas (Bécard and Fortin, 1988), las ha convertido en el huésped más ampliamente usado para cultivar HMA. Se ha visto que, la asociación entre estas raíces transformadas y los HMA muestran mayor colonización intraradical y producen mayor desarrollo de hifas extraradicales que las raíces no transformadas, lo cual es una ventaja para la producción de estos hongos (Fortin *et al.*, 2002). Sin embargo, todas las etapas del crecimiento del hongo (como el patrón de colonización, distribución de vesículas, mecanismos de esporulación y propagación de las micorrizas) pueden variar según el hospedante utilizado (Tiwari and Adholeya, 2003).

Selección del inóculo fúngico

Dos tipos de inóculo pueden ser usados para iniciar un cultivo monoaxénico: (1) esporas o esporocarpos, y (2) fragmentos de raíces micorrizadas conteniendo vesículas o vesículas aisladas (Fortin *et al.*, 2002). Dependiendo del HMA, a menudo un tipo de inóculo se adapta mejor que el otro para iniciar el cultivo puro. Para las especies de micorrizas que producen esporas de tamaño muy pequeño (diámetro < 100 µm), la desinfección es a menudo difícil de lograr. Las especies que producen este tipo de esporas también producen un alto número de vesículas dentro de la raíz, estas son *G. intraradices*, *G. proliferum*, y pueden ser considerados como inóculo para iniciar un cultivo monoaxénico. La germinación de las vesículas aisladas o dentro de segmentos de raíz es rápida y eficiente. En el caso de segmentos de raíces micorrizadas, la germinación que surge de las extremidades de la raíz es múltiple (Diop *et al.*, 1994; Declerck *et al.*, 1996), incrementando el potencial de infección. Por el contrario, para especies que producen pocas vesículas (algunas especies de *Glomeraceae*, como *G. caledonium*, *G. mosseae*, etc.) o no producen vesículas (las *Gigasporaceae*) y producen grandes esporas (diámetro > 150 µm), las esporas son usadas como inóculos. Cuando el hongo produce esporocarpos, estos son los inóculos más apropiados para iniciar el cultivo monoaxénico por su germinación múltiple.

A pesar de la gran variedad de aplicaciones, el uso de cultivo de órganos de raíz (ROC, del inglés: root organ culture) presenta algunas limitaciones para el estudio de la simbiosis de los HMAs. Estas van desde la ausencia de tejidos fotosintéticos a un desajuste en el balance hormonal. En este sentido, el estudio de los mecanismos fisiológicos involucrados en el transporte de minerales y carbohidratos del hongo a los brotes de la planta y viceversa, puede verse modificado por la ausencia de tejido

fotosintético. De la misma manera, la adición de sacarosa al medio de cultivo, para compensar la falta de fotosintatos puede modificar la bioquímica de la interacción planta-hongo. En este contexto, el desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* con plantas autotróficas asociadas a hongo MA parece fundamental.

Inicialmente, Mosse (1962) estableció el primer sistema de cultivo *in vitro* en donde asoció plantas enteras (como trébol, maíz, cebolla, pepino, pasto ovillo) con el hongo *Endogone* sp., y los hizo crecer en un medio salino inorgánico.

En las siguientes dos décadas varios autores experimentaron la asociación *in vitro* de un HMA con una planta hospedante en medio líquido o agarizado (Mosse and Phillips, 1971; Strullu and Romand, 1986). A mediados de los noventa, Elmeskaoui y colaboradores (1995) desarrollaron un sistema de cultivo tripartito, asociando en un sólo contenedor, raíces de zanahoria micorrizadas con plántulas de frutillas. Este sistema fue utilizado para investigar el estrés hídrico (Hernandez-Sebastia *et al.*, 1999, 2000) y el efecto de CO₂ en la formación de micorrizas (Louche-Tessandier *et al.*, 1999). Sin embargo estos sistemas también presentaban limitaciones, posiblemente debido a la complejidad de tener tres organismos en un mismo sistema. Voets y col. (2005) desarrollaron un sistema de cultivo *in vitro* en donde, las raíces de las plantas se asociaban al HMA en un medio de cultivo sólido, bajo estrictas condiciones *in vitro*, mientras que la parte aérea de la planta (parte fotosintética) se desarrollaba fuera del sistema, al aire libre. Aquí, los autores evaluaron la producción de esporas generadas, el desarrollo de la planta y del hongo, la capacidad germinativa de las esporas producidas y la habilidad del HMA de micorrizar plantas de papa (*Solanum tuberosum*). Este sistema de cultivo autótrofo fue aplicado con éxito en diferentes cultivares de *S. tuberosum* como así también en cultivos de *Medicago truncatula* L. (Voets *et al.*, 2005). Con este sistema los autores obtuvieron esporas en gran cantidad (approx. 12.000 esporas), aunque se requirió mucho tiempo para lograrlo (alrededor de 22 semanas), posiblemente debido al tiempo que se necesita para que las esporas del hongo germinen, crezcan, alcancen la raíz y se desarrollen dentro de estas. Con la idea de optimizar los tiempos de micorrización, Voets y col. (2009) modificaron este sistema autótrofo parcialmente cerrado, y propusieron el uso de una planta donadora de micelio (PDM) para permitir una rápida, amplia y homogénea colonización de las raíces. Más recientemente, Gallou y col. (2010) demostraron la eficiencia de este sistema *in vitro* con PDM para estudiar los cambios en la expresión de genes de defensa durante las diferentes etapas de la colonización de raíz con HMA (pre-colonizado, colonización temprana y estado tardío) en plántulas de papa, ya que permite sincronizar el desarrollo del

hongo dentro de la raíz. En un trabajo posterior, Gallou (2011) analizó la expresión génica (*GST1*, *Lox*, *MAPK* and *PAL*) durante diferentes estados de la simbiosis papa- *Glomus* sp. MUCL 41833, y comprobó que esta metodología *in vitro* puede ser utilizada para estudiar cambios en la expresión de genes asociados a la simbiosis plantas-HMA.

Este sistema también ha sido probado en cultivo de gran porte, como son plantas de banana y caucho (Koffi *et al.*, 2009; Sosa-Rodriguez *et al.*, 2013). Koffi y col. (2013) destacan el interés de este sistema de cultivo *in vitro* como una herramienta prometedora para investigar los factores bioquímicos y los mecanismos moleculares implicados en la bio-protección conferida por HMA, ya que han podido comprobar el efecto atenuador sobre una población de nematodos que afectan raíces de banana.

Hasta el momento no se ha reportado el uso de esta metodología de cultivo *in vitro* en plantas de soja, posiblemente porque este cultivo alcanza gran tamaño en poco tiempo. Sin embargo, es sabido que estos sistemas de cultivo *in vitro* tienen varias ventajas, que hacen crecer nuestro interés en el uso de esta metodología para evaluar mecanismos moleculares. Entre las ventajas de este sistema, encontramos que la planta puede crecer de manera autótrofa, es decir, sin suministro extra de fuentes de carbono. De esta manera es la raíz la única fuente de carbono para el desarrollo de hongos; el hecho de que sea una metodología *in vitro* permite tener controlado el sistema, con ausencia de otros microorganismos. Además, brinda la posibilidad de supervisar, de manera no destructiva, el desarrollo de los microorganismos en estudio y la pureza y calidad de las extracciones de RNA/DNA (Croll *et al.*, 2009).

OBJETIVO ESPECÍFICO

Con todo lo expuesto, en este capítulo se plantea el siguiente **Objetivo específico:**

- Desarrollar un método de inoculación e infección *in vitro* de plantas de soja con hongos micorrízico arbusculares (HMA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para obtener un cultivo puro de hifas micorríticas *in vitro*, se micorrizaron raíces de zanahoria (*Daucus carota* L.) transformadas mediante *Agrobacterium rhizogenes* (Fortin *et al.*, 2002).

Para ello se usó como inóculo micorrícico esporas *Rhizophagus irregularis* aisladas de suelo de macetas mantenidas en invernadero con plantas de trébol (*Trifolium repens*) micorrizado (durante al menos 3 meses) y fragmentos cortos de raíces de estas plantas de trébol.

Aislamiento del inóculo micorrícico: Las muestras de suelo fueron tomadas al azar y las raíces de las plantas de trébol separadas para su posterior desinfección. El suelo fue lavado con agua corriente haciéndolo pasar por sucesivos tamices (710 μm - 45 μm). Lo recolectado en el tamiz de 45 μm fue colocado en un tubo de centrífuga de 50 ml hasta completar la mitad del volumen. Luego se agregó un volumen igual de una solución de sacarosa 60% (p/v). Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min. Las esporas fueron obtenidas con una jeringa de la interfase formada entre las dos capas, y fueron colocadas en una placa de *Petri*.

Desinfección del inóculo micorrícico: Tanto las esporas de HMA como los fragmentos de raíces micorrizadas de trébol (*Trifolium repens*) fueron lavados reiteradas veces con agua destilada, para eliminar los restos de suelo. Luego se transfirieron a un aparato de filtrado para su desinfección superficial. Se trataron con una solución de etanol 95%, durante 2 min. Se enjuagaron sucesivas veces con agua destilada estéril y se mantuvo el inóculo durante 10 min en una solución de cloramina T 2% (con 2 gotas de Twen 20). Cuando la solución fue filtrada, el papel de filtro con las estructuras desinfectadas fue cuidadosamente colocado en una placa de *Petri* estéril. Bajo condiciones asépticas (en cámara de flujo laminar) y usando un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800) las esporas fueron transferidas y colocadas en medio mínimo solidificado con GelGro. Las placas se mantuvieron en oscuridad a 25°C durante 72 hs, ya que el proceso de germinación de las esporas se inicia generalmente a partir del tercer día de incubación. Se considera que una espора ha germinado cuando se detecta la aparición de tubo germinativo.

Micorrización de raíces transformadas de zanahoria: Los fragmentos de raíces que mostraron crecimiento de micelio fúngico o aquellas esporas que lograron germinar, fueron transferidos a cajas de *Petri* con raíces transformadas de zanahoria creciendo en medio de

cultivo modificado de White (medio M) solidificado con 3 gl^{-1} de Phytigel TM (SIGMA). Las placas fueron conservadas durante 5-6 meses a 25-28°C en oscuridad (Figura 20).

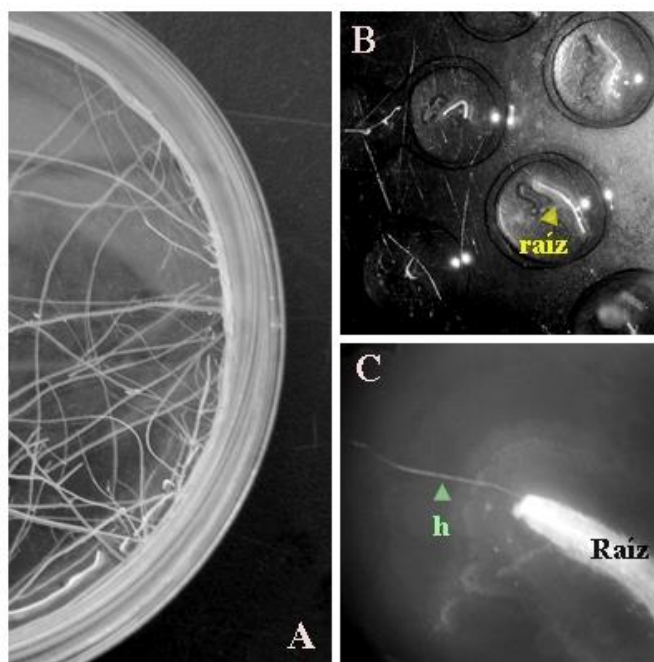


Figura 20: **A:** Raíces transformadas de zanahoria creciendo en medio de cultivo modificado de White (medio M) solidificado con Phytigel TM (SIGMA). **B:** Fragmentos de raíces de trébol micorrizadas con *R. irregularis*, colocadas en gotas de medio mínimo solidificado con Gel-Gro, para permitir el desarrollo de hifas extraradicales. **C:** Observación en lupa de un fragmento de raíz de trébol con desarrollo de una hifa (h) de *R. irregularis* creciendo en medio mínimo.

Dado que no fue posible establecer una micorrización efectiva, y para optimizar los tiempos, se decidió optar por un sistema de raíces de zanahoria transformadas ya micorrizadas.

Cultivo, propagación y mantenimiento de R. irregularis: Se utilizó una cepa de *R. irregularis* suministradas por Eliane Dumas Gaudot³. Las mismas fueron mantenidas en asociación simbiótica con raíces transformadas de zanahoria en placas de *Petri* (de 90 mm de diámetro) conteniendo medio modificado Strullu-Romand (MSR) (Strullu and Romand, 1986; Declerck, Strullu *et al.*, 1998), solidificado con 3 gl^{-1} de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (Cranenbrouck, Voets *et al.*, 2005). Las placas fueron mantenidas durante

³ Plante-Microbe-Environnement, Dijon, France (INRA).

3 meses en oscuridad en posición invertida a 27°C, para lograr una gran producción de esporas.

Desinfección de semillas de soja: Las semillas de soja (cv. Don Mario 4800) fueron esterilizadas superficialmente por inmersión en alcohol al 70% durante 1 min, luego fueron sumergidas en hipoclorito de sodio (50 %) por 10 min, enjuagadas 3 veces en agua destilada estéril y germinadas en grupos de 6 semillas por placa de *Petri* (de 140 mm de diámetro) con medio MSR con sacarosa (10 gl⁻¹) (sin vitaminas), solidificado con 3 gl⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Las placas fueron incubadas a 27°C, durante 4 días en oscuridad y luego mantenidas 1 día en fitotron (16 horas de luz y 8 hs de oscuridad con 22°/18°C, respectivamente, y 70% de humedad relativa).

Desinfección de semillas de Medicago truncatula: Las semillas de *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong A 17 (SARDI, Australia) fueron esterilizadas superficialmente por inmersión en hipoclorito de sodio (30 %) durante 15 min, enjuagadas 3 veces en agua destilada estéril y germinadas en grupos de 25 semillas por placa de *Petri* (de 90 mm de diámetro) con medio MSR sin sacarosa ni vitaminas, solidificado con 3 gl⁻¹ de Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Las placas fueron incubadas a 27°C, durante 3 días en oscuridad y luego mantenidas 2 días en fitotron (16 horas de luz y 8 hs de oscuridad con 22°/18°C respectivamente, 70% de humedad relativa).

Método de tinción de raíces para cuantificar niveles de micorrización: Las raíces fueron aclaradas utilizando KOH 10% durante 3 horas; se blanquearon y acidificaron con HCl 1% durante 15 minutos y se tiñeron con azul tripán 0.2% durante 15 minutos. Luego fueron enjuagadas con agua destilada y por último conservadas en glicerol 50%.

Las raíces teñidas fueron observadas con microscopio compuesto (Olympus BH2, Olympus Optical, GmbH, Alemania) a 40X. Se evaluó colonización total de la raíz por HMA de acuerdo al método de Mc.Gonigle y col. (1990) analizando porcentaje de arbusculos (%A), vesículas (%V) e hifas (%H). Se observó un promedio, de por lo menos, 120 intersecciones.

Utilizando los sistemas de raíces transformadas de zanahoria ya micorrizadas, se diseñaron y probaron nuevos sistemas, para lograr micorrizar plántulas de soja en condiciones *in vitro*. Los sistemas probados son expuestos a continuación y fueron clasificados según la metodología empleada para la inoculación:

- Método 1. Inoculación directa con hifas y esporas de *R. irregularis*.
- Método 2. Raíces transformadas de zanahoria micorrizadas con *R. irregularis* como donante de micelio.
- Método 3. Plantas donadoras de micelio.

Método 1. Inoculación directa con hifas y esporas de R. irregularis.

Para obtener el inóculo de HMA (esporas y micelio), fue necesario ajustar la técnica de solubilización del medio, descrita por Doner y Bécard (1991). Esta técnica consiste en colocar un taco de medio MSR con esporas y micelio *R. irregularis* en una solución de citrato de sodio (10 mM, pH 6.0) a una temperatura aproximada de 30°C (en una relación 1/10) hasta lograr disolver el medio. El mencionado taco con esporas y micelio de *R. irregularis* se obtiene de una placa de *Petri* con raíces transformadas de zanahoria micorrizadas y con buena producción de esporas y micelio extraradicular. Luego de filtrar la solución resultante, lo obtenido (esporas + micelio) es usado como inóculo.

Los sistemas fueron construidos como se indicó en el capítulo II. Las plántulas de soja previamente germinadas (5 días antes) bajo condiciones de esterilidad, fueron colocadas cuidadosamente, a través de un orificio, en cajas de *Petri* de 140 mm de diámetro x 20 mm de altura con medio mínimo M (Bécard and Fortin, 1988) sin sacarosa, gelificado con 4 gl⁻¹ de GelGroTM (ICN, Biomedicals, Irvine, CA, USA), con las radículas dentro del medio de cultivo y los cotiledones hacia fuera para permitir el desarrollo de la parte aérea fuera de la placa.

Las placas fueron selladas para evitar contaminaciones y envueltas en papel sulfito, para simular las condiciones de oscuridad en la raíz. Al cuarto día de incubación, cuando la raíz llegó a expandirse en el medio, se colocaron varias dosis de inóculos micorrícicos en diferentes puntos de la placa (Figura 21).

Los sistemas fueron mantenidos en cámara de crecimiento, con un régimen de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad, a 25°C durante 6 semanas. Pasado este tiempo, las plantas fueron cosechadas, y las raíces fueron teñidas con azul tripan para comprobar la micorrización.

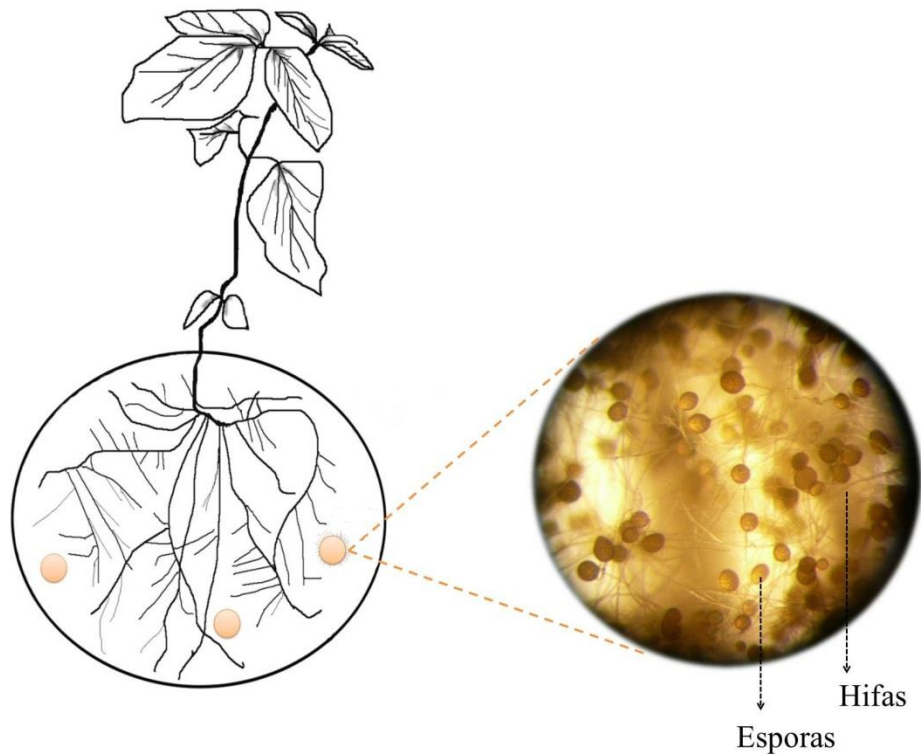


Figura 21: Esquema de una planta de soja con buen crecimiento en medio mínimo M sin sacarosa, gelificado con 4 gl^{-1} de GelGro™ (ICN, Biomedicals, Irvine, CA, USA) (Bécard and Fortin, 1988). La Figura muestra los diferentes puntos de inoculación con HMA. En la foto se pueden observar esporas e hifas de *R. irregularis*, luego de aplicar la técnica de solubilización del medio, descripta por Doner y Becard (1991).

Método 2. Raíces transformadas de zanahoria micorrizadas con *R. irregularis* como donante de micelio.

Para esta metodología se diseñó un sistema de cultivo *in vitro* con dos compartimentos. Para ello, se colocó dentro de una placa de *Petri* de 140 mm de diámetro una placa de menor tamaño (55 mm de diámetro), para separar físicamente el compartimento de la raíz (CR) del compartimento de la hifa (CH). Dentro del CR, se hicieron crecer raíces transformadas de zanahoria, micorrizadas en medio MSR. Las placas de *Petri* se sellaron con Parafilm (Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, IL 60631) y se incubaron en la oscuridad a 27°C durante 3 meses (Figura 22A). Pasado este tiempo, se produjeron miles de esporas y el micelio del hongo micorrízico arbuscular (HMA) comenzó a invadir el compartimento de mayor tamaño (CH), desarrollándose profusamente sobre el medio MSR sin sacarosa ni vitaminas (Figura 22B). En ese

momento se realizó un hueco en la placa de *Petri* del lado opuesto al CR para colocar las plántulas de soja (pre-germinadas de 5 días). Las raíces de las plántulas se pusieron en estrecho contacto con el micelio extra radical (MER) del HMA (Figura 22C). Las placas de *Petri* se volvieron a sellar con Parafilm (Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, IL 60631) y los huecos fueron cuidadosamente cubiertos con grasa de silicona para evitar contaminaciones. Posteriormente las placas de *Petri* fueron envueltas con bolsas de plástico opacas para que las raíces de soja permanezcan en la oscuridad, mientras que la parte aérea de la misma se desarrollara en condiciones de luz. La incubación se llevó a cabo en una cámara de crecimiento fijada en 22/18°C (día/noche), humedad relativa del 70%, fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Las plantas permanecieron en los sistemas por 15 días. Pasado ese tiempo, se cosecharon y las raíces fueron teñidas para evaluar el porcentaje de micorrización.

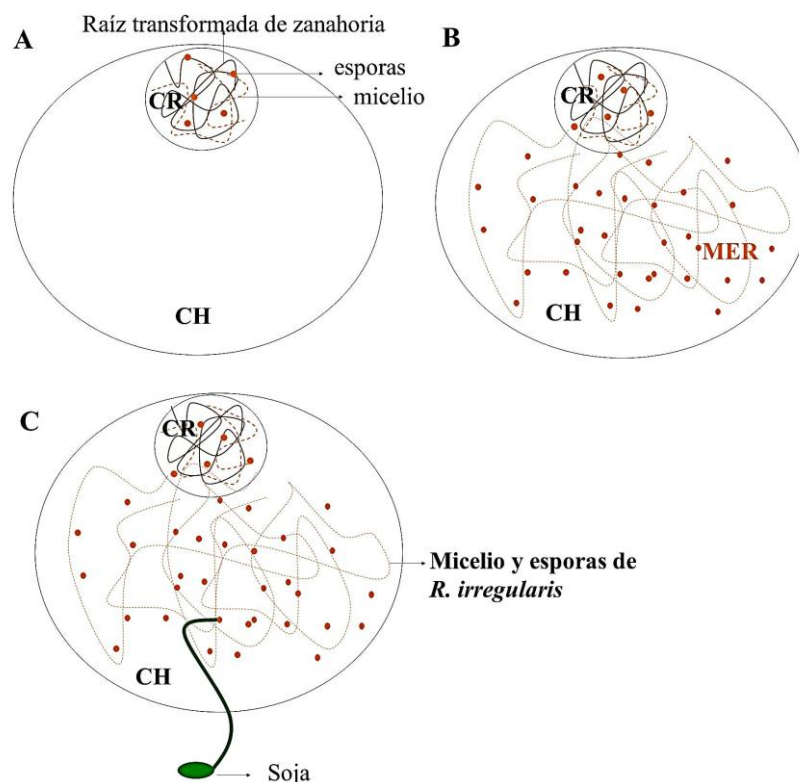


Figura 22: Esquema del sistema *in vitro* utilizando raíces transformadas de zanahoria micorrizadas con *R. irregularis* como donante de micelio. A: Armado del sistema. El mismo contiene dos compartimentos, uno donde se desarrollan las raíces transformadas de zanahoria micorrizadas creciendo en medio MSR (CR) y un compartimento de mayor tamaño (CH), destinado al desarrollo del micelio del HMA. **B:** Sistemas luego de 3 meses de incubación. Se

observa crecimiento de micelio extra radicular (MER), con desarrollo de hifas y esporas de *R. irregularis* en el CH. **C:** Armado del sistema completo. Las plántulas de soja se colocan en el lado opuesto del CR, a través de un orificio hecho en la placa, con las radículas creciendo dentro del medio y la parte aérea fuera de la placa.

Método 3. Plantas donadoras de micelio.

Para esta metodología se puso a punto un sistema de cultivo *in vitro* parcialmente cerrado (HAM-P), bicompartimentado, utilizando una planta de *Medicago truncatula* como donadora de micelio (Voets *et al.*, 2005; Voets *et al.*, 2009).

El diseño del sistema consistió en colocar una placa de *Petri* (de 55 mm de diámetro) dentro de otra placa de *petri* de mayor tamaño (de 140 mm de diámetro), y generar de esta manera una placa con dos compartimentos. Dentro de la placa pequeña se colocó un taco de medio Strullu-Romand Modificado (MSR) (Declerck *et al.*, 1998 modificado de Strullu and Romand, 1986), con esporas e hifas de *R. intraradices*. Ambos compartimentos fueron llenados con medio MRS sin sacarosa ni vitaminas. De esta manera, quedaron divididos los compartimentos CH, o compartimento de la hifa, y el CR, o compartimento de la raíz (Voets *et al.*, 2005).

Se realizó un orificio en la base de la placa de *Petri* (próximo a la placa pequeña) para permitir el crecimiento de la planta de *Medicago truncatula* (o planta donadora de micelio) y de esta manera poder establecer la asociación con el hongo micorrícico (Voets *et al.*, 2005). Una vez que el sistema fue armado completamente (Figura 23A), las placas fueron cubiertas con una bolsa plástica negra para que tanto las raíces como el HMA se desarrollen en oscuridad. Se mantuvieron los sistemas en cámara de crecimiento a 20°C con 70-80 % de humedad relativa y un fotoperíodo de 16/8 h.

Doce semanas después de establecida la asociación. Se hizo un nuevo orificio en la zona del CH. Una plántula de soja de 5 días fue transferida a dicho compartimento a través de este orificio, con la raíz en la superficie del medio, y el tallo extendido, fuera de la placa (Figura 23B).

Las plantas de soja fueron mantenidas en los sistemas por 15 días. Pasado ese tiempo se cosecharon y las raíces fueron teñidas para su evaluación.

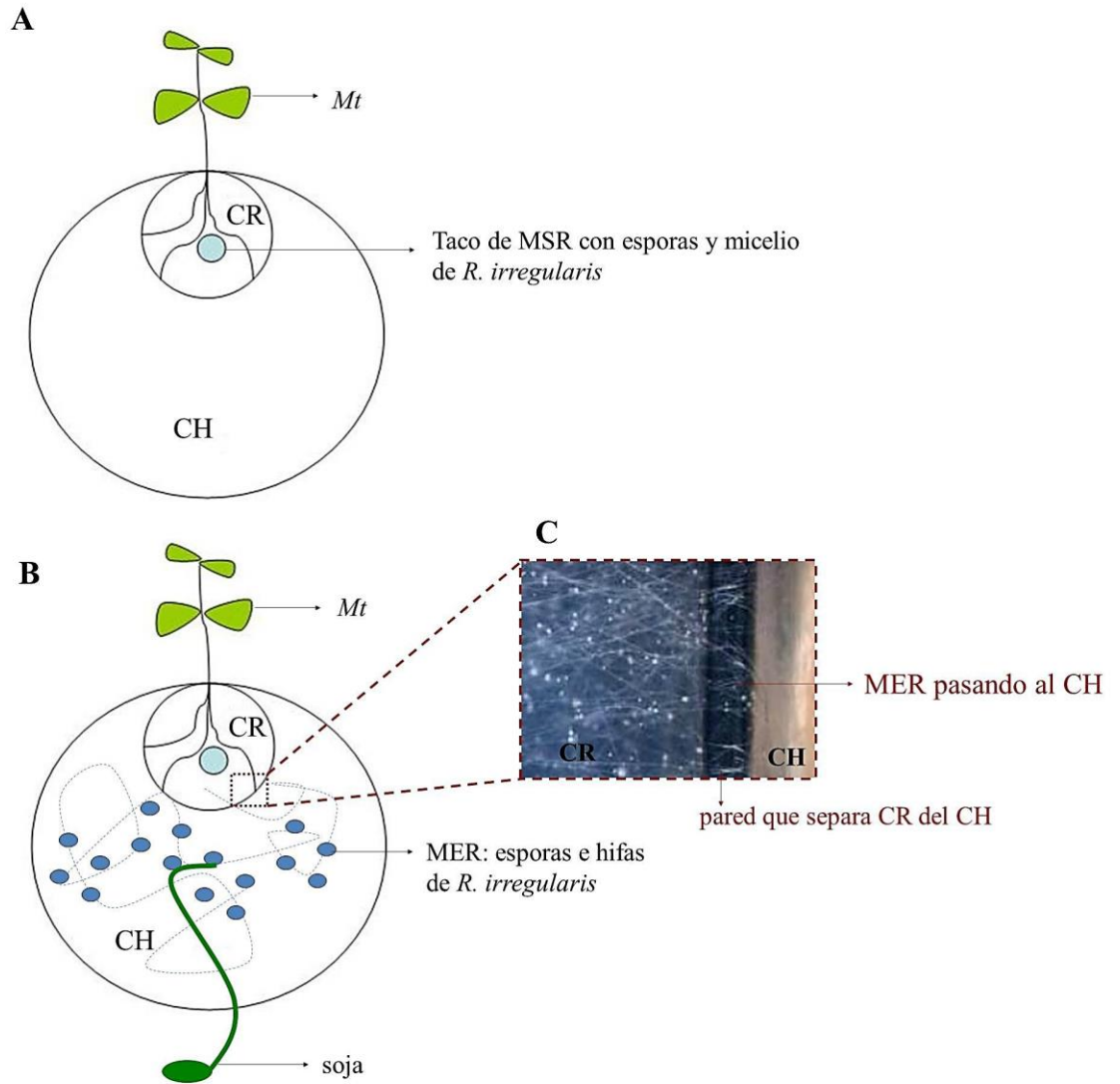


Figura 23: Esquema de un sistema de cultivo *in vitro* parcialmente cerrado (HAM-P). **A:** sistema de dos compartimentos, CR: compartimento de la raíz. CH: compartimento de la hifa. *Mt*: planta de *Medicago truncatula* creciendo en íntima relación con el HMA. **B:** Una vez que la planta de *Mt* se ha micorrizado, comienza a desarrollar micelio y espóra extra radicular (MER), el cual comienza a crecer en la zona del CH. Por un orificio se introduce una plántula de soja, con la radícula creciendo sobre MER. **C:** la foto muestra como el MER es capaz de atravesar la pared que divide el CR del CH.

RESULTADOS

Las raíces de las plantas de soja fueron teñidas con azul tripán y por observación al microscopio óptico se pudo confirmar la presencia de estructuras típicas de hongos micorrícicos arbusculares (Figura 24).

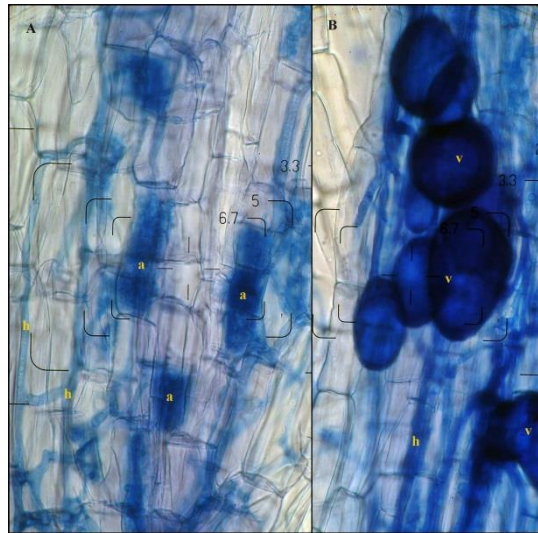


Figura 24: Estructuras típicas de HMA teñidas con azul tripán. En **A)** se pueden observar **a:** arbusculos, **h:** hifas. En **B)** se observan **v:** vesículas **h:** hifas.

Los tres métodos de inoculación fueron evaluados de acuerdo al método de Mc. Gonigle y col. (1990). Se observaron al microscopio óptico un promedio de por lo menos 120 intersecciones por planta evaluadas y se estableció el porcentaje de arbusculos (%A), vesículas (%V) e hifas (%H). Se calculó colonización total de la raíz por HMA.

Los resultados mostraron que, con el método 1 (*Inoculación directa con hifas y esporas de R. irregularis*) no fue posible obtener plantas de soja micorrizadas. Con los métodos 2 y 3 en cambio sí fue posible observar estructuras típicas de micorrizas en las raíces de soja observadas. En la Tabla 9 se muestran los porcentajes de micorrización alcanzados con cada una de las metodologías evaluadas.

Tabla 9: Porcentaje de micorrización (arbúsculos (%A), vesículas (%V) e hifas (%H) y el porcentaje de micorrizas total) para las 3 metodologías evaluadas.

	% Micorrización			% Micorrizas Total
	%A	%V	%H	
Método 1	0	0	0	0
Método 2	6,36	1,27	6,18	10
Método 3	18,55	2,18	15,45	36,2

Método 1: Inoculación directa con hifas y esporas de *R. irregularis*. **Método 2:** Inoculación con raíces transformadas de zanahoria micorrizadas con *R. irregularis* como donante de micelio. **Método 3:** inoculación mediante plantas donadoras de micelio.

DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y evalúan tres metodologías alternativas para obtener plantas de soja (*Glycine max*) micorrizadas, en condiciones *in vitro*. Es posible que la nula micorrización de las plantulas de soja observada con la metodología 1 (*inoculación directa con hifas y esporas de HMA*) pueda deberse al hecho de que se requiere un tiempo mayor a 6 semanas para lograr una micorrización efectiva. Cuando se inocula con esporas de hongos micorrícicos, éstas deben primero germinar generando un tubo germinativo, desarrollar una hifa infectiva y alcanzar la raíz para lograr micorrizar la planta. Todo este proceso debe cumplirse con la energía de reserva que tienen las esporas, dado que no tienen capacidad de obtener otra fuente de carbono que no sean sus propias reservas. Esta situación es totalmente diferente en los otros dos métodos en los que el inóculo eran raíces micorrizadas (transgénicas o de plantas de *M. truncatula*) de las cuales las esporas podía extraer energía orgánica.

La metodología 2 (*inoculación con raíces transformadas de zanahoria micorrizadas con HMA como donante de micelio*) alcanzó un porcentaje de micorrización total de 10% luego de 15 días de estar en contacto con el micelio extraradicular. Si bien con este método la micorrización fue medianamente efectiva, cuando se lo comparó con la metodología 3 (*plantas donadoras de micelio*), ésta superó a la anterior mostrando un porcentaje de micorrización del 36,2%.

De esta manera, se pudo concluir que el sistema *de cultivo in vitro parcialmente cerrado*, que utiliza *Medicago truncatula* como planta donadora de micelio es el que mejor se adapta.

CONCLUSIÓN

Se logró ajustar un sistema adecuado para micorrizar plantas de soja. Se concluye que el sistema que utiliza una planta de *Medicago truncatula* como donadora de micelio, es la metodología que mejor se adapta para obtener sistemas experimentales con una buena micorrización.

Se determinó que, el tiempo mínimo necesario para obtener plantas de soja con buen porcentaje de micorrización es de 15 días en contacto directo con micelio extra radical activo de HMA. Pasado este tiempo, los sistemas alcanzan un porcentaje de micorrización superior al 15%.

Este sistema abre las puertas para el estudio del papel que cumplen los HMA en la protección de las plantas de soja contra los principales patógenos de raíz, que afectan a este cultivo. El establecer una triple interacción (soja/HMA/patógenos de raíz) bajo estrictas condiciones *in vitro*, permite estudiar a nivel molecular cómo estos hongos formadores de micorrizas son capaces de controlar ciertas patologías en las plantas (por ejemplo, la estimulación de genes de defensa de la soja previo al contacto con el organismo invasor).

BIBLIOGRAFÍA

- Ark, P. A., & Thompson, J. P. (1961). Detection of hairy root pathogen, *Agrobacterium rhizogenes*, by the use of fleshy roots. *Phytopathology*, 51, 69–71.
- Bécard, G., & Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, 108, 211–218.
- Bécard, G., & Piché, Y. (1992). Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. *Methods in Microbiology*, 24, 89–108.
- Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Renard, L., Strullu, D. G., & Declerck, S. (2005). Methodologies for *in vitro* cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. In *In vitro Culture of Mycorrhizas*, 341-375. Springer Berlin Heidelberg.
- Croll, D., & Sanders, I. R. 2009. Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 13
- Dalpé, Y., & Declerck, S. (2002) Development of *Acaulospora rehmii* spore and hyphal swellings under root organ culture. *Mycologia*, 94, 850–855.
- de Souza, F.A., & Declerck, S. (2003). Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia*, 95, 1004–1012.
- Declerck, S., Strullu, D. G., & Plenchette, C. (1998). Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus sp.* isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*, 579-585.
- Declerck, S., Strullu, D.G., & Plenchette, C. (1996). *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycological Research*, 100, 1237–1242.
- Diop, T.A. (1995) Ecophysiologie des champignons mycorrhiziens à vésicules et arbuscules associés à *Acacia albida* Del. dans les zones Sahélienne et Soudano-Guineene du Sénégal. Thèse de Doctorat, Université d'Angers
- Diop, T.A., Bécard, G., Piché, Y. (1992) Long-termin vitro culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrot. *Symbiosis*, 12(3), 249-259.
- Diop, T.A., Plenchette, C., & Strullu, D.G. (1994) Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza*, 5(1), 17-22.
- Doner, L. W., & Bécard, G. (1991). Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnology Techniques*, 5(1), 25-28.
- Elmeskaoui, A., Damont, J. P, Poulin, M. J., Piché, Y., Desjardins, Y. (1995). A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*, 5, 313–319. doi:10.1007/BF00207403.
- Fortin, J.A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St Arnaud, M., Coughlan, A. P., Piché, Y. (2002). Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany*, 80, 1–20.

- Gallou, A., Mosquera, H. P. L., Cranenbrouck, S., Suárez, J. P., & Declerck, S. (2011). Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(1), 20-26.
- Gallou, A.; De Jaeger, N.; Cranenbrouck, S.; Declerck, S. (2010) Fast track in vitro mycorrhization of potato plantlets allow studies on gene expression dynamics. *Mycorrhiza*, 20, 201–207.
- Hernandez-Sebastia, C., Piché, Y., Desjardins, Y. (1999). Water relations of whole strawberry plantlets *in vitro* inoculated with *Glomus intraradices* in a tripartite culture system. *Plant Science*, 143, 81–91. doi:10.1016/S0168-9452(99) 00014-X.
- Hernandez-Sebastia, C., Samson, G., Bernier, P. Y., Piché, Y., Desjardins, Y. (2000). *Glomus intraradices* causes differential changes in amino acid and starch concentrations of *in vitro* strawberry subjected to water stress. *New Phytologist*, 148, 177–186. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00744.x
- Koffi, M. C., de la Providencia, I. E., Elsen, A., & Declerck, S. (2009). Development of an in vitro culture system adapted to banana mycorrhization. *African Journal of Biotechnology*, 8(12), 2750-2756.
- Koffi, M. C., Vos, C., Draye, X., & Declerck, S. (2013). Effects of *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 on the reproduction of *Radopholus similis* in banana plantlets grown under *in vitro* culture conditions. *Mycorrhiza*, 23, 279–288. DOI 10.1007/s00572-012-0467-6
- Louche-Tessandier, D., Samson, G., Hernandez-Sebastia, C., Chagvar dieff, P., & Desjardins, Y. (1999). Importance of light and CO₂ on the effects of endomycorrhizal colonization on growth and photosynthesis of potato plantlets (*Solanum tuberosum*) in an *in vitro* tripartite system. *New Phytologist*, 142, 539–550. doi:10.1046/j.14698137.1999.00408.x
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115, 495-501.
- Mosse, B. (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology*, 27, 509–520
- Mosse, B., & Phillips, J. M. (1971) The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. *Journal of General Microbiology*, 69, 157–166.
- Mosse, B., & Hepper, C. (1975). Vesicular arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathology*, 5, 215–223.
- Mugnier, J., & Mosse, B. (1987) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology*, 77, 1045–1050
- Redecker, D., Kodner, R., & Graham, L.E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486), 1920-1921.
- Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W., & Sagen, H.E. (1930) Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *Journal of Agricultural Research*, 41, 507–540

- Selosse, M.A., & Le Tacon, F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership?. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(1), 15-20.
- Sosa-Rodriguez, T., Dupré de Boulois, H., Granet, F., Gaurel, S., Melgarejo, L.M., Carron, M.P., & Declerck, S. (2013). *In vitro* mycorrhization of the rubber tree *Hevea brasiliensis* Müll Arg. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49, 207–215. DOI 10.1007/s11627-012-9485-5.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., & Fortin, J.A. (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research*, 100, 328–332.
- Strullu, D.G., & Romand, C. (1986). Méthodes d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 303, 245–250.
- Tiwari, P., & Adholeya, A. (2003). Host dependent differential spread of *Glomus intraradices* on various Ri T-DNA transformed roots *in vitro*. *Mycological Progress*, 2(3), 171-177.
- Voets, L., de la Providencia, I. E., Fernandez, K., Ijdo, M., Cranenbrouck, S., & Declerck, S. (2009). Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. *Mycorrhiza*, 19, 346–356.
- Voets, L., de Boulois, H. D., Renard, L., Strullu, D. G., & Declerck, S. (2005). Development of an autotrophic culture system for the *in vitro* mycorrhization of potato plantlets. *FEMS microbiology letters*, 248(1), 111-118.

Capítulo 4

Análisis del efecto de los hongos micorrícicos arbusculares en plantas de soja inoculadas con F. virguliforme en un sistema in vitro

INTRODUCCIÓN

El uso combinado de la siembra directa y el monocultivo, en conjunto con el cambio climático y la difusión de genotipos susceptibles, han generado el ambiente propicio para que las enfermedades comenzaran a manifestarse con mayor intensidad en el cultivo de soja, provocando importantes pérdidas (Carmona, 2014). El impacto negativo o deletéreo de las prácticas agrícolas sobre el ambiente provocó el interés mundial dirigido a métodos alternativos para el control de herbívoros, patógenos y malezas, y consecuentemente a la investigación de diferentes aspectos relacionados con las estrategias defensivas de las plantas.

Muchos son los factores bióticos y abióticos que pueden ser responsables de pérdidas de rendimiento agrícola, donde las enfermedades juegan un rol directo (Akhtar y Siddiqui, 2008). El estudio de un posible papel de la simbiosis micorrítica en la protección contra patógeno de plantas se inició en la década de 1970, y una gran cantidad de información se ha publicado en el tema (Hooker *et al.*, 1994; Linderman, 1994; Pozo *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2012).

En condiciones naturales, las raíces de la mayoría de las plantas existen en asociación con Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA), y la simbiosis resultante, *micorriza*, tiene importantes efectos en la planta. La respuesta más frecuentemente documentada es un aumento en la nutrición de fósforo; sin embargo, otros efectos se han observado, incluyendo aumento de la resistencia a estreses bióticos y abióticos (Liu *et al.*, 2007). Se ha visto que, la asociación con HMA puede reducir el daño causado por fitopatógenos en especial los patógenos de suelo. Como es imaginable, el nivel de esta resistencia puede variar con la especie y la cepa de HMA y frente a diferentes patógenos. Por lo tanto, puede esperarse que los resultados de las interacciones entre HMA, patógenos y plantas cambien en los diferentes patosistemas (Azcón-Aguilar y Barea, 1996).

Los HMA son biótrosfos obligados y por lo tanto requieren de la planta hospedante para completar su ciclo de vida. Esto favorece un continuo intercambio, especialmente de nutrientes, entre “los socios”. En la planta, esta interacción implica importantes cambios en el metabolismo primario y secundario así como en la regulación de mecanismos de defensa (Harrison, 1999; Fester and Hause, 2005). Estos cambios generalmente tienen un alto impacto en la fisiología de la planta, alterando su capacidad para enfrentar situaciones de estrés.

En un primer momento, se atribuyó la mejora del crecimiento y/o el rendimiento de las plantas micorrizadas exclusivamente a la mejora del estado nutricional (Linderman, 1994). Con el avance de las investigaciones y de las técnicas para el análisis de las interacciones entre organismos, muchos autores reportaron un aumento en la tolerancia de plantas micorrizadas a estreses abióticos, como sequía, salinidad, y presencia de metales pesados (Miransari, 2010; Smith *et al.*, 2010). También se observó un incremento de resistencia a un amplio rango de patógenos, especialmente patógenos de suelo (bacterias, hongos, nemátodos, e insectos) (Azcón-Aguilar and Barea, 1996; Whipps, 2004).

La reducción de los síntomas de enfermedad así como del daño causado por el agente causal, ha sido descrita para numerosos hongos patógenos como *Phytophthora*, *Gaeumannomyces*, *Fusarium*, *Chalara (Thielaviopsis)*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Verticillium*, *Aphanomyces*, y para nematodos como *Rotylenchus*, *Pratylenchus* y *Meloidogyne*. Esto no significa que la formación de micorrizas arbusculares sea efectiva contra estos patógenos bajo todas las circunstancias. De hecho, un aumento de la resistencia inducida por HMA o una disminución en la susceptibilidad requiere un pre-establecimiento de dichos hongos y un amplio desarrollo de la simbiosis antes del ataque del patógeno (Azcón-Aguilar and Barea, 1996).

Luego de un primer ataque de patógenos (ya sean virus, hongos, bacterias) o algún daño (como el producido por artrópodos herbívoros, por un daño mecánico o por el contacto con algunos químicos), las plantas adquieren la capacidad de protegerse frente a posteriores ataques (Camarena-Gutiérrez and De la Torre-Almaráz, 2007). De esta manera podemos citar dos mecanismos por los cuales una infección o tratamiento previo, induce la resistencia contra subsecuentes infecciones, dando como resultado una respuesta más precisa frente a la posterior exposición a un patógeno. Estos mecanismos son: la resistencia sistémica adquirida (SAR), y la resistencia sistémica inducida (ISR). En general, la SAR está asociada a la respuesta ante patógenos, mientras que la ISR está asociada con la capacidad de las rizobacterias para promover el crecimiento de la planta y protegerla contra patógenos.

En la resistencia inducida, el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) juegan un papel clave (Durrant and Dong, 2004) y la eficiencia en la regulación de la respuesta depende del tipo específico de organismo y la cantidad, composición y tiempo de identificación de la señal que produce la activación de genes de defensa (Mur *et al.*, 2006).

En este capítulo se hará hincapié en un tipo específico de mecanismo del tipo ISR, ya que se estudiará la interacción entre las plantas y los HMA. Se ha visto que, durante el establecimiento de la simbiosis micorrítica, ocurre una modulación de la respuesta de defensa de la planta, que se inicia con el reconocimiento del HMA. Como consecuencia de esta modulación, se activa la respuesta inmune, manteniendo a las plantas en un “estado sensibilizado”. Las plantas en este estado responden más rápida y eficientemente ante el ataque de un patógeno. A esta resistencia se la conoce como resistencia inducida por micorrizas (MIR, del inglés Mycorrhiza Induced Resistance) (Gallou, 2011).

Los mecanismos de resistencia inducida por micorrizas en respuesta a patógenos han sido estudiados en diferentes plantas, como frijol, arroz, papa y tomate (Guillon *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Gallou *et al.*, 2011; Campos-Soriano *et al.*, 2012). Basados en estos resultados, es que se ha sugerido que este tipo de MIR es similar a ISR (Pozo and Azcon-Aguilar 2007; Jung *et al.*, 2012). Pozo y Azcon-Aguilar (2007) proponen que cuando la micorriza está bien establecida y es funcional, suprime la respuesta dependientes de SA en la planta, compensado por un aumento de la respuesta regulada por JA. Es por esta razón, que se ha visto que MIR es principalmente eficaz contra patógenos necrotrofos (Figura 25).

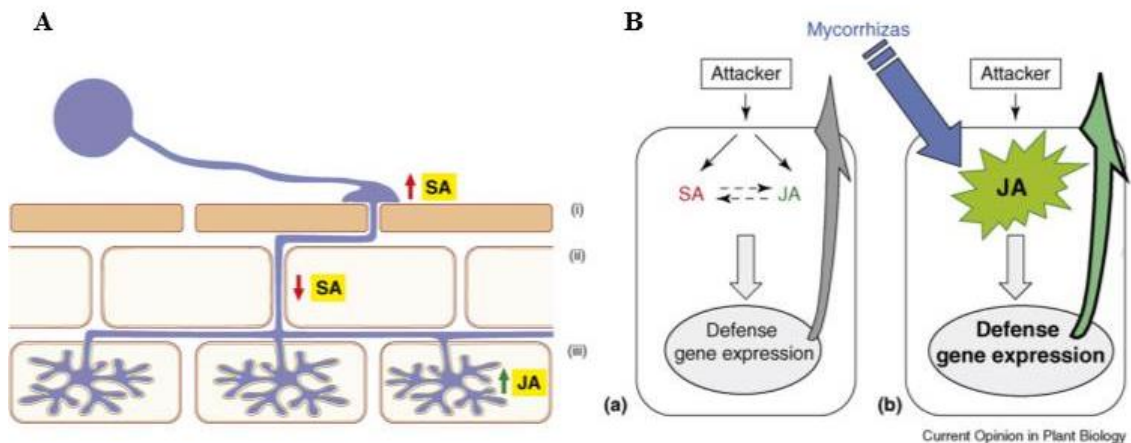


Figura 25 A: Modulación de las señales de defensa durante el establecimiento de la simbiosis micorrítica (i) luego de la germinación, el hongo crece hacia la superficie de la raíz y forma un apresorio. Esto provoca un marcado aumento en los niveles de ácido salicílico (SA). (ii) en una interacción compatible, la planta disminuye los niveles de SA y el hongo coloniza la corteza de la raíz. (iii) Con la formación de los arbuscúlos, la planta aumenta la biosíntesis de ácido jasmónico (JA). **B:** Modelo que ilustra el sensibilizado de las respuestas dependientes de JA en plantas micorrizadas. (a) A partir del reconocimiento del atacante, la planta produce las señales

relacionadas con la defensa de JA, ET, y SA en diferentes proporciones. El diálogo cruzado entre las vías que coordinan determina la respuesta apropiada. (b) la formación de micorrizas prepara los tejidos para una activación más rápida y eficaz de las respuestas de defensa JA-dependiente, lo que resulta en una mayor resistencia. Ilustraciones tomadas de Pozo and Azcon-Aguilar, 2007

El proceso de sensibilización (o priming) consiste en tres etapas claras. La primera etapa incluye todos los cambios celulares en ausencia de patógeno. A esta etapa se la denomina “estado de sensibilización pre-desafío”. Es de esperar que los cambios ocurridos aquí sean lo suficientemente sutiles como para preparar a la planta para el ataque del patógeno, pero sin ocasionarle grandes costos en su rendimiento. Luego, una segunda etapa que afecta estados tempranos y finales de la respuesta de defensa, y que ocurre después que la interacción con el patógeno se ha establecido. La mayoría de los estudios han demostrado que el sensibilización está fuertemente regulado por hormonas; sin embargo, también hay evidencia de la participación de derivados de compuestos fenólicos y muchos otros metabolitos secundarios, que permiten que la respuesta de las plantas sea más fuerte y rápida. Finalmente, una tercera etapa consiste en una reacción de defensa a largo plazo (Gamir *et al.*, 2014).

Una vez que la planta interactúa con el patógeno, el tratamiento de sensibilización promueve una serie de respuestas que pueden variar entre las interacciones planta-patógeno. De hecho, el sensibilización es un fenómeno horizontal que activa muchos mecanismos de defensa diferentes, y que no siempre se superponen con la respuesta de defensa basal de la planta (Pastor *et al.*, 2013).

Muchas respuestas que son activadas por la planta y, en algunos casos, inducidas por el proceso de sensibilización para promover la resistencia, solo se llevará a cabo durante las primeras etapas de la infección, mientras que estas respuestas están ausentes o se diferencian en las etapas finales (Ton and Mauch-Mani, 2004; Pastor *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2011).

En base a lo expuesto, considerando los resultados obtenidos en el capítulo II de esta tesis y la metodología de cultivo *in vitro* desarrollada en el capítulo III, se propone evaluar qué ocurre con la respuesta de defensa de plantas previamente micorrizadas y enfrentadas a *F. virguliforme*, en comparación con las plantas no micorrizadas. Para ello, se planteó el siguiente objetivo específico.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Evaluar cambios en los niveles de transcripción de genes involucrados en la defensa en plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas frente a la infección con *F. virguliforme*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología: Se utilizó un sistema de cultivo *in vitro* parcialmente cerrado (HAM-P), el cual fue diseñado como se indicó en el capítulo III. Para poder obtener una buena micorrización de las plantas de soja, los sistemas fueron mantenidos en cámara de crecimiento a 25°C con 70-80 % de humedad relativa y un fotoperíodo de 16/8 h, durante 15 días. Pasado este tiempo, los sistemas micorrizados y no micorrizados fueron divididos al azar en 2 grupos (Figura 26):

A- Sistemas no micorrizados

- Plantas Control
- Plantas inoculadas con *Fusarium virguliforme* (Fv)

B- Sistemas micorrizados

- Plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis* (Ri)
- Plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis* y *Fusarium virguliforme* (RiFv)

Se usaron un total de 36 sistemas. Por cada réplica biológica se llevaron a cabo 3 repeticiones técnicas.



Figura 26: La foto muestra los 4 tratamientos en estudio al momento de la toma de muestra. **C:** control; **Fv:** plantas infectadas con *Fusarium virguliforme*; **Ri:** plantas micorrizadas con *Rhizophagus irregularis*; **RiFv:** plantas micorrizadas con Ri e infectadas con Fv

Inoculación con F. virguliforme: Luego de 15 días, tanto las placas pequeñas como las plantas de *Medicago truncatula* fueron retiradas de todos los sistemas, los cuales fueron rellenos con medio MRS templado a 40°C. En este momento, los tratamientos Fv y RiFv fueron inoculados con un taco de agar de aprox. 1 cm² con micelio fúngico de *F. virguliforme*.

El inóculo de *F. virguliforme* fue tomado a partir de un cultivo fresco del patógeno, crecido en medio PDA durante 7 días a 25°C.

Toma de muestra: Los sistemas fueron observados bajo la lupa, a través de la tapa de la placa de Petri. Una vez que la llegada del patógeno a la raíz fue evidente, se tomaron muestras de raíces en 2 zonas diferentes de la misma:

1. Zonas adyacentes al punto de llegada de *F. virguliforme* (FvA)
2. Zonas lejanas al punto de llegada de *F. virguliforme* (FvL) (Figura 27).

De igual manera se tomaron muestras en plantas micorrizadas (en zonas adyacentes y lejanas al punto de llegada de *F. virguliforme*: RiFvA y RiFvL, respectivamente). Además se tomaron muestras en plantas micorrizadas sin *F. virguliforme* (Ri) y plantas controles (C).

Un grupo de plantas fue cosechado en el momento en el que el hongo patógeno (*F. virguliforme*) llega a la raíz de las plántulas de soja. A este muestreo se lo consideró como Tiempo 1 (T1). Un segundo grupo de plantas se cosechó 48 hs luego de que *F. virguliforme* llegue a la raíz de la soja. A este muestreo se lo denominó Tiempo 2 (T2).

Las muestras fueron conservadas a -80°C para hacer análisis de expresión génica.

Una vez realizada la toma de muestra, parte de la raíz fue usada para estimar la colonización intraradical de micorrizas y corroborar la infección de Fv.

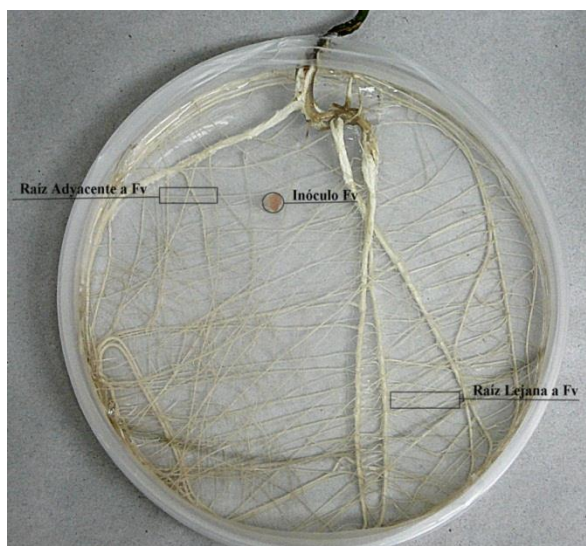


Figura 27: Detalle del sistema experimental, con las zonas de muestreo y de inoculación con *F. virguliforme*.

Colonización intraradical por R. irregularis: Las raíces fueron cosechadas luego de que las plantas de soja estuvieran 16 días en contacto con el MER de *R. irregularis* MUCL 41833.

Las raíces fueron clarificadas en 10% de KOH a temperatura ambiente durante 3 horas, lavadas con agua destilada, colocadas en 1% de HCL durante 15 minutos, y teñidas con azul de tripan al 0,2% (15 min a temperatura ambiente). La colonización intraradical fue estimada usando un microscopio óptico (Olympus SZ40, Olympus Optical GMBH, Hamburg, Germany) a 10X y 40X de magnificación según técnica descrita por McGonigle y col. (1990). En total, 200 intersecciones fueron observadas. Cada intersección fue considerada según las siguientes categorías: “negativo” (sin material fúngico en la raíz), “arbusculos”, “vesículas” y “colonización total”.

Infección y evaluación de síntomas causados por F. virguliforme en plantas de soja micorrizadas y no micorrizadas: La infección de *F. virguliforme* fue confirmada mediante observaciones al microscopio óptico. Para ello, fragmentos de raíces en contacto con el patógeno fueron teñidos con azul tripán, al 0,2% como se describió antes.

Los síntomas en hojas fueron evaluados a las 24 y 48 horas post inoculación con *F. virguliforme*, cuando las plantas tenían 16 y 18 días de crecimiento. Para la evaluación de los síntomas en hojas se utilizó el siguiente índice: 0: sin síntomas, 1 = hasta 24% de las plantas con síntomas foliares (necrosis internerval), 2 = 25-49% de las plantas con síntomas foliares, 3 = 50-74% de las plantas con síntomas foliares, 4 = 75 a 100% de las

plantas con síntomas en las hojas y menos de 50% de defoliación, y 6 = 75-100% de las plantas con síntomas en las hojas y más de 50% de defoliación.

La necrosis en raíz se evaluó visualmente, comparando el tamaño de la zona necrótica en el punto donde las hifas entraron en contacto con la superficie de la raíz. Se evaluaron y compararon para ello plantas micorrizadas y no micorrizadas.

Análisis estadístico: Los datos fueron sujetos a análisis de la varianza mediante INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2008) seguidas por el test LSD Fisher (Fisher, 1936).

Extracción de RNA: A partir de las muestras de raíces se extrajo ARN total mediante el método de TRIzol, utilizando materiales libres de RNasa. Para ello, se pulverizó 0,1 gr de muestra en mortero con aire líquido y se agregó 1 ml de TRIzol. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 ml e incubado durante 5 minutos entre 15 a 30°C para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se agregó 0,3 ml de cloroformo cada 1 ml de TRIzol, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó 2 a 3 minutos entre 15 a 30°C. Pasado ese tiempo, se centrifugó nuevamente a 12.000 g a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo al cual se le agregó 0,8 ml de alcohol isopropílico (2-propanol). Se incubó 10 minutos entre 15 a 30°C y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g a 4°C. Al pellet se le agregó 1 ml de etanol 75% y se centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos. Finalmente, el pellet se resuspendió en 25 µl de agua tratada con DEPC y se incubó durante 5 minutos a 65°C en baño seco. El RNA extraído se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

Las muestras de RNA fueron analizadas mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 1,2% para comprobar su integridad.

La concentración de RNA total fue determinada en un espectrofotómetro, NanoDrop®-ND 1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) usando una alícuota de 2 µl de la solución de RNA total. La pureza del RNA fue estimada a partir de la relación entre los valores de absorbancia a A260/280.

Para reducir las variaciones existentes dentro de cada tratamiento, se mezclaron un mínimo de 2 réplicas biológicas para cada tratamiento, de manera de obtener una concentración final de 10 ng/µl.

En ensayos de interacción soja/*F. virguliforme*, mostrados en el capítulo II de esta tesis, se logró identificar por la metodología de cDNA-AFLP, un grupo de genes que se expresaron de manera diferencial durante la interacción soja/patógeno. En este capítulo, se evaluó el comportamiento del *Gen 22*, luego de dos tiempos post inoculación con *F.*

virguliforme, comparando que ocurre con los transcritos de este gen en plantas con y sin micorrizas. Para ello, se hicieron ensayos de PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para el *Gen 22* y para el Factor de Elongación 1 α (diseñados según lo expuesto en el capítulo II, ver Tabla 10).

Las propiedades de los cebadores desarrollados se calcularon con la herramienta Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculador

(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

Tabla 10: Secuencias nucleotídicas de los cebadores específicos diseñados para validar el comportamiento del *Gen 22* por PCR en tiempo real.


Nombre	Orientación	Secuencia (5'-3')	Amplificación (pb)
Primer 22	Left Primer	AGAACTAAGTAGAACTGGAG	105
	Right Primer	GCTTGCAATGTCATCGAG	
Factor de Elong. 1 α	Left Primer	CTGTAACAAAATGGATGCTA	106
	Right Primer	GTCAGGGTTGTATCCTACTT	

PCR en tiempo real: Para realizar los ensayos de PCR en tiempo real se tuvieron en cuenta las muestras correspondientes a los tratamientos de plantas de soja micorrizadas (Ri, RiFv) y sin micorrizar (Control y Fv), en zonas adyacentes y lejanas al punto de llegada del patógeno a la raíz. En total 6 tratamientos fueron evaluados: Control, Ri, RiFvA, RiFvL, FvA y FvL, cuando *F. virguliforme* llega a la raíz de soja (T1) y 48 hs posteriores a la llegada de Fv (T2).

Se siguió el protocolo del Kit de Invitrogen “EXPRESS One-Step SYBR GreenER™”, usando EXPRESS SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal, EXPRESS SuperScriptR Mix for One-Step SYBR GreenER, 0,01 μ g de molde de RNA y 0,2 μ M de Cebadores específicos. Para cada muestra se corrieron reacciones con el cebador específico para el Factor de Elongación 1 α , el cual fue usado como gen calibrador, para

asegurar que la expresión diferencial no fue debida a diferente cantidad de molde inicial de RNA.

Además de las muestras problema, se incluyó un control sin enzima RT, para corroborar la inexistencia de ADN genómico y un control sin ARN para cada cebador utilizado para descartar contaminaciones.

El experimento fue llevado a cabo en un termociclador Rotor Gene 6000. El programa utilizado fue el siguiente: 53°C, 5 min/ 95°C, 2 min/ (95°C, 15 seg/ 53°C, 60 seg/ 74°C, 10 seg ) x45 ciclos. Curva de melting.

Antes de analizar las muestras problema se procedió a la generación de curvas estándar mediante diluciones seriadas de la muestra de ARN para evaluar la eficiencia de cada cebador a utilizar. A partir de las curvas estándar, se dedujo la eficiencia de los cebadores probados.

Para el cálculo de las concentraciones de transcritos de los genes candidatos se usó la herramienta del software rotor gene 6000, que utiliza el método Delta Delta CT, que supone una eficiencia de reacción de PCR óptima e idéntica (del 100%) tanto para el gen de interés como para el gen de referencia.

RESULTADOS

Evaluación de los niveles de micorrización (%) y de infección de F. virguliforme de los sistemas biológicos bajo estudio.

En la Tabla 12 se resumen los porcentajes de micorrización para los tratamientos con HMA. Se observó un porcentaje de micorrización total superior al 15% para ambos tratamientos.

Tabla 12: Porcentajes de micorrización total, cantidad de hifas, vesículas y arbusculos en plantas micorrizadas.

		Ri T1	RiFv T1
Estructuras	Hifas	13,5	14,4
	Arbusculos	7,2	2,2
	Vesículas	3,5	0
	% Micorrización Total	24,3	16,5

Tratamientos Ri: plantas micorrizadas con *Rhizophagus irregularis*. **RiFv:** plantas micorrizadas e infectadas con *Fusarium virguliforme*. Los valores se expresan en %.

La observación de las raíces inoculadas con *F. virguliforme* reveló la presencia de hifas del patógeno creciendo de manera inter e intracelular (Figura 28C y B, respectivamente). El crecimiento intercelular fue predominantemente paralelo al eje de la raíz (Figura 28C), mientras que las hifas intracelulares fueron perpendiculares a este (Figura 28B). Además, fue posible detectar una gran cantidad de hifas en la zona del extremo de la raíz (Figura 28A). Se evidenciaron estructuras fúngicas con pared engrosada, hinchada y fuertemente pigmentada (Figura 28B y C). Estas estructuras fueron descritas por Howard y se las conoce con el nombre de hifopodios (H). Los hifopodios se han definido como estructuras de propagación del hongo después de la infección de la planta, y que podría mejorar la penetración o la supervivencia.

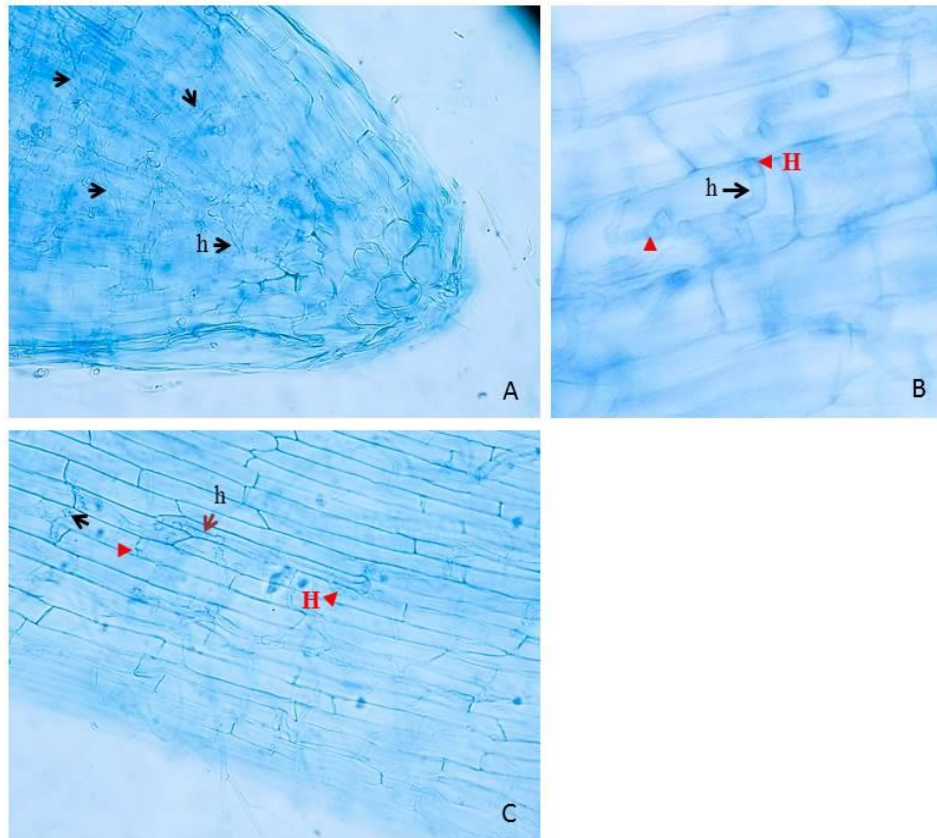


Figura 28: Raíz de soja teñida con azul tripán. Se pueden observar hifas creciendo inter e intracelularmente (h). En B y C se pueden observar estructuras invasoras (puntas de flechas rojas), hinchadas y pigmentadas (H). La imagen A muestra la punta de una raíz con gran cantidad de hifas de *F. virguliforme* (h).

Se hicieron observaciones macroscópicas de las raíces de las plantas de soja, luego de 48 hs de estar en contacto con el hongo patógeno (Figura 29). Cuando se analizaron las raíces próximas a la entrada de *Fv*, las mismas mostraron síntomas de necrosis (Figura 29B ▲); mientras que, en las raíces previamente micorrizadas, este síntoma disminuye significativamente (Figura 29D ▲).

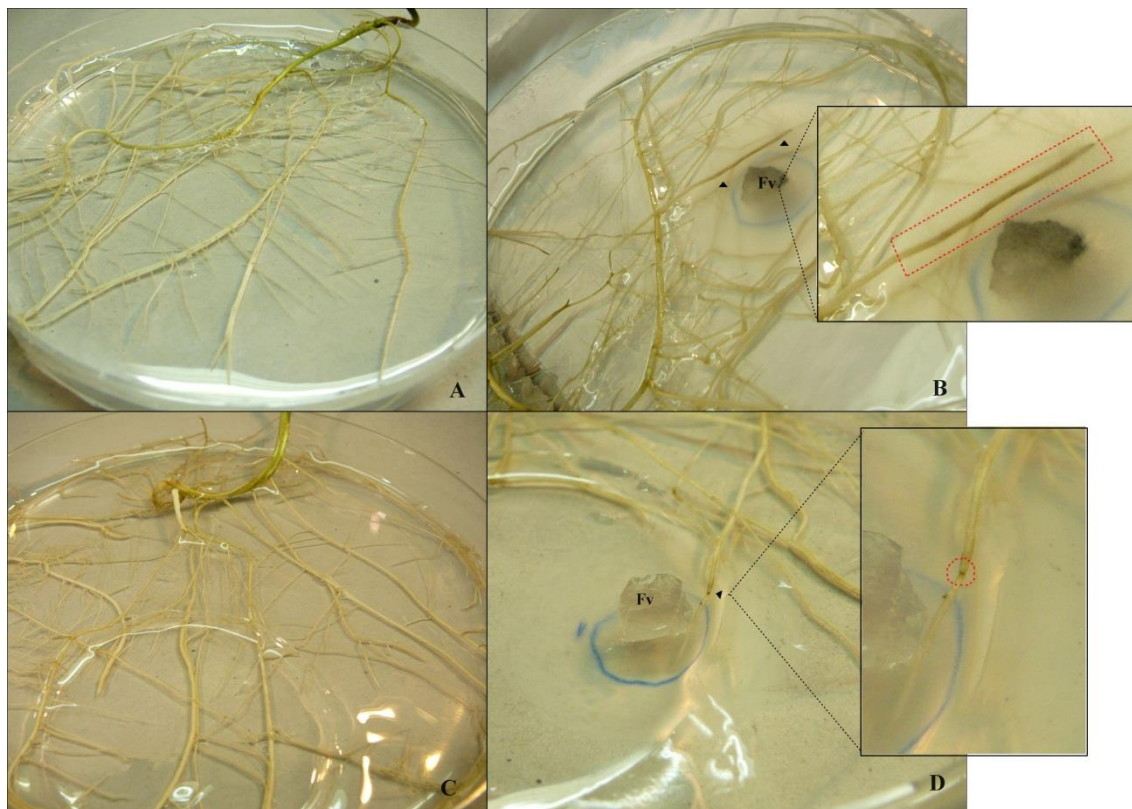


Figura 29: Detalle de raíces de soja creciendo en medio MRS sin sacarosa ni vitaminas. A: Raíz de una planta de soja creciendo bajo condiciones controles. **B:** Raíz de soja creciendo en presencia de *F. virguliforme*. **C:** raíz de soja creciendo en presencia de HMA. **D:** raíces de soja creciendo bajo el tratamiento RiFv. Las líneas de puntos, muestran en detalle las zonas de necrosis en raíces próximas a la entrada de Fv.

Luego de la extracción de RNA de raíz, se comprobó la integridad del mismo en geles desnaturalizantes de agarosa (Figura 30).

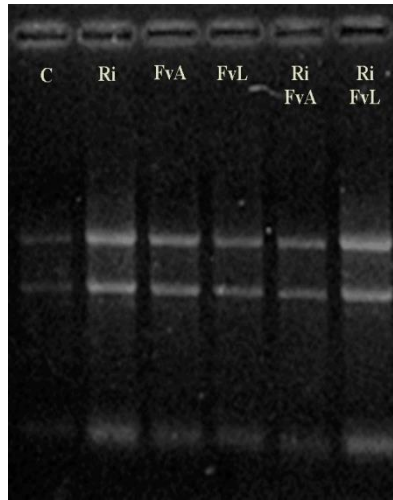


Figura 30: Muestras de RNA extraído por el método de TRIZOL corridas en gel desnaturalizante de agarosa al 1,2%. Se comprobó la integridad de las muestras de RNA correspondientes a los tratamientos C: controles, Ri: plantas micorrizadas, FvA: raíz adyacente a la infección con Fv, en plantas infectadas con Fv, FvL: raíz lejana a la infección con Fv, en plantas infectadas con Fv, RiFvA: raíz adyacente a la infección con *F. virguliforme* de plantas micorrizadas, RiFvL: raíz lejana a la infección con *F. virguliforme* de plantas micorrizadas.

La Figura 31 muestra las concentraciones relativas de los transcritos del *Gen 22* en el momento en el que el hongo toma contacto con la raíz (T1) y 48 horas después de este momento (T2). Los resultados se calcularon relativos al control sin inocular, y se calibraron mediante los valores de Ct del gen del factor de elongación 1α . Los niveles de concentración relativa de los transcritos obtenidos para el *Gen 22* se detallan en el Anexo II, Tabla 2 al final de este capítulo.

Durante el primer momento (T1), no se observaron cambios significativos para los tratamientos estudiados en relación al control sin inocular (C). Sin embargo, si se analizan los cambios en relación a las plantas micorrizadas (Ri), puede verse una marcada diferencia con respecto a las plantas inoculadas con *F. virguliforme* (FvA y FvL). La presencia del patógeno aumenta la concentración de transcritos de este gen. Cuando se evaluaron los resultados 48 hs posteriores a la llegada del patógeno a la raíz (Figura 31, T2), se pudo observar un marcado incremento de los transcritos del *Gen 22* en las plantas micorrizadas e infectadas con Fv, tanto en zonas adyacentes (RiFvA) como lejanas (RiFvL) a la entrada del patógeno (diferencia que corresponde a un aumento de 144% y 162%, respectivamente, si se las compara con C). Se observó una diferencia significativa

en el tratamiento inoculado con *F. virguliforme* en la zonas lejanas al punto de llegada del patógeno con respecto al control sano (C). Los tratamientos con micorrizas (Ri) se mantuvieron similares al control (C).

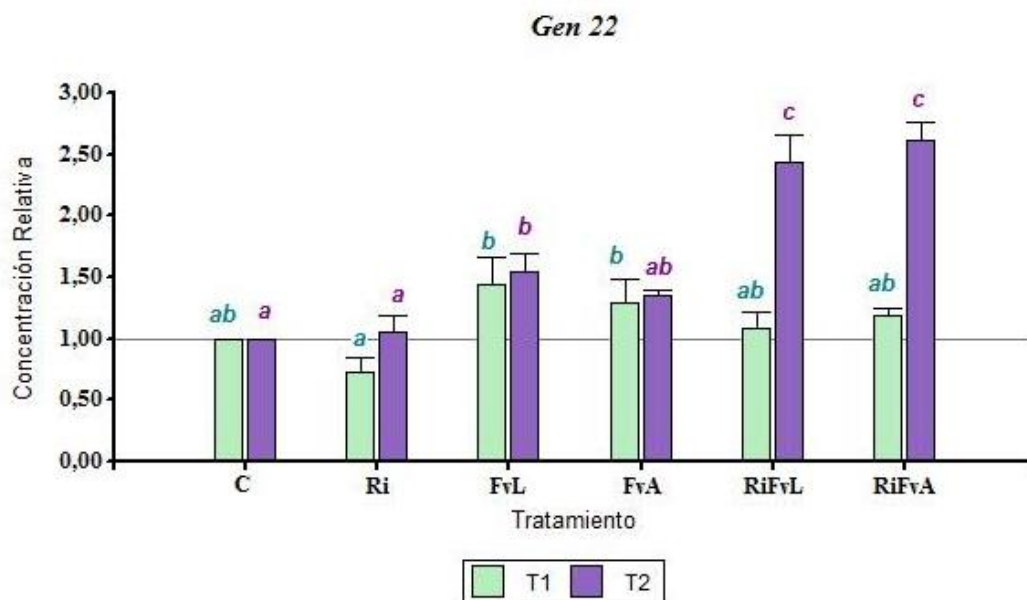


Figura 31: Niveles de concentración relativa de los transcritos del *Gen 22*, a dos tiempos post infección con *F. virguliforme*. T1: Tiempo 1, cuando *F. virguliforme* entra en contacto con la raíz de soja; T2: Tiempo 2, 48 hs posteriores a la entrada de Fv. Ri: raíz de plantas de soja micorrizadas con *R. irregularis*. FvL: raíz lejana al punto de entrada de Fv. FvA: Raíz adyacente a la entrada de Fv. RiFvL: raíz lejana a la entrada de *F. virguliforme* en plantas micorrizadas y RiFvA: raíz adyacente a *F. virguliforme* en plantas micorrizadas. C: control sin inocular. La línea gris indica la concentración de este gen para el tratamiento control (C: 1.00), y se muestra a modo de indicar las diferencias observadas entre cada tratamiento y el control. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La identificación molecular de este gen fue presentada en el capítulo II. Como se pudo observar, tiene una alta homología con la secuencia codificante de la proteína receptora serina/treonina quinasa con dominios repetidos ricos en leucina (LRR) (Tabla 12, capítulo II).

DISCUSIÓN

Se planteó un ensayo donde se evaluó el comportamiento del *Gen 22* en plantas sanas sin micorrizar, plantas sanas micorrizadas, plantas infectadas con *F. virguliforme* y plantas micorrizadas e infectadas con *F. virguliforme*. Los resultados mostraron que, en un primer momento (T1) no se observaron cambios significativos en los niveles de transcripción de este gen entre los diferentes tratamientos con respecto al control sin inocular (C). Significativamente, 48 hs posteriores a la llegada del patógeno y una vez establecida la interacción con la planta (T2), los tratamientos que mostraron un claro incremento en los niveles de transcripción del *Gen 22* fueron solamente aquellos en los que la infección de *F. virguliforme* se dio en las raíces que estaban previamente micorrizadas, tanto en zonas adyacentes como en zonas distantes a la entrada del patógeno. No se apreció un cambio importante en los niveles de transcripción del *Gen 22* en las plantas sin micorrizar ni en las plantas micorrizadas que no fueron desafiadas con *F. virguliforme*. Estas últimas (Ri), no mostraron un aumento en la transcripción de dicho gen a las 48 hs, manteniéndose su valor en un nivel similar al control (C= 1; Ri= 1.06).

Tampoco se observaron diferencias en los niveles de transcripción del *Gen 22* en plantas sin micorrizar e infectadas con *F. virguliforme* (FvL: 1,55; FvA: 1,36).

Se evidencia una clara diferencia entre la concentración de los transcritos del *Gen 22*, que manifiesta un incremento de aproximadamente el 150%, si se comparan los tiempos 1 y 2 de plantas micorrizadas infectadas con *F. virguliforme*. Este incremento se dio en el tiempo 2 tanto en raíz adyacente al punto de ingreso del patógeno como en zonas alejadas al mismo. El incremento es muy llamativo dado que cuando se compararon los niveles de transcripción del *Gen 22* en ambos tiempos y en las mismas posiciones en raíces no micorrizadas desafiadas con *F. virguliforme* con respecto al control, tal incremento no existió. Dicho de otra manera, según estos resultados, parecería que la planta micorrizada tiene mejor capacidad de reacción que la no micorrizada frente a la invasión del patógeno.

Durante el establecimiento de la simbiosis micorrícica, se establece una modulación de los sistemas de defensa y como consecuencia de esto, puede ocurrir una suave pero altamente eficiente activación del sistema inmune de la planta tanto local como sistémica. Esto a su vez lleva a un estado de “sensibilización” de la capacidad de respuesta de la planta, que está más pronta a reaccionar frente al ataque de un patógeno (Pozo *et al.*, 2009).

Se propone que existirían diversos MAMPs de organismos beneficiosos, como son las rizobacterias PGPRs o las mismas micorrizas, que al ser reconocidos por las plantas, resultarían en una suave y efectiva activación de los sistemas de defensa (Zhang and Zhou, 2010). Como vimos en el capítulo II, este gen tiene alta homología con un receptor LRR treonin/serin quinasa, una amplia familia de receptores tipo quinasa que tienen función de proteínas receptoras (PRR) (Song *et al.*, 1995; Gomez-Gomez *et al.*, 2001; Shiu *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). En soja han sido reportados al menos 310 genes que codifican para proteínas tipo receptor serina treonina quinasa con regiones repetidas ricas en leucina (Ver lista completa de genes en el Anexo II, Tabla 1 al final del capítulo).

Si hacemos un análisis rápido de las 310 proteínas predichas, puede observarse una gran diversidad entre ellas siendo los dominios ricos en leucina (LRR-RI) y los dominios de fosforilación (PKc) los que realmente se mantienen.

Es llamativo que ante tal diversidad de proteínas tipo receptor serina treonina quinasa con regiones repetidas ricas en leucina, cuando se evalúa por BLAST la secuencia detectada mediante cDNA-AFLP, haga blanco única y exclusivamente con una secuencia (número de acceso en NCBI XM_006599002.1) y además con una identidad de casi el 100%. Lo más aproximado que se podría afirmar es que los dominios LRR de RPK interactúan con un grupo diverso de proteínas para dar lugar a la señal de respuesta. Por lo tanto, es indudable que los RPK juegan un rol central en la señalización durante el reconocimiento de patógenos, y la activación subsiguiente de los mecanismos de defensa de la planta.

Cuando se evaluó la sintomatología causada por *F.virguliforme*, pudo comprobarse una menor zona de necrosis en las plantas previamente micorrizadas, comparadas con las no micorrizadas. Estos resultados permiten afirmar que las micorrizas disminuyen los síntomas ocasionados por patógenos fúngicos, en este caso particular *F. virguliforme*.

Ha sido reportado que la simbiosis micorrítica reduce la capacidad patogénica de las infecciones fúngicas, ya sea por interacción directa o indirecta (Wehner *et al.*, 2010). Se ha sugerido que los HMA y los patógenos frecuentemente comparten la misma rizosfera (Graham, 2001), donde en un primer momento, algunos patógenos con capacidad saprofítica o de vida libre, tienen ventajas sobre los HMA. Sin embargo, cuando estos últimos se establecen dentro de la raíz, la situación cambia y la micorriza previene la entrada del patógeno (Caron *et al.*, 1986). Una vez que el hongo micorrítico coloniza los tejidos de la raíz, el patógeno queda excluido de estas células, y como consecuencia, se

logra un mayor control contra el patógeno (Matsubara *et al.*, 2001; Sylvia and Chellemi, 2001).

De acuerdo con Sikes (2010), el efecto bioprotector de las micorrizas depende de varios factores, entre ellos el genotipo del hospedante, la especie de HMA involucrada y la eficiencia de la colonización de la raíz. McAllister y col. (1994) sugirieron que, tanto el método como el tiempo de inoculación con HMA pueden ser factores importantes a la hora de proteger a la planta del ataque de patógenos, ya que para que se logre la resistencia inducida por HMA se requiere un amplio desarrollo de la simbiosis antes del ataque del patógeno (Azcón-Aguilar and Barea, 1996). En este sentido, Shukla *et al.* (2014) sugieren que los suelos pre-tratados con HMA pueden actuar como bioprotectores contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Dado que las plantas de soja fueron inoculadas con *F. virguliforme* 18 días posteriores a la germinación, y que las muestras fueron tomadas 2 días después del primer contacto del patógeno con la raíz, sólo fue posible observar, por tinción con azul tripan, algunas estructuras típicas de Fv. No fue posible observar síntomas foliares, posiblemente debido a la edad de las plantas. Esto se correlaciona con lo observado por Gongora-Canul y col. (2011). Estos autores observaron una correlación positiva entre las plantas inoculadas con *F. virguliforme* al momento de la siembra y los síntomas foliares, mientras que la inoculación luego de 4 o más días posteriores a la siembra no mostró desarrollo de síntomas foliares. Se ha visto, además, menor gravedad de los síntomas en hoja cuando la infección de las plántulas no llega a los tejidos xilemáticos de la raíz y solo se limita al tejido cortical (Gongora-Canul *et al.*, 2011; Navi *et al.*, 2008). Nuestros resultados mostraron que no fue posible observar desarrollo de micelio en la zona del xilema, sin embargo, se observaron hifas tanto en la punta de algunas raíces como en zonas laterales. Navi y col. (2008) observaron que *F. virguliforme* usualmente ingresa a la raíz por la zona de la punta, y con menor frecuencia a través de la zona de los pelos radiculares próximos a la zona del ápice.

CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos, es posible concluir que, la simbiosis micorrícica trae aparejado una marcada diferencia en la expresión génica, en la fase temprana de la triple interacción (soja/HMA/Fv). El gen analizado (*Gen 22*) mostró ser homólogo a proteínas que tienen función de proteínas receptoras (PRR) del tipo LRR treonina/serina quinasa, que son capaces de reconocer patrones moleculares tanto de patógenos como de organismos benéficos. La simbiosis micorrícica bien establecida, mantiene a la planta de soja en un estado de alerta, permitiéndole reaccionar más eficientemente cuando se la enfrenta a Fv. Se comprobó un efecto protector en las plantas de soja por parte de *R. irregularis* MUCL 41833 ante el ataque de *Fusarium virguliforme*, con menor daño a nivel radicular.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhtar, M. S., & Siddiqui, Z. A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, 61-97. Springer Netherlands.
- Azcon-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6, 457–464.
- Camarena-Gutiérrez, G., & De la Torre-Almaráz, R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo*, 13-157.
- Campos-Soriano, L., García-Martínez, J., & Segundo, B. S. (2012). The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular plant pathology*, 13(6), 579-592.
- Carmona, M. A. (2014). Enfermedades de fin de ciclo y mancha ojo de rana en el cultivo de soja: desarrollo de un sistema de puntuación y determinación del umbral de control (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales).
- Caron, M., Richard, C., & Fortin, J. A. (1986). Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection*, 67, 15–19.
- Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2012). SOS too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*, 17(9), 538–545.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185-209.
- Fester, T., & Hause, G. (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, 15, 373–379.
- Fisher, R. A. (1936). The Use of Multiple Measurements in Taxonomy Problems. *Annals of Eugenics*, 7, 179-188.
- Gallou, A. (2011). Impact of *Rhizophagus* sp. (syn. *Glomus* sp.) and *Trichoderma harzianum* on the potato resistance against *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora infestans*, two major potato pathogens. Docteur en Sciences agronomiques et ingénierie biologique, Université catholique de Louvain, Belgique. 446 pp.
- Gallou, A., Lucero-Mosquera, H. P., Cranenbrouck, S., Suárez, J. P., & Declerck, S. (2011). Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(1), 20-26.

- Gamir, J., Sánchez-Bel, P., & Flors, V. (2014). Molecular and physiological stages of priming: how plants prepare for environmental challenges. *Plant cell reports*, 33(12), 1935-1949.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., & Boller, T. (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13, 1155-1163.
- Gongora-Canul, C., & Leandro, L. (2011). Plant age affects root infection and development of foliar symptoms of soybean sudden death syndrome. *Plant Disease*, 95, 242-247.
- Graham, J. H. (2001). What do root pathogens see in mycorrhizas? *New Phytologist*, 149, 357-359.
- Guillon, C., St-Arnaud, M., Hamel, C., & Jabaji-Hare, S. H. (2002). Differential and systemic alteration of defence-related gene transcript levels in mycorrhizal bean plants infected with *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Botany*, 80, 305–31. DOI: 10.1139/B02-015.
- Harrison, M. (1999). Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 361–89.
- Hooker, J. E., Jaizme-Vega, M., & Atkinson, D. (1994). Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi S, Schüepp H (eds) *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser, Basel, pp 191–200.
- Howard, R. J. (1997). Breaching the outer barriers—cuticle and cell wall penetration. In *Plant relationships*, 43-60. Springer Berlin Heidelberg.
- Jung; S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez; J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 651-664. DOI 10.1007/s10886-012-0134-6
- Linderman, R. G. (1994). Role of VAM fungi in biocontrol. In: Pflieger FL, Linderman RG (eds) *Mycorrhizae and Plant Health*. APS, St Paul, 1–26
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C. D., & Harrison, M. J. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal*, 50, 529–544.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 183–193.
- Matsubara, Y., Kayukawa, Y., Yano, M., & Fukui, H. (2001). Effect of arbuscular mycorrhizal fungus infection on the incidence of *Fusarium* root rot in *asparagus* seedlings. *Japanese Society for Horticultural Science*, 70, 202–206.

- McAllister, C. B., Garcia-Romera, I., Godeas, A., & Ocampo, J. A. (1994). Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biology Biochemistry*, 10, 1363-1367.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115, 495-501.
- Miransari, M. (2010). Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology*, 12, 563-569.
- Mur, L. A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., & Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, 140(1), 249-262.
- Navi, S. S., & Yang, X. B. (2008). Foliar symptom expression in association with early infection and xylem colonization by *Fusarium virguliforme* (formerly *F. solani* f. sp. *glycines*), the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Health Progress*, doi: 10.1094/PHP-2008-0222-01-RS.
- Pastor, V., Luna, E., Ton, J., Cerezo, M., García-Agustín, P., & Flors, V. (2013). Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(11), 1334-1344
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Ton, J., Van Pelt, J. A., & Van Loon, L. C. (2002). Signaling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 4, 535-544.
- Pozo, M. J., Verhage, A., García-Andrade, J., García, J. M., & Azcón-Aguilar, C. (2009). Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi, pp. 123-135, in C. Azcón-Aguilar, J. M. Barea, S. Gianinazzi, and V. Gianinazzi-Pearson (eds.), *Mycorrhizas - Functional Processes and Ecological Impact*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Pozo, M.J.; Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biology*, 10, 393-398.
- Shiu, S. H., Karlowski, W. M., Pan, R., Tzeng, Y. H., Mayer, K. F., & Li, W. H. (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, 16, 1220-1234.
- Shukla, A., Dehariya, K., Vyas, D., & Jha, A. (2014). Interactions between arbuscular mycorrhizae and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: effects on fungal development, seedling growth and wilt disease suppression in *Cicer arietinum* L., *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, DOI: 10.1080/03235408.2014.884831
- Sikes, B. A. (2010). When do arbuscular mycorrhizal fungi protect plant roots from pathogens? *Plant Signaling Behavior*, 5, 763-765.

- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S., & Smith, F. A. (2010). Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, 326(1-2), 3-20.
- Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W. X., Zhu, L. H., Fauquet, C., & Ronald, P. (1995). A receptor kinase like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 270, 1804-1806.
- Sylvia, D. M., & Chellemi, D. O. (2001). Interactions among root-inhabiting fungi and their implications for biological control of root pathogens. *Advances in Agronomy*, 73, 1–33.
- Ton, J., & Mauch-Mani, B. (2004). b-Amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, 38, 119–130.
- Wehner, J., Antunes, P. M., Powell, J. R., Mazukatow. J., & Rillig, M. C. (2010). Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia*, 53, 197–201.
- Whipps, J. M. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1198–1227.
- Zhang, J., & Zhou, J. M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular Plant*, 3, 783–793.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125, 749-760.

ANEXO II

Tabla 1: Lista de genes que codifican para proteínas tipo receptor serina treonina quinasa

Database: GENES - Search term: LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase

<u>gmx:100785189</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK-like
<u>gmx:100793137</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g29180-like
<u>gmx:100800018</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g14390-like
<u>gmx:100807456</u>
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like
<u>gmx:100811366</u>
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like
<u>gmx:100782520</u>
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like
<u>gmx:100813889</u>
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase HSL2-like
<u>gmx:100805681</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g12460-like
<u>gmx:100794714</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g63430-like
<u>gmx:102661500</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like
<u>gmx:100776814</u>
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR-like
<u>gmx:100808724</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g14390-like
<u>gmx:100784869</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like
<u>gmx:100787530</u>
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like
<u>gmx:100805010</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g51810-like
<u>gmx:100794233</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RKF3-like
<u>gmx:100815349</u>
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RFK1-like

gmx:100787157

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230-like

gmx:100797186

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g30520-like

gmx:100809790

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:102664587

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100785752

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100792450

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100784864

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g07650-like

gmx:100775762

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g26540-like

gmx:100800924

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100799709

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100792651

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100786298

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RKF3-like

gmx:100785947

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100808740

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720-like

gmx:100785251

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56130-like

gmx:100778093

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100805769

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g16250-like

gmx:100784917

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100804875

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA-like

gmx:100813425

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360-like

gmx:100802757
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100802571
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100783886
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360-like

gmx:100797653
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1-like

gmx:100818792
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100776204
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g37250-like

gmx:100784397
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100788119
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like; K13420 LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 [EC:2.7.11.1]

gmx:100801889
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100790944
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720-like

gmx:100808098
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100809704
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230-like

gmx:100793416
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g10290-like

gmx:100799227
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g63710-like

gmx:100779744
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g63430-like

gmx:102669785
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g12460-like

gmx:100779045
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g20450-like

gmx:100804368
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK-like

gmx:100776587
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g16250-like

gmx:100801571
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100795363
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA-like

gmx:100776054
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100783363
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1-like

gmx:100781769
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360-like

gmx:100807051
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230-like

gmx:100817368
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53430-like

gmx:100801735
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:102669972
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA-like

gmx:100777473
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERL1-like

gmx:100801413
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g07560-like

gmx:100802475
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK-like

gmx:100777316
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100816683
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:100775344
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53440-like; K04733
interleukin-1 receptor-associated kinase 4 [EC:2.7.11.1]

gmx:100803695
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g51810-like

gmx:100796084
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MEE39-like

gmx:100795031
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102667325
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100800886
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g63710-like

gmx:100781978
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g63430-like

gmx:102663839
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like; K13420 LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 [EC:2.7.11.1]

gmx:100817960
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like; K13420 LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2 [EC:2.7.11.1]

gmx:100785174
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100786591
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100788556
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230-like

gmx:100795940
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RFK1-like

gmx:100777862
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g20940-like

gmx:100811547
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g10290-like

gmx:100816707
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:102662598
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g29180-like

gmx:102663366
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g29180-like

gmx:100781084
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g28960-like

gmx:100797706
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53430-like

gmx:100812068
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:100798233
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:100803891
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2-like

gmx:102670178
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g26540-like

gmx:100789785

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g14390-like

gmx:100792943

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g26540-like

gmx:100794698

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RCH1-like

gmx:100790485

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK-like

gmx:100776284

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g51880-like

gmx:100777879

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g51860-like

gmx:102660013

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g51860-like

gmx:100779474

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g05700-like

gmx:100795611

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g20940-like

gmx:100819046

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100801459

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:102660377

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100780567

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56130-like

gmx:100800185

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERL1-like

gmx:100776297

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g48740-like

gmx:100785561

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:102664380

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100803216

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100798447

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100809775

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100791042

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:102665337

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100800224

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA-like

gmx:100800760

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RKF3-like

gmx:100808055

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720-like

gmx:100819611

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g34110-like

gmx:102668066

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100788059

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102663025

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RCH1-like

gmx:102664345

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100786447

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102665288

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100792145

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g63430-like

gmx:100800970

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g12460-like

gmx:100797612

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100795838

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100777573

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g23950-like

gmx:100801161

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100799888

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100807163

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100798488
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720-like

gmx:100786654
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g10290-like

gmx:102660997
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:100813275
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100814345
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100815226
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53430-like

gmx:100784920
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53430-like

gmx:100783862
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53430-like

gmx:102667854
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102661633
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100819882
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2-like

gmx:100812406
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RCH1-like

gmx:100798007
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720-like

gmx:100801728
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like; K04733

interleukin-1 receptor-associated kinase 4 [EC:2.7.11.1]

gmx:100788143
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:100805261
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100810610
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g45780-like

gmx:100807390
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230-like

gmx:100779594
probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g29180-like

gmx:100815784

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100776201

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100808994

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g45840-like

gmx:100813139

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g26540-like

gmx:102661871

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g07650-like

gmx:100795732

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100797314

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100820416

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100776429

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100798381

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g16250-like

gmx:100782307

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA-like

gmx:100814382

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RCH1-like

gmx:100779427

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100801035

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100777490

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:102663195

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2-like

gmx:100792239

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g05700-like

gmx:100809588

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53430-like

gmx:100778920

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230-like

gmx:100793639

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g20940-like

gmx:100797153

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100800503

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:100782320

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53440-like

gmx:102660019

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100795047

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2-like

gmx:100784831

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100812804

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g48740-like

gmx:102661442

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102661656

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102661933

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:102662131

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102662253

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102662522

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102663251

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102663381

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102665161

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERL2-like

gmx:100818491

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:102665566

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102666031

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102666266

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100819564

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g34110-like

gmx:100780710

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100796295

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100795774

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100781266

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100778055

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100776988

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100819751

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100815494

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102667769

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g12460-like

gmx:100793481

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102668231

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100787143

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100801973

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100789253

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102663732

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102665287

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR-like

gmx:102666084

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100783408

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102668069

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102668329

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102668471

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102669000

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102670330

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102660274

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102660520

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RCH1-like

gmx:102660657

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102660792

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100789433

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102661033

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100791537

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g20940-like

gmx:102662339

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:102663556

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100813892

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100816553

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102664851

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102664983

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102665118

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100777516

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA-like

gmx:100781812

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:102666829

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100783427

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100784493

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100785021

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100786594

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100792966

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102670103

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:102670243

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:102670498

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100805146

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102661525

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102661937

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100776286

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100777881

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:100787675

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g59680-like

gmx:100775565

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g23950-like

gmx:100786961

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230-like

gmx:100778064

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g26540-like

gmx:100779315

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100816573

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g74360-like

gmx:100784503

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g37250-like

gmx:100815313

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g16250-like

gmx:102664811

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g53430-like

gmx:100807148

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720-like

gmx:100813228

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g10290-like

gmx:100784541

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100786467

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100814122

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1-like

gmx:100802880

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g26540-like

gmx:100803061

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g14390-like

gmx:100801467

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g36180-like

gmx:100815339

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RCH1-like

gmx:100780938

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100811066

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100783633

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100785766

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56140-like

gmx:100800048

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2-like

gmx:102667398

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA-like

gmx:100815005

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100798809

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100814634

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100812486

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100815688

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:102665964

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:102666504

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:102666977

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100803058

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2-like

gmx:100815880

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:102669273

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:102660074

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:102661105

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100802574

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2-like

gmx:100809509

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:100819453

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RKF3-like

gmx:100819980

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RKF3-like

gmx:100784017

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720-like

gmx:100790388

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g56130-like

gmx:102667187

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g16250-like

gmx:100790391

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g20450-like

gmx:100811653

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERL2-like

gmx:100804889

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g34110-like

gmx:100783504

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At5g16900-like

gmx:102669604

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA-like

gmx:100810229

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RCH1-like

gmx:100793419

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:102661555

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

gmx:100813639

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g08850-like

gmx:102663061

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g34110-like

gmx:102663198

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570-like

gmx:100809222

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g67720-like

gmx:100819230

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1

gmx:100779617

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g29180-like

gmx:100816028

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1-like

gmx:100803920

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1-like

gmx:100777308

probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g06840-like

gmx:100801518

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO2-like

gmx:100792484

LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase GSO1-like

Tabla 2: Concentraciones relativas de los transcritos del *Gen 22* en raíces de soja, durante el momento 1(T₁) y 2 (T₂) de la infección por *Fusarium virguliforme*.

Concentraciones relativas del transcritpo 22		
Tratamientos	Tiempo 1	Tiempo 2
C	1,00 ± 0,14 ab	1,00 ± 0,14 a
Ri	0,73 ± 0,17 a	1,06 ± 0,14 a
FvL	1,44 ± 0,14 b	1,55 ± 0,17 b
FvA	1,29 ± 0,17 b	1,36 ± 0,17 ab
RiFvL	1,09 ± 0,14 ab	2,43 ± 0,14 c
RiFvA	1,19 ± 0,17 ab	2,62 ± 0,17 c

Tiempo 1: cuando *F. virguliforme* entra en contacto con la raíz de soja; **Tiempo 2:** 48 hs posteriores a la entrada de Fv. **Ri:** raíz de plantas de soja micorrizadas con *R.irregularis*. **FvL:** raíz lejana al punto de entrada de Fv. **FvA:** Raíz Adyacente a la entrada de Fv. **RiFvL:** raíz lejana a la entrada de *F. virguliforme* en plantas micorrizadas y **RiFvA:** raíz adyacente a *F. virguliforme* en plantas micorrizadas. El control sin inocular se representa como **C**.

Discusión y conclusiones generales

DISCUSIÓN GENERAL

Algunas prácticas de manejo pueden reducir el riesgo de daños, pero ninguna ha podido impedir la enfermedad. La principal herramienta para el manejo del SMS es el uso de cultivares de soja parcialmente resistentes, ya que no hay genotipos con resistencia completa (Gibson *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1997; Westphal *et al.*, 2008). Otras prácticas culturales recomendadas son aquellas que promueven un buen drenaje del suelo, disminuyen la compactación, y la siembra tardía de manera de evitar sembrar en suelos fríos y muy húmedos (Lenzi *et al.*, 2013). Dado que no hay una práctica que sea totalmente eficaz, es que se plantea la necesidad de utilizar estrategias alternativas o complementarias a las ya existentes, para manejar la enfermedad. En este sentido, y a partir de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, se propone el uso de microorganismos, considerados como benéficos por no producir enfermedad en el hospedante, como potencial alternativa a la hora de proteger a los cultivos. Estos organismos benéficos protegen a las plantas porque pueden, por ejemplo, aumentar la disponibilidad de nutrientes o actuar de manera antagonica con los patógenos, mejorando el estado general de las plantas, lo que les permite disminuir los factores de estrés (Pozo *et al.*, 2015). El hecho de que los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) puedan establecer una simbiosis con la mayoría de las plantas y que promuevan el crecimiento vegetal reduciendo el uso de fertilizantes químicos, aportando además estabilidad a la estructura del suelo (Gianinazzi *et al.*, 2010), los convierte en potenciales herramientas de protección.

El estudio de las interacciones entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo, presenta dos problemas claros. Uno de ellos, es la diversidad que el ambiente presenta, y el segundo es la imposibilidad de observar el sistema radicular a lo largo del proceso. Es por ello que el desarrollo de un sistema bajo condiciones de crecimiento controladas, donde solo interactúen los organismos deseados, y que además posibilite la observación directa del sistema radicular, permite aportar conocimientos valiosos a nuestros estudios. Consecuentemente, uno de los aportes más relevantes de este trabajo de tesis doctoral, fue el desarrollo y el ajuste de dos sistemas de cultivo *in vitro* para el estudio de las interacciones entre el cultivo de soja y hongos del suelo.

El primer sistema fue desarrollado para el estudio específico de la interacción entre la raíz de plantas de soja y hongos patógenos del suelo (Bressano *et al.*, 2010). Con este sistema y la metodología utilizada para la inoculación de *F. virguliforme*, fue posible establecer diferentes tiempos y zonas de muestreo, dando la posibilidad de estudiar la dinámica de la expresión génica durante etapas tempranas de la interacción soja-patógeno.

Dado que el eje central de esta tesis era el análisis de los posibles mecanismos por los cuales los HMA protegen a las plantas del ataque de un patógeno, es que se ajustó un segundo sistema de cultivo *in vitro* con una planta donadora de micelio, con el fin de obtener plantas de soja micorrizadas en condiciones controladas. Este sistema, adaptado del sistema desarrollado por Voets y col. (2009), se basa en hacer crecer una planta joven de soja en una red de micelio extra radical (MER) activo, que se extiende a partir de una planta donante (*M. truncatula*). La colonización de las plantas a través del MER es un mecanismo predominante en la naturaleza (Friese y Allen, 1991). Este sistema permitió establecer el tiempo mínimo necesario para obtener plantas de soja micorrizadas *in vitro*. Cabe destacar que se observó un nivel de micorrización homogénea en dos experimentos independientes, mostrando con esto su confiabilidad, solidez y reproducibilidad.

De la comparación de los resultados generados entre las interacciones planta-patógeno y planta-patógeno-HMA, fue posible vislumbrar qué ocurre en la planta de soja cuando es enfrentada a un patógeno fúngico de raíz, en presencia o no de micorrizas. En un primer momento, fue posible corroborar que el hongo necrótrofo (*F. virguliforme*), es capaz de activar una reacción de defensa inducida, aún antes de entrar en contacto con la raíz. Esa activación de la respuesta se aprecia en un incremento de la transcripción de genes que codifican para los receptores tipo quinasas (RLKs), que constituyen los primeros eslabones en la denominada inmunidad innata de las plantas, basada en el reconocimiento de patrones (plant pattern recognition receptor, PRRs) (Lacombe *et al.*, 2010). Posteriormente, nuestros resultados mostraron que, cuando la micorrización está bien establecida, la planta de soja (creciendo en condiciones *in vitro*), es capaz de reaccionar más eficientemente ante el ataque del mismo patógeno. Se podría suponer que la vía de defensa inducida por *F. virguliforme*, es también activada en presencia de HMA, pero de una manera más atenuada. Dado que estos receptores RPKs también serían capaces de reconocer patrones derivados de organismos benéficos, las plantas previamente micorrizadas modularían el sistema de defensa, manteniéndolas en un estado sensibilizado. Se ha observado que la presencia de micorrizas en las raíces de las plantas conlleva a una activación de las vías de defensa dependientes del jasmónico (Pozo y Azcón-Aguilar

2007), lo que les permitiría reaccionar más rápidamente cuando se enfrenta a un patógeno necrótrofo (Glazebrook, 2005; Ton *et al.*, 2002). Nuestros resultados mostraron una disminución del daño causado por *F. virguliforme* a nivel radicular, que se observó como una reducción de las áreas necrosadas en plantas micorrizadas. Si bien fue posible corroborar la infección con Fv, observando estructuras fúngicas dentro de la raíz, no fue posible observar síntomas foliares. Probablemente, una de las razones por las cuales no se observaron síntomas foliares fue la edad de las plantas al momento de realizar la inoculación con Fv. Se ha visto que para que el patógeno llegue a penetrar los haces vasculares la infección debe ocurrir en etapas tempranas del desarrollo (Gongora-Canul *et.al.*, 2011). También debe considerarse que el lapso que media entre la inoculación con *F. virguliforme* y el momento de toma de muestras es muy breve (48 hs) como para que se manifiesten síntomas foliares. Si el hongo no llega al xilema, no ocurre el movimiento de la toxina que produce los síntomas foliares (Navi and Yang, 2008). Solo observamos estructuras fúngicas en la zona de la corteza radicular, sin observar colonización en los haces conductores. Sin embargo, se han considerado dos puntos importantes: uno es que *F. virguliforme* puede causar pérdidas por podredumbre radicular, sin necesidad de mostrar síntomas foliares, y el otro es que, para observar resistencia inducida por HMA es necesario un amplio desarrollo de la simbiosis antes del ataque del patógeno (Azcón-Aguilar and Barea, 1996). Es por este último punto, que en este trabajo de tesis se optó por la inoculación de *F.virguliforme* luego de la micorrización de las plantas de soja.

Dado que en el suelo, estos microorganismos no están solos, por la enorme biodiversidad que existe en la rizosfera, y que tanto el método como los tiempos de inoculación de HMA son factores importantes a la hora de proteger a la planta del ataque del patógeno (McAllister *et al.*, 1994), en esta tesis se planteó además un ensayo de larga duración bajo condiciones controladas de invernadero, donde se incluyeron mediciones fisiológicas y bioquímicas relacionadas con el estrés oxidativo. A fin de complementar el estudio del efecto protector que ejercen las micorrizas, se incorporó al análisis el efecto del estrés por sequía. Los resultados encontrados mostraron una mejora en el estado hídrico en presencia de micorrizas, sobre todo en condiciones de sequía, y una reducción del daño oxidativo generado por el estrés biótico, tanto en sequía como en riego continuo. Estos resultados sugieren que, además de la activación de genes específicos, la planta activa un sofisticado sistema antioxidante para contrarrestar el daño provocado por el organismo invasor.

CONCLUSIONES GENERALES

La disminución del daño oxidativo en plantas micorrizadas e inoculadas con *Fusarium virguliforme*, se sugiere como mecanismo implicado en la tolerancia al patógeno tanto bajo condiciones de riego continuo como de sequía.

El desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* mostró ser una herramienta fundamental para el estudio de los eventos tempranos de la infección de *F. virguliforme* en raíces de soja, permitiendo el análisis preliminar de inducción génica. Se observó que las plantas de soja reconocen efectores del patógeno de manera temprana, provocando un aumento en la expresión de receptores tipo quinasa. Estos receptores son responsables del reconocimiento y posterior activación de mecanismos de defensa.

El trabajo realizado en condiciones *in vitro* ha permitido confirmar la participación de la simbiosis micorrícica en la mitigación del daño causado por el patógeno fúngico de raíz *F. virguliforme*. Se observó un efecto protector por parte de los HMA ante el ataque de *F. virguliforme* en condiciones de crecimiento *in vitro*. Las plantas con buen porcentaje de micorrización previo al estrés biótico, se mantienen en estado de alerta y responden más efectivamente cuando son enfrentadas a Fv.

El desarrollo de esta metodología nos da la posibilidad de estudiar esta triple interacción y abre puertas a un estudio más detallado a nivel molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- Azcon-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6, 457–464.
- Bressano, M., Giachero, M. L., Luna, C. M., & Ducasse, D. A. (2010). An in vitro method for examining infection of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(3), 201-204.
- Friese, C. F., & Allen, M. F. (1991) The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*, 83, 409–418.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M-N, van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20, 519–530.
- Gibson, P. T., Shenaut, M. A., Njiti, V. N., Suttner, R. J., & Myers Jr, O. (1994). Soybean varietal response to sudden death syndrome. In: Proc 24th Soybean Seed Res Conf, Chicago, Illinois, 6-7.
- Gongora-Canul, C. C., & Leandro, L. F. S. (2011). Effect of soil temperature and plant age at time of inoculation on progress of root rot and foliar symptoms of soybean sudden death syndrome. *Plant Disease*, 95(4), 436-440.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
- Lacombe S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E., Peeters N., Dahlbeck D., van Esse H. P., Smoker M., Rallapalli G., Thomma B.P.H.J., Staskawicz B., Jones J. D. G. & Zipfel, C. (2010). Inter-family transfer of a plant pattern recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology*, 4, 365-369.
- Lenzi, L., Masiero, B., Conde, B., Fuentes, F., Distéfano, S., & Salines, L. (2013). Comportamiento de cultivares de soja frente al síndrome de la muerte súbita. Campañas 2006/07 a 2012/13. Informe de actualización técnica. EEA Marcos Juárez, (25).
- Navi, S. S., & Yang, X. B. (2008). Foliar symptom expression in association with early infection and xylem colonization by *Fusarium virguliforme* (formerly *F. solani* f. sp. *glycines*), the causal agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Health Progress*, doi, 10.1094/PHP-2008-0222-01-RS.
- Pozo, M. J., & Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 393-398.
- Pozo, M. J., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., & García-Garrido, J. M. (2015). Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 205(4), 1431-1436.
- Roy, K. W., Rupe, J. C., Hershman, D. E., Abney, T. S. (1997). Sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*; 81(10), 1100–11.
- Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(1), 27-34.

- Voets, L., de la Providencia, I. E., Fernandez, K., IJdo, M., Cranenbrouck, S., & Declerck, S. (2009). Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under *in vitro* conditions. *Mycorrhiza*, 19, 346–356.
- Westphal, A., Abney, T. S., Xing, L. J., & Shaner, G. E. (2008). Sudden Death Syndrome of Soybean. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094. PHI-I-2008-0102-01.

Anexo III

ANEXO III. 1: MANEJO DEL RIEGO.

Luego de la siembra de las semillas de soja pregerminadas, todas las macetas fueron regadas con agua destilada hasta saturación. Se dejaron escurrir 24 horas y posteriormente se midió el peso total, representando el peso de capacidad de campo. Cada uno de los tratamientos fue sometido a dos regímenes de riego, a un grupo se los mantuvo bajo riego continuo, llevado a capacidad de campo y al otro se lo sometió a un período de sequía.

Tratamientos capacidad de campo (CC). Las macetas fueron pesadas dos a tres veces por semana, adecuando el peso al valor de capacidad de campo antes calculado mediante la adición de agua destilada.

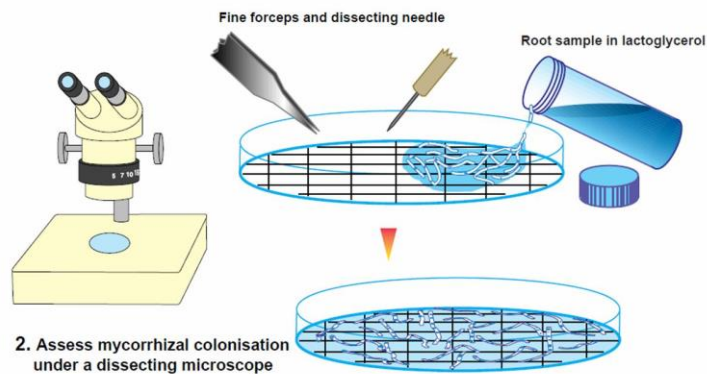
Tratamientos sequía. Las macetas fueron pesadas dos a tres veces por semana. Con ese valor se calculó el agua que habían consumido, tomando como referencia el peso al que las habíamos llevado el día de riego anterior. Al promedio de agua consumida por las plantas de cada tratamiento se procedió al cálculo del 60% y esa cantidad de agua fue agregaba a cada maceta. Si mostraban síntomas de marchitez se les agregaba toda el agua que habían consumido.

ANEXO III. 2: ESTIMACIÓN VISUAL DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN MÉTODO DE LA INTERSECCIÓN EN PLACA CUADRICULADA (GRIDLINE INTERSECTION METHOD)

Este método se utiliza para estimar la proporción de raíces infectadas así como su extensión total. La raíz fue extendida en una placa de petri de plástico de 10 x 10, en la que se realizó una grilla con cuadrados de 1 cm. Las líneas verticales y horizontales fueron escaneadas y la presencia o ausencia de infección fue anotada en cada punto donde la raíz interceptaba una línea. Luego se calculó el porcentaje de raíz micorrizada respecto al total de raíz (ver Figura 1).

THE GRIDLINE INTERSECTION METHOD

1. Randomly disperse cleared and stained roots in dish with grid lines



3. Follow all horizontal and vertical lines. Count intersects with roots and mycorrhizas separately

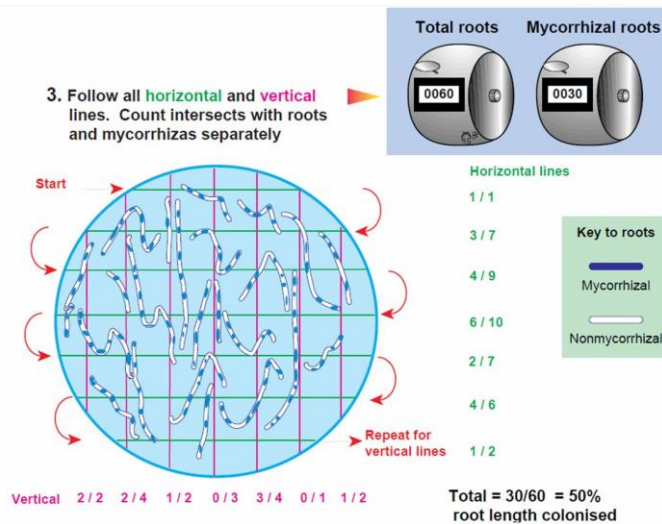


Figura 1. Representación del método de cuantificación micorrícica.

http://www2.dijon.inra.fr/m_ychintec/Protocole/protoframe.html

Giovannetti, M & Mosse, B (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytology*, 84, 489-500.

ANEXO III. 3: TINCIÓN DE MICORRIZAS CON AZUL TRIPÁN

SOLUCIONES DE USO

KOH 10%	Reactivo KOH	Cantidad 10 gr
	Llevar a 100 ml con agua destilada	
HCl 1%	Reactivo agua destilada	Cantidad 99 ml
	HCL absoluto	1 ml
Glicerol ácido	Reactivo agua destilada	Cantidad 450 ml
	glicerol	500 ml
	HCl	50 ml
Solución de azul tripán	Reactivo azul tripán	Cantidad 0,5 gr
	glicerol ácido	1litro

PROCEDIMIENTO

Las raíces seleccionadas fueron aclaradas colocándolas en una solución de KOH 2,5%, y mantenidas a 121°C por 5 min en autoclave. Luego, fueron enjuagadas en agua corriente y colocadas en una solución de H₂O₂ al 10% por 10 min para remover la pigmentación. Posteriormente, se colocaron en HCl al 1% por 3 min. Las raíces decoloradas se enjuagaron con agua destilada por 3 min antes de proceder a la tinción con azul tripán o sudán IV. Para teñirlas con azul tripán, las raíces fueron colocadas en la solución de azul tripán y autoclavados a 121°C por 3 min. Fueron conservadas en glicerol ácido. Para la tinción con sudán IV, las raíces fueron colocadas en la solución de sudán IV, autoclavadas a 121°C por 3 min y mantenidas en glicerol ácido. Para tinciones duales las raíces fueron teñidas inicialmente con azul tripán, desteñidas por 24 hs en glicerol ácido y transferidas a la solución de sudán IV. Luego desteñidas por 3 min en agua destilada y almacenadas en glicerol ácido.

Los segmentos radiculares fueron colocados en portaobjetos con algunas gotas de glicerol. El cubreobjetos fue presionado firmemente para facilitar la visualización a gran aumento (100X). Las raíces fueron observadas con microscopio Zeiss Axiophot en modo

convencional y DIC a 100X, y fotografiadas con la cámara de video a color Sony Power HAD.

Barrow, JR (2004). Unique Characteristics of a Systemic Fungal Endophyte of Native Grasses in Arid Southwestern Rangelands. Seed and soil dynamics in shrubland ecosystems: proceedings. 2002, August 12-16. A Hild, N Shaw, S Meyer, D Booth y E McArthur. Laramie, WY, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station: 216.

ANEXO III. 4: ESTIMACIÓN DE LOS PERÓXIDOS DE LÍPIDOS EVALUADOS COMO CONTENIDO DE MALONDIALDEHIDO (MDA)

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

TCA 0,1% Ácido tricloroacético	Reactivo	Cantidad
	TCA 100%.	0,1 ml
	Se completa a 100 ml con agua destilada	
TCA 20% Ácido tricloroacético	Reactivo	Cantidad
	TCA 100%.	20 ml
	Se completa a 100 ml con agua destilada	
TCA 20% Ácido tricloroacético + TBA	Reactivo	Cantidad
0,5% Ácido tiobarbitúrico	TCA 100%.	20 ml
	Ácido tiobarbitúrico	0,5 gr
	Se completa a 100 ml con agua destilada	

PROCEDIMIENTOS

Se molieron con mortero y aire líquido 0,2 gr de hojas con 1,5 ml de TCA al 0,1%. Los homogenatos fueron centrifugados a 15000 g por 10 min. El cromógeno fue formado al mezclar 0,5 ml del sobrenadante con 0,5 ml de la solución que contiene TCA 20%/TBA 0,5%. La mezcla se incubó a 90°C por 20 min. Los tubos se centrifugaron a 15000 g por 10 min y el sobrenadante fue usado para la lectura en espectrofotómetro (Heath and Packer, 1968).

MEDICIÓN EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Se leyó la absorbancia a **532 y 600 nm**. Ante ciertos materiales se puede incluir la lectura a 440 nm, con el fin de descontar los azúcares. Se preparó un blanco reemplazando la muestra por el medio de extracción, y los controles para cada muestra fueron preparados sin TBA al igual que Hodges y col. (Hodges, Delong *et al.*, 1999).

MEZCLA DE REACCIÓN

Problema 0,5 ml de muestra + 0,5 ml de TCA 20%/TBA 0,5%.

Testigo 0,5 ml de muestra + 0,5 ml de TCA 20%.

Blancos

Problema 0,5 ml de TCA 0,1% + 0,5 ml de TCA 20%/TBA 0,5%.

Testigo 0,5 ml de TCA 0,1% + 0,5 ml de TCA 20%.

CÁLCULOS A POSTERIORI

MDA (mmoles/gr) = (Delta A x Vol. extracción x Dilución)/(ε x Peso Fresco de muestra x 1000)

Delta A: resta de los valores de absorbancia a 532 y 600 nm de los problemas menos la diferencia de los valores de los testigos.

Volumen de extracción (ml): en este caso 1,5.

Dilución: Volumen final de reacción / volumen de muestra (en este caso 1/0,5 =2)

ε: Coeficiente de extinción molar *155 milimolar-1.cm -1*.

Peso Fresco de muestra (gr): en este caso 0,2 gr.

1000 (mililitros/litros): para pasar de mMolar a mmoles/ml.

Heath, R y Packer, L (1968). "Photoperoxidation in isolated chloroplast.I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation." Arch. Biochem. Biophys 125(1): 189-198.

Hodges, D, Delong, J, Forney, C y Prange, R (1999). "Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues and other interfering compounds." Planta 207: 604-611.

ANEXO III. 5: EXTRACCIÓN DE MATERIAL PARA LA MEDICIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS STOCK

	Reactivos	Cantidad
K ₂ HPO ₄ (fosfato mono ácido–di básico de potasio) 0,5M- PM174, 2 (pH 9).	K ₂ HPO ₄	21,8 gr
	Llevar a 250 ml con agua destilada.	
KH ₂ PO ₄ (fosfato di ácido– monobásico de potasio) 0,5M – PM 136,1 (pH 4,33).	KH ₂ PO ₄	17 gr
	Llevar a 250 ml con agua destilada.	
Buffer fosfato de potasio 0,5M 10X	A la solución de K ₂ HPO ₄ 0.5M ir agregando la solución de KH ₂ PO ₄ 0,5M hasta llegar al pH deseado para cada enzima.	
EDTA tetra sódico 10X (10mM) (Ácido Etilendiaminotetracético) (PM 380,2)	Reactivos	Cantidad
	EDTA	0,760 gr
	Llevar a 200 ml con agua destilada.	

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DE USO

	Reactivos	Cantidad
Buffer extracción 0,05M	Buffer fosfato de potasio 0,5M	1 ml
	EDTA 10 mM	1 ml
	Agua destilada	8 ml

PROCEDIMIENTO

Material vegetal: 200 mg.

Buffer extracción frío: 1,5 ml.

Si hubiera poca muestra, disminuir las cantidades proporcionalmente: 100 mg de muestra y 0,75 ml de buffer extracción.

Se molieron con mortero y aire líquido 0,2 gr de hojas con 1 ml de buffer extracción 0,05 M y una cucharadita de PVPP (Polivinilpirrolidona). Se homogeniza y se coloca en un eppendorf. Luego se enjuaga el mortero con los 0,5 ml restante de buffer. El

PVPP es agregado a la mezcla para contrarrestar el efecto de las impurezas ya que actúa como scavenger de radicales libres que pudieran oxidar los fenoles de la muestra; luego, el mismo precipita en la centrifugación.

Se centrifugó a 14000 rpm durante **30** min a 4° C. Se pasó el sobrenadante a otro eppendorf limpio y se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante **10** min a 4°C. Luego, se mantiene en hielo.

El Buffer extracción varía según las diferentes enzimas:

Superóxido dismutasa: Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4

Catalasa: Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4

Ascorbato peroxidasa: Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,2 agregando 5 mM de ácido ascórbico (PM: 198,1)

ANEXO III. 6: TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

FUNDAMENTO

El colorante azul brillante de Coomasie tiene su capacidad de absorción máxima a 465 nm, sin embargo cuando se acopla con proteínas, este pico se traslada a 595 nm. Existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas presente en la muestra.

Ésta técnica se utiliza para cuantificar entre 1 a 10 µg de proteínas. Para cuantificar de 10 a 100 µg se debe incrementar el volumen de la solución de colorante en 5 veces.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DE USO

	Reactivo	Cantidad
Reactivo de Coomasie	Azul Brillante Coomasie (BBC) (G-250)	0,1 gr
	Etanol al 95%	50 ml
	Ácido Fosfórico al 85% (p/v).	100 ml
	Llevar a 1l con agua destilada. Filtrar con papel Whatman N°1. Almacenar en frasco ámbar a 4°C (máx. 6 meses).	

MEDICIÓN EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Se mide a una longitud de onda de 595 nm

CURVA PATRÓN

Se preparó una solución de Albúmina de 1 mg/ml. A partir de esta solución se tomaron las muestras para preparar los estándares de referencia. Con ellos se construyó la curva estándar, con la que se compararon las muestras experimentales para determinar la concentración de proteína total.

Tubos	Agua (µl)	Albúmina(1 mg/ml)	Coomasie (µl)	Cantidad de albúmina (µg)
Blanco	500	--	500	0
1	499	0.5 µl	500	0,5
2	499	0.75 µl	500	0,75
3	499	1 µl	500	1
4	498	2 µl	500	2
5	495	5 µl	500	5
6	490	10 µl	500	10
7	480	20 µl	500	20

Luego se procedió a graficar los resultados:

Eje Y = absorbancia obtenida a 595 nm

Eje X = cantidad de albúmina (µg).

La curva se utilizó para determinar la concentración de proteínas en las muestras experimentales.

MEZCLA DE REACCIÓN

Tratamientos	Reactivo Coomasie	Agua	Extracto
Blanco	500 µl	500 µl	---
Problema	500 µl	490 µl	10 µl*

* El extracto se agrega en cantidades suficientes para ser detectado por la curva patrón. O sea en una concentración de proteínas que quede dentro del rango en que se hizo la curva patrón.

PROCEDIMIENTOS

Las muestras se pueden guardar refrigeradas (4°C) por 3 días, o congeladas (-20°C) por 2 meses. Las muestras se deben centrifugar a 3000 RPM por 3 min. Los tubos problema se deben hacer por duplicado.

Se prepara la mezcla de reacción y se mide luego de 5 min de incubación a T° ambiente. El color máximo se desarrolla en 5 min pero el color puede disminuir de tono luego de 10 a 15 min. La disminución máxima ocurre a las 4 h. Por todo lo anterior la valoración debe ser en un máximo de 10 hasta 15 min. El rango de error en el color es de un 2%.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Sedmark, J. and Grossberg, J.E. 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for proteins using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry*, 79, 544-552.

ANEXO III. 7: TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

FUNDAMENTO

La luz Ultra Violeta (UV) influye sobre la riboflavina, la cual se oxida reduciendo el oxígeno a ión superóxido. Éste, a su vez, en presencia de metionina como catalizadora, se oxida reduciendo el NitroBlueTetrazolium (NBT) a blue formazan, responsable de la coloración azul. Así la concentración del ión superóxido está directamente relacionada con el color. El extracto vegetal incluye la enzima SOD, la cual dismuta o secuestra el ión superóxido. Es por esto que a mayor cantidad de SOD se reduce menor cantidad de NBT y se obtiene una menor coloración.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DE USO

EDTA 1 μ M	Reactivos	Cantidad
	EDTA 10 mM	1 ml
Metionina 130 mM (PM 149,2)	Agua destilada	9 ml
	Reactivos	Cantidad
NBT 750 μ M (PM 817,8)	Metionina	0,19 gr
	Llevar a 10 ml con agua destilada. Debe prepararse en el momento	
	Reactivos	Cantidad
	NBT	0,00613 gr
	Llevar a 10 ml con agua destilada. Debe prepararse en el momento	

Riboflavina 40 μ M (PM 376,4)	Reactivos	Cantidad
	Riboflavina	3,8 mg
	Llevar a 250 ml con agua destilada. Debe prepararse en el momento	

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA

Se preparó una mezcla general, de la cual agregamos 400 μ l en la cubeta. Se debe mantener en oscuridad envolviendo la probeta con papel aluminio. No poner en hielo porque precipita.

Reactivo	Cantidad
Buffer Fosfato de potasio 0,5 M pH 7.8	10 ml
EDTA 1 μ M	10 ml
Metionina 130 mM	10 ml
NBT 750 μ M (PM 817,8)	10 ml

MEDICIÓN EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

MEZCLA DE REACCIÓN

Tratamientos	MIX (Bf., NBT, metionina, EDTA)	Riboflavina	Extracto vegetal	H2O destilada
Blanco	400 μ l	100 μ l	---	500 μ l
Testigo	400 μ l	100 μ l	---	500 μ l
Problema	400 μ l	100 μ l	20 – 100 μ l	400-480 μ l

PROCEDIMIENTO

Se midió en el espectrofotómetro la Densidad Óptica con longitud de onda **560 nm**, en cubetas de cuarzo.

1°- El **blanco** incluyó la mezcla de reacción excepto el extracto (Mix. + Riboflavina) y no se expone a la luz UV. Fue realizado para hacer el blanco del espectro.

2°- Debió determinarse la concentración óptima de Riboflavina en los tubos testigos sin el extracto vegetal. Se realizó una curva, agregando desde 10 μ l de Riboflavina hasta 100 μ l, variando el agua, con la mezcla constante hasta completar 1 ml de la cubeta. Se expuso a luz UV 9 min, y se midió en el espectrofotómetro, habiendo determinado el blanco con 100 μ l de Riboflavina.

Elegimos la concentración en la cual la densidad óptica estuvo cercana a 0,250. La Riboflavina debe agregarse como último reactivo, mezclando bien, y colocando en la luz UV inmediatamente.

3º- La concentración óptima del extracto vegetal debió determinarse haciendo una curva. Se eligió uno de los tubos problema, se colocó 20, 40, 60 y 80 µl de muestra, con la concentración de Riboflavina elegida en el paso 2, 400 µl de mix y agua hasta completar 1 ml. Se mezcló, se colocó 9 min en la luz UV, y se midió la absorbancia. Tener la precaución de colocar siempre primero un testigo, hecho con todo menos la muestra, para poder asegurarnos de que la reacción fue efectiva, el testigo, como antes, debe dar 0,25 aprox.

La densidad óptica de los problemas debe ser superior a 0,030. Elegir la cantidad de muestra problema que de entre 0,25 y 0,03 de DO.

4º- Luego de determinar la cantidad de Riboflavina y de muestra a utilizar, se comenzó con la medición. Primero colocamos el testigo, que lleva toda la mezcla de reacción excepto el extracto (Mix. + Riboflavina). Aquí se desarrolló el máximo de color, al cual le vamos a restar la DO del problema. En los tubos **problema** se colocó Mix + Extracto + Riboflavina. Se puede preparar todos los tubos inicialmente, ya que la reacción se inicia al agregar la Riboflavina. Ingresamos los tubos a la incubación a UV cada 20 segundos, inmediatamente después de agregar la Riboflavina, y los retiramos al concluirse los 9 min, cada 20 segundos en el orden de ingreso.

CÁLCULOS

Una unidad SOD se define como la cantidad de enzima que causa el 50% de inhibición de la reducción fotoquímica del NBT.

$$\text{SOD: } (\text{DO Testigo} / \text{DO problema}) - 1$$

Si la DO del problema y del testigo son iguales: el cociente es 1 y el resultado final es 0. Si la DO del problema es la mitad de la del testigo: el cociente es 2 y el resultado final es 1.

USOD/gr peso fresco= (USOD * Vol. extracción) / (peso fresco de hoja * Vol. del extracto en la reacción).

Referirlas a mg de proteínas, luego de cuantificar los extractos mediante la técnica de medición de proteínas (Anexo 6).

Beauchamp, C. O., & Fridovich, I. (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 317(1), 50-64.

ANEXO III. 8: TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE CATALASA (CAT)

FUNDAMENTO

En el espectrofotómetro se mide la disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El extracto vegetal contiene CAT, la cual reacciona con el H_2O_2 . Se observa una disminución de la absorbancia debida a la reducción de H_2O_2 por la enzima antioxidante CAT.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DE USO

Solución de peróxido de hidrógeno 50 mM

Titulamos el peróxido de hidrógeno puro. Se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 240 nm. Se calculó su molaridad con el siguiente coeficiente de extinción: $38 \times M H_2O_2 \cdot l \times cm^{-1}$,

Molaridad H_2O_2 puro = $38 / \text{Absorbancia a 240 nm}$

Alícuota a extraer = $(\text{Vol. Solución buscada} \times [H_2O_2] \text{ buscada}) / ([H_2O_2] \text{ puro}) = (10 \text{ ml.} \times 0,050 \text{ M}) / M H_2O_2 \text{ puro}$

MEDICIÓN EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

MEZCLA DE REACCIÓN

Tratamientos	H ₂ O destilada	Buffer Fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4	Extracto vegetal	H ₂ O ₂ 50 mM*
Blanco	900 µl	100 µl	---	---
Testigo	800 µl	100 µl	---	100 µl
Problema	De 790 ul a 750 µl	100 µl	10 - 50 µl	100 µl

*Si se ve una disminución muy errática en la caída de DO se puede probar bajando la concentración de H_2O_2 de 50 a 25 mM.

PROCEDIMIENTOS

Lo que se mide en el espectrofotómetro es la absorbancia del peróxido. Mientras más enzima tenga el extracto, hay más reducción del peróxido y hay una caída de la DO (densidad óptica) más marcada (un ángulo mayor) en el tiempo.

Se mide en cubetas de cuarzo. Se trabaja con longitud de onda 240 nm (coeficiente de extinción $43.6 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$) Se mide durante 30-45 segundos con intervalos de 1 segundo.

1°- El blanco se realizó solo con el buffer y el agua destilada. Luego se midió el testigo, el cual debe dar una absorbancia de alrededor de 0,5, si diera más baja o más alta modificar la concentración de H₂O₂ presente en la mezcla de reacción.

2°- La concentración óptima del extracto vegetal debió determinarse mediante una curva. Se eligió uno de los tubos problema, se colocó entre 10 a 50 ul de muestra. Se comprobó que ante un aumento del extracto, aumenta el delta (alfa) de DO. Se buscó seleccionar una alícuota de extracto en la cual la relación con el delta alfa sea lineal, esto es que los aumentos de concentración del extracto conlleven un aumento directo en la caída de la curva. De esta manera nos aseguramos estar dentro de la curva de sensibilidad de la técnica.

CÁLCULOS A POSTERIORI

CAT (mmoles H₂O₂ /mg): ((ΔA 240. min⁻¹) x Vol. Extracción x Dilución)/ (43,6 x peso fresco de muestra x 1000)

ΔA 240. min⁻¹: Es la diferencia entre la densidad óptica inicial y la final a 240 en un min.

Vol. Extracción (ml): en este caso 1,5.

Dilución: Volumen final de reacción / volumen muestra (1000 μ l/10 μ l)

43,6 mM⁻¹: Coeficiente de extinción molar (factor de relación entre DO y concentración)

Peso fresco de muestra (g): 0,2 gr.

1000 (mililitros/litros) para pasar de mMolar a moles / ml.

1 unidad CAT descompone 1 micromol de H₂O₂ por min (a 25 °C y pH 7,0)

Aebi, H (1984). Catalase *in vitro*. Methods Enzymology, 105, 121-126.

ANEXO III. 9: TÉCNICA DE MEDICIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE ASCORBATO PEROXIDASA (APX)

FUNDAMENTO

En este caso se mide la absorbancia del ácido ascórbico. En presencia de peróxido de hidrógeno, el ácido ascórbico se reduce a dehidroascorbato o monodehidroascorbato. Luego, la enzima antioxidante ascorbato peroxidasa, presente en el extracto vegetal, oxida

el ácido ascórbico reduciendo el peróxido de hidrógeno. Se mide la disminución de absorbancia del ácido ascórbico por su oxidación.

PREPARACIÓN DE LOS REATIVOS DE USO

Buffer Determinación	Reactivo	Cantidad
	Buffer Fosfato 0.5 M pH 7,2	16 ml
	EDTA	0,0061 gr
	De esta solución, apartamos 1 ml como buffer para el blanco A los 15 ml restantes, le agregamos	
	Ácido Ascórbico	0,0149 gr
	Se mantienen en hielo	
H ₂ O ₂ 1 mM	Se sigue el procedimiento descrito en la técnica CAT	

MEDICIÓN EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Lo que se mide en el espectrofotómetro es la cinética de la absorbancia del ácido ascórbico. Mientras más enzima tenga el extracto, hay más oxidación del ácido ascórbico y hay una caída de la DO (densidad óptica) más marcada (un ángulo mayor) dentro de la cinética.

El pico de absorbancia del ácido ascórbico se encuentra a una longitud de onda de 265 nm (en este punto el coeficiente de absorción es de $14 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Sin embargo, debido a que a dicha longitud de onda, las absorbancia superan el valor de 1, se puede trabajar a otras longitudes de onda menores modificando el coeficiente de extinción molar. A 290 nm, el coeficiente es de $2,8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ según Asada. A 295 nm, el coeficiente que hemos calculado es de $1,2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Se mide durante 1 min con intervalos de 5 segundos.

MEZCLA DE REACCIÓN

Tratamientos	H ₂ O destilada	Buffer determinación	Extracto vegetal	H ₂ O ₂ 1 mM
Blanco	800 µl	100 µl (sin ascórbico)	---	100 µl
Testigo general	800 µl	100 µl	---	100 µl
Problema	De 790 µl a 730 µl	100 µl	10 - 70 µl	100 µl
Testigo part.	De 890 µl a 830 µl	100 µl	10 - 70 µl	---

PROCEDIMIENTOS

Todos (tanto problemas como testigos) se llevan a un volumen final de 1 ml. Se mide en cubetas de cuarzo. El orden de las mediciones fue el siguiente: blanco, testigo general, curva de determinación de la alícuota de los problemas, problemas, testigos particulares.

Orden de los reactivos: H₂O, Buffer, Ascórbico, extracto (homogeneizar), H₂O₂, (homogeneizar).

1°- El **blanco** se realizó con el buffer con EDTA sin ascórbico y H₂O₂.

2°- Cuando se realizó la cinética del **testigo general**, los valores deben ser cercanos a cero, de otra manera, significaría que están ocurriendo oxidaciones inespecíficas del ácido ascórbico debido a contaminación del buffer o excesiva cantidad de H₂O₂ (oxidación no enzimática del ascórbico por H₂O₂).

3°- En los tubos **problema** se evaluaron diferentes cantidades de extracto vegetal. Se comprueba que ante un aumento del extracto, aumenta el delta (alfa) de DO. Se busca seleccionar una alícuota de extracto en la cual la relación con el delta alfa sea lineal.

4°- En los tubos **testigos particulares**, se colocó todo menos H₂O₂, para descartar las oxidaciones inespecíficas del extracto con otros metabolitos. Tiene que dar valores cercanos a cero.

CÁLCULOS A POSTERIORI

$APX = (\text{Pendiente} \times \text{Vol. extracción} \times \text{Dilución}) / (\epsilon \times \text{Peso Fresco de muestra} \times 1000)$

APX (mmol Ascorbato Oxidado)/ min x g hoja fresca)

Pendiente: [Rates dA/min del problema – Rates del testigo particular]

Volumen de extracción (ml): en este caso 1,5.

Dilución: Vol. final de reacción / vol. Muestra

ϵ : coeficiente de extinción molar (el cual depende de la longitud de onda)

Peso Fresco de muestra (gr): en este caso alrededor de 0,2.

1000 (mililitros/litros): para pasar de mMolar a m moles/ ml

Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.

**ANEXO III. 10: PROTOCOLO GELES DISCONTINUOS-NO
DESNATURALIZANTES**

PREPARACIÓN DE LOS GELES

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK

Buffer de corrida 10X	Reactivo		
	TRIS		30 gr
	Glicina		144 gr
	Llevar a 1 l con agua destilada		
Buffer de separación TRIS 1,3 M pH 8,8	Reactivo	100 ml	PM
	TRIS	18,15 gr	121,1 gr
	Agua	50 ml	
	Ajustar el pH con ClH puro. Llevar a 100 ml con agua destilada.		
Buffer de concentración TRIS 0,22 M pH 7	Reactivo	100 ml	PM
	TRIS	2,66 g	121,1 g
	Agua	100 ml	
	Ajustar el pH con ClH puro. Llevar a 100 ml con agua destilada.		
Acrilamida para el gel de separación 30:0,8%	Reactivo		100 ml
	Acrilamida		30 gr
	Bis acrilamida		0,8 gr
	Agua		50 ml
	Llevar a 100 ml con agua destilada. Conservar en heladera cubierto con papel aluminio.		
Acrilamida para el gel de concentración: 10:2%	Reactivo		100 ml
	Acrilamida		10 gr
	Bis acrilamida		2 gr
	Agua		50 ml
	Llevar a 100 ml con agua destilada. Conservar en heladera cubierto con papel aluminio		
Azul de bromo fenol	Reactivo		
	Azul de bromo fenol		0,003 gr

	Agua	10 ml
	Conservar en heladera cubierto con papel aluminio	
Buffer muestra - 4X	Reactivo	
	Buffer concentración	2 ml
	Glicerol	2 ml
	Azul de bromo fenol (Sol. Stock)	2 ml
	Volumen final	6 ml
	Conservar a T° ambiente cubierto con papel aluminio	
Per sulfato de NH ₄ 10%	Reactivo	
	Per sulfato de amonio	1 gr
	Agua	10 ml
	Alicuotar en tubos epp y mantener a -20°C	

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE USO

Gel	de	Reactivo (ml)	10%	11%	12%
Separación		Agua	2,45	2,18	1,914
		Acril/Bis 30:0,8%	2,66	2,93	3,196
		Buffer separación	2	2	2
		Glicerol	0,8	0,8	0,8
		En el momento de preparar el gel agregar			
		TEMED	0,012	0,012	0,012
	Per sulfato de amonio 10%	0,12	0,12	0,12	
	<i>Volumen final</i>	8,042	8,042	8,042	
Gel	de	Reactivo (ml)			
Concentración		Agua		0,556	
		Acril/Bis 10:2%		2	
		Buffer concentración		1	
		Glicerol		0,4	
	En el momento de preparar el gel agregar				

	TEMED	0,008
	Per sulfato de amonio 10%	0,08
	<i>Volumen final</i>	4,04
Buffer	de Reactivo	Cantidad
corrida 1X	Buffer corrida 10X	50 ml
	Agua	450 ml
	Volumen final	500 ml
Buffer	de Reactivo	Cantidad
corrida 1X con	Buffer corrida 10X	50 ml
ascórbico	Ascórbico	0,198 gr
(APX)	Agua	450 ml
	Volumen final	500 ml

PROCEDIMIENTO

GEL DE SEPARACIÓN

Se ensamblaron los vidrios con los separadores de 1,5 mm. Luego se marcó el límite hasta donde la matriz de acrilamida será vertida, trazando una línea horizontal en el vidrio con un marcador indeleble. Para saber la ubicación exacta de la línea, colocar el peine entre ambos vidrios y medir 1 centímetro por debajo de los dientes del peine.

Se realizó la mezcla del gel de separación a una concentración de acuerdo a la enzima en cuestión, mezclando los distintos componentes, para los Geles SOD y APX se utilizaron concentraciones del 10 al 11%

Una vez finalizada la solución, se añadieron los catalizadores Persulfato de amonio y TEMED uno por uno, tratando de mezclar cada reactivo de manera uniforme en todo el volumen. La polimerización de la solución recién comienza cuando ambos reactivos son agregados. Inmediatamente la solución fue vertida entre los vidrios hasta la línea trazada.

Posteriormente, se añadió una capa de agua (aproximadamente 1000 µl) sobre la solución de poliacrilamida para evitar el ingreso de moléculas de oxígeno que retarden la polimerización.

Se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 15 min, usando como control de polimerización la solución de poliacrilamida remanente. Una vez formado el gel, se descartó la capa de agua.

GEL DE CONCENTRACIÓN

El gel de concentración es la matriz de poliacrilamida que tiene como característica retener las proteínas manteniéndolas uniformes antes que ellas migren hacia el gel de separación. Este proceso permite mejorar la resolución de las proteínas en la electroforesis.

Se mezclaron los componentes del gel de concentración y se agitó a fin de asegurar que el TEMED y el APS se distribuyan uniformemente en todo el volumen de la solución.

Se agregó la solución entre los vidrios de la cámara y sobre el gel de separación ya polimerizado. Inmediatamente después, se colocó el peine entre ambos vidrios.

Se dejó polimerizar la poliacrilamida a temperatura ambiente por 15 min, usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedó remanente en el vaso de precipitado. Al momento que se coloca, el gel se vuelve opaco y blanquecino.

Una vez formado el gel, fue colocado en el tanque, y se agregó 150 ml de buffer de corrida 1X en el espacio entre los geles se retiró el peine cuidadosamente. Para geles de APX se utilizó el buffer de corrida conteniendo ascórbico. Lavar todos los pocillos ya formados con chorro suave del mismo buffer. Colocamos 200 ml de buffer corrida 1X en el exterior de los geles. Para geles de APX utilizamos el buffer de corrida con ascórbico.

Precorrer el gel por al menos 20 min, a amperaje constante $I=12,5$ mA por gel.

Davis, BJ (1962). Disc electrophoresis II—Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academy of Sciences*, 121, 404-427.

ANEXO III. 11: SUPERÓXIDO DISMUTASA-GELES NO DESNATURALIZANTES

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK

K ₂ HPO ₄ 0.5 M PM174.2 (pH 9)	Reactivos	Cantidad
	K ₂ HPO ₄ Llevar a 250 ml con agua destilada.	21.8 gr
KH ₂ PO ₄ 0.5 M PM136.1 (pH 4.33)	Reactivo	Cantidad
	KH ₂ PO ₄ Llevar a 250 ml con agua destilada.	17 gr
Buffer fosfato de potasio 0.5 M 10X pH 7.8	A la solución de K ₂ HPO ₄ ir agregando la solución de KH ₂ PO ₄ hasta llegar al pH de 7.8 aprox 37 ml de este ultimo para 250 ml de K ₂ HPO ₄ .	
Buffer fosfato de potasio 0.5 M 10X pH 7.4	A la solución de K ₂ HPO ₄ ir agregando la solución de KH ₂ PO ₄ hasta llegar al pH de 7.4, aprox 70 ml de este ultimo para 250 ml de K ₂ HPO ₄ .	

SOLUCIONES A PREPARAR

Buffer fosfato de potasio 0.05 M pH 7,4	Reactivo		Cantidad (ml)
	Agua		8
	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4		1
	EDTA 10 mM		1
	<i>Volumen final</i>		10
SOD purificada	Reactivo	1 gel	10 geles
	Agua	29,8 µl	298 µl
	Buffer Muestra	10 µl	100 µl
	SOD 5U/ul	0,2 µl	2 µl
	<i>Volumen final</i>	40	400
Preparación de las muestras	Reactivo		Gel 1,5 mm peine 10 calles
	Muestra		ul para la cant. de prot. deseada
	Agua		hasta 30 µl
	Buffer muestra		10 µl
	<i>Volumen final</i>		40 µl

PROCEDIMIENTOS

Se molieron 0,1 gr de hoja en mortero con aire liquido. Se colocaron 0,45 ml de buffer y una cucharadita de PVPP. Se centrifugó 20 min a 12000 rpm a 4°C. Como observamos inhibición de la enzima, se procedió filtrar el extracto mediante un epp de 0,5 ml perforado colocado dentro de un epp de 1,5 ml. El epp pequeño se rellenó con lana de vidrio, y por encima 3 cucharaditas de Sephadex G25. Allí se colocó el sobrenadante de cada tubo y se centrifugó 10 min a 80 rpm. Mantener en hielo.

Realizamos Bradford con el fin de cuantificar la concentración de proteínas. En hojas de soja la concentración de proteínas estuvo alrededor de 2-6 µg por ul de extracto.

Se calculó la cantidad de proteínas a sembrar por calle. Se recomienda entre 40 y 70 µg. Inicialmente realizamos una calibración de las concentraciones a sembrar colocando concentraciones crecientes de proteínas y observando que a mayor cantidad de proteínas mayor actividad. Además en cada gel se sembró una unidad de SOD purificada.

Las muestras a sembrar se prepararon calculando 1 parte de buffer muestra y tres de muestra, diluyendo con agua hasta completar el volumen.

Se depositó cuidadosamente este volumen en cada pocillo, con un tip blanco, evitando la contaminación del pocillo contiguo.

Se seleccionó mantener el amperaje constante, bajo esta condición el voltaje aumenta durante la corrida. El valor del amperaje o corriente eléctrica (medida en amperios o miliamperios) dependerá de la fuerza iónica del buffer. En el caso de trabajar con buffer

Tris-Glicina 1X el valor recomendado es de 25 a 30 miliamperios por gel. Se corre por aproximadamente 1 hora, hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) llegó al límite inferior del gel.

Se separó el gel de empacamiento del gel de resolución realizando un corte transversal. Se hizo una pequeña muesca en una de las esquinas del gel, a fin de que sirva de orientación para ubicar el orden en que fueron cargadas las muestras. Se removió el gel. Para desprender el gel del vidrio remojarlo nuevamente con buffer de electroforesis o agua destilada y usar uno de los espaciadores a manera de espátula para levantarlo por una de las puntas. El buffer de electroforesis puede ser devuelto a su frasco original para su posterior uso, pudiendo ser reciclado 1 o 2 veces, aunque mucho uso puede afectar el tiempo de corrida.

Los vidrios, los espaciadores y el tanque deberán ser lavados con abundante agua y detergentes que puedan ser fácilmente removidos. Posteriormente, enjuagarlos con agua destilada y secarlos.

REVELADO DEL GEL

SOLUCIONES DE USO

Solución de preincubado	Reactivo	Cantidad		
	Buffer 0,5 M pH 7,8		8 ml	
	EDTA 10 mM		8 ml	
	<i>Volumen final</i>		80 ml	
Solución de teñido	Reactivo	Cantidad	[Final]	PM
	Solución de preincubado	40 ml	0,05 M	
	TEMED	54 µl	0,135%	116,21 gr
	Riboflavina 3,3 mM	800 µl	66 µM	376,37 gr
	NBT	0,020 gr	0,61mM	817,7 gr

Se colocó el gel en la solución de preincubado durante 25 min en oscuridad con agitador rotatorio, mientras se preparaba la solución de teñido. Se incubó el gel en la solución de teñido por 25 min en oscuridad en agitador. Se enjuagó en agua destilada, y se expuso a la luz hasta que aparecieron bandas claras de actividad SOD sobre un fondo azul oscuro. Las isoenzimas individuales SOD fueron identificadas de acuerdo a Sandalio y col. (1987). Los geles fueron preincubados por 30 min en buffer fosfato 50 mM (pH 7,8), conteniendo ya sea, 2 mM KCN o 5 mM H₂O₂ y luego fueron revelados con la solución de

teñido. Las enzimas que contienen Cu/Zn son inhibidas por KCN e inactivadas por H₂O₂, mientras que las enzimas FeSOD son resistentes a KCN e inhibidas por H₂O₂. Las MnSOD son resistentes tanto a KCN como a H₂O₂.

En la Figura 1A se puede observar un gel de calibración SOD, a partir del cual, se hizo un gráfico de calibración (Figura 1B) para determinar la concentración de proteína a usar.

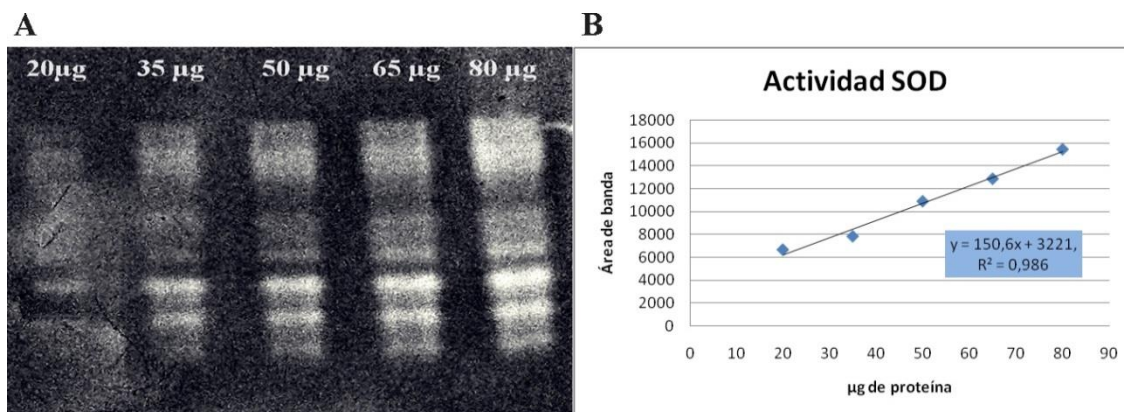


Figura 1: **A:** Gel de calibración SOD. Actividad Superóxido dismutasa para diferentes concentraciones de una muestra de soja control. **B:** Gráfico de calibración que muestra la relación entre la concentración de proteínas (µg) y el área de las bandas, con un R² de 0,986

Para poder reconocer las diferentes isoformas de la enzima SOD, se sembró la misma concentración de proteína (70 µg) por triplicado en un mismo gel, los cuales fueron cortados en el momento de hacer el revelado. Después de la electroforesis, fue visualizada la actividad SOD. Cada gel fue incubado en diferentes soluciones. El gel control fue pre-incubado en búfer fosfato pH 7,8, y los otros dos se pre-incubaron en búfer fosfato pH 7,8 con 5 mM de H₂O₂ o con 2mM de KCN (Beauchamp and Fridovich, 1971).

De este modo, como se puede observar en la Figura 2, se detectó la presencia de la isoforma MnSOD en todos los geles (A, B y C) ya que no es inhibida ni por H₂O₂ ni por KCN. Sin embargo, la isoforma CuZnSOD, es inhibida tanto por H₂O₂ como por KCN, de manera que sólo estuvo presente en el gel control (C). No así la isoforma FeSOD que se inhibe por H₂O₂ pero no por KCN, por lo que estuvo presente en los geles B y C.

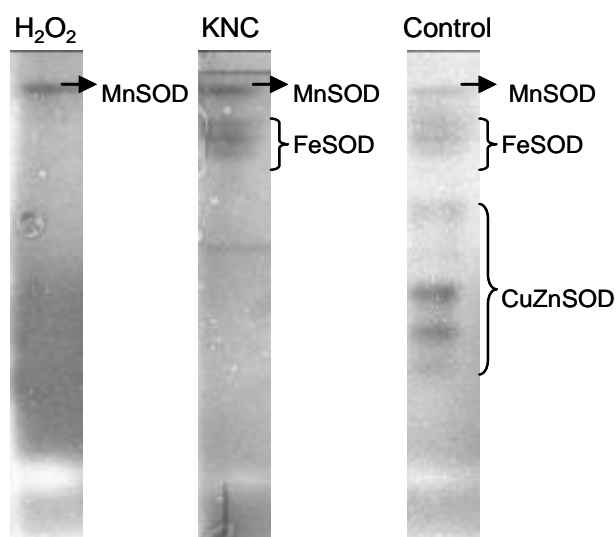


Figura 2: Gel de inhibición para la enzima SOD. Se sembraron 70 µg de proteínas en cada calle. En el gel A se puede ver la isoforma MnSOD que no es inhibida por H₂O₂ (5 mM). En el gel B se observan las isoformas FeSOD y MnSOD, las cuales no son inhibidas por KNC (2 mM). Finalmente, en el gel C, las formas CuZnSOD, FeSOD y MnSOD.

Beauchamp, C & Fridovich, I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.

Beauchamp, CO & Fridovich, I (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochimica et Biophysica Acta*, 317(1), 50-64.

Sandalio, LM, Palma, JM & Rio, LAD (1987). Localization Of Manganese Superoxide Dismutase In Peroxisomes Isolated From *Pisum sativum L.* *Plant Science*, 51, 1-8.

Donahue, JL, Okpodu, CM, Cramer, CL, Grabau, EA & Alscher, RG (1997). Responses of Antioxidants to Paraquat in Pea Leaves (Relationships to Resistance). *Plant Physiology*, 113(1), 249-257.

ANEXO III. 12: GEL APX -GELES NO DESNATURALIZANTES

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK

Buffer fosfato de potasio 0,5 M 10X pH 7,0	A la solución de K ₂ HPO ₄ ir agregando la solución de KH ₂ PO ₄ hasta llegar al pH de 7,0.						
EDTA tetra sódico 10 X (10 mM) (Ácido Etilendiaminotetracético) (PM 380,2)	<table border="0"> <thead> <tr> <th>Reactivo</th> <th>Cantidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EDTA</td> <td>0,760 gr</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Llevar a 200 ml con agua destilada</td> </tr> </tbody> </table>	Reactivo	Cantidad	EDTA	0,760 gr	Llevar a 200 ml con agua destilada	
Reactivo	Cantidad						
EDTA	0,760 gr						
Llevar a 200 ml con agua destilada							

SOLUCIONES DE USO

Buffer extracción pH 7	Reactivo	Cantidad	Concentración	PM
	Bf. fosfato de potasio 0,5 M	1 ml	50 mM	
	pH 7			
	EDTA 10mM	1 ml	1mM	
	Ácido Ascórbico	0,01 gr	5 mM	198,1
	Agua	8 ml		
	Volumen final	10 ml		
Preparación de las muestras	Reactivo		Gel 1,5 mm – peine	10 calles
	Muestra		µl con la cant.de prot. deseada	
	Agua		Hasta 45 µl	
	Buffer muestra		15 µl	
	<i>Volumen final</i>		60 µl	

PROCEDIMIENTOS

Se molieron 0,1 gr de hoja en mortero con aire liquido. Se colocaron 0,45 ml de buffer y una cucharadita de PVPP. Se centrifugó 20 min a 12000 rpm a 4°C. Como observamos inhibición de la enzima, se procedió filtrar el extracto mediante un epp de 0,5 ml perforado colocado dentro de un epp de 1,5 ml. El epp pequeño se rellenó con lana de vidrio, y por encima 3 cucharaditas de Sephadex G25. Allí se colocó el sobrenadante de cada tubo y se centrifugó 10 min a 80 rpm. Mantener en hielo.

Realizamos Bradford con el fin de cuantificar la concentración de proteínas. En hojas de soja la concentración de proteínas estuvo alrededor de 2-6 µg por ul de extracto.

Se calculó la cantidad de proteínas a sembrar por calle. Se recomienda entre 30 a 40 µg. Inicialmente realizamos una calibración de las concentraciones a sembrar colocando concentraciones crecientes de proteínas y observando que a mayor cantidad de proteínas mayor actividad (Figura 3A y B).

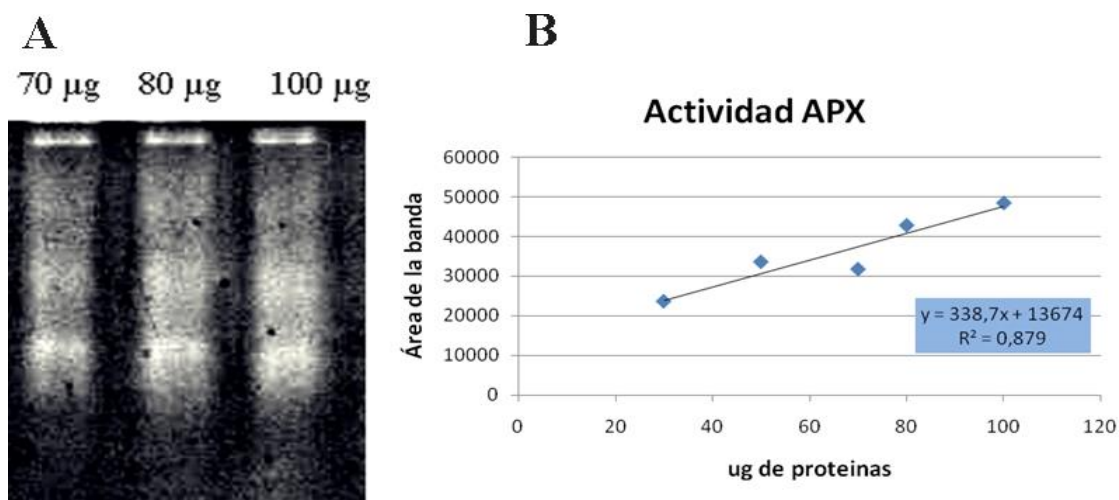


Figura 3: Gel de calibración APX. **A:** actividad ascorbato peroxidasa para diferentes concentraciones de una muestra de soja control. **B:** Gráfico de calibración que muestra la relación entre la concentración de proteínas (μg) y el área de las bandas, con un R^2 de 0,879

Las muestras a sembrar se prepararon calculando una parte de buffer muestra y tres de muestra, diluyendo con agua hasta completar el volumen.

Se depositó cuidadosamente este volumen en cada pocillo, con un tip blanco, evitando la contaminación del pocillo contiguo.

Se seleccionó mantener el amperaje constante, bajo esta condición el voltaje aumenta durante la corrida. El valor del amperaje o corriente eléctrica (medida en amperios o miliamperios) dependerá de la fuerza iónica del buffer. En el caso de trabajar con buffer Tris-Glicina 1X el valor recomendado es de 25 a 30 miliamperios por gel. Se corrió por aproximadamente 1 hora, hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) llegó al límite inferior del gel.

Se separó el gel de empacamiento del gel de resolución realizando un corte transversal. Se hizo una pequeña muesca en una de las esquinas del gel, a fin de que sirva de orientación para ubicar el orden en que fueron cargadas las muestras. Se removió el gel. Para desprender el gel del vidrio remojarlo nuevamente con buffer de electroforesis o agua destilada y usar uno de los espaciadores a manera de espátula para levantarlo por una de las puntas. El buffer de electroforesis puede ser devuelto a su frasco original para su posterior

uso, pudiendo ser reciclado 1 o 2 veces, aunque mucho uso puede afectar el tiempo de corrida.

Los vidrios, los espaciadores y el tanque deberán ser lavados con abundante agua y detergentes que puedan ser fácilmente removidos. Posteriormente, enjuagarlos con agua destilada y secarlos.

REVELADO DEL GEL

SOLUCIONES DE USO

Solución	de	Reactivo	Cantidad	Concentración	
Solución equilibrio		Bf. fosfato de potasio 0,5 M	15 ml	50 mM	
		EDTA 10 mM	15 ml	1 mM	
		Ascórbico	0,059 gr	2 mM	
		Agua	120 ml		
		Volumen final	150 ml		
Solución peróxido		Bf. fosfato de potasio 0,5 M	3 ml	50 mM	
		EDTA 10 mM	3 ml	1 mM	
		Ascórbico	0,012 gr	4 mM	
		H ₂ O ₂ 10,8 M	0,006 ml	2 mM	
		Agua	24 ml		
		Volumen final	30 ml		
Solución teñido		Reactivo	Cantidad	[]	PM
		Bf. fosfato de potasio 0,5 M pH 7,8	3 ml	50 mM	
		EDTA 10 mM	3 ml	1 mM	372,2
		TEMED	0,127 ml	28 mM	116,21
		NBT	0,06 gr	2,45 mM	817,7
		Agua	24 ml		
	Volumen final	30 ml			

Se colocó el gel en la solución de equilibrio por 30 min, cambiando el buffer cada 10 min. Luego, se incubó 20 min en la solución de peróxido. Se enjuagó el gel en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7 por 1 min y fue colocado en la solución de teñido por 10 a 15 min. Se detuvo la reacción lavando el gel con agua. La actividad APX fue observada como una banda sin color en un fondo azul.

Para realizar geles de inhibición de la enzima se incubó el gel en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7 conteniendo 10 mM KCN por 20 min antes de la tinción.

Mittler, R & Zilinskas, BA (1993). Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 212(2), 540-546.

Anexo IV

ANEXO IV. 1: EXTRACCIÓN DE ARN- TRIZOL-INVITROGEN

SOLUCIONES A PREPARAR

AGUA DEPC 0,1%	Colocar 0,1 ml de DEPC cada 100 ml de agua a tratar. Incubar 12 horas a 37°C. Autoclavar 20 min para inactivar la droga.
----------------	--

A partir de las muestras de raíces se extrajo ARN total mediante el método de TRIZOL®, según el siguiente protocolo especificado por el fabricante, utilizando materiales libres de ARNasas. Se molieron 0,1 gr de muestra vegetal con aire líquido y mortero, y se agregó 1 ml de TRIZOL®. Se homogeneizó y se centrifugó a no más de 12000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo (en esta solución se puede mantener a -70°C por 1 mes). El tubo se incubó 5 min entre 15°C y 30°C para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se agregó 0,2 ml de cloroformo cada 1 ml de TRIZOL® utilizado y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Se dejó reposar 2 a 3 min entre 15 y 30°C. Luego se centrifugó como máximo a 12000 g a 4°C. Se traspasó a un nuevo tubo la fase acuosa superior y se agregó 0,5 ml de alcohol isopropil (2-propanol) cada 1 ml de TRIZOL®. La fase inferior se puede guardar para extraer DNA y proteínas, no más de 1 noche a 4°C. Se incubó 10 min entre 15 a 30°C y se centrifugó 10 min a no más de 12000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante.

Para lavar el pellet, se agregó 1,5 ml de etanol 75% cada 1 ml de TRIZOL®. En etanol se puede mantener 1 semana a 4°C o un año a -20°C. Se vortereó para mezclar y se centrifugó a no más de 7500 g por 7 min. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet al aire 5 a 10 min. No permitir que seque demasiado porque decrece su solubilidad. Se agregaron 30 µl de agua DEPC y se resuspendió con el tip. Se incubó 10 min entre 55 a 60°C y se mantuvo a -80°C.

Se realizó un tratamiento con ADNasas con el fin de eliminar restos de ADN de las muestras de ARN. La eliminación de ADN contaminante se comprobó mediante reacciones de PCR del ARN extraído.

PURIFICACIÓN DEL ARN

Con el fin de extraer el ADN genómico contaminante de las muestras de ARN se utilizaron 2 métodos diferentes.

1- Columnas de purificación del Kit RNeasy MiniKit siguiendo el protocolo del fabricante

2- Reacciones con ADNasa I Gibco-grado amplificación.

Se describe el procedimiento de la utilización de la ADNasa I.

Mezcla de reacción

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Cantidad (µl)
Agua		Hasta 10 µl	
Buffer DNAsa I	10X	1X	1
DNAsa I	10U	1U	1
ARN		Hasta 1 µg	x
Volumen final			10

PROCEDIMIENTO

Se realizó la mezcla de reacción, y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Para inactivar la ADNasa se agregó 1 µl de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C por 10 min.

ANEXO IV. 2: GEL ARN

Las muestras de ARN fueron corridas en gel desnaturizante de agarosa al 1,2% para comprobar su integridad.

Buffer	Reactivos	Cantidad
Formaldehido 10X	Agua DEPC	98 ml
	MOPS	4,186 gr
	EDTA 0.5M	2 ml
	Acetato de sodio	0,41gr

	Volumen Total	100 ml
	Todos los reactivos y materiales deben estar libres de RNAasas. De otra manera, puede prepararse con agua destilada, tratar con DEPC el buffer completo y luego autoclavar.	
Buffer de corrida 1X	Reactivos	Cantidad
	Agua DEPC	264 ml
	Formaldehido 37%	6 ml
	Buffer FA 10X	30 ml
	Volumen Total	300 ml
Gel ARN al 1.2%	Reactivos	Cantidad
	Agua DEPC	27 ml
	Formaldehido 37%	0,54 ml
	Buffer Formaldehido 10X	3 ml
	Agarosa	0,36 gr
	Volumen Total	30 ml
	Disolver la agarosa en el agua calentando en el microondas. Mantener en baño térmico a 60°C. Agregar buffer FA 10X y formaldehido.	

PROCEDIMIENTO

Se prepararon las soluciones y se procedió a preparar el gel. Se volcó en el soporte la matriz del gel mantenida a 60° C y se dejó gelificar. El gel se precorrió con buffer de corrida a 50v para equilibrar.

Las muestras fueron preparadas en buffer loading (comercial) respetando la proporción buffer loading: muestra igual a 3:1. Se calentaron las muestras a 65 ° C por 10 min y se colocaron inmediatamente en hielo para proceder a sembrarlas.

ANEXO IV. 3: POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE ADNC (ADNC AFLP)

PCR REVERSO

Para generar la primera hebra de ADN copia a partir del ARN extraído se utilizó el KIT RT PCR IMPROM –PROMEGA. Se utilizó 1 µg de ARN de cada muestra problema.

MEZCLA DE REACCIÓN

	Control +	Control -	Muestra
ARN	ARN control	-----	1 µg
Cebador poliT	10 µM	10 µM	10 µM
Agua	Hasta 5 µl	Hasta 5 µl	Hasta 5 µl

PROCEDIMIENTO

Se incubó a 70° C por 5 min, y luego se colocó inmediatamente en hielo por 5 min. Se centrifugó brevemente, y se volvió a colocar en hielo.

MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivo	Cantidad (µl)	[Final]
H2O	6,1	
Improm 5X Reaction buffer	4	1X
Cl2Mg (25 mM)	2,4	3 mM
dNTPs mix (10mM)	1	0,5 mM
RNAsin (40 U/ µl)	0,5	20 U/15 µl
Reverso Transcriptasa	1	
Volumen final	15	

PROCEDIMIENTO

Los 15 µl anteriores se agregaron a los tubos conteniendo los cebadores y el ARN. Se colocaron los tubos en un termociclador con el siguiente programa: 5 min a 25°C, 1h a 42°C. Por último 15 min a 70°C, con el fin de inactivar la reverso transcriptasa.

VERIFICACIÓN DE LA TRASCRIPTIÓN REVERSA

Para verificar la reacción de la reverso transcriptasa se procedió a generar un juego de cebadores a partir de un exón de la secuencia de la enzima antioxidante Catalasa, el cual genera un amplicón de 427 pb.

Cebador CAT exón 3 up-5': GTC CGC GAT GGC CTC AAG TT

Cebador CAT exón 3 low-3': GGG GGT CAA AGT CAA GCC TGT C

MEZCLA DE REACCIÓN

	Concentración stock	Concentración final	Volumen para una reacción (µl)
Agua		12	
Buffer Colorless c/ Cl ₂ Mg	5X c/7,5 mM Cl ₂ Mg	1X y 1,5 mM	4
DNTPs	2,5 mM	0,25 mM	2
Cebador CAT exón 3 up-5'	10 µM	0,2 µM	0,4
Cebador CAT exón 3 low-3'	10 µM	0,2 µM	0,4
Taq Polimerasa	5 U/ µl	1 U/20 µl	0,2
Molde	determinar	determinar	1
Volumen total			20

PROCEDIMIENTO

Se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa: 2 min a 94°C, 26 ciclos de 1m a 94°C, 1m a 56°C y 1m a 72°C. Por último 5 min a 72°C.

SÍNTESIS DE LA SEGUNDA CADENA DE ADN

Para generar la segunda hebra de ADN copia se utilizaron 10 µl de ADNc simple hebra de cada muestra problema.

MATERIAL NECESARIO

Agua DEPC

Ligase Buffer 10X

DNTPs mix 10 mM

ADN ligase E.coli (10 U/µl)

ADN polimerasa I E.coli (10 U/µl)

ARNasa H *E.coli* (2 U/μl)
 T4 ADN polimerasa
 0,5 M EDTA pH 8
 Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico
 NH₄OAc 7,5 M
 Etanol absoluto helado
 Etanol 70% helado
 Baño a 16°C
 Estufa a 37°C

MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivos	Cantidad (μl)
Agua DEPC	32
Ligase Buffer 10X	5
DNTPs mix 10 mM	1
DNA ligase <i>E.coli</i> (10 U/μl)	0,33
DNA polimerase I <i>E.coli</i> (10 U/μl)	1,33
RNAsa H <i>E.coli</i> (2 U/μl)	0,33
Volumen Total	40
Volumen de muestra ADNc simple hebra	10

PROCEDIMIENTO

Llevamos la mezcla de reacción a baño térmico a 16°C por 2 horas. Agregamos 0,667 μl de T4 ADN polimerasa e incubamos a 16°C por 5 min. Colocamos los tubos en hielo y agregamos 3,33 μl de 0,5 M EDTA pH 8. Agregamos 53,33 μl de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico. Vortereamos y centrifugamos a temperatura ambiente por 5 min a 14000 g. Transferimos 46,7 μl de la fase superior a un nuevo tubo. Adicionamos 23,33 μl de NH₄OAc 7,5 M y 170 μl de etanol absoluto congelado. Vortereamos y centrifugamos inmediatamente a temperatura ambiente por 20 min a 14000 g. Removemos el sobrenadante cuidadosamente. Lavamos el pellet con 170 μl de etanol

70% helado. Centrifugamos por 2 min a 14000 g, removimos el sobrenadante y lo descartamos. Secamos el DNA a 37° C por 10 min y resuspendimos el pellet en agua DEPC, 3 µl por cada 25 µg de ARN total inicial. Posteriormente hicimos una dilución 1/20.

CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

MATERIAL NECESARIO

Agua

Estufa a 37° C

OPA (10X)

BSA (10 mg/ml de 100X)

MseI (10 U/µl)

HindIII

EcoRI (10 U/µl)

Termociclador

ADNc doble cadena

MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivos	Cantidad (µl)
Agua	16,9
OPA (10X)	2
BSA (10 mg/ml de 100X)	0,2
MseI (10 U/µl)	0,2
HindIII o EcoRI (10 U/µl)	0,2
Volumen Total	19,5
Volumen de muestra	0,5

PROCEDIMIENTO

Se realizaron 2 mezclas, una con cada combinación, MseI que reconoce 4 nucleótidos, o sea de corte frecuente, más una de las otras dos que reconocen 6 nucleótidos, ya sea HindIII o EcoRI.

Se colocó en esta reacción ADNc doble cadena. En general se usa una dilución 1/20 de los 3 µl de la resuspensión de la doble cadena.

Incubar a 37°C por 3 horas, y luego a 70°C por 15 min

LIGACIÓN

MATERIAL NECESARIO

Agua

Ligase Buffer 10X

EcoRI/ HindIII adapt. (5 μ M)

MseI adapt. (50 U)

T4 DNA ligasa (3 U/ μ l)

Baño a 22°C

Tubos de digestión de cDNA con enzimas de restricción

MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivos	Cantidad (μl)
Agua	2,67
Ligase Buffer 10X	0,4
EcoRI/ HindIII adapt. (5uM)	0,4
MseI adapt. (50 uM)	0,4
T4 DNA ligasa (3 U/ μ l)	0,13
Volumen Total	4

PROCEDIMIENTO

Agregamos la mix a los tubos de digestión, e incubamos a 22°C por 3 horas como mínimo o toda la noche.

PRE-AMPLIFICACIÓN

MATERIAL NECESARIO

Agua MilliQ

Buffer Taq pol 10X

MgCl₂ (25 mM)

DNTPs (10 mM)

EcoRI/ HindIII primers (5 μ M)

MseI primers (5 μ M)

Taq pol (5 U/ μ l)
 ADN con adapt. Ligados
 MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivos	Cantidad (μ l)
Agua	6
Buffer Taq pol 10X	1
MgCl ₂ (25 mM)	0,6
DNTPs (10 mM)	0,1
EcoRI/HindIII rimers (5 μ M)	0,5
MseI primers (5 μ M)	0,5
Taq pol (5 U/ μ l)	0,3
Volumen Total	9
ADN con adapt. ligados	1

PROCEDIMIENTO

Se realizaron 2 mix, una con cada combinación, MseI +EcoRI y MseI + Hind III. Se colocó en un termociclador con el siguiente programa: 2 min a 94°C, 26 ciclos de 1m a 94°C, 1m a 56°C y 1m a 72°C. Por último 5 min a 72°C. Al final del PCR se agregaron 40 μ l de agua MilliQ.

TABLA: JUEGOS DE ADAPTADORES ESPECÍFICOS UTILIZADOS PARA CADA ENZIMA DE RESTRICCIÓN

Nombre		Secuencia (5'-3')
Mse I	Adaptador 1	GAC GAT GAG TCC TGA G
	Adaptador 2	TAC TCA GGA CTC AT
EcoR I	Adaptador 1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
	Adaptador 2	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
Hind III	Adaptador 1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
	Adaptador 2	AGC TGG TAC GCA GTC TAC

AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

MATERIAL NECESARIO

Agua MilliQ

Buffer Taq pol 10X

MgCl₂ (25 mM)

DNTPs (10 mM)

EcoRI/ HindIII primers anclados con 1 o 2 nucleótidos (5 μM)

MseI primers (5 μM)

Taq pol (5 U/μl)

ADN preamplificado

MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivos	Cantidad (μl)
Agua	12,3
Buffer Taq pol 10X	2
MgCl ₂ (25 mM)	1,2
DNTPs (10 mM)	0,1
EcoRI/HindIII primers anclados (5 μM)	1
MseI primers (5 μM)	1,2
Taq pol (5 U/μl)	0,2
Volumen Total	18
ADN preamplificado	2

PROCEDIMIENTO

Se realizó una amplificación selectiva colocando cebadores con 1, 2 y 3 bases extras en el extremo 3', lo que permite restringir ampliamente el número de amplicones generados. Se colocó en un termociclador con el siguiente programa: 2 min a 94°C, 13 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 65°C y 1m a 72°C. Luego 23 ciclos 30s a 94°C, 30s a 56°C y 1m a 72°C. Por último 5 min a 72°C.

ANEXO IV. 4: GEL DE POLIACRILAMIDA

Las muestras amplificadas se corrieron en geles de poliacrilamida, y fueron reveladas con nitrato de plata 0,2%.

LIMPIEZA DE PLACAS

SOLUCIONES NECESARIAS

Solución Repel	Identificación		
	Repel-silane-ES, marca Plusone Pharmacia 17-1332-01		
Solución Bind	Reactivos	Cantidad	Identificación
	Alcohol 95%	1 ml	
	Ácido Acético Glacial	5 µl	
	Bind- Silane Plusone	5 µl	Pharmacia 17-1330-01)
	Preparar en el momento		

PROCEDIMIENTOS

PLACA MAYOR (SOPORTE REPELENTE)

Se limpió 2 veces la placa con alcohol 95% utilizando Kimwipes (delicate task wipers) con guantes. Luego se desparramó 1,5 ml de repel por toda la placa con un Kimwipes. Se esperó 5 min y se limpió nuevamente con alcohol 95%.

PLACA MENOR (ADHERENTE)

Se limpió 2 veces la placa con alcohol 95% utilizando Kimwipes con guantes (no utilizar los mismos que para la placa anterior). Se desparramó la solución Bind rápidamente, se esperó 5 min y se limpió nuevamente con alcohol 95% 2 veces.

GEL DE POLIACRILAMIDA

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK

Tris 1 M pH 7,5	Reactivos	Cantidad
	H ₂ O	250 ml
	Tris base (PM: 121,14 gr)	30,28 gr
	Ajustar el pH con hidróxido de sodio concentrado, ajuste fino con hidróxido de sodio 1N.	
	Autoclavar	
EDTA 0,5 M pH 8	Reactivos	Cantidad

	H ₂ O	250 ml	
	EDTA (PM: 372,24 gr)	46,53 gr	
	Disolver en 125 ml de agua y agregarle 10 pastillas de NaOH (5 gr) y dejar disolver. Es difícil ajustar el pH y el EDTA solo es disuelto próximo al pH 8.		
	Autoclavar.		
Per sulfato de amonio 10% (APS)	Reactivos	Cantidad	Identificación
	H ₂ O	50 ml	
	APS	5 gr	CAT APS Promega V 3133 (125 gr) o V 3131 (25 gr)
	Alicuotar 600 ul en epp. Mantener a -20° C		
Acetato de sodio 4 M	Reactivos	Cantidad	
	H ₂ O	1000 ml	
	Acetato de sodio trihidrat. (PM: 136,08 gr)	408,24 gr	
TBE 10X	Reactivos	Cantidad	Identificación
	H ₂ O	1000 ml	
	Tris base (PM: 121,14 g)	108 gr	Invitrog 15504-020
	Acido bórico (PM: 61,83g)	55 gr	Merck 100165-0500
	EDTA (PM: 362,42 gr)	9,3	Merck108418-0250

SOLUCIONES PARA EL GEL DE POLIACRILAMIDA

Matriz para el gel de acrilamida 6%	Reactivos	Cantidad	Identificación
	TBE 1X	1000 ml	
	Urea	420 gr	
	Bisacrilamida	3 gr	Cat. Bisacrilamida, Pharmacia: 17-1304-01(o Promega V 3143-125 g)

		Acrilamida	60 gr	Cat.	Acrilamida
					Pharmacia: 17-1302-01 (o Promega V 3111-1100 g
					Completar el volumen con TBE 1X, disolviendo de a un reactivo por vez. Mantener a 4°C en oscuridad.
Polimerizadores		Reactivos	Cantidad	Identificación	
		Matriz	120 ml		
		TEMED	120 µl	Cat. TEMED Promega V 3161	
		APS 10%	600 µl		
					Agregar en el momento de rellenar la placa, solo polimeriza cuando se agregan ambos reactivos a la matriz.
Acetato de sodio 0,5 M		Reactivos		Cantidad	
		Acetato de sodio 4 M		50 ml	
		TBE 1X		350 ml	
					Se utiliza para rellenar la cuba inferior
Loading Buffer		Reactivos	Cantidad	Identificación	
Formamida		Formamida	10 ml	Promega H5052	
		EDTA 0,5 M pH 8	200 µl	Merck 1.08418.0250	
		Azul de Bromofenol	10 mg	Amersham US12370 10 gr /Pharmacia 171329-01	
		Xylene cyanol	10 mg	BioRad 1610423/Amersham US23513 (25 gr)	
					Mantener en la heladera, no congelar.
Marcador De Peso Molecular		Reactivos	Cantidad	Identificación	
		Marcador de peso molecular 50 pb	8 µl	Promega E4521	
		DNA step ladder			

Loading Buffer	64 μ l
(formamida)	
H ₂ O milliQ	128 μ l

Mantener en la heladera, no congelar.

MONTADO DE LA PLACA

PROCEDIMIENTOS

Luego de la limpieza, se colocaron los flejes que separan los vidrios sobre la placa mayor. Se colocó la placa menor con la cara tratada hacia abajo, y se selló con cinta de papel los costados, dejando un espacio pequeño para inyectar la poliacrilamida. Se armó el aparato, y se puso boca abajo.

Se preparó la poliacrilamida, agregando los reactivos que polimerizan a la matriz. Se colocó este líquido en una jeringa de 200 ml con una manguerita, y se retiró el aire de la manguera dejando salir el líquido. Se inyectó lentamente en la placa cuidando que se llene parejo. Cuando llegó al inicio de la placa, se aseguró la manguera para no permitir que siga saliendo líquido ni que entre aire. Se colocó el peine suavemente para que no se hagan burbujas. Se dejó polimerizar como mínimo 45 min.

Luego se desmontaron las placas y se retiraron las cintas. Se volvió a montar en la cuba. En la cuba de abajo agregamos la solución de acetato de sodio 0,5 M. Por encima se colocó TBE 1X. Es recomendable que se prepare 1,5 l de TBE 1X al inicio y con ese mismo diluir el acetato. Pequeñas diferencias en concentración pueden dar errores de corrida.

Se retiró el peine y se limpiaron las calles con una jeringa y una aguja usando el mismo buffer de la placa. Se precorrió por 45 min como mínimo, a 50 grados de temperatura y 80W de potencia. El voltaje puede variar dependiendo del buffer.

PREPARADO DE LA MUESTRA

Loading Buffer	Reactivos	Cantidad	Identificación
Formamida	Formamida	10 ml	Promega H5052
	EDTA 0,5 M pH 8	200 μ l	Merck 1.08418.0250
	Azul de Bromofenol	10 mg	Amersham US12370 10 gr /Pharmacia 171329-01

	Xylene cyanol	10 mg	BioRad 1610423/Amersham US23513 (25 gr)
	Mantener en la heladera, no congelar.		
Marcador De Peso Molecular	Reactivos	Cantidad	Identificación
	Marcador de peso molecular (50 pb) DNA step ladder	8 µl	Promega E4521
	Loading Buffer (formamida)	64 µl	
	H ₂ O milliQ	128 µl	
	Mantener en la heladera, no congelar.		

PROCEDIMIENTOS

Se colocaron 8 µl de loading buffer a los 20 µl de reacción de amplificación selectiva. Además se preparó 12 µl de marcador. Se desnaturalizaron las muestras por 5 min a 94°C y se colocaron inmediatamente en hielo por 5 min como mínimo. Las calles se llenaron con 10 µl de la muestra con tips punta pico de pato. Se debe realizar la muestra bastante rápido a fin de evitar que la temperatura descienda de los 35°C. Se procedió a correr el gel por 4 horas a 50 grados de temperatura y 80W de potencia.

REVELADO DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

SOLUCIONES PARA REVELAR EL GEL DE AFLP

Solución fijadora	Reactivos	Cantidad
	H ₂ O milliQ	1780 ml
	Ácido acético glacial	20 ml
	Alcohol etílico absoluto	200 ml
	Mantener a 4°C	
Solución de Ácido Nítrico 1,5%	Reactivos	Cantidad
	Ácido nítrico	30 ml
	H ₂ O milliQ	1970 ml
	Mantener a 4°C	

Solución Stop	Reactivos	Cantidad
	H ₂ O milliQ	1900 ml
	Ácido acético glacial	100 ml
	Mantener a 4°C	
Solución de Nitrato de plata 0,2%	Reactivos	Cantidad
	H ₂ O milliQ	2 l
	Nitrato de plata	4 gr
	Mantener a T° ambiente	
Solución reveladora	Reactivos	Cantidad
	H ₂ O milliQ	2 l
	Carbonato de sodio	60 gr
	Formaldehido 37%	1200 µl
	El formaldehido se agrega en el momento de revelar. Preparar el día del revelado y usar frio	

PROCEDIMIENTOS

Colocamos el gel en la solución fijadora en agitación, como mínimo 10 min, puede dejarse ON. Luego se lavó con 2 litros de agua destilada por 1 min. Se retiró el agua y se colocó una solución de ácido nítrico en agitación por 2 min y 40 segundos. Se volvió a enjuagar con agua destilada por 1 min. Se retiró el agua y se colocó una solución de Nitrato de plata por 20 min, al cual debe agregarse 2 min al tiempo total por cada reutilización de la solución. Se cubrió la bandeja para evitar la luz. Se enjuagó con 2 l de agua destilada por 30 s, se descartó esa agua y se volvió a enjuaga con 2 l de agua destilada por 30 s. Se colocó el formaldehido a la solución reveladora y se remojó el gel en 1 litro de ella. Agitamos suavemente hasta que aparecieron las primeras bandas. Se colocó en otra bandeja el litro restante de solución reveladora para transferir el gel y completar el revelado. Si se deja mucho tiempo se empieza a oscurecer el fondo. Cuando se vieron las bandas claramente se colocó en la solución stop por 5 min. Se enjuagó por 1 min el gel en 2 l de agua destilada.

LAVADO DE LAS PLACAS	Reactivos	Cantidad
	H ₂ O milliQ	3 l
Solución de NaOH 3%	Hidróxido de sodio	90 gr

PROCEDIMIENTO

Colocar los vidrios en la solución de NaOH y dejar remojar en agitación.

ANEXO IV. 5: PCR EN TIEMPO REAL

Kit EXPRESS SYBR® GreenER™

MATERIAL NECESARIO

Agua DEPC

Kit EXPRESS One-Step SYBR® GreenER™

ARN libre de ADN

MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivos	Cantidad (µl)
EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal	10
EXPRESS SuperScript® Mix for One-Step SYBR® GreenER™	0,5
10 µM forward primer (200 nM final)	0,4
10 µM reverse primer (200 nM final)	0,4
ARN (1 pg–1 µg total RNA)	X
Agua DEPC	Hasta 20 µl
Volumen Total	20

PROCEDIMIENTO

La mezcla de reacción se realizó manteniendo los tubos a 4°C. Se utilizó aproximadamente 0,1 µg de ARN por muestra. Además de las muestras problema, se incluyó un control sin enzima RT, para corroborar la inexistencia de ADN genómico y un

control sin ARN para cada cebador utilizado para descartar contaminaciones. Se colocó en el termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Research) con el siguiente programa: 5 min a 53°C para la síntesis de ADNc, 95° C por 2 min, 40 ciclos de 30s a 95°C, 60s a 53°C y 10 s a 74°C. Posteriormente se realizó una curva de melting entre 60 y 95°C. Antes de analizar las muestras problema se procedió a la generación de curvas estándar para cada cebador a utilizar. Ésta fue realizada mediante diluciones seriadas de la muestra de ARN. Luego de la corrida de PCR en tiempo real, el programa incluido en el termociclador genera las curvas estándar, de las cuales se deduce la eficiencia de los cebadores probados.

ANEXO IV. 6: R.A.C.E. (RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS)

MATERIAL NECESARIO

Agua

ADN copia

MEZCLA DE REACCIÓN

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Cantidad (µl)
Agua			12
Buffer Colorless c/ Cl ₂ Mg	5X c/7,5 mM Cl ₂ Mg	1X y 1,5 mM	4
DNTPs	2.5 mM	0,25 mM	2
Cebador extremo 5´	10 µM	0,2 µM	0,4
Cebador gen de interés	10 µM	0,2 µM	0,4
Taq polimerasa	5 U/µl	1 U/20 µl	0,2
Molde	determinar	determinar	1
Volumen total			20

Se generó el ADN copia tal como se describe en Anexo T, reemplazando el cebador poli T por el cebador poli T que tiene agregado una secuencia al azar en el extremo 5´. Este ADN copia es el que se utiliza en esta reacción. Los cebadores utilizados fueron:

Nombre	Secuencia (5´-3´)
Poli T + cola 5´	TATAGGCCATCGAGGCC(T)20
Cola 5´	TATAGGCCATCGAGGCC

Se realizó la mezcla de reacción y se colocó en el termociclador. El programa utilizado fue el siguiente: 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 30 s, 53°C 30 s 72°C 2 min, y por último 72°C por 5 min. Las reacciones se corrieron en gel de agarosa al 2% con el fin de evidenciar los fragmentos amplificados.

Wang, X., & Young III, W. S. (2003). Rapid amplification of cDNA ends. In *PCR protocols* (pp. 105-115). Humana Press.

ANEXO IV. 7: TÉCNICA DE CLONADO TOPO-TA

Para clonar los fragmentos obtenidos por la técnica R.A.C.E. se utilizó el kit de clonado TOPO-TA. Se utilizaron 3 µl de producto de PCR y se ligó al vector. Se incubó 2 hs a 37°C. Se colocó junto a células electrocompetentes y se sometió a un shock en el electroporador. Inmediatamente se resuspendieron en medio LB. Se incubaron 1 hora a 37°C y luego se sembraron en placas de LB con ampicilina. Se incubaron una noche a 37°C. Las colonias que crecieron fueron repicadas en otra placa con ampicilina y se le realizó un PCR para comprobar que poseían el inserto. Para hacer el PCR se tocó cada colonia con un tip estéril, el cual se colocó en 10 µl de agua estéril en un tubo epp. A esto se le agregó 10 µl de la siguiente mezcla de reacción.

PCR de colonias con vector TOPO TA

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Cantidad (µl)
Agua			3
Buffer Colorless c/ Cl ₂ Mg	5X c/7,5 mM Cl ₂ Mg	1X y 1,5 mM	4
DNTPs	2,5 mM	0,25 mM	2
M13 F	10 µM	0.2 µM	0,4
M13 R	10 µM	0.2 µM	0,4
Taq polimerasa	5 U/µl	1 U/20 µl	0,2
Volumen total			20

Nombre	Secuencia (5'-3')
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

Se seleccionaron los clones que presentaron diferente tamaño de inserto, se repicaron en medio LB con ampicilina.