

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Utilización de cepas nativas de hongos micorrízicos
arbusculares en la regulación del estrés por sequía en un
genotipo de soja susceptible. Participación del estrés oxidativo y
la defensa antioxidante.**

por

Lic. Betiana Clarisa Grümberg

Directora: Dra. Celina Mercedes Luna

Co-Directora: Dra. Silvina Vargas Gil

Lugar de Trabajo

CIAP-INTA



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Dra. Celina Mercedes Luna, IFRGV-CIAP-INTA

Ing. Agr. José Beltrano, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP)

Dr. Roberto Carlos Urcelay, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC)

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la realización del presente trabajo.

A Celina y Silvina, mis directoras de tesis, por su paciencia, dedicación, motivación y orientación continua. Ha sido un verdadero privilegio contar con su guía y ayuda a lo largo de estos años. Gracias por apoyarme en mis decisiones y preocuparse siempre por mi bienestar.

A los miembros del Jurado de Tesis Doctoral, Dr. Carlos Urcelay, Ing. Agr. José Beltrano y Dr. Ramiro Lascano, quienes me guiaron, incentivaron y formaron durante la realización de mi tesis, como así también realizaron aportes de sumo interés en la etapa de finalización.

Al CIAP-INTA, por brindarme el espacio y la infraestructura donde desarrollar este trabajo. Y gracias a todas las personas que trabajan allí por la calidez recibida diariamente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de la Beca Doctoral con la cual se realizó esta tesis.

Al área de Micología del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) por la capacitación en manejo de HMA recibida y por haber cedido los inóculos de HMA utilizados. También a Sonia Silvente por su colaboración en los estudios de expresión génica y de metabólica.

A Marina, Lorena y Gervasio, quienes me recibieron, me enseñaron y ayudaron en los comienzos de mi trabajo. También a Sora, Marcos, Carla, Exequiel, Monica y Daniela del equipo de investigadores de Fisiología del estrés hídrico y térmico del Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) por su ayuda en la última etapa.

A Walter y Mariela que me ayudaron tanto en los ensayos, con el riego y los muestreos. También a Chiche y los chicos del galpón por colaborar siempre para que todo esté en condiciones para largar mis ensayos a tiempo.

A todos mis amigos por siempre alentarme y acompañarme. Agradezco a mis “amigos del Inta”, las de la facu y los que me fui encontrando a lo largo de mi vida.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia. Mis padres y hermanos que siempre están y me apoyan en todos mis proyectos con mucho amor. También a mis suegros y cuñados por brindarme su ayuda para que pueda terminar mi carrera.

Por último, aunque no menos importante, quiero agradecerle de todo corazón a Salo, mi compañero, quien siempre me alienta y se alegra tanto con mis logros. También a mis hijos, Eitan y David, que me dieron fuerzas para cumplir con este objetivo con sus abrazos y risas. ¡Muchas gracias!

Publicaciones derivadas de la tesis

- Grümberg BC, Urcelay C, Shroeder MA, Vargas-Gil S, Luna CM (2015) The role of inoculum identity in drought stress mitigation by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. *Biology and Fertility of Soils* 51(1):1-10
- Perez-Brandán C, Arzeno JL, Huidobro J, Conforto C, Grümberg B, Hilton S, Bending GD, Meriles JM, Vargas-Gil S (2014) The effect of crop sequences on soil microbial, chemical and physical indicators and its relationship with soybean sudden death syndrome (complex of *Fusarium* species). *Spanish Journal of Agricultural Research* 12(1):252-264
- Perez-Brandán C, Huidobro J, Grümberg B, Scandiani MM, Luque AG, Meriles JM, Vargas-Gil, S (2014) Soybean fungal soil-borne diseases: a parameter for measuring the effect of agricultural intensification on soil health. *Canadian Journal of Microbiology* 60:73–84
- Perez-Brandán C, Arzeno JL, Huidogro J, Grümberg B, Conforto C, Hilton S, Bending G, Meriles J, Vargas-Gil S (2012) Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Protection* 40:73-82
- Grümberg B, Conforto C, Rovea A, Boxler M, March G, Luna C, Meriles J, Vargas Gil S (2010) La glomalina y su relación con la productividad del cultivo de maíz. *Revista de Informaciones agronómicas del Cono Sur (IPNI)* 47:23-25

Índice

Listado de abreviaturas	1
Resumen	3
Summary	4

INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1. La soja: un cultivo de importancia económica	7
2. La sequía y respuestas de las plantas a este estrés	8
3. Las micorrizas arbusculares en la protección frente al estrés por sequía	10
4. La simbiosis micorrícica como mecanismo de mitigación del estrés oxidativo por sequía	12

Objetivo general	17
Hipótesis general	17

CAPÍTULO 1	19
Selección de un genotipo de soja susceptible al estrés por sequía	
Introducción	21
Materiales y Métodos	23
Resultados	26
Discusión	33
Conclusiones	35

CAPÍTULO 2	
Importancia de la identidad del inóculo de HMA en la mitigación del estrés por sequía en soja	37
Introducción	39
Materiales y Métodos	41
Resultados	47
Discusión	56
Conclusiones	61

CAPÍTULO 3	
Efecto de la simbiosis HMA-soja sobre la respuesta a tiempos cortos y largos de sequía. Un análisis bioquímico y molecular de la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante.	63
Introducción	65
Materiales y Métodos	67
Resultados	71
Discusión	84
Conclusiones	87

CAPÍTULO 4	
Comparación de metabolitos en plantas de soja inoculadas y no inoculadas con <i>Septoglomus constrictum</i> luego de 2 días de sequía	89
Introducción	91
Materiales y Métodos	92
Resultados	93
Discusión	96
Conclusiones	99

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	101
Discusión general	103
Conclusiones generales	105

BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXO DE TÉCNICAS	121

Listado de abreviaturas

°C: grados centígrados
ACP: análisis de componentes principales
ADC: arginina descarboxilasa
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
AF: área foliar
ANOVA: análisis de la varianza
APX: ascorbato peroxidasa
ARN: ácido ribonucleico
Az: azúcares solubles
C: control
CAT: catalasa
CC: capacidad de campo
CH: contenido hídrico de la parte aérea
CIT: clorofila total
CP: componente principal
CR: control riego
CRA: contenido relativo de agua
CS: control sequía
Cu: cobre
DAO: diamina oxidasa
dSAM: s-adenosilmetionina descarboxilada
DT: diámetro del tallo
ERO: especies reactivas del oxígeno
Fe: hierro
g: gramos
Ga: *Glomus aggregatum*
GABA: ácido γ -aminobutírico
GC-MS: del inglés Gas chromatography-mass spectrometry (Cromatografía gaseosa-espectrometría de masa)
G-POD: guayacol peroxidasa
GSH: glutatión reducido
GSSG: glutatión oxidado
Gsp: *Glomus* sp.
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
HMA: hongos micorrícicos arbusculares
hs: horas
K: potasio
Lpa: longitud de parte aérea
M: inoculada con HMA
MA: micorriza arbuscular

MDA: malondialdehído
mg: miligramos
ml: mililitros
mM: milimolar
mmoles: milimoles
Mn: manganeso
MR: micorriza riego
MS: micorriza sequía
Mx: mezcla de HMA
N: nitrógeno
nm: nanómetro
ODC: ornitina descarboxilasa
P: fósforo
PAO: poliamina oxidasa
PAs: poliaminas
pb: pares de bases
PCR: del inglés Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFpa: peso fresco de parte aérea
Pro: prolina
PSpa: peso seco de parte aérea
PSr/PSpa: relación entre peso seco de la raíz y peso seco de la parte aérea
PSr: peso seco de la raíz
Put: putrescina
R: riego
RT-PCR: del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa)
S: sequía
SAM: s-adenosilmetionina
SAMDC: s-adenosilmetionina descarboxilasa
Sc: Septoglomus constrictum
SCC: soja ciclo corto
SOD: superóxido dismutasa
Spd: espermidina
SPDS: espermidina sintasa
Spm: espermina
SPMS: espermina sintasa
TEF: factor de elongación de la transcripción $\alpha 1$
UV: ultravioleta
Zn: zinc

Resumen

La soja, uno de los cultivos más importantes de Argentina, se ve afectada por diversas condiciones ambientales. La sequía es uno de los factores abióticos más importantes que limitan el crecimiento y rendimiento de este cultivo en muchas áreas. La simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) puede proteger a las plantas de estos efectos. El objetivo de esta tesis doctoral fue analizar la interacción HMA-planta como una estrategia para incrementar la tolerancia al estrés por sequía, y generar conocimientos sobre los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que intervienen en la regulación del estrés por sequía en las plantas de soja micorrizadas. Se trabajó con un genotipo de soja que fue caracterizado como el más susceptible, resultante de la comparación de tres genotipos ciclo corto. La inoculación de este cultivar con aislamientos de tres cepas nativas de HMA (*Septoglomus constrictum*, *Glomus* sp. y *Glomus aggregatum*), inoculadas por separado o como inóculo mixto incrementó la tolerancia de estas plantas a la sequía, aumentando el contenido hídrico y el contenido foliar de nitrógeno y fósforo, y disminuyendo el daño oxidativo. Sin embargo, no se observó un efecto de complementariedad entre cepas, ya que el inóculo mixto no produjo mayor beneficio que los aislamientos por separado. Al evaluar a tiempos de sequía cortos (2 días) y más largos (7 días) la mitigación de este estrés en el mismo genotipo, la inoculación con *S. constrictum* mostró un control temprano del daño oxidativo por incremento de la defensa antioxidante no enzimática. Además se evidenció un aumento de la actividad superóxido dismutasa. A tiempos más largos, el incremento de la actividad enzimática catalasa y ascorbato peroxidasa coincidió con la mayor expresión génica de estas enzimas. El aumento de la expresión génica de arginina descarboxilasa y disminución de diamina oxidasa sugieren un incremento en la síntesis y disminución en la degradación de poliaminas en las plantas inoculadas bajo sequía, que fue acompañado por un mayor nivel de espermina a tiempos largos de sequía. El análisis de los metabolitos diferencialmente afectados por la sequía permitió sugerir vías metabólicas con mayor o menor actividad en las plantas de soja inoculadas con *S. constrictum* luego de 2 días de sequía, que dejan abiertas nuevas vías de estudio para la comprensión de los mecanismos implicados en esta simbiosis.

Summary

Soybean is one of the most important crops in Argentina and it is affected by different environmental conditions. Drought is one of the most relevant abiotic factors that limit soybean growth and yield in many areas. The symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can protect soybean plants. The objective of this PhD thesis was to analyze the interaction between AMF-plant, as a strategy to improve the drought stress tolerance, and to generate knowledge about the physiological, biochemical and molecular mechanisms that interact in the process of regulation of the drought stress in mycorrhizal soybean plants. We worked with a soybean genotype characterized as the most sensitive in relation to other three short cycle genotypes. The inoculation of this genotype with three native AMF isolates (*Septoglomus constrictum*, *Glomus* sp. y *Glomus aggregatum*), either separated or as a mixture, improved the drought tolerance of these plants by increasing their water content and phosphorous and nitrogen concentration in leaves, and reducing their oxidative damage. However, no complementarity effect was observed among AMF isolates since the mixture was not better than the individual ones. In the study of a short-term (2 days) and a long-term (7 days) drought stress mitigation, the inoculation of the same susceptible soybean genotype with *S. constrictum* showed an early regulation of the oxidative damage due to the increase in the non-enzymatic antioxidant defense. Also an increase in the superoxide dismutase activity was observed. In longer periods, the improvement in catalase y ascorbate peroxidase enzyme activity coincided with more gene expression of these enzymes. The increment of arginine decarboxylase gene expression and the reduction of diamine oxidase suggest an increase in the synthesis and a decrease in polyamines catabolism in inoculated plants under drought. Moreover, a high level of spermine was observed under long periods of drought. The analysis of metabolites differentially affected by drought, allowed us to suggest metabolic pathways with more or less activity in *S. constrictum* inoculated soybean plants after 2 days of drought. This is the stepping stone to new studies that should be carried out in the understanding of mechanisms involved in this symbiosis.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La soja: un cultivo de importancia económica

La planta de soja

La soja es una planta herbácea anual. Es el principal cultivo empleado para la producción de aceite comestible en el mundo y por su alto contenido en proteínas, es usado en la formulación de alimentos nutritivos y económicos para humanos y animales, como harina y carne de soja (Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, 1991).

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).

Breve reseña de la soja en el mundo

La soja cultivada (*Glycine max*) es nativa del este asiático, probablemente originaria del norte y centro de China, donde se cree fue domesticada en el siglo XI AC. La primera introducción en América fue en 1765, desde China a Georgia, EE.UU. Sin embargo, recién en 1940 se produce la gran expansión del cultivo en ese país, liderando la producción mundial de soja a partir de 1954 hasta la actualidad (Giorda y Baigorri 1997). En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión se inició a principios del siglo XX y la producción comercial comenzó en la década del 40, constituyéndose en la actualidad en el segundo productor mundial de grano de soja (Giorda y Baigorri 1997). Estados Unidos, Brasil, Argentina e India son los países que lideran dicha producción actualmente.

La soja en Argentina

Las primeras plantaciones de soja en Argentina se realizaron en 1862. Hacia 1956, aun no se conocían los aspectos básicos de la soja como cultivo, y se decidió emprender un plan de investigación agrícola con ensayos comparativos de rendimiento, manejo de cultivo y desarrollo de maquinaria. Como consecuencia del esfuerzo dedicado a la investigación, conocimiento y promoción del cultivo, la Argentina pudo exportar granos de soja por primera vez en 1962 con destino a Hamburgo, Alemania, para ser comercializada en Europa (Giorda y Baigorri 1997). Desde los años 70, la producción de soja se incrementó notablemente hasta la actualidad.

La Argentina es el mayor exportador mundial de harina y aceite de soja, y el tercero en exportar poroto sin procesar. Se estima que la producción de soja del país alcanzará 59,6 millones de toneladas en el ciclo 2014/15, con un área destinada a este cultivo de 20,2 millones de hectáreas (Bolsa de comercio de Rosario).

El problema de la sequía en la producción de soja

Argentina es uno de los países líderes del mundo en producción de soja, con una gran expansión en áreas de cultivo durante los últimos 30 años. Sin embargo, en los últimos años en el noreste y noroeste argentino, la agricultura (principalmente la producción de soja) se ha extendido a áreas más áridas y menos fértiles que las tradicionalmente usadas. En esas áreas de cultivo recientemente incorporadas, donde las condiciones climáticas son extremas y el suelo es pobre por la erosión, la soja se encuentra bajo estrés abiótico, lo que incrementa su susceptibilidad a enfermedades (Perez-Brandán et al. 2012).

Por otro lado, según estudios del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), la temperatura del planeta se elevará de 1,8 a 4°C suplementarios en el curso de este siglo, luego de haber aumentado 0,8°C durante el siglo pasado. Un aumento de la temperatura global resultará en cambios como ya se están observando a nivel mundial: aumento de los niveles del mar; cambios en el patrón y cantidad de precipitaciones; expansión de los desiertos subtropicales. Los impactos de los recientes eventos climáticos extremos, como las olas de calor, las sequías, las inundaciones y los incendios forestales, demuestran una significativa vulnerabilidad y exposición de algunos ecosistemas y muchos sistemas humanos, como la producción alimentaria, debido a la variabilidad climática (5to informe del grupo de trabajo II del IPCC, 2014). La producción de la región pampeana, donde se localiza la mayor concentración de la población nacional y cerca del 40% de la riqueza agrícola-ganadera del país, será una de las más afectadas, con épocas de sequías e inundaciones extremas.

2. La sequía y respuestas de las plantas a este estrés

La sequía es una deficiencia de precipitaciones durante un período de tiempo relativamente prolongado.

El principal factor abiótico que limita la distribución geográfica y el rendimiento de los cultivos es la sequía (Araus et al. 2002), ya que diversos y numerosos procesos de la

planta pueden ser alterados por ésta. Las respuestas pueden ser transitorias o bien involucrar cambios en la expresión génica. Según Tambussi (2004) tres de las respuestas que se consideran más relevantes son la inhibición del crecimiento, el cierre estomático y el ajuste osmótico, y además se incluye el estrés oxidativo.

Inhibición del crecimiento: uno de los primeros efectos del déficit hídrico sobre los vegetales es la inhibición de la elongación celular y por ende, del crecimiento. El crecimiento de la raíz es menos sensible que el crecimiento de la parte aérea, lo que conduce a un aumento de la relación raíz / parte aérea (Mullet y Whitsitt 1996). La variación del área foliar es una de las respuestas macroscópicas más tempranas en plantas sufriendo déficit hídrico (Passioura 1996)

Cierre estomático: El cierre estomático es uno de los efectos del estrés hídrico más ampliamente conocido. El fenómeno está vinculado al aumento de los niveles xilemáticos del ácido abscísico (ABA), aunque la intensidad de la respuesta puede ser modulada por otros factores. El resultado obvio del cierre estomático es la disminución de la tasa de transpiración y por ende, del agua consumida por la planta. Esta caída de la conductividad estomática produce una caída de la asimilación de CO₂ y diversos efectos asociados, tales como acumulación de poder reductor, susceptibilidad a la fotoinhibición y/o fotooxidación, etc.

Ajuste osmótico: La acumulación de osmolitos en las células vegetales resulta en una disminución del potencial osmótico, permitiendo el mantenimiento de la absorción de agua y de la presión de turgencia. En condiciones de estrés hídrico esto puede contribuir al mantenimiento de diversos procesos fisiológicos tales como la apertura estomática, la fotosíntesis y la expansión celular (Serraj y Sinclair 2002). Esta respuesta al déficit hídrico es conocida como ajuste osmótico u osmorregulación.

Aumento del estrés oxidativo: Es conocido que la sequía promueve el cierre de estomas y la consiguiente disminución en la absorción de CO₂, fenómenos que aumentan la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Gill y Tuteja 2010). Además, numerosas observaciones reportan el aumento del daño oxidativo, evaluado como MDA, en condiciones de sequía (Smirnoff 1993).

3. Las micorrizas arbusculares en la protección frente al estrés por sequía

Micorriza es la simbiosis mutualística entre hongos de suelo y las raíces de plantas superiores (Sieverding 1991). Las micorrizas arbusculares (MA) son asociaciones simbióticas entre un amplio rango de especies vegetales, angiospermas, gimnospermas, pteridófitas, y algunas briófitas, con un limitado rango de hongos pertenecientes al phylum *Glomeromycota* (Schüßler et al. 2001). En esta simbiosis el hongo suministra a la planta compuestos inorgánicos (sales minerales) que ésta necesita para su nutrición (micotrofia), y la planta aporta al hongo heterótrofo los compuestos orgánicos (fotosintatos) (Smith y Read 2008).

Bajo condiciones de laboratorio, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son biótrosos obligados, no exhiben especificidad de huéspedes y se pueden asociar con plantas muy distantes taxonómicamente (Paszkowski 2006). La amplia distribución de esta simbiosis dentro del reino vegetal ha sido atribuida a su antigüedad, ya que registros fósiles de plantas terrestres micorrizadas sitúa el origen de esta simbiosis al menos a 400 millones de años atrás (Remy et al. 1994).

Las hifas de los HMA generalmente no poseen septos y pueden crecer tanto fuera (extra-radical) como dentro de la raíz (intra-radical) (Figura 1). Esta estructura cenocítica permite que el núcleo pueda moverse a lo largo de la hifa (Bago et al, 1999). El micelio intra-radical produce típicamente estructuras muy ramificadas dentro de las raíces corticales denominadas arbusculos. Muchas especies de HMA también forman grandes células intra-radicales globosas llamadas vesículas que cumplen una función de almacenamiento. Si bien los arbusculos y las vesículas han sido considerados como estructuras diagnósticas de la simbiosis micorrícica arbuscular, un amplio rango de estructuras intra-radicales, formadas por los HMA son reconocidas, incluyendo enrollamientos intracelulares de hifas (coils), los cuales a veces se presentan sin la presencia de arbusculos (Smith y Read 2008). Las esporas de los HMA son asexuales, multinucleadas y se producen directamente por el micelio, tanto dentro como fuera de la raíz.

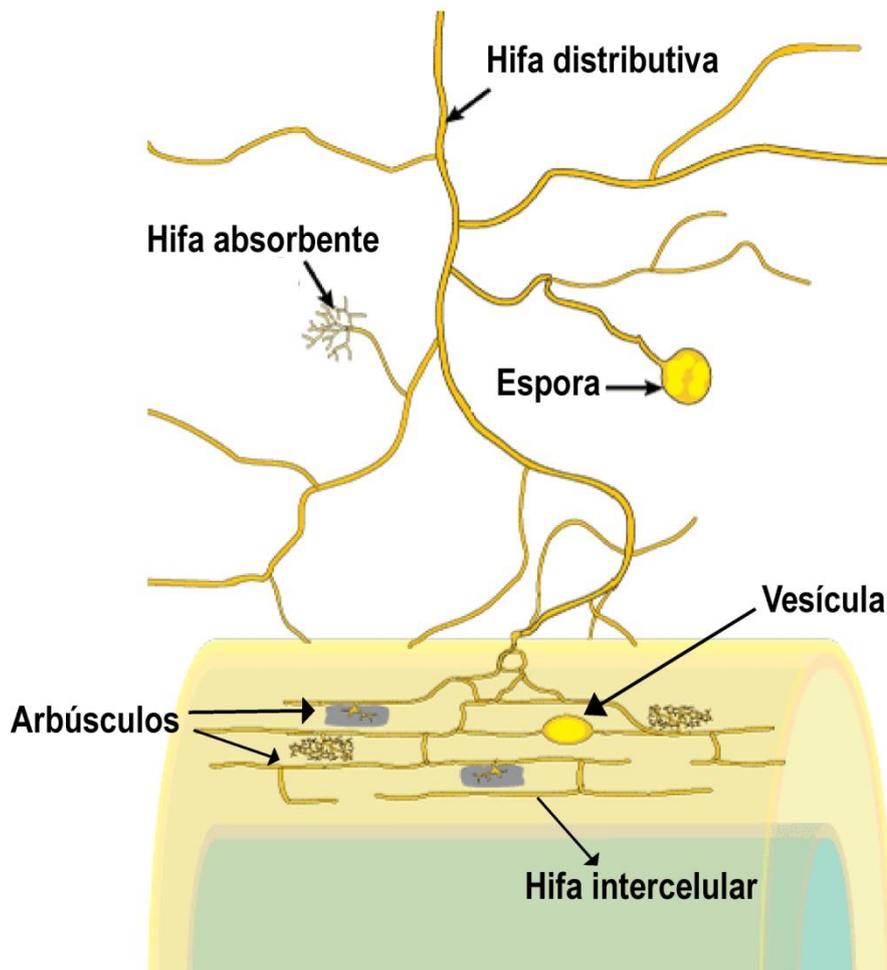


Figura 1. Estructuras características de micorrizas arbusculares (Imagen adaptada de <http://mycorrhizas.info/vam.html>)

Los HMA no solo se diseminan por esporas. Nuevas plantas pueden ser colonizadas desde fragmentos de hifas presentes en el suelo o creciendo en fragmentos de raíz colonizada. Alternativamente, las raíces pueden ser colonizadas por micelio extra-radical que se extiende desde micorrizas establecidas previamente, lo que puede dar lugar una gran red de micelio que conecta los sistemas radicales de varias plantas de igual o diferente especie (Smith y Read 2008).

El proceso de relación simbiótica hongo-planta comienza con la germinación de las esporas presentes en el suelo. Tras la formación del tubo germinativo, la hifa crece hasta encontrar una raíz hospedadora. Allí forma un apresorio y penetra entre las células epidérmicas o a través de los pelos radicales. Después de la penetración, comienza la colonización del tejido parenquimático de la raíz. En las células de la capa interna de este tejido se forman los arbusculos. Las hifas externas que corren por la superficie de la raíz pueden penetrar en ésta a intervalos irregulares (Bago et al. 2000). El reconocimiento y las

complejas alteraciones morfológicas y fisiológicas de ambos simbioses sugieren que esta simbiosis es el resultado de un conjunto de eventos de señalización finamente regulados (Paszkowski 2006).

En los últimos años las MA se han convertido en el centro de atención por su capacidad potencial para mitigar tanto el estrés abiótico como el biótico (Smith y Read 2008; Linderman 1994). Dicha capacidad se ha relacionado frecuentemente con la provisión de nutrientes, particularmente la mineralización de fósforo orgánico (Augé 2001). Otro importante efecto de las MA es el mantenimiento del contenido hídrico en la planta (Augé 2001). Morfológicamente se ha observado que, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y con ello la planta aumenta de 100 a 1000 veces su superficie de absorción y capacidad de captación de agua. Asimismo, esta simbiosis ejerce una serie de efectos benéficos en el suelo mismo, al aumentar la capacidad de agregación del agua, y las propiedades de su retención (Ruiz-Lozano 2003).

Varios estudios en el tema han demostrado que la contribución de la simbiosis micorrízica a la tolerancia a la sequía resulta de una combinación de efectos físicos, nutricionales, fisiológicos y celulares (Ruiz-Lozano 2003). Se han propuesto mecanismos como el aumento del ajuste osmótico, y de la hidratación foliar, disminución de la sequía por obtención de agua a través de la hifa (Ruiz-Lozano y Azcón 1995), aumentos de la adquisición de agua relacionado a cambios en la morfología radical (Kothari et al. 1990) o a cambios en la estructura del suelo (Augé 2001) y reducción del estrés oxidativo (Porcel et al. 2003; Porcel y Ruiz-Lozano 2004).

4. La simbiosis micorrízica como mecanismo de mitigación del estrés oxidativo por sequía

Es conocido el efecto mitigante de la sequía en la interacción HMA-soja, sin embargo la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante como mecanismo es controvertida (Porcel y Ruiz-Lozano 2004; Alguacil et al. 2003; Wu et al. 2006a).

En el caso de las PAs existen datos de su comportamiento como factores señalizantes, que son capaces de estimular la colonización de HMA al ser exudados por el hospedante (El-Ghachtouli et al. 1995). Sin embargo, faltan datos acerca de la relación del metabolismo de las PAs en plantas micorrizadas durante la sequía, y su relación con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante.

El estrés oxidativo

Muchos de los procesos deletéreos sufridos por plantas sometidas a condiciones adversas son mediados por especies reactivas del oxígeno (ERO) (Allen 1995), tales como ion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot), entre las más conocidas. Las ERO son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico (O_2) (Mittler 2002). Hay muchas fuentes potenciales de ERO en las plantas, de las cuales, algunas de ellas, son reacciones involucradas en el metabolismo normal, como la fotosíntesis y la respiración. Otras fuentes de ERO pertenecen a rutas metabólicas incrementadas durante estreses abióticos, como la glicolato oxidasa en los peroxisomas durante la fotorrespiración (Mittler 2002). Entre los factores de estrés capaces de producir daños por acumulación de ERO se encuentra la sequía, entre muchas otras tales como infecciones fúngicas, bacterianas y virales, la alta irradiación, hiperoxia, anoxia, deficiencia mineral, bajas y altas temperaturas, herbicidas redox-cíclicos (paraquat, diquat), contaminantes atmosféricos (SO_2 , NO_2 , ozono) y metales pesados. Normalmente, los mecanismos protectores de las células pueden eliminar estos compuestos sin mayores dificultades. Cuando los sistemas de defensa fallan o cuando aumenta desmedidamente la producción de ERO, el balance entre oxidantes y antioxidantes favorece a los primeros y sobreviene la condición conocida como estrés oxidativo (Mittler 2002; Apel y Hirt 2004).

Las ERO tienen un papel dual en la biología vegetal, ya que son productos tóxicos del metabolismo aeróbico y a la vez actúan como reguladores claves del crecimiento, del desarrollo y de vías de defensa (Mittler et al. 2004).

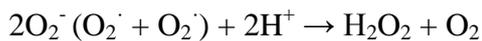
Defensa antioxidante

Las plantas se defienden del daño ocasionado por el estrés oxidativo mediante un complejo sistema antioxidante que consiste en enzimas antioxidantes como superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT) y ascorbato peroxidasas (APX), entre otras, y antioxidantes no enzimáticos como glutatión y ascorbato, quienes se encargan de minimizar las concentraciones de O_2^- y H_2O_2 (Mittler 2002; Foyer y Noctor 2005).

En la célula vegetal debe existir un balance intracelular entre la generación de H_2O_2 y los sistemas de atrapamiento de radicales existentes en todas las células (Mittler et al. 2004). Esta homeostasis celular requiere la coordinación de diferentes reacciones en los compartimentos celulares y está gobernada por una red compleja de sistemas prooxidantes y antioxidantes (Noctor y Foyer 1998). El ascorbato (ASC) es quizás el antioxidante más

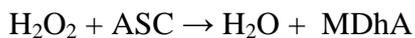
importante en la célula vegetal, con un papel fundamental de eliminación de H₂O₂ (Polle et al. 1990). El ciclo Glutación-Ascorbato es vital en la detoxificación de H₂O₂ en los cloroplastos, aunque este sistema también ha sido identificado en el citosol (Nakano y Asada 1981), peroxisomas y mitocondrias (Jiménez et al. 1997).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) actúa como la primera línea de defensa catalizando la dismutación del ion superóxido (O₂⁻) en oxígeno (O₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), mediante la siguiente reacción:

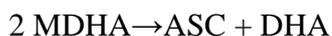


Fe-SOD, Mn-SOD y Cu/Zn-SOD son los grupos de SOD de acuerdo al metal pesado que usa la enzima como cofactor y pueden actuar de una manera contradictoria luego de un estrés abiótico (Szöllösi 2014)

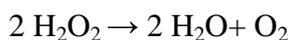
Luego, otras enzimas como ascorbato peroxidasa (APX) y catalasas (CAT) detoxifican del H₂O₂ (Mittler 2002). Las APX catalizan la eliminación del H₂O₂ producido continuamente en las células usando ácido L-ascórbico (ASC, ascorbato a pH fisiológico, también llamado vitamina C) como sustrato reductor, mediante la siguiente reacción:



El monodehidroascorbato (MDHA), radical bastante estable, puede oxidarse a dehidroascorbato (DHA) o volver a reducirse a ASC. Dos radicales de este tipo pueden dismutar para formar ASC y DHA:



Las CAT son enzimas antioxidantes presentes en todos los organismos aeróbicos y son eficientes catalizadores para la reacción:



Se localizan en los sitios de mayor producción de H₂O₂ dentro de las células, como peroxisomas, mitocondrias y citosol, de plantas superiores. Si bien numerosas investigaciones descartan la actividad CAT en cloroplasto, otros (Sheptovitsky y Brudig 1996) observan dicha actividad en el orgánulo, por lo cual no se puede descartar categóricamente su inexistencia. La modulación del H₂O₂ por isoenzimas de CAT dentro de células u organelas específicas, a un tiempo y fase del desarrollo específicos, interfiere directa o indirectamente con la transducción de señales en plantas.

Las diferentes afinidades de APX (rango de μM) y CAT (rango de mM) por el H₂O₂ sugiere que pertenecen a dos clases diferentes de enzimas atraparoras de H₂O₂: APX podría ser responsable de la regulación fina de ERO para señalización, mientras que CAT podría ser responsable de la remoción del exceso de ERO durante el estrés.

En el estrés por sequía se ha demostrado la participación del estrés oxidativo, y que la defensa antioxidante se induce en individuos tolerantes a dicho estrés (Lascano et al. 2001; Moumeni et al. 2011; Signorelli et al. 2013; Talbi et al. 2015).

Las poliaminas como antioxidantes

Entre los compuestos considerados antioxidantes existe creciente interés en el estudio de las poliaminas (PAs). Las mismas son un grupo de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se presentan en las células de todos los seres vivos (Galston 1983). Por su carácter policationico (cargadas positivamente) pueden unirse y formar complejos con moléculas polianiónicas (cargadas negativamente), tales como algunas proteínas, fosfolípidos, pectinas, el ADN y el ARN, entre otras (Galston 1983; Galston y Kaur-Shawney 1990). Debido a estas características, las PAs afectan la actividad celular, y como consecuencia están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos, que van desde el crecimiento y desarrollo vegetal, hasta la protección contra el estrés biótico y abiótico (Guye et al. 1986; Evans y Malmberg 1989; Faust y Wang 1992; Bais y Ravishankar 2002).

Las principales PAs son putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) (Figura 2). El punto inicial en la síntesis de PAs son los aminoácidos ornitina y arginina, que son descarboxilados por las enzimas ornitina descarboxilasa (ODC) y arginina descarboxilasa (ADC) respectivamente para producir Put. La síntesis de las poliaminas Spd y Spm ocurre a partir de la adición a la Put de uno o dos grupos aminopropilo donados por la S-adenosilmetionina descarboxilada (dSAM). La dSAM deriva de la S-adenosilmetionina (SAM) por acción de la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC). A su vez, SAM deriva del aminoácido metionina. La adición de grupos aminopropilo es catalizada por enzimas específicas llamadas espermidina y espermina sintasas (SPDS y SPMS) (Andersen et al. 1998) (Figura 2).

Debido a su acción protectora en las membranas (Guye et al. 1986) y a su capacidad para controlar radicales libres como los iones superóxido (Ha et al. 1998), las PAs minimizan el estrés en diversos órganos. Una de las enzimas que participan en el catabolismo de las PAs es la diamino oxidasa (DAO), que convierte la Put en Δ^1 -pirrolina, y genera amonio y H_2O_2 como subproductos. Luego Δ^1 -pirrolina es catabolizada a ácido γ -aminobutírico (GABA) (Gill y Tuteja 2010). El H_2O_2 liberado puede entrar en la cadena de

transducción de señales del estrés promoviendo la activación de la respuesta de defensa antioxidante (Zacchini y de Agazio 2004).

Es interesante notar que plantas transgénicas que sobre-expresan ADC, SPDS o SAMDC pueden tolerar múltiples estreses como salinidad, sequía, baja y alta temperatura (Gill y Tuteja 2010). Además, Sudhakar et al. (2015) recientemente encontraron mayor acumulación de PAs por el incremento en la actividad de las enzima SPDS y SAMDC, y la disminución en la actividad DAO y poliamina oxidasa (PAO) en un cultivar de mijo tolerante a la salinidad, al compararlo con uno susceptible.

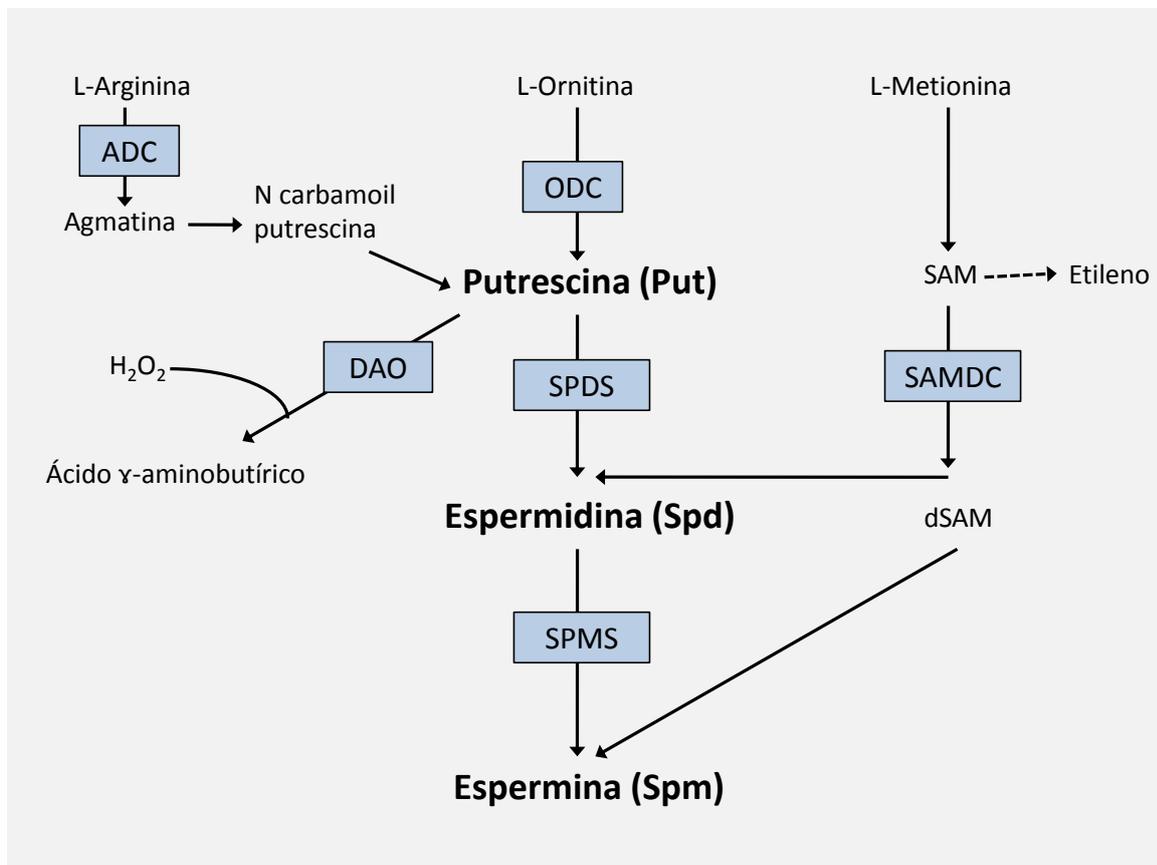


Figura 2. Metabolismo de las poliaminas. ADC: Arginina descarboxilasa; SAMDC: s-adenosil metionina descarboxilasa; SPDS: espermidina sintasa; SPMS: espermina sintasa; DAO: diamina oxidasa; ODC: ornitina descarboxilasa

OBJETIVO GENERAL

Analizar la interacción HMA-planta como una estrategia para incrementar la tolerancia al estrés por sequía.

Generar conocimientos sobre los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que intervienen en la regulación del estrés por sequía en las plantas de soja micorrizadas.

HIPÓTESIS GENERAL

La simbiosis con cepas nativas de HMA mejora la tolerancia a la sequía de un genotipo de soja susceptible a dicho estrés, mediante un aumento de la defensa antioxidante y la regulación del daño oxidativo.

CAPÍTULO 1

Selección de un genotipo de soja
susceptible al estrés por sequía

Introducción

Como estrategia de trabajo para lograr el objetivo general de esta tesis doctoral se comenzó identificando un genotipo de soja susceptible a la sequía, para luego evaluar su comportamiento frente al mismo estrés, en simbiosis con HMA nativos.

En este trabajo se utilizaron genotipos de soja de ciclo corto (SCC). Estos genotipos presentan, entre otras características, un mayor potencial de rendimiento comparado con cultivares de ciclo largo. Sin embargo, la SCC muestra estrictos requerimientos hídricos y nutricionales en períodos clave del cultivo, lo que la hace más susceptible al estrés por sequía (Popp et al. 2006; Edwards y Purcell 2005), siendo esta característica de particular interés para este trabajo. En consecuencia, se comparó la tolerancia de tres genotipos de SCC frente al estrés por sequía: DM50048, NA5009RG y DM3700, pertenecientes a los grupos de madurez IV, V y III respectivamente. Estos genotipos eran sembrados en distintas áreas de cultivo de la provincia de Córdoba al comenzar con esta tesis. Y cabe destacar que en un estudio comparativo de diferentes cultivares de soja realizado durante la campaña 2012-2013 en INTA EEA Manfredi, con cuatro fechas de siembra (FS) diferentes, el genotipo NA5009RG produjo el tercer mejor rendimiento al sembrarlo en la FS1, y el mejor peso de 1000 granos en la FS3 (Piatti y Ferreyra 2013).

Como criterios de selección del genotipo tolerante se consideraron diferentes caracteres fisiológicos y bioquímicos. Entre ellos se evaluaron parámetros de crecimiento, tales como la variación del área foliar por ser una de las respuestas macroscópicas más tempranas en plantas sufriendo déficit hídrico (Passioura 1996). También, el crecimiento de la raíz, que en sequía, es menos sensible que el crecimiento de la parte aérea, lo que conduce a un aumento de la relación raíz / parte aérea (Mullet y Whitsitt 1996). Además se consideró el contenido hídrico y el contenido relativo de agua (CRA), que ha sido medido en las hojas en condiciones de sequía y resultó mayor en genotipos más tolerantes a este estrés (Ritchie et al. 1990).

Como criterios bioquímicos se evaluaron algunos relacionados con el estrés oxidativo y la tolerancia a la sequía. Entre ellos, la peroxidación de lípidos es las membranas biológicas es el síntoma más evidente de estrés oxidativo en las plantas. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de la modificación oxidativa de lípidos y es responsable del daño de la membrana celular que incluye cambios en las propiedades intrínsecas de la membrana, como fluidez, transporte iónico, pérdida de

actividad enzimática y entrecruzamiento de proteínas. Singh et al. (2012) mostró que la inestabilidad de membranas biológicas, que se refleja por lipoperoxidación, fue mayor en genotipos de trigo susceptibles a la sequía que en los tolerantes.

Otro carácter bioquímico de interés es el glutatión (GSH), un tripéptido no proteico de bajo peso molecular que se encuentra presente en la mayoría de los tejidos vegetales. Tiene un papel multifacético en el metabolismo (Grill et al. 2001), interviniendo en vías de biosíntesis, de detoxificación de xenobióticos y en la química antioxidante. Además, este compuesto protege a las plantas del estrés oxidativo y también actúa como una forma de almacenamiento y transporte de sulfuro reducido. Ya que la defensa antioxidante y las reacciones redox juegan un rol central en la aclimatación de las plantas a su ambiente, el glutatión ha sido considerado un candidato adecuado como marcador de estrés (Tausz et al. 2004). La respuesta de la síntesis de glutatión al estrés osmótico ha sido sugerida como una técnica adecuada para la selección de cultivares tolerantes (Lascano et al. 2001).

Por lo expuesto, los **objetivos específicos** fueron: Caracterizar genotipos de soja con tolerancia diferencial a un estrés por sequía e identificar el genotipo susceptible, utilizando parámetros de crecimiento, de contenido hídrico y de daño oxidativo como criterios de selección, los que fueron evaluados en dos niveles de sequía y en la recuperación de la condición de estrés.

La **hipótesis** a evaluar fue que los genotipos de soja DM50048, NA5009RG y DM3700 se diferencian en cuanto a la tolerancia frente a un estrés por sequía, mediante una regulación diferencial del contenido hídrico, del crecimiento y del daño oxidativo.

Materiales y Métodos

Crecimiento del material vegetal y sistema experimental

El experimento de evaluación de los distintos genotipos se llevó a cabo en un diseño factorial 3 x 2 completamente al azar, con tres genotipos y dos condiciones hídricas: riego (R) y sequía (S). Los 3 genotipos de soja fueron: DM50048 (referido como 48), NA5009RG (9) y DM3700 (0).

Se pusieron a germinar semillas de los distintos genotipos, desinfectadas previamente con hipoclorito de sodio (1%), en bandejas con algodón humedecido y papel absorbente a 28° C por 72 horas (hs). Las plántulas de 3 días se trasplantaron a macetas plásticas de 5 litros con sustrato formado por una mezcla de arena, perlita, vermiculita y suelo (1:1:1:1) esterilizada mediante dos autoclaves de 1 hora separadas por 24 hs. El ensayo comenzó con 30 macetas por cada genotipo de SCC, con cuatro plántulas en cada una. Luego de 10 días se descartaron dos plantas de cada maceta, conservando las de mejor estado general (turgencia, estado de desarrollo y posición en la maceta) en condiciones controladas de luz (16 hs de luz diarios) y temperatura (media de 25°C) en invernáculo. Las plantas se mantuvieron durante 30 días a capacidad de campo (CC), 40% de humedad, correspondiente con la máxima cantidad de agua que puede retener el suelo después de haber drenado el agua gravitacional. Luego, las macetas de cada genotipo se dividieron en dos lotes iguales al azar:

A) Riego: lote mantenido por riego normal a CC (15 macetas)

B) Sequía: lote al cual se le interrumpió el riego (15 macetas).

El contenido de agua de las macetas fue determinado diariamente con un sensor ECH2O (Decagon devices inc.) que mide la constante dieléctrica del medio en función del cambio de voltaje. Este valor fue relacionado con el porcentaje de humedad del sustrato a través de una curva de calibración que se realizó previamente de la siguiente manera: las macetas con una planta de soja en una mezcla de arena, perlita, vermiculita y suelo (1:1:1:1), fueron regadas a saturación. Luego, se tomaron los valores de voltaje y peso de las mismas a medida que el sustrato se fue secando. Finalmente, se obtuvo la función que relaciona ambas variables para el sustrato utilizado:

Porcentaje de humedad en sustrato (%) = 0,1912 x Voltaje (mV) – 63,048 (Figura 3).

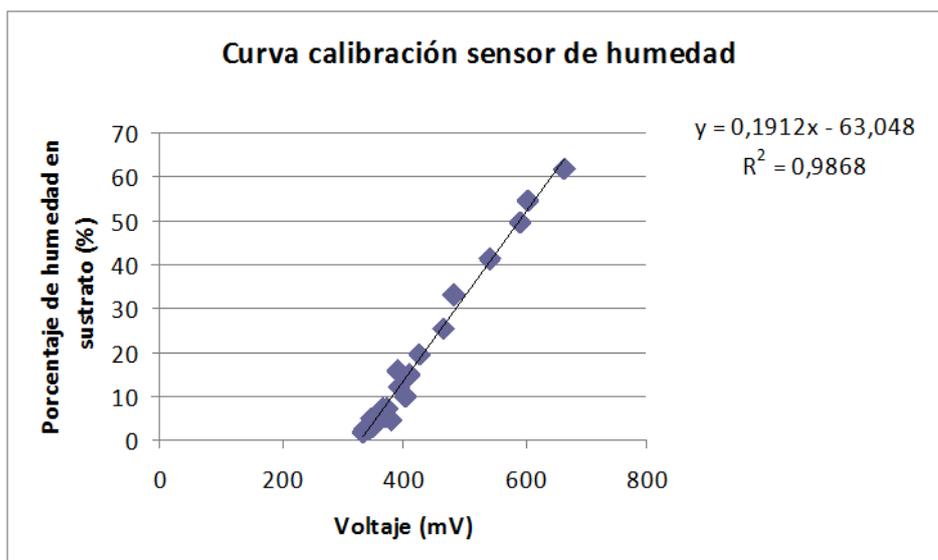


Figura 3. Curva de calibración del sensor ECH2O. Función que relaciona las mediciones de cambio de voltaje con el porcentaje de humedad de un sustrato de arena, perlita, vermiculita y suelo (1:1:1:1).

Los muestreos se realizaron en dos momentos de la sequía, y luego de su recuperación:

- 1) a los 10 días de interrumpido el riego, cuando el contenido hídrico del suelo con tratamiento de sequía alcanzó el 15% de humedad, correspondiente al 35% de CC;
- 2) a los 15 días de interrumpido el riego, cuando el contenido hídrico del suelo con tratamiento de sequía alcanzó el 7% de humedad, correspondiente al 17,5% de CC;
- 3) en la recuperación producida por riego y mantenimiento de la CC durante 6 días en las macetas que fueron sometidas a sequía.

En cada uno de esos momentos se tomaron muestras de cada uno de los seis tratamientos y se realizaron mediciones de parámetros hídricos, de crecimiento y de daño oxidativo.

Parámetros evaluados

1) *Parámetros hídricos.* Para medir el contenido relativo de agua (CRA) foliar se tomó el peso fresco (PF) de la 2^{da} hoja trifoliada. Luego se la incubó por 4 hs en una placa de Petri con agua destilada para obtener el peso de turgencia (PT). El peso seco (PS) de la hoja se obtuvo por secado en estufa, hasta lograr un peso constante. Con los valores obtenidos se calculó CRA, según Barrs y Weatherley (1962), como: $100 \times (PF-PS) / (PT-PS)$. También se determinó el contenido hídrico de la parte aérea (CH), para lo cual se

tomó el peso fresco de la parte aérea (PFpa) y peso seco de la parte aérea (PSpa) y se calculó como la siguiente relación: $100 \times (PFpa-PSpa)/PSpa$.

2) *Parámetros de crecimiento*. El diámetro del tallo (DT), justo por encima de la 1^{era} hoja trifoliada, se midió utilizando un calibre digital. El área foliar (AF) se determinó en la 4^{ta} hoja trifoliada, para lo cual se calcaron en papel los contornos de los tres folíolos, se recortaron y sus pesos se relacionaron con el peso de áreas conocidas (1 cm^2) del mismo papel. También se midió la longitud total de la parte aérea (Lpa) (considerando el tallo y sus ramificaciones), el peso fresco de la parte aérea (PFpa) y peso seco de la parte aérea (PSpa) por métodos convencionales.

3) *Daño oxidativo de las plantas*. Este parámetro fue estimado en la 3^{era} hoja trifoliada a través del contenido en sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) y expresado como equivalentes en malondialdehído (MDA), que es un producto de la peroxidación de lípidos de membrana, según la técnica de Heath y Packer (1968) modificado por Hodges (1999) (ver Anexo A).

4) *Defensa antioxidante no enzimática*. El contenido en glutatión reducido y glutatión total fue medido en la 3^{era} hoja trifoliada con una técnica adaptada de Lascano et al. (2001) (ver Anexo B), y fue expresado como la relación: glutatión reducido/ glutatión oxidado (GSH/GSSG).

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el empleo del programa InfoStat Profesional (Di Rienzo et al. 2013). Los datos se analizaron estadísticamente a través del análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias entre medias fueron comparadas con tests de diferencias mínimas significativas (LSD) Fisher, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Además se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP) para detectar diferencias entre los tres genotipos de soja bajo los dos niveles de sequía y la recuperación.

Resultados

Comparación de los tres genotipos de soja bajo dos niveles de sequía y su capacidad de recuperación

Según los ACP con las variables evaluadas, el tratamiento de sequía (S) tuvo diferentes efectos en los tres genotipos de soja (Figuras 4, 5 y 6).

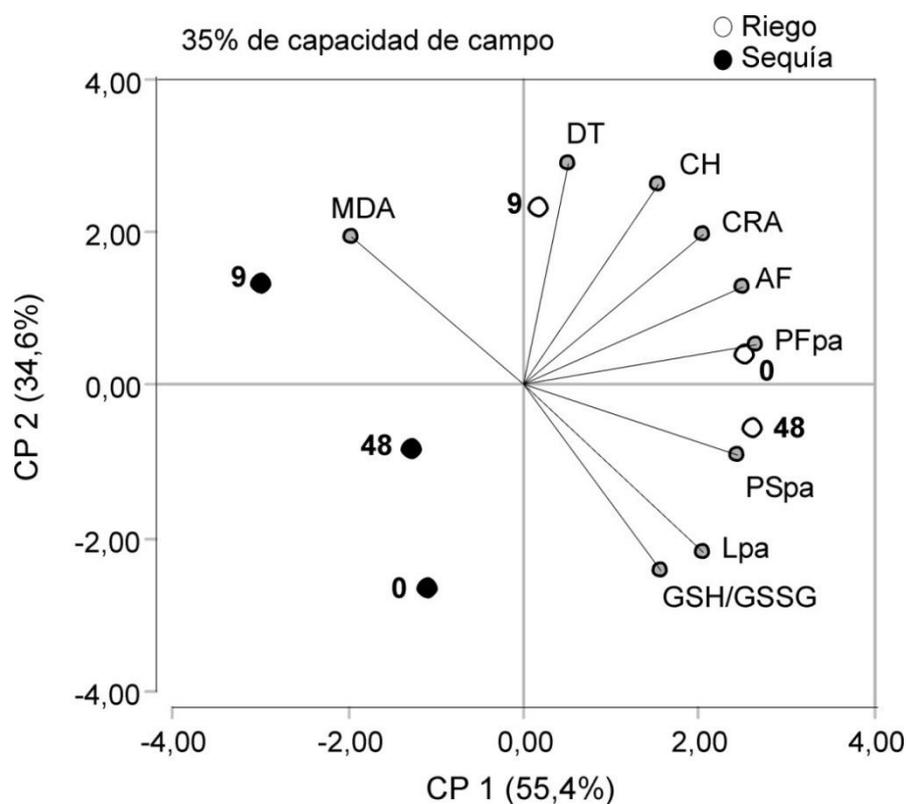


Figura 4. Biplot de Análisis de componentes principales (ACP) para 3 genotipos de soja (NA5009, DM50048 y DM 3700) en 2 condiciones hídricas: riego (capacidad de campo) y sequía (35% de capacidad de campo).

Variabes: Área foliar (AF), Contenido hídrico (CH), Peso fresco de parte aérea (PFpa), Peso seco de parte aérea (PSpa), Diámetro del tallo (DT), Contenido relativo de agua (CRA), Concentración de malondialdehído (MDA), Longitud de parte aérea (Lpa) y Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG).

Con una humedad en el suelo de 35% de CC, los primeros 2 ejes, basados en el biplot, explicaron el 90% de la variación total entre tratamientos para las variables medidas (Figura 4). El componente principal 1 (CP1) explicó el 55,4% de la variabilidad de los datos, mientras que el componente principal 2 (CP2) explicó el 34,6%. A lo largo del CP1 se separaron los 3 genotipos por su condición hídrica, aunque todos mostraron distancias

similares en proyecciones sobre el CP1 entre los tratamientos R y S. Las variables que más contribuyeron para la separación a lo largo de este eje fueron PSpa, PFpa y AF, relacionados con R, y MDA relacionado con S. Mientras que a lo largo del CP2 se separó el genotipo 9 de los genotipos 0 y 48, contribuyendo para esta separación CH, DT, la relación GSH/GSSG y Lpa.

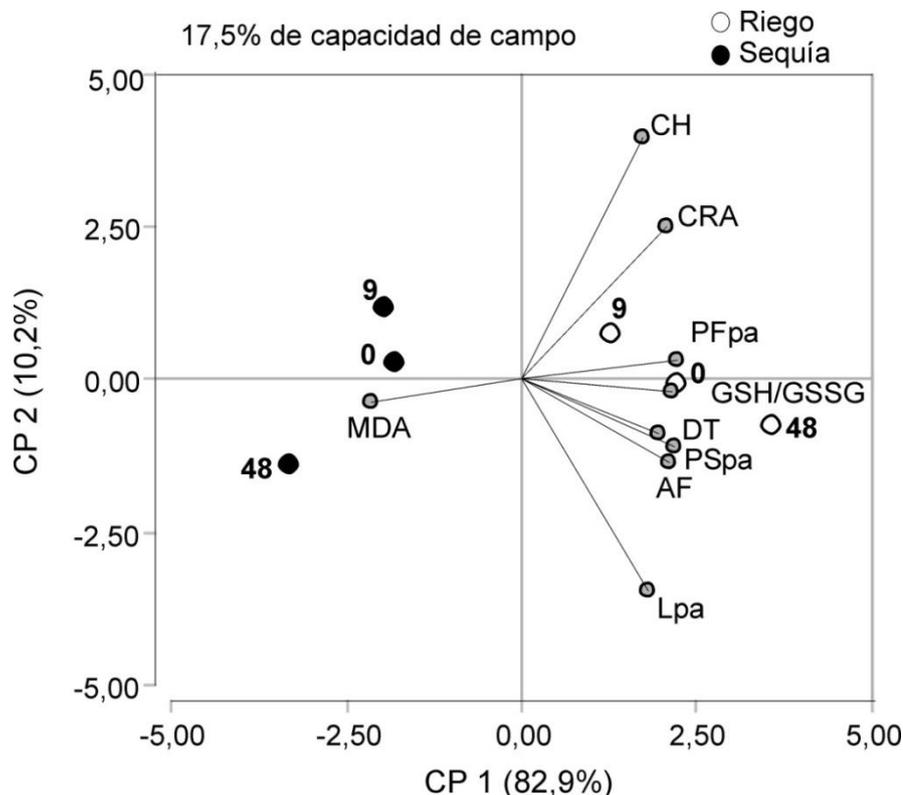


Figura 5. Biplot de Análisis de componentes principales (ACP) para 3 genotipos de soja (NA5009, DM50048 y DM 3700) en 2 condiciones hídricas: riego (capacidad de campo) y sequía (17,5% de capacidad de campo).

VARIABLES: Área foliar (AF), Contenido hídrico (CH), Peso fresco de parte aérea (PFpa), Peso seco de parte aérea (PSpa), Diámetro del tallo (DT), Contenido relativo de agua (CRA), Concentración de malondialdehído (MDA), Longitud de parte aérea (Lpa) y Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG).

Bajo sequía severa (17,5% de CC) el eje CP1 explicó el 82,9% de la variación de los datos, mientras que el CP2 explicó el 10,2% de 93,1% de la variabilidad total de los parámetros medidos (Figura 5). El eje CP1 nuevamente mostró la separación de los tratamientos S y R. Los parámetros que tuvieron más peso sobre el CP1 para separar los tratamientos R de los de S fueron: la relación GSH/GSSG, PSpa, PFpa, AF, DT y CRA relacionados con el tratamiento R, mientras que el contenido en MDA se relacionó

nuevamente con el tratamiento S. En la comparación de los 3 genotipos, el genotipo 48 fue el que mostró proyecciones más extremas sobre este eje, en las dos condiciones hídricas, mostrando una diferencia con respecto a los otros dos genotipos. Además, a lo largo del CP2 se separó el genotipo 9 del 48, sobre todo en condiciones de S. Sobre este eje, el genotipo 9 se asoció con mayores valores de CH y CRA, y el genotipo 48 con mayores valores de Lpa.

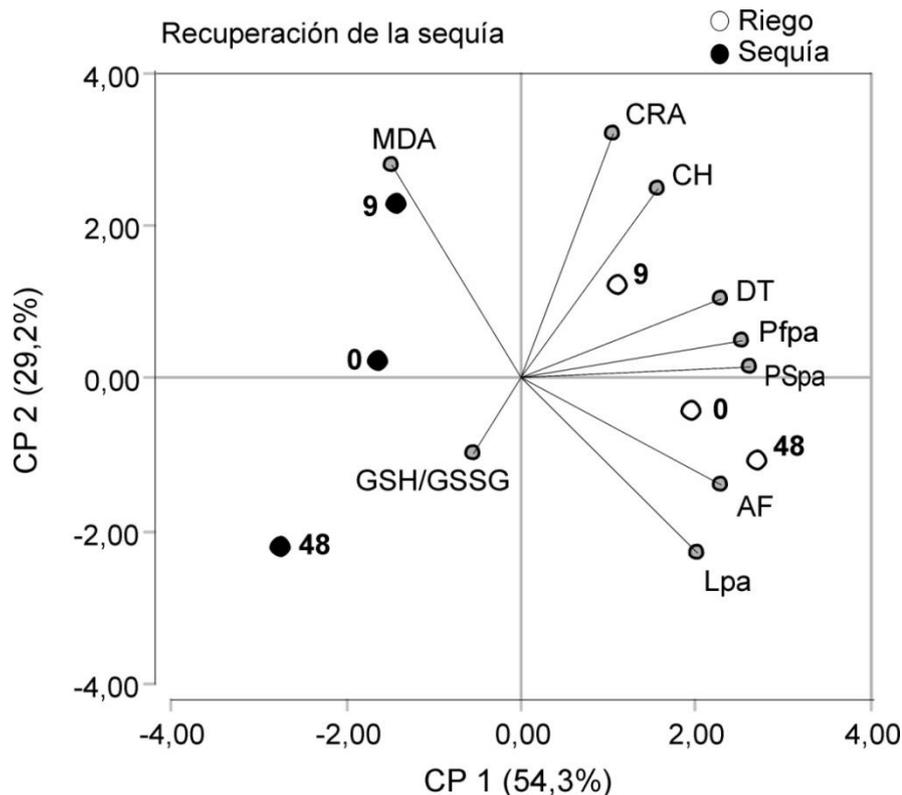


Figura 6. Biplot de Análisis de componentes principales (ACP) para 3 genotipos de soja (NA5009, DM50048 y DM 3700) en 2 condiciones hídricas: riego (capacidad de campo) y recuperación de la sequía (después de 6 días a capacidad de campo).

Variables: Área foliar (AF), Contenido hídrico (CH), Peso fresco de parte aérea (PFpa), Peso seco de parte aérea (PSpa), Diámetro del tallo (DT), Contenido relativo de agua (CRA), Concentración de malondialdehído (MDA), Longitud de parte aérea (Lpa) y Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG).

En la recuperación de la sequía, los dos primeros ejes del ACP explicaron el 83,5% de la variabilidad total entre genotipos y condiciones hídricas. El eje 1 explicó el 54,3%, mientras que el eje 2 explicó el 29,2% (Figura 6). De acuerdo al ACP, el genotipo 48 fue nuevamente el más afectado, ya que mostró las proyecciones más extremas sobre el CP1, comparado con los otros dos genotipos, en las dos condiciones hídricas. En el CP1 las variables que más contribuyeron a la separación de los tratamientos fueron AF, PSpa y

PFpa, con valores superiores en el tratamiento R, con un efecto más evidente en el genotipo 48. En el CP2 las variables que más peso tuvieron para la separación de los genotipos fueron MDA y CRA; siendo el genotipo 9 el que registró mayores valores de estas variables.

Efecto de una humedad del suelo del 17,5% de CC sobre el crecimiento, el contenido hídrico y el daño oxidativo de los tres genotipos de soja evaluados

Los resultados de los ACP mostraron que el genotipo 48, tanto en la sequía más severa como en la recuperación, evidenció mayor susceptibilidad en los parámetros medidos, comparado con los otros dos genotipos. Particularmente, la humedad en el suelo del 17,5% de CC sería una condición hídrica apropiada para la selección de genotipos de soja con tolerancia diferencial a sequía. Por ello, se seleccionó esa humedad del suelo para mostrar los efectos específicos sobre las distintas variables de parámetros hídricos, de crecimiento y de daño oxidativo.

Tabla1. Contenido hídrico y parámetros de crecimiento de tres genotipos de soja (9, 48, 0), bajo condiciones de riego y sequía (17,5% de capacidad de campo).

Regimen hídrico	Genotipos de soja	CH (%)	CRA (%)	PSpa (g)	PFpa (g)	DT (cm)	AF (cm ²)	Lpa (cm)
Riego	9	75±3a	98±5a	3,1±0,1b	12,3±0,8a	3,5±0,1ab	97±7a	44±3c
	48	74±3a	98±4a	3,9±0,2a	15,0±0,7a	3,8±0,1a	113±7a	91±3a
	0	74±3a	94±5a	3,4±0,1ab	13,4±0,8a	3,2±0,1b	99±6a	78±4b
Sequía	9	69±3a	72±5b	1,8±0,2c	6,0±0,7 b	3,0±0,1b	42±7b	28±4d
	48	41±3b	33±6c	1,9±0,1c	3,2±0,7b	3,0±0,1b	54±7b	47±4c
	0	64±3a	57±5b	1,7±0,1c	4,8±0,8b	3,1±0,1b	42±7b	47±3c
Significancia								
Régimen hídrico (H)		***	***	***	***	**	***	***
Genotipo (G)		**	*	NS	NS	NS	NS	***
H x G		**	*	NS	*	NS	NS	*

* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; NS: no significativo

Contenido hídrico (CH), Contenido relativo de agua (CRA), Peso seco de parte aérea (PSpa), Peso fresco de parte aérea (PFpa), Diámetro del tallo (DT), Área foliar (AF), Longitud de parte aérea (Lpa)

Los valores son medias ± DE. Las mismas letras en cada columna indican diferencias no significativas entre tratamientos, de acuerdo al test de LSD (p ≤ 0,05).

En la Tabla 1 se observa que para una humedad de 17,5% de CC, los valores de PFpa, PSpa, DT y AF no fueron significativamente diferentes para los tres genotipos de soja evaluados. Estas variables se vieron afectadas por la condición hídrica, mostrando mayores valores en las plantas R. Sin embargo, CH, CRA y Lpa fueron afectadas significativamente por los diferentes genotipos.

El CH y el CRA fueron afectados por la condición hídrica y el genotipo, y también por la interacción de estos 2 factores. En la condición de R todos los genotipos mostraron valores similares de CH y CRA (Tabla 1). Por el contrario, bajo condiciones de S, el genotipo 48 mostró menores valores que los genotipos 9 y 0 para estas dos variables.

Los 3 genotipos mostraron diferencias significativas en Lpa, tanto en R como en S, existiendo también interacción entre los factores (Tabla 1). El genotipo 9 tuvo el menor valor tanto en R como en S. En riego, el genotipo 48 tuvo la mayor Lpa de los 3 genotipos, pero en S no tuvo diferencias significativas con el valor del genotipo 0.

Para el daño oxidativo por sequía, los resultados se expresaron como porcentaje de cambio de las variables medidas en S respecto a las mediciones con R para cada genotipo, calculado de la siguiente manera: $(\text{valor de la variable en sequía} - \text{valor de la variable en riego}) \times 100 / (\text{valor de la variable en riego})$.

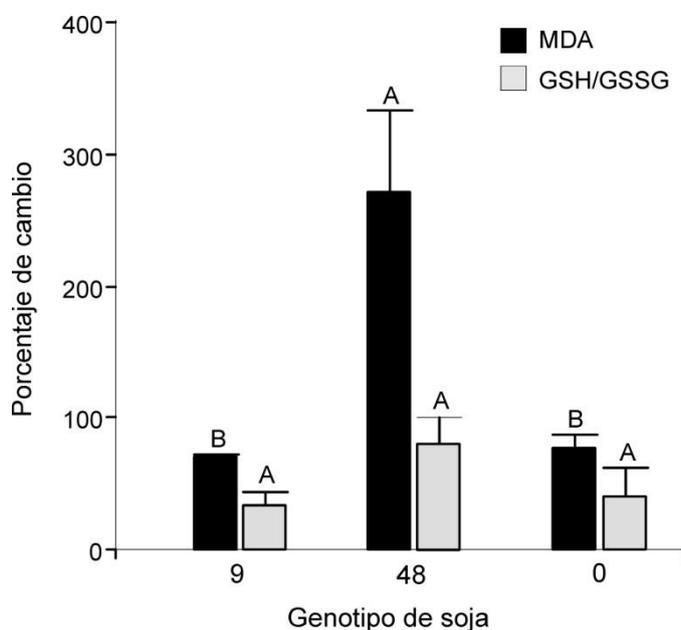


Figura 7. Porcentaje de cambio en malondialdehído (MDA) y en la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) por la sequía (17,5% de capacidad de campo) en tres genotipos de soja (NA5009, DM50048y DM 3700).

Las barras con el mismo color y letras diferentes, presentan diferencias significativas, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

El cambio en contenido en MDA fue superior en el genotipo 48, siendo significativa esta diferencia con los otros dos genotipos (Figura 7). El MDA fue un 267,7% superior en S para el genotipo 48, mientras para 0 y 9 fue de alrededor de 70% este incremento. La relación GSH/GSSG disminuyó por el tratamiento de S en los 3 genotipos (datos no mostrados), sin observarse diferencias en el porcentaje de cambio entre los genotipos.

Capacidad de recuperación de un tratamiento de sequía severo de los tres genotipos de soja evaluados

Si bien con una humedad en el suelo de 17,5% de CC no se evidenciaron diferencias en PSpa entre los genotipos (Tabla 1), al evaluar esta variable en la recuperación de la sequía se observó que PSpa fue influenciado por la condición hídrica, el genotipo, y también por la interacción de estos 2 factores (datos no mostrados). Las plantas de los genotipos que se mantuvieron en condiciones de riego normal durante todo el ensayo no mostraron diferencias significativas (Figura 8). Sin embargo, luego del período de recuperación, el genotipo 48 tuvo un valor significativamente menor de PSpa, comparado con los otros dos genotipos en las mismas condiciones.

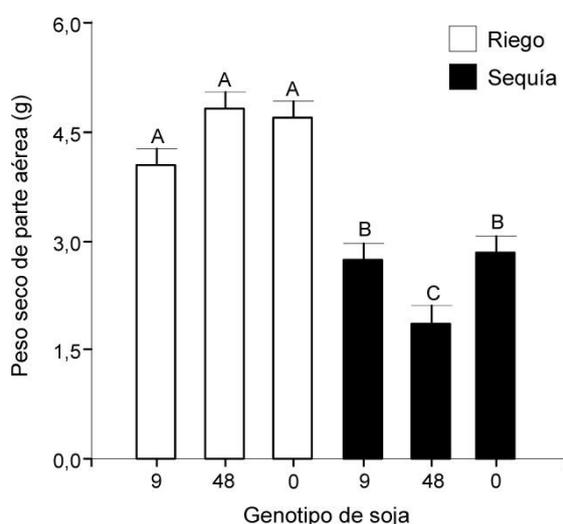


Figura 8. Efecto de recuperación luego de la sequía (17,5% de capacidad de campo) sobre el peso seco de la parte aérea (g) en tres genotipos de soja (NA5009, DM50048 y DM 3700). Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

En la Figura 9 se muestran plantas de 50 días de edad foliar de los genotipos 48 y 9, recuperadas con riego normal luego de haber alcanzado una humedad en el suelo de 17,5% de CC (S), en comparación con sus tratamientos control (R). Las plantas del genotipo 48 no lograron recuperar la turgencia de sus hojas, sobre todo de sus primeras hojas. Mientras que todas las hojas de las plantas del genotipo 9 se ven turgentes luego de 6 días de riego normal.



Figura 9. Efecto de recuperación de los genotipos de soja DM50048 y NA5009 luego de la sequía (17,5% de capacidad de campo). Plantas de 50 días de edad foliar, sometidas a: recuperación por riego luego del tratamiento de sequía (S) y riego normal (R).

Discusión

El ACP es uno de los métodos exploratorios más populares usados para reducir la complejidad de los datos multivariados. Es un método de elección para identificar patrones, y destacar similitudes y diferencias entre las muestras. Su utilización en los distintos niveles de sequía y la recuperación permitieron identificar diferencias entre los genotipos. De este modo, se pudo caracterizar distintos momentos del tratamiento de sequía: un porcentaje de humedad, 35% de CC, en la maceta donde las plantas ya demostraron estar sensibilizadas al estrés hídrico, y otro, 17,5% de CC, donde se diferenciaron los genotipos por su tolerancia a la sequía.

En las plantas, el CRA de la hoja refleja directamente el estado hídrico de la planta y puede ser usado para identificar genotipos tolerantes al estrés (Rampino et al. 2006). En este estudio, el mayor nivel de CRA bajo sequía severa se encontró para el cultivar 9 (Tabla 1), aunque no hubo diferencia significativa con el genotipo 0, y de acuerdo a Rampino et al. (2006), podría ser definido como un genotipo tolerante al déficit hídrico. Sin embargo, en el genotipo 48 el CRA fue afectado significativamente, sugiriendo una mayor susceptibilidad.

Con respecto a la biomasa, PSpa y PFpa disminuyeron con el tratamiento de sequía severa. Este resultado está de acuerdo con Reddy et al. (2004) quien reportó que el estrés hídrico inhibió la producción de materia seca debido a la inhibición de la fotosíntesis. El PSpa del genotipo 48 bajo riego normal fue mayor que el correspondiente al genotipo 9 bajo esta condición control (Tabla 1). Mientras que, bajo sequía, no hubo diferencia significativa entre estos dos genotipos. Sin embargo, hubo mayor disminución de este parámetro en el genotipo 48 con respecto al 9, sugiriendo que fue más afectado por la sequía. Así mismo, el genotipo 48 tuvo un valor significativamente menor en PSpa luego del período de recuperación, comparado con los otros dos genotipos en las mismas condiciones, todo lo cual podría estar sugiriendo mayores daños en su metabolismo fotosintético durante la sequía, o estar directamente relacionado con una reducción en el área fotosintéticamente activa de la planta por el aumento de la tasa de abscisión foliar como una estrategia de escape a la sequía (O'Toole et al. 1977). Cuando el déficit hídrico alcanza condiciones extremas y la planta no consigue mantener su contenido hídrico por encima del CRA crítico (Lawn y Likoswe 2008), se observa la muerte progresiva de hojas,

iniciando por las más viejas y siguiendo por las más nuevas, tal como se observó en el genotipo 48 (Figura 9).

Como forma de adaptación al estrés por sequía, y para minimizar la pérdida de agua, las plantas llevan a cabo modificaciones en su arquitectura, alterando la asignación de recursos a diferentes zonas. Bloom et al. (1985) sugieren que las plantas asignan más fotosintatos a estructuras que son usadas para adquirir los recursos que están limitando su crecimiento. Según estos autores, ya que el agua es el recurso limitante en la sequía, más recursos son asignados a las raíces para la adquisición de un mayor contenido de agua. Además, ya que se limitan los recursos a las partes aéreas, las plantas en sequía son más cortas y tienen hojas más pequeñas (Haile 2000). En este estudio, tanto el AF como la Lpa disminuyeron en todos los genotipos sometidos a una sequía severa en concordancia con la bibliografía presentada. Además, esta disminución en Lpa fue mayor para el genotipo 48 y solo este cultivar sufrió una disminución significativa en el DT por este tratamiento.

Al evaluar el daño oxidativo en los distintos tratamientos, pudo observarse que los valores de MDA se vieron significativamente aumentados por la sequía en los tres genotipos evaluados (Figura 7). Sin embargo, este aumento fue superior en las plantas del genotipo 48, lo cual indica mayor daño oxidativo y sugiere mayor susceptibilidad a la sequía de este cultivar. Este resultado concuerda con numerosas observaciones que reportan el aumento del daño oxidativo, evaluado como MDA, por condiciones de sequía (Smirnoff 1993). Es conocido que la sequía promueve el cierre de estomas y la disminución del CO₂, fenómenos que estimulan el transporte de electrones a nivel fotosintético, todo lo cual aumenta la generación de ERO a nivel de cloroplastos y mitocondrias (Gill y Tuteja 2010).

Los resultados de variación del daño oxidativo se compararon con la relación entre glutatión reducido y glutatión oxidado (GSH/GSSG) o nivel redox, el cual al aumentar indica un incremento en el estado reducido del tejido, mientras que al disminuir señala un aumento del estado oxidado celular. En los tres genotipos se observó una disminución en el nivel redox bajo la condición de sequía severa, mostrando un estado más oxidado con respecto a la condición control. Coincidentemente, una sequía severa con bajo CRA causó una oxidación de la reserva de glutatión en hojas de cebada (Smirnoff 1993).

Conclusiones

Con el tratamiento de sequía progresivo planteado, se obtuvo un rango de tolerancia entre los genotipos de SCC estudiados. El genotipo 48 fue considerado el más susceptible a sequía, el genotipo 9 fue el más tolerante, mientras que el genotipo 0 fue intermedio o moderadamente tolerante.

Tanto la información del genotipo de mayor sensibilidad como la humedad del suelo en la cual las plantas de soja comenzaron a manifestar un estrés por sequía, se utilizaron posteriormente en el diseño de los ensayos que permitieron estudiar el efecto de la simbiosis micorrízico arbuscular sobre la tolerancia a la sequía de plantas de soja, y se presentan en los capítulos 2 y 3.

CAPÍTULO 2

Importancia de la identidad del inóculo
de HMA en la mitigación del estrés
por sequía en soja

Introducción

Las micorrizas arbusculares son simbiosis mutualistas entre raíces de plantas y hongos que pertenecen al phylum *Glomeromycota*. Según la clasificación más reciente, dentro del phylum *Glomeromycota* se encuentran 9 familias (Redecker et al, 2013). En la Figura 10 se presenta el árbol filogenético con los distintos géneros dentro de cada familia (<http://invam.caf.wvu.edu/>).

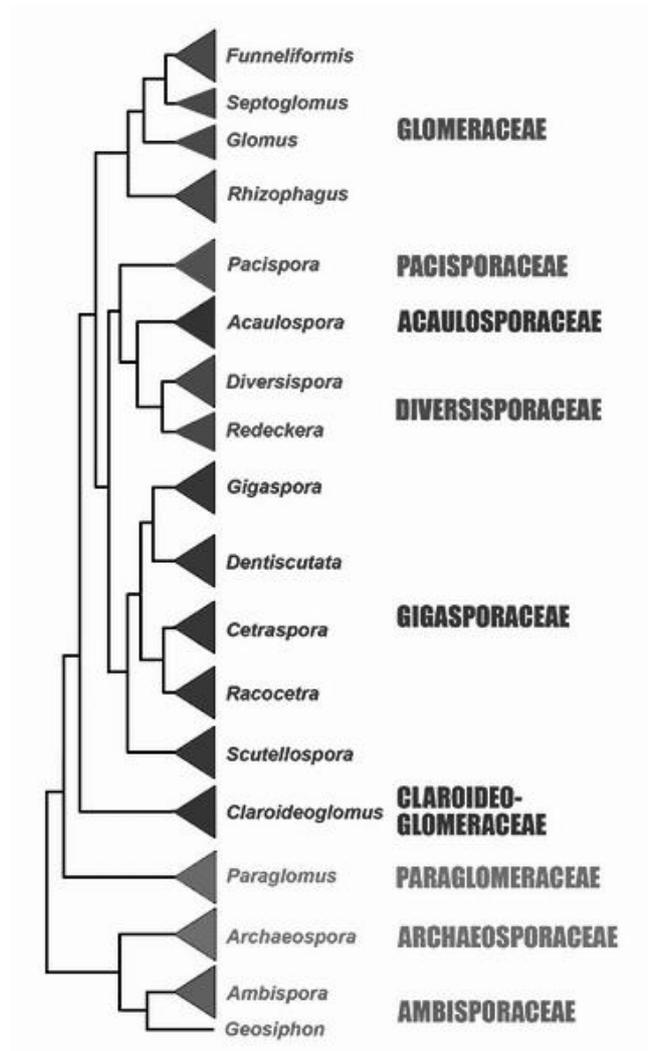


Figura 10. Árbol filogenético del phylum *Glomeromycota* (<http://invam.caf.wvu.edu/>)

Esta ampliamente reconocido que la composición de la comunidad de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) puede influenciar en el desarrollo de la planta (van der Heijden et al. 2003; Jansa et al. 2008). Sin embargo, algunos primeros trabajos indicaban que los mayores beneficios para las plantas se producen con una única especie de HMA

más eficiente (Edathil et al. 1996). Más recientemente, se ha sugerido que los beneficios de las mezclas de especies de HMA sobre las plantas pueden ser mayores que los proporcionados por los aislamientos individuales (Hoeksema et al. 2010; Verbruggen and Kiers 2010). Estos beneficios pueden ser el resultado de la diferenciación de nichos y la colaboración entre las distintas especies fúngicas (efecto de complementariedad) (e.g. Maherali y Klironomos 2007) o de un efecto dominante de alguna especie particularmente productiva (efecto de selección) (e.g. Vogelsang et al. 2006).

La posibilidad de mejorar la resistencia a sequía en plantas a través de la inoculación con HMA ha sido ampliamente investigada (Augé 2001; Rapparini y Peñuelas 2014; Saia et al. 2014). Recientemente ha sido demostrado que la inoculación con HMA de importantes plantas agroforestales como *Phaseolus mungo*, *Triticum aestivum*, *Eucalytus tereticornis* and *Albizia procera*, podría ser más importante que la humedad del suelo en mejorar el crecimiento vegetal (Shukla et al. 2013). Particularmente, los efectos de la inoculación con aislamientos individuales de HMA en el comportamiento de plantas de soja expuestas a S han sido mostrados en Porcel y Ruiz-Lozano (2004). Sin embargo, hasta este momento, en ningún estudio se compara el efecto de aislamientos individuales de HMA con su mezcla bajo condiciones de riego normal (R) y de S en un genotipo de soja.

En esta tesis doctoral, se aislaron e identificaron morfoespecies presentes en un suelo agrícola. Luego, se seleccionaron aislamientos de tres especies de HMA, *Septoglomus constrictum* (Sc), *Glomus* sp. (Gsp), y *Glomus aggregatum* (Ga), conocidas por encontrarse entre las más abundantes en los suelos agrícolas y naturales de Argentina central (Urcelay et al. 2009; Grilli et al. 2012; Longo et al. 2014).

El **objetivo** de este estudio fue caracterizar el comportamiento de cepas nativas de HMA, como inóculos individuales y su mezcla, frente al estrés por sequía, en un genotipo de soja susceptible al estrés en estudio. Los efectos de los aislamientos individuales y su mezcla, se compararon por su respuesta respecto al crecimiento de la planta, la nutrición mineral y la absorción de agua (Rapparini y Peñuelas 2014), o con los mecanismos relacionados a la tolerancia a la sequía por ajuste osmótico, prolina (Pro) o azúcares solubles (Az), y mitigación del daño oxidativo (Rapparini y Peñuelas 2014).

La **hipótesis** a evaluar fue que una mezcla de aislamientos de HMA provee más beneficios a las plantas de soja que cada uno de los aislamientos individuales.

Materiales y métodos

Aislamiento de cepas nativas de HMA a partir de suelo agrícola

Con la finalidad de aislar cepas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) nativos de la región, se tomaron muestras de suelo de un ensayo establecido en la EEA INTA Manfredi, en un suelo Argiudol típico serie Oncativo. Dicho ensayo cuenta con distintos patrones de rotación de cultivos, entre soja y maíz, y está establecido desde el año 1992, lo cual le otorga al sistema una gran estabilidad. Todas sus parcelas son igualmente tratadas con los agroquímicos de uso rutinario en la zona, y según las diferentes necesidades de cada cultivo (fertilizantes, herbicidas y plaguicidas). Las muestras de suelo se tomaron de los 15 cm superiores de suelo en enero de 2008. Se tomaron diez submuestras de cada punto de muestreo seleccionado al azar, que luego fueron mezcladas para formar una muestra compuesta para cada uno de los diez puntos. El suelo se conservó a 4°C hasta su uso.

El aislamiento de esporas se realizó por la técnica de tamizado húmedo y centrifugación en sacarosa (Walker, 1991). Se tomaron muestras de 50 g de suelo, que fueron disueltas en agua y pasadas por un tamiz (900 μm) para descartar restos de material vegetal. A continuación, se utilizó un tamiz de porosidad inferior (37 μm), donde quedan retenidas las esporas. El enjuague proveniente de este tamiz se centrifugó y, mediante un gradiente de sacarosa, se recuperaron las esporas micorrícicas. Las esporas obtenidas se decantaron en papel filtro y se observaron en una lupa estereoscópica.

La identificación taxonómica se realizó con base en la forma, tamaño y color de las esporas; grosor, número y ornamentación de las capas de la pared; y forma y acoplamiento de la hifa de sostén. Se tomaron como base, el manual de identificación de Schenk and Pérez (1990), las descripciones originales y la descripción propuesta por la International Collection of Vesicular and Arbuscular Mycorrhizal Fungi (<http://invam.caf.wvu.edu/>). Con tal fin, se montaron las esporas viables, según la apariencia externa, en preparaciones usando alcohol polivinílico-acido láctico-glicerol (PVLG) con y sin reactivo de Melzer (1:1 v/v), para ser observadas en un microscopio compuesto.

Obtención de inóculos a partir de las esporas aisladas

Con el fin de obtener inóculos monospóricos de las distintas cepas aisladas del suelo agrícola, se hicieron germinar semillas de sorgo (*Sorghum allepense*) y maíz (*Zea mays*) en bandejas con mezcla 3:1 en volumen de arena y tierra estéril. Las plántulas se transportaron a macetas con la misma mezcla estéril. Las esporas aisladas se colocaron de a una en las proximidades de las raíces de las distintas plántulas. Las mismas se dejaron crecer en invernáculo bajo condiciones controladas y riego normal (riego diario con agua destilada) por 75 días. Una semana antes del primer control de los inóculos, se interrumpió el riego para estimular la esporulación. Se tomaron muestras de suelo con sacabocado de las distintas macetas, y en ellas se evaluó la presencia de esporas de HMA, según la metodología ya descrita, y colonización de raíces por estos hongos. La tinción de las raíces de sorgo y maíz para la observación de estructuras de HMA y la cuantificación de la colonización se realizaron de acuerdo a Phillips and Hayman (1970) y McGonigle et al. (1990), respectivamente (ver detalles de ambas técnicas en el Anexo C).

Propagación de inóculos monospóricos

Debido a la imposibilidad de lograr un cultivo monospórico de esporas aisladas del suelo agrícola analizado, se trabajó con inóculos monospóricos de *Glomus aggregatum* (75 esporas/100g de sustrato aprox.), *Septoglomus constrictum* (70 esporas/100 g de sustrato aprox.) y *Glomus* sp. (dorada) (2000 esporas/100 g de sustrato aprox.), provenientes de Cuesta Blanca, Dpto. Punilla, Prov. de Córdoba, Argentina, cedidos por el área de Micología del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV). Se trabajó con estas especies debido a que son las mismas que se encontraron en el suelo agrícola del ensayo.

Para la propagación de dichos inóculos se desinfectaron semillas de sorgo (*Sorghum allepense*) con hipoclorito de sodio (1%), y se pusieron a germinar, por 72 horas a 28°C, en bandejas con algodón humedecido y papel absorbente. Las plántulas se colocaron en 6 jardineras con mezcla de arena, tierra, perlita y vermiculita en iguales cantidades, esterilizada mediante 2 autoclaves de 1 hora separadas por 24 horas. Por cada cepa micorrízica, el inóculo monospórico se colocó en las proximidades de las raíces de las plantas ubicadas en 2 jardineras, haciéndose crecer las plantas en invernáculo bajo condiciones controladas a 20-25°C y riego normal. Luego de 6 meses, se tomaron muestras

de raíces de las plantas inoculadas para cuantificar su micorrización: *Septoglomus constrictum*: 17,5 y 20,2%; *Glomus* sp.: 21,8 y 18,5%; y *Glomus aggregatum*: 39 y 26,2%.

Luego, se descartó la parte aérea de las plantas de sorgo y fragmentos de raíces junto con el suelo se utilizaron para la propagación de las cepas de HMA en plantas de maíz. Los porcentajes de micorrización luego de 6 meses de propagación de las distintas cepas fueron en promedio: *Septoglomus constrictum*: 72%; *Glomus* sp.: 85%; *Glomus aggregatum*: 71%.

Finalmente, estos inóculos se propagaron en plantas de soja (descartando la parte aérea de las plantas de maíz) durante los 4 meses previos al ensayo de comparación de las distintas cepas de HMA por su efecto sobre soja bajo condiciones de sequía. Luego de cada renovación de plantas de propagación de inóculos se hizo un riego con solución nutritiva Hoagland reducida en fosfatos (0,25 mM, que es 1/4 del fosfato de potasio recomendado en el protocolo general). La tinción de las raíces de sorgo y maíz para la observación de estructuras de HMA y la cuantificación de la colonización se realizaron de acuerdo a Phillips and Hayman (1970) y McGonigle et al. (1990), respectivamente (ver detalles de ambas técnicas en el Anexo C). Además de la observación de las raíces, se realizó un control de la población de esporas para confirmar la presencia de cada uno de los aislamientos.

Condiciones de crecimiento de un genotipo de soja susceptible a la sequía inoculado con HMA bajo diferentes condiciones hídricas

El experimento de inoculación con los distintos inóculos propagados se llevó a cabo en un diseño factorial 5 x 2 completamente al azar, con cinco tratamientos de inoculación y dos condiciones hídricas: riego (R) y sequía (S). Los cinco tratamientos de inoculación fueron: un control (C) sin HMA, tratamientos de inoculación con *Septoglomus constrictum* (Sc), *Glomus* sp. (Gsp), *Glomus aggregatum* (Ga) por separado, y un inóculo Mixto (Mx) formado por la mezcla de las tres especies de HMA. Cada tratamiento (combinación de los cinco distintos tratamientos de inoculación y las dos condiciones hídricas) se replicó cinco veces en macetas de cinco litros con dos plantas cada una.

Se hicieron germinar semillas del genotipo DM50048 (caracterizada en el Capítulo 1 como de mayor susceptibilidad a la sequía), desinfectadas con hipoclorito de sodio (1%), en bandejas con algodón humedecido y papel absorbente a 28° C por 72 horas. Cuatro plántulas se trasplantaron a cada maceta de cinco litros, que contenía sustrato (mezcla de

arena, perlita, vermiculita y suelo, 1:1:1:1) esterilizado mediante 2 autoclaves de 1 hora separadas por 24 horas. El inóculo de micorrizas consistió en 20 g de fragmentos de raíces de soja con un 60% aproximadamente de colonización y fue agregado en el centro de la maceta, cerca de las raíces de las plántulas de soja en el momento del trasplante. A los tratamientos C, se agregó el producto de la filtración del enjuague de raíces micorrizadas a través de un tamiz de 37 μ m, que retiene las raíces y esporas de HMA (Mortimer et al. 2008), y esas mismas raíces previamente esterilizadas mediante autoclave con la finalidad de eliminar la presencia de micorrizas viables. De este modo, el control contiene los microorganismos propios del suelo (debido al agregado de la filtración), pero no HMA (Kohler et al. 2008). Finalmente, las diferencias observadas corresponden a la presencia o ausencia de micorrizas en los distintos tratamientos. Luego de 10 días se descartaron 2 plantas, conservando en cada maceta las de mejor estado general (turgencia, estado de desarrollo y posición en la maceta). Las plantas se hicieron crecer en invernáculo en condiciones controladas de luz (16 horas de luz diarias) y temperatura (media de 25°C), y regadas con agua destilada tres veces por semana para mantener la humedad del suelo cercana a CC durante los primeros 45 de crecimiento de las plantas. Luego, se continuó regando normalmente en la mitad de las macetas de cada tratamiento de inoculación, para mantener el contenido hídrico del sustrato cercano a CC durante todo el ensayo. En la otra mitad de las macetas se interrumpió el riego. El contenido hídrico del suelo en las macetas se evaluó periódicamente por el método de la pesada. A los 7 días se alcanzó una humedad del suelo de alrededor de 35% de CC, que es la condición en la que el genotipo de soja 48 mostró ser susceptible sin mostrar daños tan evidentes como con el 17,5% de CC (según resultados mostrados en el Capítulo 1). Esta humedad del suelo se mantuvo durante 7 días más por pesada de las macetas y reposición del agua perdida diariamente. Transcurrido este período de estrés, se realizó el muestreo del material vegetal para su evaluación. Para determinar el contenido de agua en las macetas durante el estrés, en el momento del muestreo se tomaron 10 gramos de sustrato de cada maceta (2 replicas) que se dejaron secar en estufa a 60 °C hasta llegar a peso constante (PS). El contenido para cada maceta se expresó como un porcentaje, calculado como: $(10-PS) * 100/PS$. El contenido de agua en la maceta durante el tratamiento de sequía fue de 7%, mientras que en las macetas con riego normal el contenido fue alrededor del 20 %.

Biomasa, concentración de nutrientes minerales, estado hídrico y colonización de raíces por HMA

La biomasa de la planta fue medida como Peso seco de la parte aérea (PSpa) y Peso seco de la raíz (PSr), luego de ser secada en estufa a 70°C hasta peso constante. Se calculó la relación raíz / parte aérea dividiendo PSr por PSpa (PSr/PSpa). El diámetro del tallo (DT), justo por encima de la 1^{era} hoja trifoliada, se midió utilizando un calibre digital. El área foliar (AF) en la 6^{ta} hoja trifoliada, el contenido relativo de agua (CRA) en la 6^{ta} hoja trifoliada y el contenido hídrico de la parte aérea (CH) se midieron como se describe en el apartado “Parámetros evaluados” de la sección “Materiales y métodos” en el Capítulo 1.

Los nutrientes minerales fueron nitrógeno total (N), determinado según el método Kjeldahl, y fósforo (P), determinado por espectrometría de absorción molecular descrito por Murphy y Riley (1962). La tinción de las raíces de soja para la observación de estructuras de HMA y la cuantificación de la colonización se realizaron de acuerdo a Phillips y Hayman (1970) y McGonigle et al. (1990), respectivamente como se detalla en el Anexo C.

Daño oxidativo y metabolitos osmóticos

Para evaluar estos parámetros se utilizó la 7^{ma} hoja trifoliada. El daño oxidativo se expresó como el contenido en malondialdehído (MDA) según técnica de Heath and Packer (1968) modificado por Hodges (1999) (ver Anexo A). El contenido en clorofila total (CIT) fue estimado de acuerdo a Arnon (1949) (ver Anexo D). El contenido en azúcar soluble (Az) fue determinado por el método de antrona en ácido sulfúrico descrita por Mokrasch (1954) (ver Anexo E). La concentración en Prolina (Pro) fue determinada por el método de Bates et al (1973) (ver Anexo F).

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el empleo del programa InfoStat Profesional (Di Rienzo et al. 2013). Los datos se analizaron estadísticamente a través del análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias entre medias fueron comparadas con tests de diferencias mínimas significativas (LSD) Fisher, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Además se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP)

para detectar diferencias entre los tratamientos de inoculación, separando las unidades experimentales en subgrupos teniendo en cuenta todas las variables analizadas.

Resultados

Aislamiento de cepas nativas de HMA a partir de suelo agrícola y obtención de inóculos monospóricos

A partir de las observaciones microscópicas se identificaron distintas morfoespecies de HMA en el suelo agrícola analizado: *Gigaspora* sp., *Glomus* sp., *Septoglomus constrictum*, *Glomus aggregatum* y *Acaulospora scrobiculata*, entre otras (Figura 11).

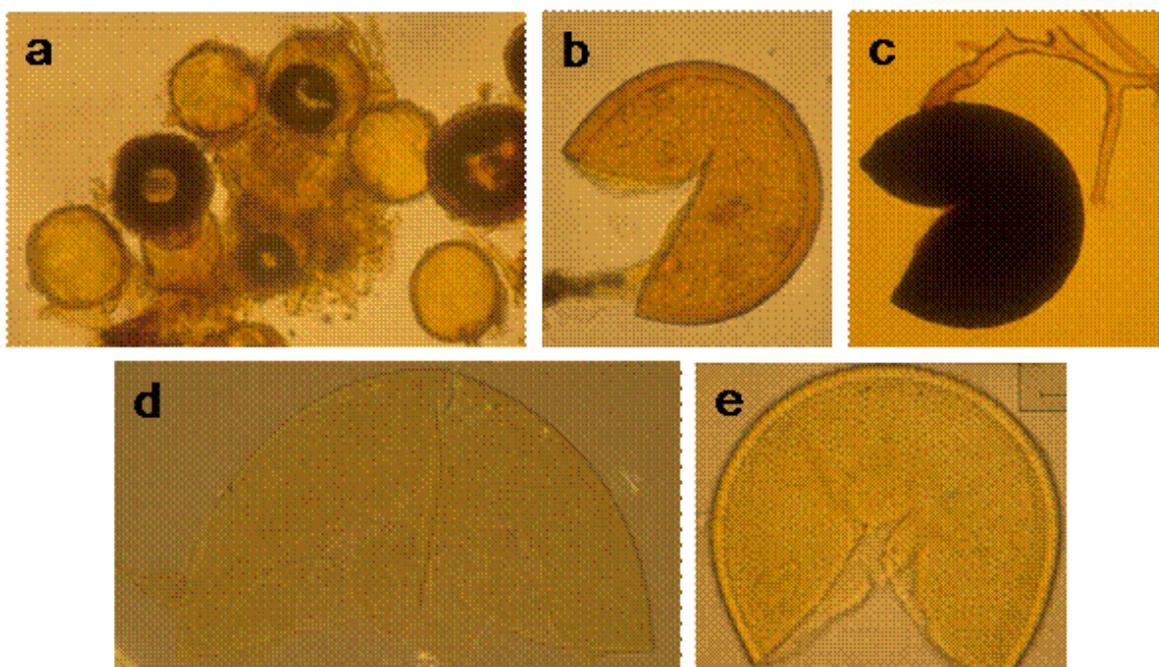


Figura 11. Morfoespecies de hongos micorrícicos arbusculares identificadas en un suelo agrícola con 15 años de distintos patrones de rotación de cultivo entre soja y maíz. a) *Glomus aggregatum*, b) *Glomus* sp., c) *Septoglomus constrictum*, d) *Gigaspora* sp. y e) *Acaulospora scrobiculata*.

Al analizar las muestras de suelo y raíz de las plantas de sorgo y maíz a los 2 meses de ser inoculadas con las esporas aisladas del suelo agrícola, no observamos presencia de esporas ni de estructuras de HMA en las raíces. Se realizó otro análisis de estos inóculos monospóricos 2 meses después con el mismo resultado en todos los cultivos.

Consideramos que las esporas aisladas de este suelo pudieron estar afectadas por alguna de las prácticas agrícolas empleadas, que finalmente perjudicaron su germinación y la colonización de las plantas trampa, siendo que las prácticas agrícolas son vistas como los factores con mayor influencia en la dinámica de los HMA y su asociación con plantas.

Los períodos de labranza y barbecho, las secuencias de rotación que incluyen plantas que no son hospedantes de HMA y otras estrategias de manejo de cultivo son factores críticos que afectan el desarrollo, la actividad y la diversidad de HMA (Douds et al. 1995; Douds y Millner 1999; Galvez et al. 2001; Jansa et al. 2003; Oehl et al. 2003–2005).

Caracterización de cepas de hongos micorrícicos arbusculares nativos en simbiosis con un genotipo de soja durante el estrés por sequía

Debido a la imposibilidad de lograr un cultivo monospórico de esporas aisladas del suelo agrícola analizado, se trabajó con inóculos monospóricos de *Glomus aggregatum*, *Septoglomus constrictum* y *Glomus* sp. (dorada), provenientes de Cuesta Blanca (Córdoba).

En el ACP (Figura 12), los tratamientos se diferenciaron claramente de acuerdo a las variables medidas. El CP1 explicó 54,2% de la variabilidad, mientras que el CP2 explicó 24,6% del 78,8% de la variabilidad total. Podemos destacar la división de los tratamientos por su nivel hídrico a lo largo del eje 1. Los tratamientos en sequía (S) se proyectan sobre el lado izquierdo de este eje, y se asocian con niveles más altos de Pro y Az. Los tratamientos con riego normal (R), sobre el lado derecho del eje, se asociaron con niveles más altos de CRA, CH, DT, PSpa y PSr. En el eje 2 se separaron los distintos tratamientos de inoculación con HMA. Tanto en las plantas con R como en las plantas con S se observó la separación del tratamiento control (C) del resto de los tratamientos de inoculación. Mientras las plantas micorrizadas, proyectadas sobre el lado inferior del eje, se asociaron con niveles superiores de CIT y mayores valores de AF, las plantas C se asociaron con mayores valores de MDA, PSr/PSpa y PSr.

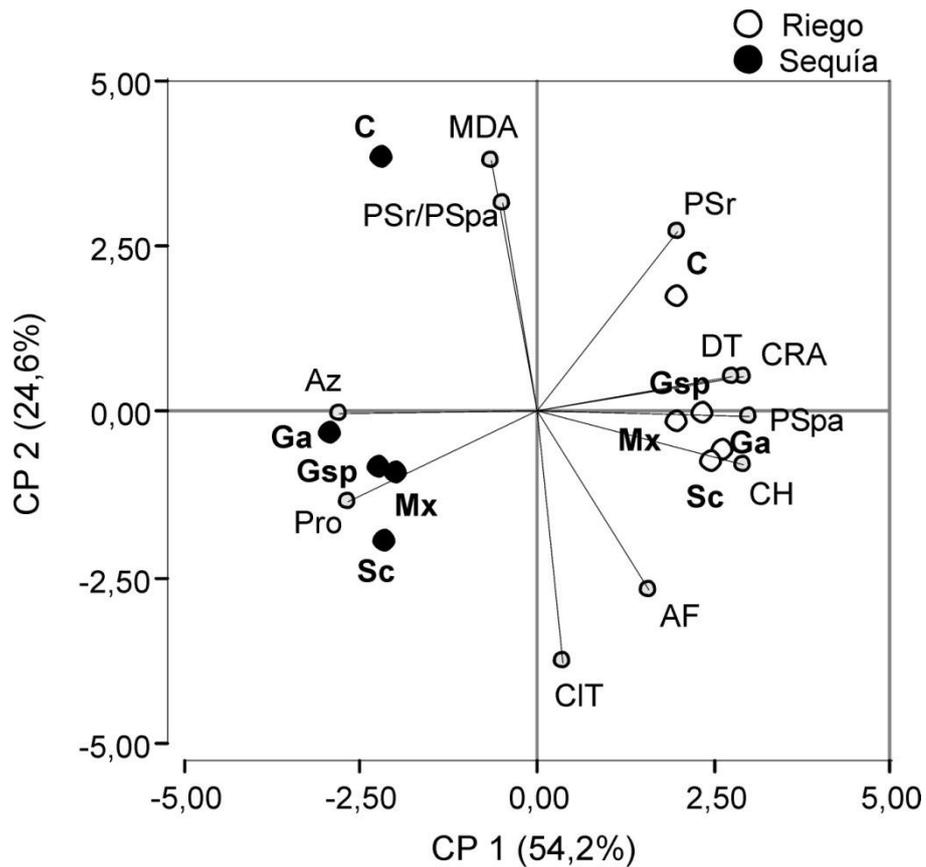


Figura 12. Biplot de Análisis de componentes principales (ACP) para plantas de soja de genotipo DM50048 con 5 tratamientos de inoculación con cepas de HMA bajo condiciones de riego y sequía, que muestra la relación correlativa entre el contenido hídrico (CH), contenido relativo de agua (CRA), peso seco de parte aérea (PSpa), peso seco de raíz (PSr), relación raíz/parte aérea (PSr/PSpa), diámetro del tallo (DT), área foliar (AF), malondialdehído (MDA), clorofila total (CIT), prolina (Pro) y azúcares solubles (Az). Control (C), *Septoglomus constrictum* (Sc), *Glomus* sp. (Gsp), *Glomus aggregatum* (Ga) y su mezcla (Mx).

Colonización micorrícica y mecanismos para evitar el estrés por sequía en aislamientos vs la mezcla de HMA en un genotipo de soja susceptible a la sequía

Los inóculos de los aislamientos y la mezcla fueron infectivos bajo ambas condiciones hídricas, teniendo *Ga* menor colonización total y por vesículas que *Sc* y *Gsp*. Bajo condiciones de R, el tratamiento *Mx* fue similarmente infectivo que *Sc* y *Gsp* (Tabla 2). Cuando se desarrolló el estrés por S, el nivel de colonización no cambió en los aislamientos individuales, comparados con la condición de R. Sin embargo, hubo una disminución significativa en la colonización por vesículas y arbusculos en el tratamiento

Mx. Además, la colonización por arbusculos en *Mx* fue menor que *Gsp*, que fue la cepa que mostró mayor habilidad para formar arbusculos bajo S. Las plantas C no mostraron colonización por HMA (Tabla 2).

Tabla 2. Colonización de raíces por cepas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), por separado y en un tratamiento mezcla de ellas, en plantas del genotipo de soja DM50048 bajo condiciones de riego o sequía.

Régimen hídrico	HMA	Colonización total (%)	Colonización por Vesículas (%)	Colonización por Arbúsculos (%)
Riego	<i>S. constrictum</i>	96 ± 2a	40 ± 17ab	52 ± 15bcd
	<i>Glomus</i> sp.	90 ± 5a	40 ± 10ab	80 ± 10a
	<i>G. aggregatum</i>	52 ± 21b	3 ± 5d	67 ± 21abc
	Mezcla de HMA	88 ± 12a	42 ± 18a	79 ± 15ab
Sequía	<i>S. constrictum</i>	95 ± 5a	34 ± 9ab	38 ± 19d
	<i>Glomus</i> sp.	91 ± 5a	30 ± 24ab	74 ± 6abc
	<i>G. aggregatum</i>	60 ± 19b	5 ± 7cd	49 ± 34cd
	Mezcla de HMA	83 ± 12a	23 ± 13bc	39 ± 20d
Significancia				
Regimen hídrico (H)		NS	NS	**
HMA		***	***	**
H x HMA		NS	NS	NS

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; NS: no significativo

Los valores son medias ± DE. Las mismas letras en cada columna indican diferencias no significativas entre tratamientos, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

En la figura 13 se muestran las distintas estructuras de micorrizas arbusculares que se encontraron en las raíces de las plantas inoculadas con los aislamientos de HMA y la mezcla de ellos.

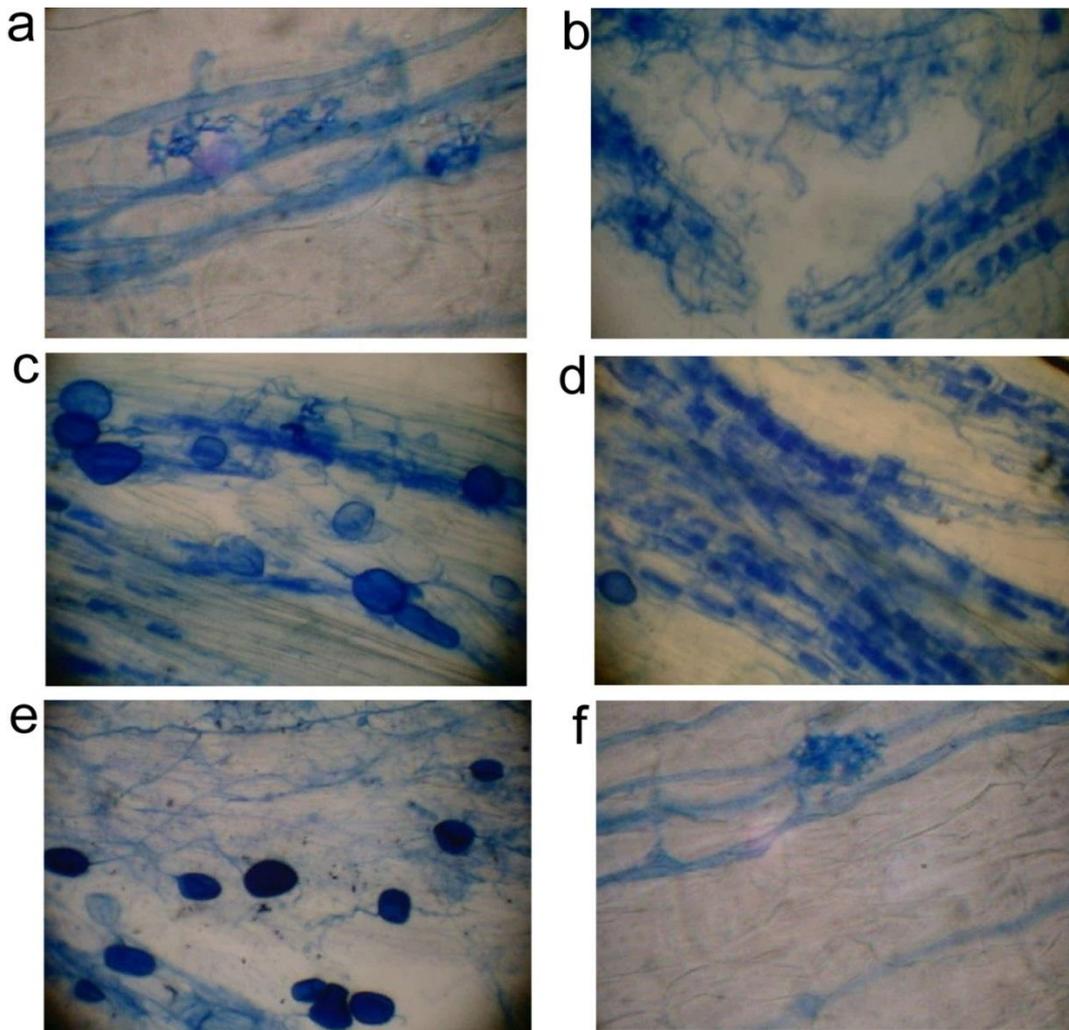


Figura 13. Colonización de raíces por cepas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), por separado y en un tratamiento mezcla de ellas, en plantas de soja de 60 días luego de un tratamiento de estrés por sequía: **a** y **b** *Septogloium constrictum*; **c** y **d** *Glomus* sp.; **e** *Glomus aggregatum*; **f** mezcla de HMA.

La biomasa evaluada como PSr y PSpa disminuyó significativamente por la condición de S tanto en plantas C como en las inoculadas con HMA (Tabla 3 y 4). Sin embargo, en PSpa las plantas C fueron más afectadas por la S, ya que sufrieron una disminución del 42%, mientras esta disminución se mantuvo entre 22 y 30% en todas las plantas inoculadas con HMA (Tabla 4). Por el contrario, la S afectó el PSr en las plantas con HMA, mientras PSr disminuyó 30% aproximadamente en todas las plantas con HMA, en las plantas C la disminución fue del 18%. Bajo ambas condiciones hídricas, en el tratamiento *Mx*, PSpa y PSr fueron similares a los aislamientos de HMA, particularmente *Mx* no superó a *Gsp* que fue la cepa que mostró mayor PSr. La relación PSr/PSpa fue incrementada significativamente por S en las plantas C, mientras que las plantas con HMA mostraron valores similares a los correspondientes a la condición de R (Tabla 3 y 4).

Además, bajo S, la relación PSr/PSpa fue significativamente menor en las plantas con HMA que en las C. No se evidenció diferencia en PSr/PSpa entre aislamientos individuales y el tratamiento *Mx* bajo ambas condiciones hídricas (Tabla 4).

La identidad de los HMA afectó el CH bajo condiciones de S, pero no bajo R (Figura 14). Bajo S, *Sc* y *Gsp* tuvieron mayor CH que las plantas C, mientras que *Ga* y el tratamiento *Mx* no se diferenciaron del control (Figura 14a). El contenido relativo de agua (CRA) sólo fue afectado por el régimen hídrico (Tabla 3 y Figura 14b).

Tabla 3. Análisis de la varianza sobre el efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y la sequía (S) sobre la colonización de raíces por HMA, parámetros de crecimiento de las plantas y las concentraciones de malondialdehído, clorofila, azúcares solubles y prolina en hojas de plantas de soja genotipo DM500048, crecidas bajo condiciones de riego normal y de sequía.

Variables	Fuente de variación (valores p)		
	HMA	S	HMA x S
Colonización total	<0,0001	0,8316	0,6741
Colonización por vesículas	<0,0001	0,0691	0,4209
Colonización por arbusculos	0,0087	0,0040	0,3169
Contenido hídrico	0,0510	<0,0001	0,0452
Contenido relativo de agua	0,5649	<0,0001	0,1722
Peso seco de raíz	<0,0001	<0,0001	0,2529
Peso seco de parte aérea	0,9403	<0,0001	0,6268
Peso seco total	0,0001	<0,0001	0,7931
Raíz/ parte aérea	0,0004	0,0130	0,0057
Nitrógeno	<0,0001	0,0111	0,1630
Fósforo	<0,0001	0,6289	0,4118
Malondialdehído	0,0209	0,4130	0,1526
Clorofila total	0,0096	0,1111	0,7400
Azúcares solubles	0,7987	<0,0001	0,0278
Prolina	0,2355	<0,0001	0,2623

Tabla 4. Biomasa y nutrientes minerales en hojas de plantas de soja inoculadas con aislamientos de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y su mezcla, bajo condiciones de riego y sequía.

Régimen hídrico	HMA	Peso seco de raíz (g)	Peso seco parte aérea (g)	Raíz/parte aérea	Nitrógeno (%)	Fósforo (%)
Riego	Control	7,8±0,9a	11,1±0,1a	0,6±0,1bc	2,5±0,2e	0,2±0,1de
	<i>S. constrictum</i>	5,9±0,6cd	9±0,6b	0,6±0,1cd	3,0±0,3de	0,4±0,1abc
	<i>Glomus</i> sp.	6,9±0,7b	9±0,6b	0,8±0,1bc	3,2±0,7cd	0,4±0,1ab
	<i>G. aggregatum</i>	4,9±0,6ef	9,8±0,9b	0,5±0,1d	3,3±0,3bcd	0,3±0,1cd
	Mezcla de HMA	6,7±0,4b	9,2±0,9b	0,7±0,1bc	4,0±0,6a	0,4±0,2abc
Sequía	Control	6,4±0,4bc	6,5±0,8c	1±0,1a	3,0±0,4de	0,1±0,1e
	<i>S. constrictum</i>	4,4±0,3f	6,7±0,7c	0,7±0,1bc	3,4±0,4bcd	0,4±0,1abc
	<i>Glomus</i> sp.	5,4±0,7de	6,8±1,3c	0,8±0,1b	3,8±0,3ab	0,5±0,1a
	<i>G. aggregatum</i>	4,2±0,4f	6,8±1,1c	0,6±0,2bc	3,7±0,4abc	0,3±0,1bcd
	Mezcla de HMA	4,8±0,4ef	7,2±0,4c	0,7±0,1bc	3,7±0,3abc	0,3±0,1bcd
Significancia						
Regimen hídrico (H)		***	***	*	**	NS
HMA		***	NS	***	***	***
H x HMA		NS	NS	**	NS	NS

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; NS: no significativo

Los valores son medias \pm DE. Las mismas letras en cada columna indican diferencias no significativas entre tratamientos, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

Con respecto a los nutrientes, la concentración de nutrientes minerales se incrementó en las plantas inoculadas con HMA bajo condiciones de R y S, comparado con las plantas C (Tabla 3). Bajo condición de R, los tratamientos de *Ga* y *Gsp* incrementaron significativamente la concentración de N, mientras que el tratamiento *Sc* se mantuvo igual a C. Cuando se desarrollo la S, sólo las plantas *Gsp* mostraron un incremento significativo en la concentración de N. Es interesante observar que las plantas inoculadas con *Mx* bajo R mostraron una mayor concentración de N que las plantas inoculadas con los aislamientos individuales. Bajo S, el tratamiento *Mx* fue capaz de mantener un nivel alto de concentración de N, aunque no superó la concentración de N de las plantas con aislamientos individuales (Tabla 4). La concentración de P se incrementó bajo la condición

de R en todos los tratamientos con HMA y este nivel fue mantenido bajo S. En ambas condiciones de riego, los tratamientos *Mx* mostraron concentraciones de P similares a las plantas inoculadas con los aislamientos individuales de HMA (Tabla 4)

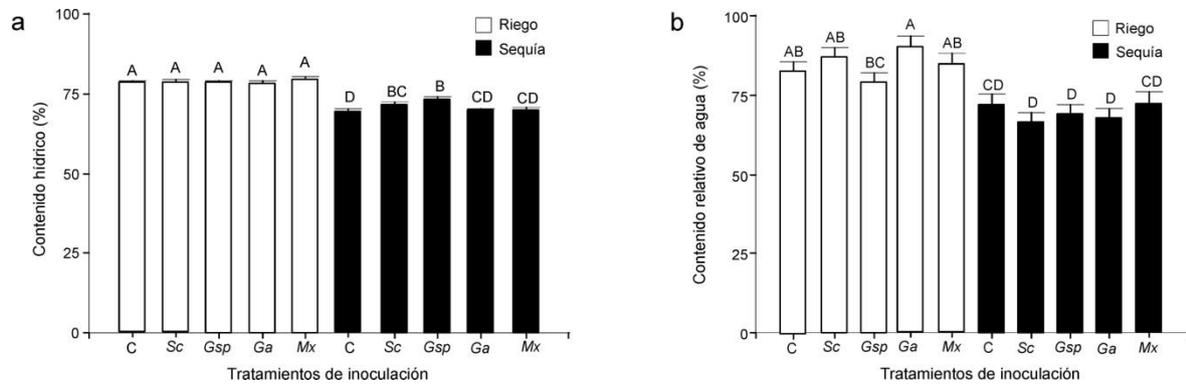


Figura 14. Efecto de la inoculación con aislamientos de hongos micorrizicos arbusculares y su mezcla sobre el contenido hídrico de plantas de soja, bajo condiciones de riego normal y sequía (35% de capacidad de campo): **a** contenido hídrico de parte aérea; **b** contenido relativo de agua. *Septoglomus constrictum* (*Sc*), *Glomus* sp. (*Gsp*), *Glomus aggregatum* (*Ga*) y su mezcla (*Mx*). Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

Mecanismos de tolerancia a la sequía en aislamientos vs la mezcla de HMA en un genotipo de soja susceptible a la sequía

De acuerdo al ANOVA, el daño oxidativo evaluado como contenido en malondialdehído (MDA) y en clorofila total (CIT) fue afectado significativamente por los tratamientos de HMA pero no por la condición de riego (Tabla 3). En las plantas C, el nivel de MDA se incremento significativamente bajo S (Figura 15a), mientras que esta se mantuvo constante en las plantas inoculadas con HMA, bajo ambas condiciones hídricas, sin diferencias entre los aislamientos y el tratamiento *Mx* (Figura 15a). Un nivel similar de contenido en CIT fue observado en las plantas inoculadas con los aislamientos de HMA y *Mx* bajo condiciones de R y S (Figura 15b). A su vez, ambos metabolitos osmóticos medidos fueron afectados significativamente por las condiciones de riego, pero sólo se observó un efecto de interacción entre los factores en el contenido en azúcares solubles (Az) (Tabla 3). Mientras no hubo diferencia en el contenido en Az entre los aislamientos y las plantas control en condiciones de S (Figura 15c), el contenido en prolina (Pro) fue mayor en las plantas inoculadas con *Gsp* y *Ga* bajo esta misma condición hídrica (Figura

15d). Al igual que en la evaluación del daño oxidativo, las plantas con el tratamiento *Mx* nunca superaron el nivel de contenido en Az y Pro de las plantas inoculadas con los aislamientos individuales (Figuras 15c y 15d).

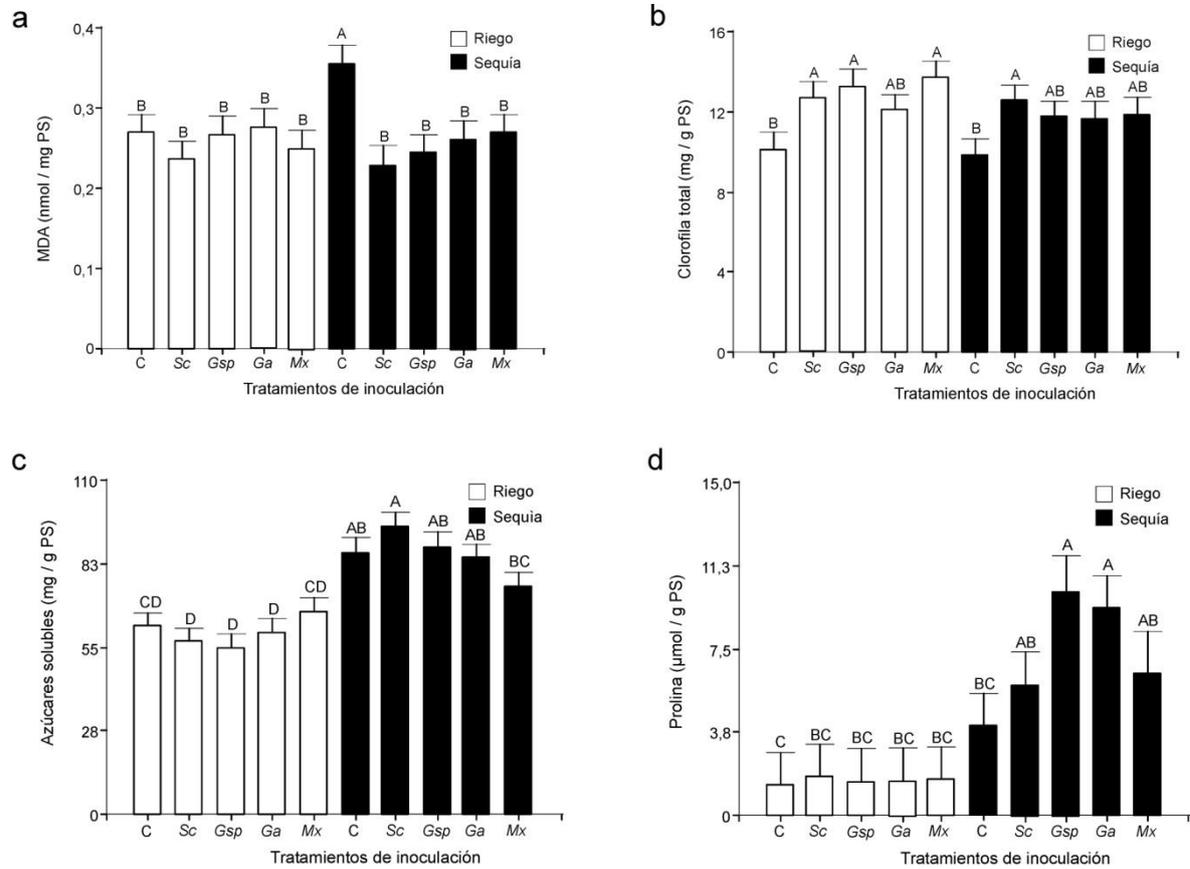


Figura 15. Efecto de la inoculación con aislamientos de hongos micorrizicos arbusculares y su mezcla sobre parámetros del daño oxidativo y osmo-regulación en plantas de soja, bajo condiciones de riego normal y sequía (35% de capacidad de campo): **a** concentración de malondialdehído; **b** concentración de clorofila total; **c** concentración de azúcares solubles; **d** concentración de prolina. *Septoglosum constrictum* (*Sc*), *Glomus* sp. (*Gsp*), *Glomus aggregatum* (*Ga*) y su mezcla (*Mx*). Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

Discusión

La influencia de la identidad fúngica sobre la simbiosis HMA-planta fue estudiada ampliamente (Jansa et al. 2008; Hoeksema et al. 2010; Wagg et al. 2011). La relación entre la riqueza en HMA y las comunidades vegetales bajo estrés abiótico puede ser crucial, dado que los HMA pueden actuar como un seguro bajo condiciones alteradas del ambiente (Shukla et al. 2013; Wagg et al. 2011). En este estudio, se examinó el rol de tres aislamientos de HMA y su mezcla sobre un genotipo previamente caracterizado por ser susceptible a S. Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte sobre el rol de aislamientos de HMA comparados con su mezcla en la mitigación del estrés por S en un genotipo susceptible a la S. Contrariamente a la hipótesis planteada, bajo S no se observó efecto de complementariedad entre los aislamientos sobre distintas variables relacionadas con crecimiento, concentración de nutrientes en el tejido, balance hídrico y alivio de estrés oxidativo en el genotipo de soja estudiado.

El porcentaje de colonización micorrícica fue afectado por la identidad de HMA de forma diferente para hifas y vesículas (Tabla 2). A su vez, la mezcla de aislamientos no mostró mayor colonización de raíz que la observada para los aislamientos individuales. Estos resultados apoyan estudios previos que muestran que el porcentaje de colonización micorrícica por mezclas de cepas no fue el resultado de la colonización aditiva por los aislamientos individuales (Jansa et al. 2008). Hay evidencia que la colonización puede disminuir por bajos niveles de humedad en el suelo (Shukla et al. 2013). Sin embargo, en este estudio, todos los aislamientos mantuvieron los mismos niveles de colonización bajo estrés por S, aunque en las plantas *Mx* se observó una disminución en la colonización por vesículas y arbusculos (Tabla 2), mostrando que la S fue capaz de afectar la colonización micorrícica como fue observado por Shukla et al. (2013) y sugiriendo una menor eficiencia del tratamiento *Mx* para colonizar la raíz.

La resistencia de la planta a la sequía mediante la colonización por HMA ha sido asociada generalmente con la promoción del crecimiento observado mayormente en experimentos en maceta (Shukla et al. 2013; Rapparini y Peñuelas 2014) pero también en experimentos a campo (Saia et al. 2014). En este estudio, S disminuyó PSpa, tanto en tratamientos micorrizados como no micorrizados, aunque este efecto fue mayor en el segundo (Tabla 3 y 4). En cambio, bajo ambas condiciones de riego, PSr disminuyó en todos los aislamientos y en la mezcla (Tabla 4). Ha sido reportado que la colonización

micorrícica bajo R y S puede cambiar el largo específico de la raíz, su arquitectura y la relación PSr/PSpa (Augé 2001). Además, es sabido que un sistema radicular mas grande, dividido más finamente o más eficiente mejora el acceso al agua del suelo y la hidratación foliar, pero esto no es necesario bajo condiciones de estrés en las plantas micorrizadas, porque la presencia de HMA intensifica las funciones radiculares, como fue sugerido por Cruz et al. (2004). En este estudio, un reducido PSr en las plantas micorrizadas, fue correlacionado con cambios en la relación PSr/PSpa comparando plantas no micorrizadas y micorrizadas bajo condiciones de S (Tabla 3 y 4). Esto está de acuerdo con los hallazgos de Veresoglou et al. (2012), quienes encontraron que la relación PSr/PSpa tendía a ser menor en plantas micorrizadas que en las no micorrizadas. Cuando se desarrollo la S en plantas de soja inoculadas con *Mx*, la biomasa evaluada como PSr, PSpa y su relación, fue similar a la obtenida cuando se inoculó con los aislamientos individuales (Tabla 4), sugiriendo una ausencia de efecto de complementariedad. Un resultado similar, pero bajo condiciones de riego normal, fue observado por Jansa et al. (2008) donde los efectos de mezclas de HMA sobre el crecimiento de la planta se encontraron en su mayoría en el rango de los efectos producidos por las respectivas especies de HMA aisladas. También, van der Heijden et al. (2003) reportó que el incremento en la diversidad micorrícica no resultó en una biomasa mayor en dos especies de plantas que coexisten naturalmente y Vogelsang et al. (2006) mostró que el incremento de la riqueza en HMA promueve la diversidad vegetal, pero que tal efecto fue pequeño en relación al efecto de las especies de HMA individuales.

El rol de las hifas de los HMA en la captación de agua, cuando este recurso es limitante, aun es materia de debate (Augé 2001; Smith et al. 2010). En un estudio reciente sobre plantas de cebada inoculadas con *G. intraradices*, Ruth et al. (2011) estimó el flujo de agua por las hifas en un 20% aproximadamente de la toma total de agua por la planta. Aquí observamos que, en comparación con la condición de R, la S afectó negativamente el contenido hídrico en soja (Tabla 3 y Figura 14). Sin embargo, mientras los efectos de los distintos inóculos no se diferenciaron bajo R, algunas cepas de HMA tendieron a mitigar los efectos negativos de la S sobre el contenido hídrico. Pero, contrariamente a las expectativas, *Mx* no se comportó mejor que los aislamientos individuales (Figura 14).

Los efectos de los HMA sobre el crecimiento del hospedante bajo sequía están relacionados generalmente con un aumento en la absorción de P por la planta, ya que la disponibilidad de P en los suelos se reduce con la disminución de la humedad en ellos (Augé 2001). En este estudio, los tratamientos en presencia de HMA mostraron un

incremento en la acumulación de P y en la de N en las plantas, en comparación con los tratamientos no micorrizados, bajo ambas condiciones de riego (Tabla 4). Esto se debe probablemente al mayor área de absorción dada por las hifas fúngicas (Smith y Read 2008; Abbaspour et al. 2012). Sin embargo, y contrario a las expectativas, *Mx* no incrementó el nivel de P más que los aislamientos individuales bajo sequía (Tabla 3). Coincidentemente, van der Heijden et al. (2003) y Vogelsang et al. (2006) encontraron que la inoculación mixta con HMA no mejoró la absorción de P por la planta. En contraste, Jansa et al. (2008) proporcionó evidencia directa de complementariedad funcional entre especies dentro de una comunidad de HMA que colonizaban un único sistema radicular. Por otro lado, se observó un efecto sinérgico del tratamiento *Mx*, bajo condiciones de R; por ejemplo, la concentración de N fue mayor en el tratamiento *Mx* que en los aislamientos individuales, lo que confirma el efecto de complementariedad de las especies micorrícicas sobre la absorción de N (Koide 2000). Interesantemente, bajo S se mantuvo la alta concentración de N. Una revisión reciente (Smith y Smith 2011) sugiere que las plantas micorrizadas pueden mejorar la absorción de N y la transferencia de N desde el HMA hasta las raíces cuando se exponen a condiciones limitantes de agua. Además, en un experimento a campo, Saia et al. (2014) encontraron que la simbiosis micorrícica incrementó el contenido en N y la fijación biológica de N de trébol sometido a S. En este sentido, varios estudios (Bagyraj et al. 1979, Lesueur y Sarr 2008, Rabie et al. 2005) han demostrado que la presencia de HMA estimula la fijación biológica de N por rizobacterias. Esto podría justificar en parte el incremento de N total registrado en los tratamientos con HMA, comparados con el C, que presenta idéntica composición microbiana por el agregado de una suspensión obtenida a partir del lavado del inóculo (ver descripción del sistema experimental)

Es sabido que la S induce la producción de estrés oxidativo caracterizado por daño oxidativo con un incremento en la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas (Cruz de Carvalho 2008). Malondialdehído es generalmente considerado como el producto y un indicador del grado de peroxidación de los lípidos de membrana. Se ha mostrado que plantas de soja micorrizadas fueron capaces de mitigar el incremento en MDA luego de un tratamiento de estrés oxidativo producido por Paraquat (Bressano et al. 2010). La concentración de clorofila ha sido generalmente mayor en hojas de plantas micorrizadas regadas, y también luego del tratamiento de S las concentraciones de clorofila fue usualmente mayor en plantas micorrizadas comparadas con las no micorrizadas (Auge 2001). En este estudio, tanto los aislamientos de HMA como el tratamiento *Mx* disminuyeron los niveles de MDA (Figura 15a), indicando una capacidad general de las

micorrizas de mitigar el daño oxidativo bajo condiciones de sequía. Estos resultados están de acuerdo con Wu et al. (2006a) quien reportó que la S incrementó los niveles de MDA en hojas y raíces de *Poncirus trifoliata* en plantas no micorrizadas, y que la inoculación con HMA redujo tanto el contenido en MDA, como de H_2O_2 y O^{2-} en hojas y raíces. Resultados similares sobre el daño oxidativo bajo S evaluados como MDA disminuidos por inoculación con HMA fueron informados en soja (Porcel y Ruiz Lozano 2004), maíz (Zhu et al. 2011), y *Casuarina equisetifolia* (Zhang et al. 2010). En este estudio, los resultados mostraron mayor contenido de CIT en las plantas *Sc* bajo sequía que en plantas tratadas con los otros aislamientos (Figura 15b). Esto está de acuerdo con Gong et al. (2013), quien encontró que *Sc* fue más eficiente en mejorar Φ PSII de plántulas de *Sophora davidii* que *G. mosseae* bajo condiciones de R y S. En cuanto a el tratamiento *Mx*, el nivel de contenido en CIT nunca excedió el de las plantas inoculadas con *Sc* (Figura 15b) y el contenido en MDA fue similar a las plantas inoculadas con los otros aislamientos individuales, sugiriendo la ausencia de efectos de complementariedad en la regulación del estrés oxidativo bajo S.

Se ha visto que las plantas micorrizadas acumulan altas concentraciones de moléculas orgánicas de bajo peso molecular, como Az, Pro u otros aminoácidos para tolerar la S y regular el potencial osmótico celular, y esto puede mejorar la absorción de agua bajo S (Wu et al. 2006a). Los datos de este trabajo indican que la concentración de Az y Pro en hojas se incrementaron durante la S tanto en plantas micorrizadas como no micorrizadas (Figuras 15c y 15d). Estos resultados están de acuerdo con reportes previos (Porcel and Ruiz-Lozano 2004; Abbaspour et al. 2012), mientras que no se observaron diferencias en la concentración de Az entre plantas inoculadas con diferentes aislamientos de HMA (Figura 15c), la concentración de Pro fue afectada por la identidad de HMA bajo S, mostrándose la mayor concentración en las plantas inoculadas con *Gsp* y *Ga* en comparación con las plantas no micorrizadas (Figura 15d). La mayor acumulación de Pro se ha relacionado con una inducción de tolerancia a la sequía por la micorriza, con Pro actuando como osmoprotector o un atrapador efectivo de especies reactivas del oxígeno (Porcel y Ruiz Lozano 2004; Rapparini y Peñuelas 2014). Contrariamente, las plantas tratadas con *Mx* mostraron un contenido en Az y Pro similar a las plantas no micorrizadas; además fueron incapaces de exceder los mayores contenidos registrados por las plantas inoculadas con aislamientos de HMA, sugiriendo ausencia de efecto de complementariedad, aunque un efecto de selección no puede ser descartado.

Recientemente, en un meta-análisis se mostró que los beneficios de los inóculos mixtos son en general mayores que los inóculos de aislamientos individuales (Hoeksema et al. 2010). Dicho efecto se observó aun cuando se estudiaron aislamientos del mismo clado filogenético (Gustafson y Casper 2006; Wagg et al. 2011). En este estudio, no se observaron efectos complementarios sobre variables relacionadas al crecimiento, el contenido de nutrientes en tejido, balance hídrico y alivio del estrés oxidativo. Así, estos resultados están de acuerdo con otros estudios recientes en los cuales el agrupamiento de aislamientos de HMA más rico no promovió una respuesta de mayor crecimiento de la planta (Doubková et al. 2013) ni mayor tolerancia frente un estrés por patógeno (Lewandowski et al. 2013) que los aislamientos individuales. A pesar que varias líneas de evidencia sugieren que la existencia de complementariedad funcional entre HMA no depende exclusivamente de la dispersión filogenética entre aislamientos (Jansa et al. 2008; Doubková et al. 2013; Lewandowski et al. 2013), no se puede descartar la posibilidad que la falta de complementariedad observada en nuestro estudio, podría estar relacionado a la afiliación filogenética de los aislamientos (Maherali y Klironomos 2007). Por otro lado, existe la posibilidad que en inóculos mixtos no todas los aislamientos colonicen las raíces (Wagg et al. 2011) o que sólo algunos de ellos formen arbusculos (Berruti et al. 2013). Cualquiera sea el mecanismo, nuestros resultados sugieren un efecto de selección (Wagg et al. 2011).

Conclusiones

Contrariamente a la hipótesis inicial, no se observó efecto de complementariedad entre aislamientos. Los resultados sugieren que la elección de un inóculo particular provee iguales o mayores beneficios que el incremento de la riqueza en HMA sobre el alivio de la sequía en soja, apoyando el efecto de selección en HMA.

S. constrictum fue una de las cepas que promovió en la planta de soja mayor contenido hídrico y menor nivel de MDA en sequía (diferente al control), y tuvo el mayor contenido en clorofilas. Consecuentemente, se eligió esta cepa para continuar con los ensayos de evaluación de mecanismos implicados en la tolerancia a la sequía.

CAPÍTULO 3

Efecto de la simbiosis HMA-soja sobre la respuesta a tiempos cortos y largos de sequía. Un análisis bioquímico y molecular de la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante.

Introducción

Los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares, por los cuales la simbiosis HMA-planta mitiga los efectos del estrés ambiental no están completamente claros (Kohler et al. 2008), pero se ha mencionado al estrés oxidativo como uno de los mecanismos implicados (Debiane et al. 2009; Bressano et al. 2010; Latef y He 2011; Wu et al. 2013; Rapparini y Peñuelas 2014). Aunque es importante mencionar que la mayoría de la evidencia sobre la relación del estrés oxidativo y la tolerancia a la sequía de plantas micorrizadas corresponde a tratamientos de larga duración y existen muy pocos reportes sobre los primeros momentos del estrés, a tiempos más cortos.

Específicamente a tiempos más largos, las actividades de SOD fueron mayores en raíces de lechuga colonizada por *G. mosseae* que en plantas no micorrizadas luego de un tratamiento de 5 semanas de sequía (Ruiz-Lozano et al. 1996). También la inoculación con cinco especies *Glomus* incrementó las actividades de SOD, G-POD y CAT en hojas de *Citrus tangerine* con 80 días de sequía (Wu et al. 2007a) y, Wu y Zou (2009) reportaron menor contenido de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y de MDA en plantas de *Citrus sinensis* micorrizadas luego de un tratamiento de sequía de 12 días. Asimismo, en plantas de soja la inoculación con HMA incrementó considerablemente la actividad glutatión reductasa en raíces y nódulos, y disminuyó el daño oxidativo de plantas de soja bajo estrés por 10 días de sequía (Porcel et al. 2003). Sin embargo, también existen resultados contradictorios ya que en estudios realizados en plantas de soja, luego de 10 días de sequía, Porcel y Ruiz-Lozano (2004) no encontraron un efecto inductivo de la defensa antioxidante asociado a las plantas micorrizadas. En el caso de las poliaminas (PAs) que entre otros efectos han sido mencionadas como antioxidantes (Goicoechea et al. 1998; Kuznetsov et al. 2006; Sudhakar et al. 2015), algunas investigaciones muestran cierta correlación entre el aumento en el contenido de PAs en plantas micorrizadas y el buen desempeño de las plantas frente al estrés salino (Sannazzaro et al. 2007; Talaat y Shawky 2013). Sin embargo, faltan datos acerca de la relación del metabolismo de las PAs en plantas micorrizadas durante la sequía, y su relación con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante.

Por otro lado, a tiempos más cortos de sequía, Fan y Liu (2011) estudiaron el efecto de la inoculación con *G. mosseae* en plántulas de *Poncirus trifoliata*, y luego de 3 días de falta de agua, las plantas micorrizadas exhibieron mayor nivel de prolina y de actividad de

las enzimas SOD y peroxidasa. Además, a nivel molecular encontraron mayor abundancia de ARNm de cuatro genes involucrados en la homeostasis de ERO y de defensa antioxidante en las plantas micorrizadas, y la mayor inducción de un gen homólogo a Cu/Zn-SOD fue coincidente con mayor actividad SOD en estas plantas. Así también Ni et al. (2013) reportaron menor contenido de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, y mayor actividad SOD en hojas de plantas de *Citrus tangerine* micorrizadas luego de 4 días de sequía.

En los esfuerzos por elucidar el mecanismo de mitigación de la sequía por la inoculación con HMA, los trabajos se han focalizado en aspectos fisiológicos y bioquímicos, mientras que la información disponible de las diferencias moleculares entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas es limitada (Fan y Liu 2011). En tal sentido, es necesario tener en cuenta que, si bien no necesariamente un gen debe ser inducido o reprimido para jugar un rol clave en un proceso biológico, la evaluación de los genes diferencialmente expresados es una de las aproximaciones más sencillas para revelar la base molecular de un sistema biológico (Wang et al. 2009). Así, en este trabajo de tesis doctoral se han evaluado en los primeros momentos de la sequía, tanto la expresión de genes de la defensa antioxidante como la actividad enzimática antioxidante.

Por lo expuesto, los **objetivos específicos** fueron: Caracterizar a tiempos cortos y largos de sequía la participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante a nivel fisiológico, bioquímico y molecular en la tolerancia a la sequía de la simbiosis *S. constrictum*-soja susceptible a este estrés; y evaluar la participación de otros mecanismos implicados como el ajuste osmótico, la acumulación de nutrientes minerales y de PAs.

La **hipótesis** a evaluar fue que la inoculación con *S. constrictum* aumenta la tolerancia a la sequía de un genotipo de soja susceptible, a través de una regulación del estrés oxidativo y cambios en el metabolismo de las PAs, desde el inicio de la sequía.

Materiales y métodos

*Condiciones de crecimiento del genotipo de soja DM500048 inoculado con *Septoglomus constrictum* bajo diferentes condiciones hídricas*

El experimento de inoculación con *Septoglomus constrictum* se llevó a cabo en un diseño factorial 2 x 2 completamente al azar, con dos tratamientos de inoculación y dos condiciones hídricas: riego (R) y sequía (S). Los dos tratamientos de inoculación fueron: inoculación con *S. constrictum* (M) y un control (C) sin HMA. Cada uno de los cuatro tratamientos (combinación de los dos tratamientos de inoculación y las dos condiciones hídricas) se replicó cinco veces en macetas de cinco litros con dos plantas cada una:

- 1: Control + riego (CR)
- 2: Control + sequía (CS)
- 3: Inoculación con *S. constrictum* + riego (MR)
- 4: Inoculación con *S. constrictum* + sequía (MS)

Para la germinación de las semillas del genotipo DM50048 y armado de macetas se procedió como se detalla en el apartado “Condiciones de crecimiento de un genotipo de soja susceptible a la sequía inoculado con HMA bajo diferentes condiciones hídricas” de la sección “Materiales y métodos” en el Capítulo 2. Todas las plantas se hicieron crecer en invernáculo en condiciones controladas de luz (16 horas de luz diarios) y temperatura (media de 25°C), y regadas con agua destilada tres veces por semana para mantener el contenido hídrico del suelo cercano a CC durante los primeros 45 días de crecimiento de las plantas. Luego, se continuó regando normalmente en la mitad de las macetas para cada tratamiento de inoculación, para mantener el contenido hídrico del sustrato cercano a CC durante todo el ensayo. En la otra mitad de las macetas se interrumpió el riego. El contenido hídrico del suelo en las macetas se evaluó periódicamente por el método de la pesada. A los 4 días se alcanzó un contenido hídrico del suelo de alrededor de 35% de CC y las plantas comenzaron a mostrar síntomas del estrés hídrico, tales como marchitamiento en hojas. Se tomó el peso de las macetas con ese contenido hídrico y se mantuvieron durante 2 días más, por reposición del agua perdida. En ese momento, se realizó un muestreo (referido en los resultados como “2 días”), en el cual se tomó la última hoja totalmente expandida de una planta por maceta. Se mantuvieron durante 5 días más y

transcurrido este período de estrés, se realizó el muestreo final (referido como “7 días”). El efecto de la simbiosis MA sobre el crecimiento del genotipo de soja susceptible a sequía fue evaluado al final de la sequía (7 días) como biomasa, concentración de nutrientes minerales y estado hídrico de la planta. Los perfiles de la actividad enzimática y los genes de la defensa antioxidante, como así también el contenido total de PAs y los genes de su metabolismo se evaluaron al tiempo más corto de sequía (2 días) y el más largo (7 días).

Biomasa, concentración de nutrientes minerales, estado hídrico y colonización de raíces por HMA

La biomasa de la planta fue medida como peso seco de la parte aérea (PSpa) y Peso seco de la raíz (PSr), luego de ser secada en estufa a 70°C hasta peso constante. Se calculó la relación raíz / parte aérea dividiendo PSr por PSpa (PSr/PSpa). El contenido relativo de agua (CRA) en la 6ta hoja trifoliada y el contenido hídrico de la parte aérea (CH) se midieron como se describe en el apartado “Parámetros evaluados” de la sección “Materiales y métodos” en el Capítulo 1. Los nutrientes minerales analizados fueron: nitrógeno total (N), determinado según el método Kjeldahl; fósforo (P), determinado por espectrometría de absorción molecular descrito por Murphy and Riley (1962); potasio, calcio, magnesio, manganeso, cobre, hierro y zinc, determinados por espectrometría de absorción atómica de llama (Kalra 1998).

La tinción de las raíces de soja para la observación de estructuras de HMA y la cuantificación de la colonización se realizaron de acuerdo a Phillips and Hayman (1970) y McGonigle et al. (1990) respectivamente, como se detalla en el Anexo C.

Daño oxidativo y metabolitos osmóticos

El daño oxidativo se expresó como el contenido en malondialdehído (MDA) según técnica de Heath y Packer (1968) modificado por Hodges (1999), descrita en el Anexo A. Los contenidos en clorofila total (CIT), en azúcares solubles (Az) y en prolina (Pro) fueron estimados según Arnon (1949), Mokrasch (1954) y Bates et al. (1973), respectivamente (detallados en los Anexos D, E y F). La eficiencia del fotosistema II (PSII), se determinó utilizando un medidor de fluorescencia portátil (FMS-2, Hansatech, Kings Lynn, UK).

Sistema de Defensa Antioxidante

Se midieron los niveles totales y estado de reducción de glutatión y ascorbato según técnicas descritas en Lascano et al. (2001) y Law et al. (1983) respectivamente, con las modificaciones detalladas en los Anexos B y G. Se midió la actividad enzimática total de Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) según las técnicas de Beauchamp y Fridovich (1973) y Aebi (1984), respectivamente (detalles en los Anexos I y J). La actividad enzimática de estas enzimas se expresó en relación con la concentración de proteínas totales en el extracto, la cual fue medida con el Método de Bradford (1976) (ver Anexo K). La composición isoenzimática de SOD y APX se analizó mediante geles de actividad – no desnaturizantes según las técnicas de Davies (1964) y los métodos de revelado por actividad enzimática según Beauchamp y Fridovich (1971) para SOD y Mittler y Zilinskas (1993) para APX (detalles y modificaciones de estas técnicas en los Anexos L, M y N).

Expresión génica de enzimas del sistema antioxidante

Para analizar el contenido en transcritos de enzimas del sistema antioxidante se utilizó el método de RT-PCR semi-cuantitativa. Para ello se realizaron extracciones de ARN de un pool de hojas para cada tratamiento utilizando TRIZOL®, según protocolo del fabricante. El pellet final se resuspendió en 25 µl de agua MilliQ estéril. Posteriormente se realizó un tratamiento con la enzima DNAsa RQ1 RNase-Free DNase (Promega) con el fin de eliminar el ADN genómico contaminante de las muestras de ARN, según protocolo del producto. Como resultado, fue posible la obtención de 2 a 3,5 µg/µl de ARN total. El ARN extraído se mantuvo a -80°C hasta su utilización. Las muestras de ARN fueron corridas en gel desnaturizante de agarosa al 1,2% para comprobar su integridad, observando el bandeo característico. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop. Con el ARN extraído se sintetizó ADNc utilizando la Transcriptasa reversa MMLV, según protocolo del producto (ver detalles de la extracción y procesamiento del ARN en el Anexo O). Finalmente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores diseñados para soja de las enzimas: Fe-SOD (analizando el gen de la isoforma Fe-SOD3 de cloroplasto), Mn-SOD, Cu/Zn-SOD (analizando el gen de la isoforma Cu/Zn-SOD2 de cloroplasto), CAT1, CAT3, CAT5 y APX (analizando los genes de las isoformas APX1 y APX2 de citosol). Los protocolos de temperaturas y las secuencias de los cebadores correspondientes a cada enzima se detallan

en el Anexo P. La amplificación por PCR de los transcritos de cada enzima se realizó por triplicado. Las bandas de expresión se observaron bajo luz UV en geles de agarosa al 1,2% teñidos con bromuro de etidio, y se cuantificaron utilizando el software ImageJ. Se realizó una cuantificación relativa al factor de elongación de la transcripción $\alpha 1$ (TEF) y el valor obtenido para cada tratamiento se relacionó con el obtenido para el tratamiento CR en cada tiempo de muestreo (Aluru et al. 2003).

Contenido en poliaminas y su metabolismo

Se midieron las concentraciones de putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) en hoja liofilizada, según lo descrito por Flores et al. (1984) y Marcé et al. (1995). Además se analizó el contenido en transcritos de enzimas del metabolismo de las poliaminas, de acuerdo a lo descrito para las enzimas de la defensa antioxidante (ver el apartado “Expresión génica de enzimas del sistema antioxidante”). Se utilizaron cebadores diseñados para soja de las enzimas: Arginina descarboxilasa (ADC), s-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC), espermidina sintasa (SPDS), espermina sintasa (SPMS), diamina oxidasa (DAO).

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el empleo del programa InfoStat Profesional (Di Rienzo et al. 2013). Los datos de las variables fisiológicas y bioquímicas se analizaron estadísticamente a través del análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias entre medias fueron comparadas con tests de diferencias mínimas significativas (LSD) Fisher, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Resultados

1. Comportamiento fisiológico de la simbiosis S. constrictum-soja luego de 7 días de sequía. Parámetros hídricos, de crecimiento y nutricionales

Estos parámetros sólo se evaluaron a los 7 días de sequía ya que consideramos que 2 días de sequía es poco tiempo para observar el efecto de la micorrización a nivel fisiológico.

Al finalizar el tratamiento de sequía se evaluó la micorrización en las plantas inoculadas MR y MS por las variables: porcentaje de micorrización, de arbusculos y de vesículas. No se encontraron diferencias significativas entre MR y MS para ninguna de estas variables (Tabla 5). En las raíces de las plantas control no se visualizaron estructuras micorrícicas.

Tabla 5. Colonización micorrícica en plantas de soja genotipo DM50048 inoculadas con *Septoglomus constrictum* luego de 7 días de sequía. MR: micorriza riego; MS: micorriza sequía.

Tratamientos	Colonización total (%)	Colonización por Vesículas (%)	Colonización por Arbusculos (%)
MR	89 ± 7a	57 ± 12a	17 ± 3a
MS	89 ± 7a	65 ± 11a	19 ± 3a

Los valores son medias ± DE. Las mismas letras en cada columna indican diferencias no significativas entre tratamientos, de acuerdo al test de LSD ($P \leq 0,05$).

Tabla 6. Análisis de la varianza sobre el efecto de la inoculación con *Septogloium constrictum* (M) y el estrés por sequía (S) sobre parámetros hídricos, de crecimiento y nutricionales de plantas de soja genotipo DM50048, crecidas bajo condiciones de riego normal y con 7 días de sequía.

Variables	Fuente de variación (valores p)		
	M	S	M x S
Contenido hídrico	0,0664	<0,0001	0,0978
Contenido relativo de agua	0,7552	<0,0001	0,0660
Peso seco de raíz	<0,0001	<0,0001	0,6942
Peso seco de parte aérea	0,9816	<0,0001	0,7380
Relación raíz/parte aérea	0,0015	0,1790	0,3650
Area foliar	0,0768	0,9727	0,1149
Nitrógeno	0,0086	0,0060	0,8836
Fósforo	0,0001	0,3842	0,7590
Potasio	0,8989	0,3554	0,0774
Magnesio	0,4710	0,5470	0,1592
Manganeso	0,1448	0,0459	0,4290
Calcio	0,0397	0,5121	0,1916
Zinc	<0,0001	0,0338	0,1319
Hierro	0,0086	0,3218	0,6826
Cobre	0,1594	0,0339	0,8355

Luego de 7 días de sequía, CH y CRA disminuyeron en los tratamientos de sequía (Tabla 6), aunque las plantas MS mostraron una menor disminución (8,5 %) en CH que las plantas CS (14 %), sugiriendo mayor capacidad de retención del agua en sequía en las primeras (Figura 16a). La biomasa disminuyó por igual en MS y CS (Figuras 16b y 16c). Sin embargo, la relación PSr/PSpa cambió por la presencia de micorrizas, obteniéndose menores valores (Figura 16d).

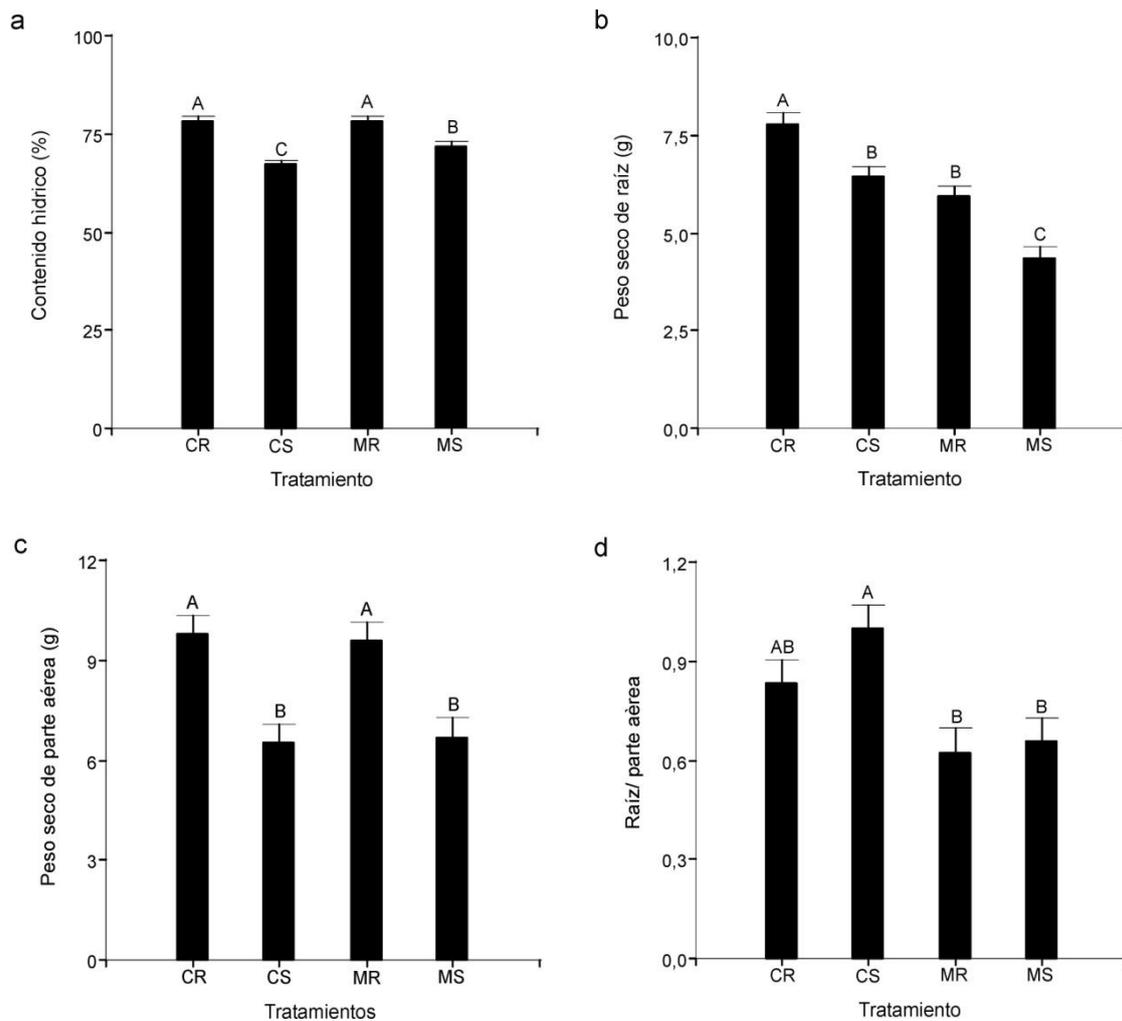


Figura 16. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septogloium constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre el contenido hídrico (a), el peso seco de raíz (b), el peso seco de parte aérea (c) y la relación raíz/parte aérea (d), luego de 7 días de tratamiento. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequía. Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

El tratamiento de S estimuló significativamente el aumento en el contenido en N en las plantas CS y MS (Figura 17a). Por otro lado, la inoculación con *S. constrictum* promovió el aumento significativo en el contenido de P y zinc, observándose además una tendencia al aumento en hierro y N (Figura 17). Los contenidos en potasio y magnesio no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 6).

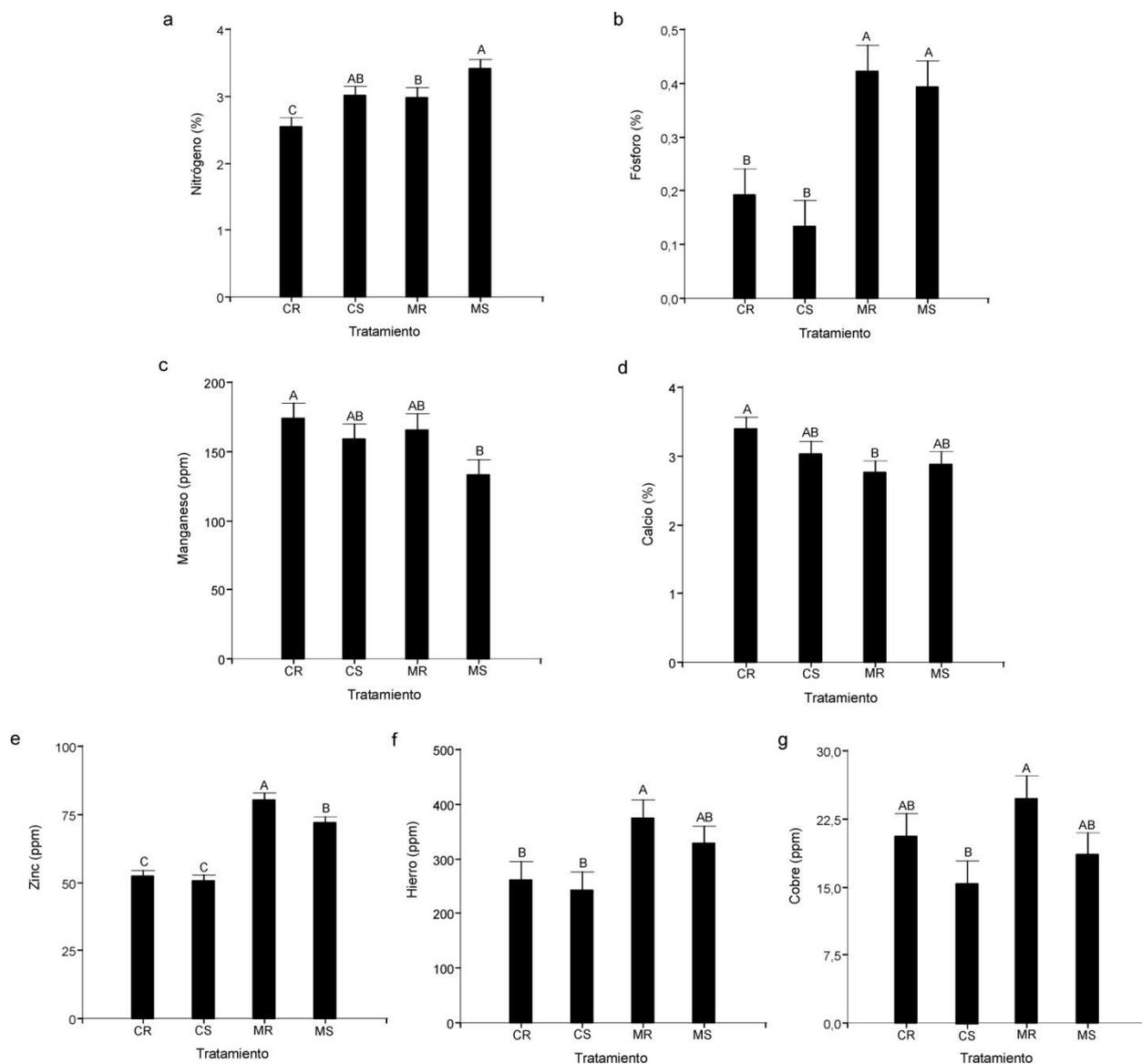


Figura 17. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septoglonus constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre el contenido en nutrientes minerales: Nitrógeno (a), Fósforo (b), Manganeso (c), Calcio (d), Zinc (e), Hierro (f) y Cobre (g), luego de 7 días de tratamiento. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequia. Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

2. Comportamiento del estrés oxidativo y la defensa antioxidante en la simbiosis *S. constrictum*-soja a tiempos cortos (2 días) y más largos de sequía (7 días)

Tabla 7. Análisis de la varianza sobre el efecto de la inoculación con *Septoglomus constrictum* (M) y el estrés por sequía (S) sobre parámetros de estrés oxidativo y defensa antioxidante de plantas de soja genotipo DM50048, crecidas bajo condiciones de riego normal, y con 2 y 7 días de sequía.

Variables	Fuente de variación (valores p)					
	2 días			7 días		
	M	S	M x S	M	S	M x S
Malondialdehído	0,0761	0,1908	0,0963	0,0360	0,1192	0,3355
Clorofila total	0,0849	0,9959	0,1067	0,0419	0,6323	0,2475
Eficiencia PSII	0,1443	0,5561	0,6988	0,0772	0,0027	0,4080
Glutación reducido	0,0133	0,5319	0,2430	0,1598	0,5565	0,1680
Glutación reducido/total	0,0079	0,5470	0,8243	0,1630	0,6672	0,9284
Ascorbato reducido/total	0,0009	0,0457	0,5082	0,0482	0,8749	0,3316
Superóxido dismutasa	<0,0001	0,5152	0,3810	0,3106	0,4533	0,5951
Catalasas	0,9337	0,0031	0,6957	0,0042	0,1774	0,7286
Putrescina	0,0871	0,3072	0,1066	0,0291	0,0357	0,1980
Espermidina	0,3961	0,0001	0,6925	0,2565	0,5281	0,9644
Espermina	0,0714	0,0001	0,0071	0,0098	0,1089	0,0347
Prolina	0,4835	0,3151	0,7425	0,2353	0,0001	0,3940
Azúcares solubles	0,1985	0,5008	0,9373	0,6635	<0,0001	0,1721

2.1. Parámetros de daño oxidativo y defensa antioxidante no enzimática

El daño oxidativo, evaluado como contenido en MDA, no mostró diferencia entre tratamientos a los 2 días de sequía (Tabla 7). Sin embargo, a los 7 días aumentó en las plantas CS, mientras se mantuvieron valores similares en los tratamientos M (Tabla 7; Figura 18).

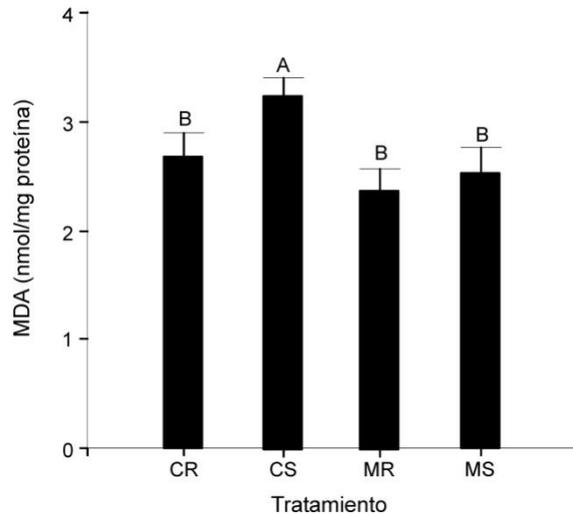


Figura 18. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septogloium constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre el contenido en malondialdehído (MDA), luego de 7 días de tratamiento. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequia. Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

A los 2 días de tratamiento no hubo diferencias significativas en el contenido en CIT entre los tratamientos (Tabla 7). Por el contrario, a los 7 días fue mayor en las plantas micorrizadas, tanto MR como MS (Tabla 7; Figura 19a). Respecto a la eficiencia del fotosistema II (PSII), este parámetro no mostró diferencias entre tratamientos a los 2 días (Tabla 7). Sin embargo, a los 7 días de tratamiento CS disminuyó con respecto a CR, y tal diferencia no se observó entre MS y MR (Figura 19b).

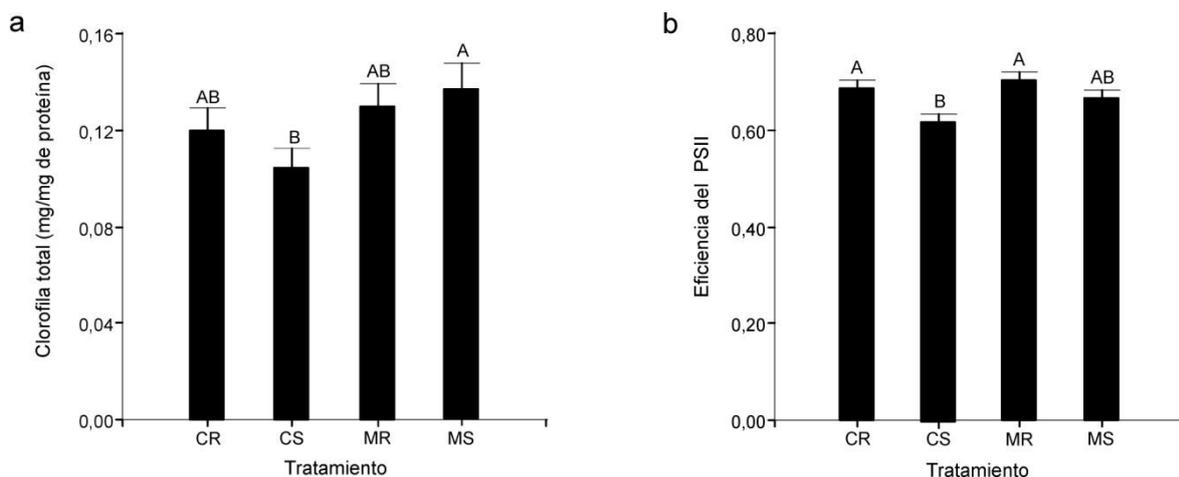


Figura 19. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septogloium constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre el contenido en clorofila total (a) y la eficiencia del fotosistema II (PSII) (b), luego de 7 días de tratamiento. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequia. Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

Con respecto a los antioxidantes no enzimáticos, a los 2 días el glutatión reducido, la relación glutatión reducido/total y la relación ascorbato reducido/total fueron mayores para las plantas micorrizadas (Figuras 20a, 20b y 20c). A los 7 días, la relación ascorbato reducido/total también fue mayor para las plantas micorrizadas (Figura 21d), sin observarse diferencias en glutatión reducido y la relación glutatión reducido/total (Tabla 7).

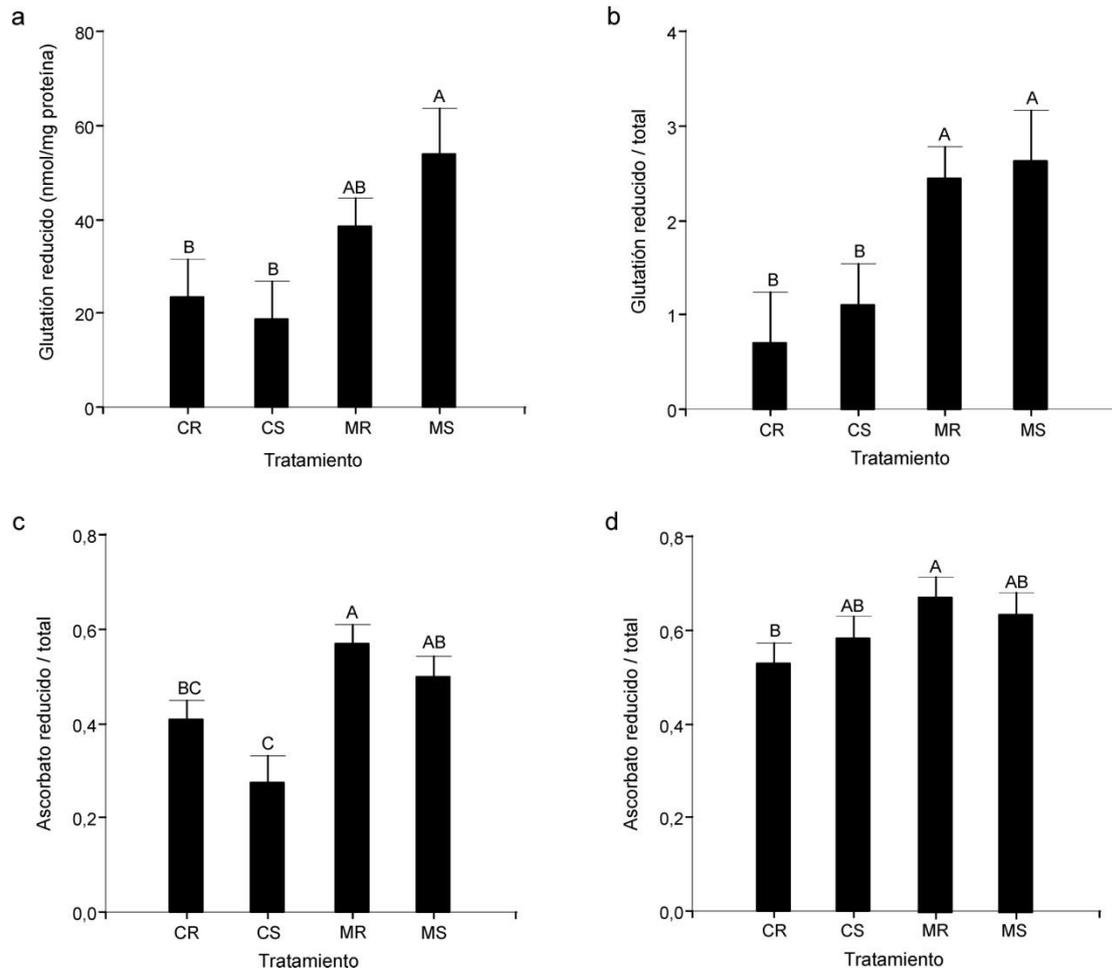


Figura 20. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septogloium constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre el contenido en glutatión reducido (a) relación glutatión reducido/ total (b) y relación ascorbato reducido/ total (c) luego de 2 días de tratamiento, y relación ascorbato reducido/ total (d) luego de 7 días de tratamiento. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequia. Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

2.2. Defensa antioxidante enzimática: actividad total y expresión génica

A los 2 días, la actividad enzimática total SOD fue mayor en las plantas micorrizadas, tanto MR como en MS (Figura 21a). En la evaluación por geles de actividad SOD, no se observaron diferencias entre las distintas isoenzimas (Figura 22b). A los 7 días la actividad total SOD no mostró diferencias entre los tratamientos (Tabla 7). Sin embargo la medición de SOD por geles de actividad mostró un aumento de la isoenzima Fe-SOD con la sequía, tanto en las MS como en las CS. (Figura 22c).

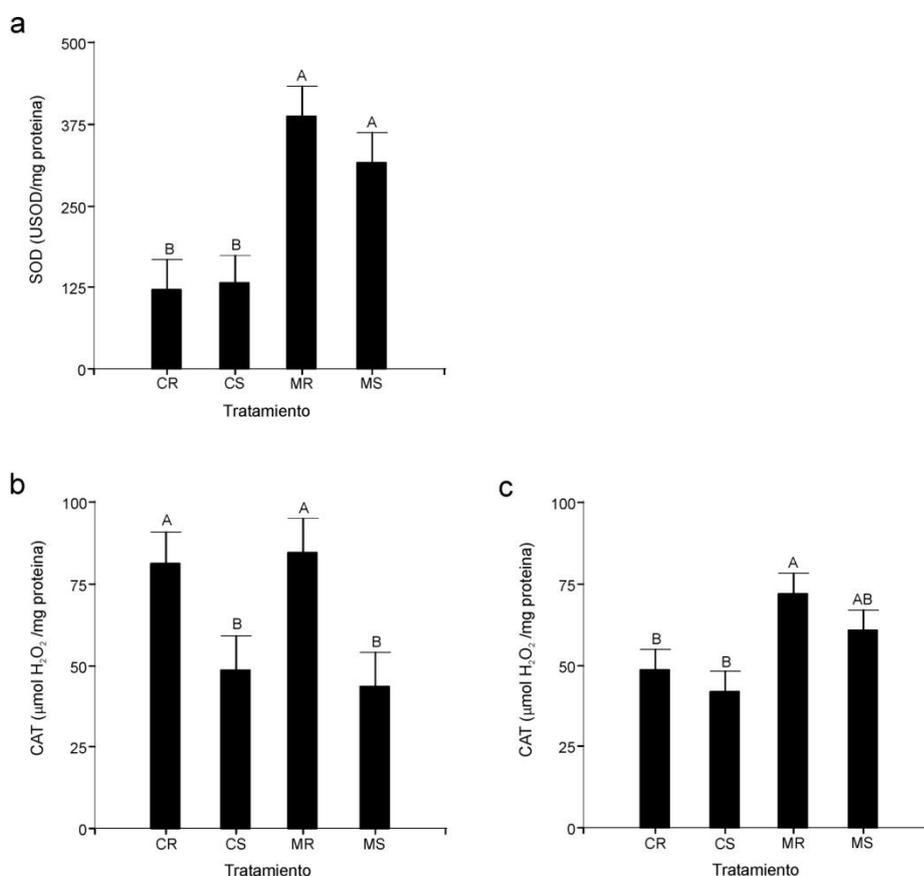


Figura 21. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septogloium constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD) luego de 2 días de sequía (a) y, catalasas (CAT) luego de 2 (b) y 7 (c) días de sequía. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequía. Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

A los 2 días, la actividad total CAT disminuyó por igual, tanto en el CS como en MS (Figura 21b). A los 7 días, se observó mayor actividad total CAT en las plantas micorrizadas (Figura 21c).

A los 2 días, la evaluación de las enzimas APX por gels de actividad, mostró aumentos con la sequía en las plantas CS y en las MS, aunque el aumento en CS fue mayor (Figura 22d). A los 7 días, las plantas MS mostraron un aumento de la actividad enzimática APX. (Figura 22e).

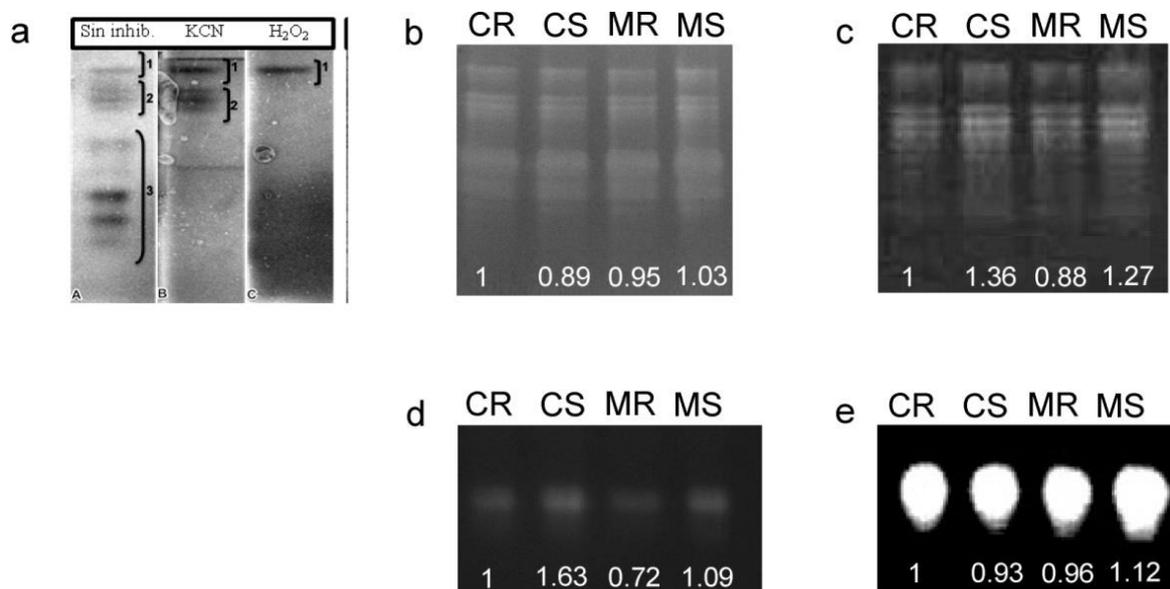


Figura 22. Gel nativo de inhibición de actividad Superóxido dismutasa (a): sin inhibidores; gel preincubado con KCN (inhibe Cu/Zn-SOD); gel preincubado con H₂O₂ (inhibe Cu/Zn-SOD y Fe-SOD). En corchetes: 1: Mn-SOD; 2: Fe-SOD; 3: Cu/Zn-SOD.

Efecto de la sequía y la micorrización con *Septoglomus constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre la actividad enzimática de las diferentes isoenzimas evaluada en gels nativos de actividad superóxido dismutasa (SOD): **b**) 2 días de sequía y **c**) 7 días de sequía, y ascorbato peroxidasa (APX): **d**) 2 días de sequía y **e**) 7 días de sequía. En la parte inferior de cada figura se muestra la cuantificación relativa de las bandas de actividad considerando un valor de 1 para CR. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequía.

A los 2 días la expresión génica de todas las isoenzimas SOD, CAT5 y APX disminuyó en las plantas MS, comparado con el resto de los tratamientos (Figura 23). A los 7 días no se observaron diferencias en la expresión génica de SOD (Figura 23). Por el contrario, en MS se observaron disminuciones en CAT1 y CAT3, y un aumento en la expresión génica de CAT 5 y APX, comparado con el resto de los tratamientos (Figura 23)

	2 días				7 días			
	CR	CS	MR	MS	CR	CS	MR	MS
TEF								
Fe-SOD	1	1,1	1,4	0,4	1	1	0,9	0,9
Mn-SOD	1	1	0,7	0,4	1	1	0,6	0,9
Cu/Zn-SOD	1	1,4	1,7	0,5	1	1,6	0,7	0,8
CAT1	1	1,5	1,2	1,2	1	0,7	0,7	0,6
CAT3	1	1,9	1,7	1,3	1	0,8	1,2	0,6
CAT5	1	1,2	1,1	0,8	1	1,3	0,9	1,5
APX	1	0,8	0,9	0,6	1	0,8	0,4	1,2

Figura 23. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septoglomus constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre la expresión génica de enzimas del sistema de defensa antioxidante, luego de 2 y 7 días de sequía. Cuantificación relativa a TEF y expresión de los valores en relación a CR, considerando para CR un valor de 1 para los dos tiempos evaluados.

TEF: Factor de elongación (usado como control); Fe-SOD, Mn-SOD y Cu/Zn-SOD: isoenzimas superóxido dismutasa; CAT1, CAT3 y CAT5: isoenzimas catalasa; APX: ascorbato peroxidasa. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequía.

2.3. Poliaminas: contenido y expresión génica de enzimas involucradas en su metabolismo

A los 2 días de tratamiento, el contenido de Putrescina (Put) fue similar en CS y MS, si bien aumentó en MR. El nivel de Espermidina (Spd) disminuyó tanto en el CS como en MS. Espermina (Spm) en CS se mantuvo similar a CR, mientras que en las plantas MS disminuyó significativamente. (Tabla 7; Figuras 24a, 24c y 24e).

A los 7 días, comparado con los otros tratamientos, en MS el nivel de Put fue menor, no se observaron diferencias en Spd y el nivel de Spm fue mayor (Figuras 24b, 24d y 24f).

A los 2 días de sequía tanto en CS como en MS aumentó la expresión génica de las enzimas ADC, SAMDC y SPMS con respecto a CR. Por el contrario, el nivel de transcritos de SPDS y DAO fue menor en MS que en CS (Figura 25).

A los 7 días, en CS hubo un mayor nivel de los transcritos de todas las enzimas del metabolismo de PAs estudiadas, con respecto a CR. Mientras que en MS fue evidente un

significativo aumento en la expresión génica de ADC y una disminución de DAO (Figura 25).

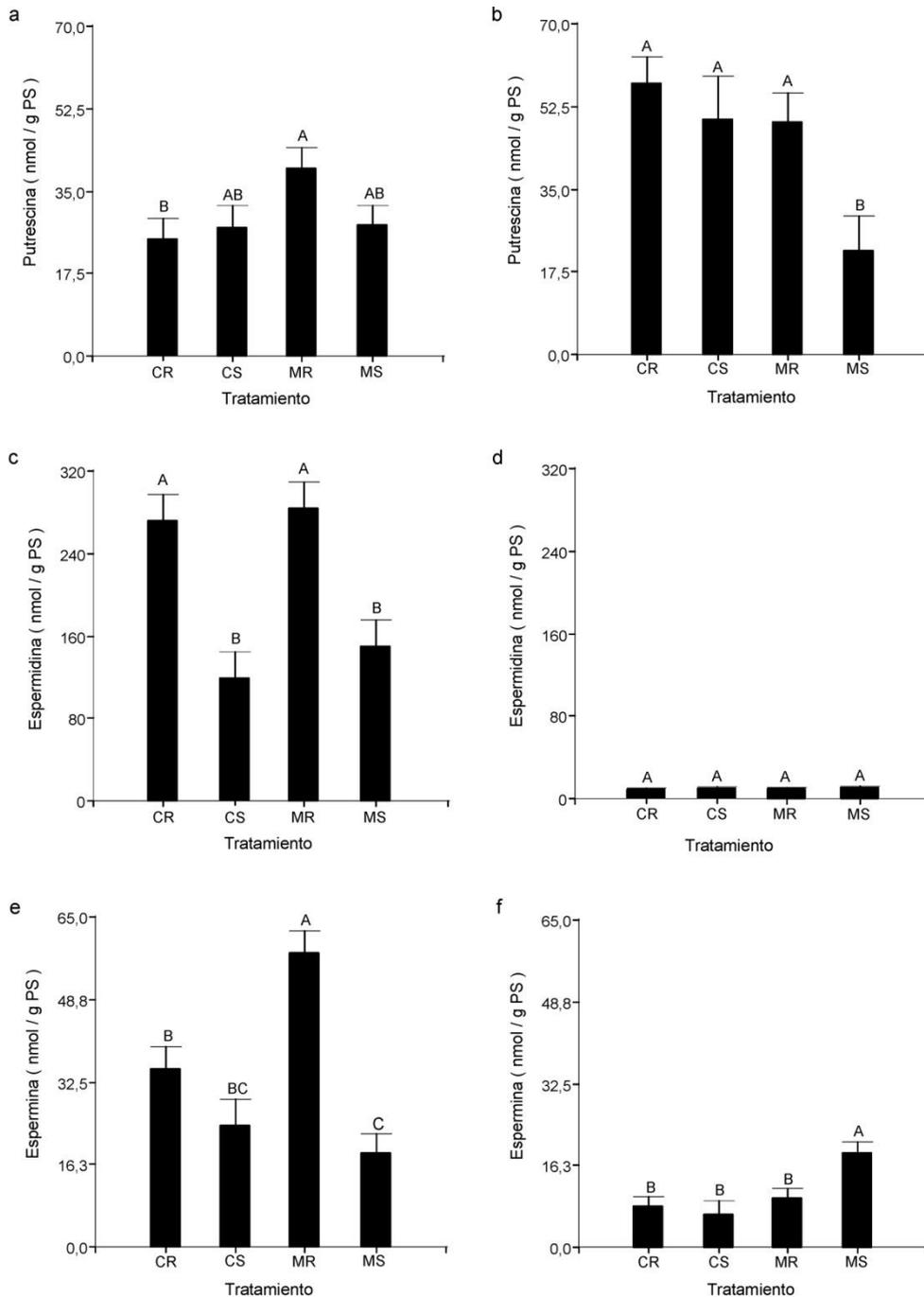


Figura 24. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septoglomus constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre el contenido en poliaminas: Putrescina (a, b), Espermidina (c, d) y Espermina (e, f) luego de 2 (a, c, e) y 7(b, d, f) días de tratamiento. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequia. Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

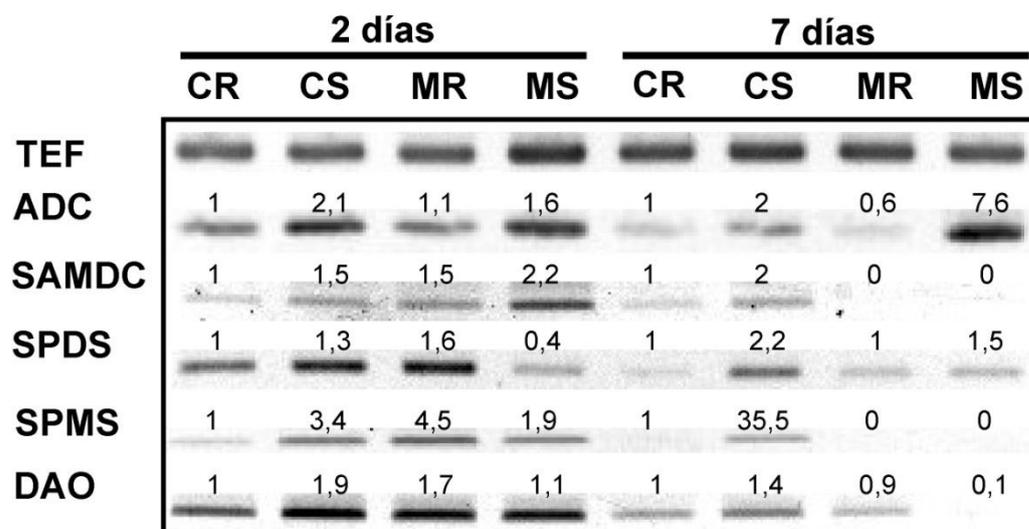


Figura 25. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septogloium constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre la expresión génica de enzimas del metabolismo de las poliaminas, luego de 2 y 7 días de sequía. Cuantificación relativa a TEF y expresión de los valores en relación a CR, considerando para CR un valor de 1 para los dos tiempos evaluados.

TEF: Factor de elongación (usado como control); ADC: Arginina descarboxilasa; SAMDC: s-adenosil metionina descarboxilasa; SPDS: espermidina sintasa; SPMS: espermina sintasa; DAO: diamina oxidasa. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequía.

3. Ajuste osmótico en la simbiosis *S. constrictum*-soja a tiempos cortos (2 días) y más largos de sequía (7 días): Prolina y azúcares solubles

A los 2 días no se observaron diferencias en el contenido de Pro y Az. A los 7 días, ambos osmolitos estaban igualmente aumentados en plantas CS y MS, con respecto a CR y MR (Tabla 7; Figuras 26a y 26b).

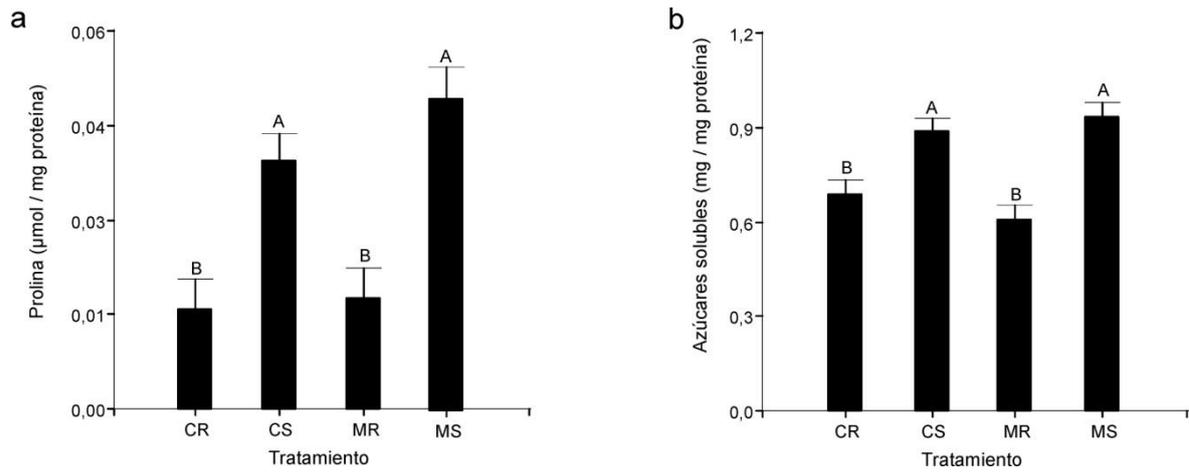


Figura 26. Efecto de la sequía y la micorrización con *Septoglomus constrictum* de plantas de soja DM50048 sobre el contenido en prolina(a) y y azúcares solubles (b) luego de 7 días de tratamiento. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequía. Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de LSD ($p \leq 0,05$).

Discusión

Confirmando lo mostrado en el Capítulo 2, *S. constrictum* colonizó eficientemente raíces de soja, aún bajo condiciones de sequía (Tabla 5) y promovió el aumento de nutrientes minerales tanto en R como en S (Figura 17). Más aún, en la simbiosis *S. constrictum*-soja se observó un mayor valor CIT, independientemente del estrés impuesto (Figura 19a).

Nuestros resultados mostraron que, a tiempos cortos del tratamiento de S no hubo daño oxidativo, según lo sugieren los niveles de MDA sin diferencias entre los tratamientos. Mientras que a tiempos más largos, las plantas CS mostraron un incremento significativo en MDA respecto a los otros tratamientos (Figura 18), sugiriendo una mayor susceptibilidad al daño oxidativo comparado con MS. Tal comportamiento de MS concuerda con otros reportes en plantas de soja micorrizadas (Porcel y Ruiz-Lozano 2004; Porcel et al. 2003; Ruiz-Lozano et al. 2001). También se ha observado este efecto mitigante de estrés oxidativo de la simbiosis en raíces de plantas de *Citrus tangerine* (Wu et al. 2006b), y en hoja y raíz de *Poncirus trifoliata* (Wu et al. 2006a), que fue acompañado por un mayor nivel de antioxidantes no enzimáticos (GSH y Asc) en hoja (Wu et al. 2006a).

La regulación del daño oxidativo está íntimamente relacionada con la detoxificación de la célula de las ERO producidas en exceso bajo condiciones de estrés (Mittler 2002). Los antioxidantes como el ácido ascórbico y el glutatión, que se encuentran en los cloroplastos y en otros compartimentos son cruciales para la defensa del estrés oxidativo de las plantas (Mittler 2002). Nosotros encontramos que a los 2 días de comenzado el estrés, las MS ya se diferenciaron de las CS, mostrando un aumento en glutatión reducido, en la relación glutatión reducido/total y en la relación ascorbato reducido/total (Figuras 20a, 20b y 20c). Estos resultados muestran una inducción de la defensa antioxidante no enzimática en la simbiosis HMA-soja mucho más temprana que la reportada por otros autores en otras especies en sequía (Wu et al. 2006a; Wu et al. 2006b; Wu y Zou 2009; Ruiz-Sanchez et al. 2010). Este comportamiento se acentuó a los 7 días ya que las plantas MS mantuvieron un nivel redox más reducido, evidenciado por una mayor relación ascorbato reducido/total (Figura 20d).

Además, los mecanismos de secuestro de ERO principales incluyen las enzimas SOD, CAT y APX. El balance entre la actividad de estas tres enzimas es crucial para

determinar el nivel de equilibrio de los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno en la célula (Mittler 2002). Las plantas MS se diferenciaron de las CS en la actividad total y en la acumulación de transcriptos de las enzimas antioxidantes a tiempos cortos y largos de la sequía.

A los 2 días, la actividad total SOD fue mayor en las plantas micorrizadas en ambas condiciones hídricas (Figura 21a). Dado que la enzima SOD secuestra ión superóxido y su principal producto es el H_2O_2 , nuestros resultados sugieren a tiempos cortos de la sequía una mayor eliminación del anión superóxido y acumulación de H_2O_2 en MS con respecto a CS. Esta idea se ve apoyada por una menor actividad APX medida en MS. Es posible que el H_2O_2 pueda estar actuando como segundo mensajero en la respuesta temprana al estrés (Fraire-Velázquez 2011). Con respecto a la expresión génica, a los 2 días se observó en MS una disminución en la acumulación de transcriptos de todas las enzimas antioxidantes estudiadas, con respecto a MR y CS (Figura 23). Las diferencias entre la actividad enzimática y la acumulación de transcriptos en los primeros momentos del estrés en MS podrían relacionarse con respuestas rápidas a la sequía que requieren de una regulación traduccional o post-transcripcional, sin modificaciones en los niveles de ARNm.

A tiempos más largos de sequía, las plantas MS mostraron un aumento de la actividad enzimática CAT y APX (Figuras 21c y 22), sugiriendo la regulación de la acumulación del H_2O_2 más tóxico. Un efecto similar fue reportado en raíces de *Citrus tangerine* micorrizadas bajo sequía prolongada donde se observó mayor actividad SOD, CAT y APX (Wu et al. 2006b), mientras que en hoja de *Poncirus trifoliata* micorrizada la mayor actividad APX fue acompañada por un menor nivel de peróxido y superóxido (Wu et al. 2006a). Con respecto a la expresión génica, hubo un incremento en MS de los transcriptos de CAT5 y APX (Figura 23). Tal comportamiento podría guardar relación con el aumento en la actividad enzimática de CAT y APX.

Entre las sustancias antioxidantes también se han mencionado las PAs (Zacchini y de Agazio 2004). Algunas investigaciones muestran cierta correlación entre el aumento en el contenido de PAs en plantas micorrizadas y el buen desempeño de las plantas frente al estrés salino (Sannazzaro et al. 2007; Talaat y Shawky 2013). En nuestro estudio, al tiempo más corto de sequía evaluado, las plantas MS no mostraron cambios en el contenido de PAs con respecto a CS (Figuras 24a, 24c y 24e). Al continuar la restricción hídrica, en MS se observó un menor nivel de Put y mayor de Spm con respecto a CS (Figura 24b y 24f). El rol fisiológico de Put en la respuesta al estrés abiótico es controvertido. Mientras muchos autores han reportado el rol protector de Put (Takahashi y Kakehi 2010), otros han

relacionado la acumulación de Put en tejidos bajo estrés con la reducción en la velocidad de síntesis de Spd y Spm, y han sugerido que dicha acumulación puede ser tóxica para ciertas células (Capell et al. 2004). Por otro lado, el mayor nivel de Spm en MS a los 7 días de sequía concuerda con una elevada concentración de Spm en plantas de citrus micorrizado en sequía reportada por Wu et al. (2013).

Con respecto a la expresión génica de las enzimas del metabolismo de las PAs, a los 2 días de sequía los niveles de transcritos de ADC y SAMDC se encontraban aumentados tanto en MS como en CS, posiblemente beneficiando la síntesis de PAs en ambos tratamientos. Sin embargo, mientras la expresión génica de DAO aumentó en CS a los 2 días, fue menor en MS (Figura 25). En la evaluación a los 7 días de tratamiento, se incrementó la diferencia entre CS y MS, con mayores niveles de transcritos de ADC y menores de DAO en MS (Figura 25). Siendo DAO una enzima que interviene en el catabolismo de las PAs, los resultados sugieren una menor degradación de PAs en las plantas MS. En apoyo de nuestros resultados a nivel génico, Talaat y Shawky (2013) reportaron en plantas de trigo micorrizadas la disminución de actividad de 2 enzimas del catabolismo de las PAs, DAO y poliamina oxidasa (PAO), bajo estrés salino. También, la disminución en la actividad de esas mismas enzimas se ha reportado para plantas de mijo tolerantes a salinidad (Sudhakar et al. 2015) y una sobre-expresión de ADC en plantas de arroz transgénicas produjo un incremento en la tolerancia a la sequía (Capell et al. 2004).

Existen investigaciones que muestran que las plantas micorrizadas acumulan altas concentraciones de osmolitos, como Az y Pro bajo condiciones de sequía (Ruiz-Lozano 2003; Kubikova et al. 2001). En este estudio, las plantas MS no mostraron cambios, con respecto a CS, en el contenido de Pro y Az en los dos tiempos evaluados (Figura 26). Esto concuerda con Porcel y Ruiz-Lozano (2004) quienes no observaron un mayor incremento en los niveles de Pro y Az en tallos de plantas de soja micorrizadas en comparación con las no micorrizadas luego de 10 días de sequía.

Conclusiones

Los resultados apoyan la hipótesis de la participación de la defensa antioxidante a los 2 días del estrés por sequía en la simbiosis *S. constrictum*-soja susceptible, resaltándose un incremento significativo del glutatión reducido, el mantenimiento del estado redox (ascorbato reducido/total y glutatión reducido/total) y aumento de la actividad SOD.

A los 7 días del estrés, además del aumento en la defensa antioxidante (CAT y APX), se observan cambios en los niveles de PAs.

A nivel de expresión génica, se observa una disminución en transcritos de enzimas claves de la regulación de ERO a los 2 días, y cambios en los transcritos de enzimas de la síntesis (ADC) y degradación (DAO) de PAs a los 7 días de sequía.

CAPÍTULO 4

Comparación de metabolitos en plantas de soja inoculadas y no inoculadas con *Septoglomus constrictum* luego de 2 días de sequía

Introducción

Un aspecto poco estudiado en la simbiosis MA es el contenido de los metabolitos. La interacción mutualista requiere un ajustado control para que los beneficios sean mutuos (Kiers et al. 2011), y del lado de la planta implica cambios importantes en el metabolismo primario y secundario, y en la regulación de los mecanismos de defensa (Harrison 1999; Hause y Fester 2005). La metabolómica es una herramienta poderosa por medio de la cual es posible obtener una perspectiva integral de cómo están reguladas las redes metabólicas y está siendo aplicada actualmente en muchos trabajos de investigación. El término “metabolómica” es definido como el análisis cualitativo y cuantitativo de todas las moléculas pequeñas en un sistema biológico (Fiehn 2001). Una de las técnicas más usadas hasta el momento para el estudio metabólico en plantas es la cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS), la cual permite la identificación y cuantificación de cientos de metabolitos en muestras vegetales que incluyen azúcares, alcoholes de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y poliaminas, resultando en la comprensión del metabolismo primario de las vías centrales (Obata y Fernie 2012). Si bien ya se han realizado algunos estudios de respuesta metabólica a estrés hídrico, térmico, lumínico, de limitación nutricional, de iones y oxidativo (Obata y Fernie 2012), no existen reportes de estudios de metabolómica que comparen la respuesta al estrés por sequía de plantas micorrizadas y no micorrizadas.

Por lo expuesto, el **objetivo específico** fue caracterizar el contenido de metabolitos en hoja de plantas de soja en la simbiosis con *S. constrictum* en los primeros momentos de la sequía.

La **hipótesis** a evaluar fue que la inoculación con *S. constrictum* produce cambios en los metabolitos que se acumulan en las hojas de plantas de soja por sequía desde el inicio de la sequía.

Materiales y métodos

Se utilizaron hojas del muestreo de 2 días de sequía del ensayo presentado en el Capítulo 3 de esta tesis. Los perfiles metabólicos comparativos se realizaron utilizando la técnica de GC-MS. La extracción de los metabolitos de hoja (30 mg) se realizó en metanol 100% (500 µl). Se agregó sorbitol a todas las muestras como estándar interno. Distintas alícuotas del sobrenadante obtenido luego de agregar agua MilliQ y centrifugar 15 minutos a 13000 rpm, se repartió en insertos de vidrio. Estos preparados se enviaron al laboratorio de la Dra. Ute Roessner de Metabolomics Australia, School of Botany en la Universidad de Melbourne (Australia), para su medición. Los datos de los niveles medidos para cada metabolito en cada tratamiento (5 réplicas) se analizaron estadísticamente a través del análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa InfoStat Profesional (Di Rienzo et al. 2013). Las diferencias entre medias fueron comparadas con tests de diferencias mínimas significativas (LSD) Fisher, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Resultados

A los 2 días del tratamiento de sequía, con la técnica GC-MS se detectaron 98 metabolitos en total, de los cuales 28 son de identidad desconocida. Entre los identificados se encontraron aminoácidos, aminos, ácidos orgánicos, azúcares, fosfatos de azúcares, ácidos grasos y esteroides. De ellos, 30 mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 8).

La S afectó de igual manera a las plantas M y C en el contenido de algunos metabolitos, produciendo incremento de fosfato y disminución de glutamina, fenilalanina, tirosina, ácido 2-metil málico, ácido cafeico, dímero dehidroascorbato, malato, fructosa, xilosa, sacarosa y glicerol. Además, otros fueron afectados por la inoculación con *S. constrictum*, con incrementos en glicolato, eritronato, glicerato, treonato, scilo-inositol y glicerol, y disminuciones en GABA y tirosina, tanto en condiciones de R como de S (Tablas 8 y 9).

Los metabolitos que fueron afectados diferencialmente por la S en las plantas M y C (interacción M x S) fueron: etanolamina, metionina, ácido sacárico, oxalato, maltosa, turanosa, inositol 1-fosfato, pinitol, β -sitosterol, estigmasterol, alantoína y urea (Tablas 8 y 9). Mientras las plantas CS mostraron un incremento en todos ellos con respecto a CR, en MS se observó disminución con respecto a MR en la mayoría de ellos. Además el contenido de alantoína y urea en CS triplicó al encontrado en MS (Tabla 9).

Tabla 8. Análisis de la varianza sobre el efecto de la inoculación con *Septoglomus constrictum* (M) y el estrés por sequía (S) sobre el contenido de metabolitos en hoja de plantas de soja genotipo DM50048, crecidas bajo condiciones de riego normal y con 2 días de sequía. Se muestran los metabolitos que resultaron significativos para M, para S o para su interacción (M x S).

Metabolitos	Fuente de variación (valores p)		
	M	S	M x S
GABA	<0,0001	0,3422	0,1019
Glutamina	0,0680	0,0476	0,1527
Fenilalanina	0,2835	0,0293	0,6460
Etanolamina	0,1986	0,4762	0,0152
Tirosina	0,0522	0,0030	0,1875
Metionina	0,0037	0,3581	0,0195
Glicolato	0,0067	0,1397	0,0885
Fosfato	0,1158	0,0119	0,8702
Ácido 2-metil málico	0,1242	0,0122	0,6994
Ácido cafeico	0,6557	0,0063	0,7496
Dímero dehidroascobato	0,0951	0,0101	0,9025
Eritronato	0,0372	0,4988	0,6412
Glicerato	0,0159	0,9943	0,2855
Ácido sacárico	0,2837	0,4693	0,0420
Malato	0,3022	0,0081	0,1264
Oxalato	0,1960	0,5554	0,0121
Treonato	0,0005	0,4844	0,3875
Fructosa	0,6134	0,0280	0,0564
Maltosa	0,1182	0,8759	0,0504
Turanosa	0,0119	0,6314	0,0059
Xilosa	0,9885	0,0119	0,6913
Scilo-inositol	0,0140	0,1243	0,5946
Inositol-1-fosfato	0,1244	0,7347	0,0093
Sacarosa	0,9260	0,0112	0,2922
Pinitol	0,0133	0,2381	0,0230
β -Sitosterol	0,3060	0,1872	0,0237
Estigmasterol	0,2020	0,4093	0,0285
Alantoína	0,0597	0,0050	0,0077
Glicerol	0,0065	0,0456	0,7444
Urea	0,0957	0,0034	0,0369

Tabla 9. Contenido de metabolitos en hojas de plantas de soja genotipo DM50048 inoculadas con *Septoglomus constrictum*, crecidas bajo condiciones de riego normal y con 2 días de sequía. Se muestran los metabolitos que resultaron significativos para la interacción entre los tratamientos Micorriza y Sequía o para los tratamientos Micorriza y Sequía individualmente. CR: control riego; CS: control sequía; MR: micorriza riego; MS: micorriza sequia. Los valores fueron expresados en relación a CR, considerando para CR un valor de 1 para todos los metabolitos.

Metabolitos	Tratamientos			
	CR	CS	MR	MS
Etanolamina	1±0,13b	2,05±0,25a	1,42±0,16ab	0,81±0,11b
Inositol-1-fosfato	1±0,17b	1,44±0,12ab	1,77±0,12a	1,21±0,08b
β-Sitosterol	1±0,22ab	1,26±0,11a	1,33±0,25a	0,44±0,37b
Estigmasterol	1±0,23ab	1,37±0,14a	1,26±0,25a	0,49±0,33b
Turanosa	1±0,33b	1,65±0,12a	1,06±0,02b	0,58±0,11b
Urea	1±0,4b	10±0,29a	1,8±0,26b	3,64±0,06b
Alantoína	1±0,38b	6,35±0,22a	1,87±0,26b	2,05±0,19b
Pinitol	1±0,01b	1,08±0,03a	1,12±0,01a	1,09±0,02a
Maltosa	1±0,12b	1,98±0,15ab	2,89±0,27a	1,75±0,23ab
Ácido sacárico	1±0,05b	1,21±0,05ab	1,24±0,04a	1,13±0,09ab
Oxalato	1±0,06b	1,29±0,03a	1,35±0,1a	1,16±0,04ab
Metionina	1±0,15a	1,22±0,15a	0,89±0,11a	0,42±0,16b
GABA	1±0,08a	0,94±0,11a	0,33±0,15b	0,53±0,1b
Glicerato	1±0,09b	0,9±0,08b	1,51±0,26b	2,81±0,21a
Glicolato	1±0,13ab	0,6±0,15b	1,58±0,32ab	1,98±0,22a
Eritronato	1±0,14ab	0,81±0,08b	1,29±0,19a	1,25±0,10ab
Treonato	1±0,13b	0,95±0,13b	2,01±0,25a	2,47±0,04a
Scilo-inositol	1±0,34ab	0,29±0,13b	1,73±0,23a	1,37±0,28a
Tirosina	1±0,23a	0,31±0,24b	0,51±0,35b	0,21±0,13b
Glicerol	1±0,03ab	0,87±0,05b	1,14±0,06a	1,05±0,03a
Glutamina	1±0,26a	0,87±0,29a	0,91±0,24a	0,15±0,17b
Fenilalanina	1±0,36a	0,38±0,39ab	0,66±0,37ab	0,25±0,17b
Fosfato	1±0,11b	1,52±0,11ab	1,31±0,09ab	1,78±0,13a
Ácido 2-metil málico	1±0,14ab	0,74±0,07b	1,21±0,12a	0,87±0,06b
Ácido cafeico	1±0,11ab	0,67±0,2b	1,09±0,09a	0,68±0,17b
Dímero dehidroascobato	1±0,36a	0,39±0,23ab	0,62±0,37ab	0,06±0,50b
Malato	1±0,09a	0,73±0,08b	0,97±0,04a	0,89±0,06ab
Fructosa	1±0,12a	0,42±0,2b	0,67±0,25ab	0,62±0,19ab
Xilosa	1±0,07a	0,7±0,08b	0,96±0,13ab	0,74±0,13ab
Sacarosa	1±0,21a	0,53±0,12b	0,88±0,10a	0,67±0,16ab

Los valores son medias ± DE. Las mismas letras en cada fila indican diferencias no significativas entre tratamientos, de acuerdo al test de LSD ($P \leq 0,05$).

Discusión

Es conocido que el estrés abiótico activa una respuesta multigen que resulta en cambios en la acumulación de metabolitos primarios y secundarios (Rodziewicz et al. 2014). Según nuestro conocimiento, los resultados obtenidos serían la primera evidencia del contenido en metabolitos en la simbiosis HMA-soja bajo sequía. Hemos podido identificar metabolitos cuyos niveles variaron significativamente en la interacción M x S, y otros que fueron característicos del tratamiento M (Tabla 8).

En este estudio, a los 2 días de sequía se encontró que en la interacción entre los dos factores (M x S) el nivel de cuatro metabolitos, etanolamina, inositol 1-fosfato, β -sitosterol y estigmasterol, relacionados con la estructura de las membranas y su mantenimiento, disminuyó en MS mientras que aumentó en CS, con respecto a la condición R (Tabla 9). Las diferencias encontradas entre las plantas M y C en condiciones de S sugieren una adaptación distinta a nivel de la estructura de las membranas, que también llevaría a diferentes vías de señalización del estrés mediada por sus componentes. En tal sentido, si bien las membranas son los principales blancos de los procesos degenerativos inducidos por la sequía crónica, a tiempos cortos tienen una gran participación en las cascadas de transducción de señal (Fraire-Velázquez 2011). Particularmente los fosfolípidos de membrana constituyen un sistema dinámico que genera gran cantidad de moléculas señal, además de su importante rol estructural durante la respuesta al estrés (Zhu 2002). Por otro lado, la turanosa, que es un disacárido que actúa en procesos de señalización intracelular estimulados por el estrés (Sinha et al. 2002; Hanson y Smeekens 2009), también mostró un incremento sólo en el CS (Tabla 9) sugiriendo nuevamente diferencias en las vías de señalización de la sequía entre plantas M y C.

Otros metabolitos que mostraron diferencias significativas en la interacción M x S fueron la urea y su compuesto derivado, el ureido alantoína. En la soja, el nitrógeno (N) fijado en los nódulos es transferido hacia las hojas en forma de ureidos para su posterior metabolismo. Sin embargo, en condiciones de sequía, se incrementan los niveles de ureidos en hojas y se ha postulado que esta acumulación podría estar involucrada en un mecanismo de retroalimentación negativa que inhibe la fijación biológica de N (Freixas Coutin et al. 2011). Nuestros resultados mostraron un nivel de alantoína en CS que fue seis veces mayor que en CR. Este comportamiento fue igualmente observado por Silvente et al. (2012) en este mismo genotipo de soja. Igualmente, Marino et al. (2007) observaron una

acumulación mayor y más temprana de ureidos en genotipos de soja sensibles a la sequía. Sin embargo, no hubo diferencias en el contenido de alantoína entre MS y MR, sugiriendo que la inoculación con *S. constrictum* podría estar protegiendo la fijación biológica de N tanto en sequía como en riego (Tabla 9).

En la interacción M x S, también fueron afectados algunos metabolitos derivados de azúcares. Entre ellos, el pinitol es un poliol cíclico descrito como osmoprotector (Streeter et al. 2001). Los polioles están implicados en la estabilización de macromoléculas y en el secuestro de radicales hidroxilo, previniendo el daño oxidativo de membranas y de enzimas (Shen et al. 1997). Nuestros resultados muestran un incremento del nivel de pinitol en las plantas CS y este comportamiento concuerda con lo reportado por Silvente et al. (2012) en el mismo genotipo de soja sometido a sequía. Por el contrario, las plantas M mantuvieron un alto nivel de pinitol, tanto en R como en S (Tabla 9), sugiriendo que la simbiosis induce la acumulación de metabolitos osmoprotectores que permiten a la planta soportar mejor el estrés. Otro azúcar que tuvo mayores niveles en las plantas MR fue la maltosa, que triplicó los mostrados por CR. La degradación del almidón por β -amilasas produce maltosa, que en el citosol es convertida a glucosa y subsecuentemente se forman fructosa y sacarosa (Tetlow et al. 2004; Kötting et al. 2010). Nuestros resultados sugieren un mayor metabolismo del almidón en las plantas micorrizadas relacionado posiblemente con el mayor requerimiento de fuentes de C de estas plantas para mantener la simbiosis (Smith y Read 2008). No se puede descartar que los azúcares derivados de la maltosa podrían estar cumpliendo una función de osmoprotector en sequía (Wu et al. 2007b).

También los resultados mostraron un incremento en los niveles de ácido sacárico y oxalato en MR con respecto a CR. El ácido sacárico o glucárico, es un ácido aldárico derivado de la glucosa que puede formar lactonas, las que a su vez han sido vinculadas a la síntesis del ácido ascórbico, entre otros metabolitos (Smirnoff 2000). Estos resultados sugieren que la vía del ascórbico podría estar estimulada en las plantas MR y en apoyo de esta idea observamos puntualmente un estímulo en la relación Ascorbato reducido/total en las plantas micorrizadas a los 2 días (Figura 21b). A su vez, el ácido ascórbico es un precursor importante del oxalato (Nuss y Loewus, 1978; Yang y Loewus, 1975), que es un anión orgánico con propiedades quelantes que incrementa la disponibilidad de P inorgánico en el suelo (Marschner 1995; Comerford 1998). Dicha función podría explicar el mayor nivel de oxalato en MR con respecto a CR ya que las plantas micorrizadas presentaron mayor concentración de P.

Otro metabolito que fue afectado por la interacción M x S fue la metionina, que es fundamental en las células vegetales dado que, además de su rol como constituyente de las proteínas y su rol central en la traducción del ARNm, controla los niveles de varios metabolitos claves, como etileno, PAs y biotina a través de su primer metabolito S-adenosilmetionina (SAM) (Amir 2008). En este estudio las plantas MS tuvieron el menor nivel de metionina, lo cual podría estar relacionado con su vida media corta debido a su metabolismo rápido hacia SAM (Giovanelli et al 1985; Miyazaki y Yang 1987) y desde allí a la vía de las PAs. Sin embargo, a los 2 días de tratamiento los niveles de las PAs Spd y Spm fueron similares en las plantas CS y MS (Figura 25). Otra posible vía es el metabolismo de SAM a etileno (Amir 2008), que es una hormona que controla la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Abeles et al. 1992). Así se podría sugerir este destino de la metionina en las plantas MS ya que existe evidencia de cambios en los niveles de hormonas por el establecimiento de la simbiosis MA (Ludwig-Müller 2010; López-Ráez et al. 2010).

Por otro lado, uno de los metabolitos afectados sólo por la inoculación con *S. constrictum* fue GABA (Tabla 8). Éste es un metabolito que en general se incrementa rápidamente en respuesta a estreses bióticos y abióticos, y se ha sugerido que cumple una función de regulador citosólico de pH, de protección frente al estrés oxidativo y de osmoprotector (Obata y Fernie 2012). En nuestro estudio el contenido de GABA fue menor en las plantas M, tanto en R como en S (Tabla 9), sugiriendo que la metabolización de GABA podría guardar relación con la regulación del estrés oxidativo, entre otros efectos (Krasensky y Jonak 2012).

Otros metabolitos que se vieron afectados significativamente por la inoculación con *S. constrictum* fueron el glicolato y el glicerato (Tabla 8). Ambos son intermediarios de la ruta de la fotorrespiración, la cual ha sido generalmente clasificada como una ruta de gasto energético, pero actualmente está siendo cada vez más apreciada como un componente auxiliar clave de la fotosíntesis y por ello del ciclo del carbono (Bauwe et al. 2012). Se ha postulado que previene que el exceso de poder reductor en forma de NADPH reaccione con el oxígeno y produzca radicales libres que puedan finalmente producir daño oxidativo (Foyer et al. 2009). Los niveles de glicolato y glicerato fueron mayores en las plantas MS con respecto a CS (Tabla 9), lo cual podría sugerir una mayor actividad de esta vía metabólica en las plantas micorrizadas, lo que podría favorecer la regulación del estrés oxidativo en las plantas micorrizadas bajo sequía.

Conclusiones

Se evidenciaron diferencias en los niveles de metabolitos según el tratamiento de micorrización y de riego.

La variación en los niveles de metabolitos sugiere distintas vías de señalización del estrés entre MS y CS, además de mayor protección de la fijación biológica del N en MS y un estímulo en las vías de producción de osmoprotectores.

Finalmente, se observan indicios de una mejor regulación de las ERO y del estrés oxidativo, sugerido por aumento de metabolitos incluidos en la vía fotorrespiratoria, en la vía del ascórbico, metabolismo de GABA y hormonas del estrés.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Discusión general

Los beneficios de los HMA hacen que la utilización de la simbiosis sea atractiva para los sistemas de agricultura sustentable, diseñados para minimizar los insumos sintéticos (Douds et al. 2010). Sin embargo, dada la heterogeneidad de microorganismos en el suelo se hace sumamente complejo entender el efecto particular de la simbiosis MA, y es en este aspecto donde el desarrollo de sistemas experimentales en condiciones controladas puede aportar conocimientos valiosos. Consecuentemente, uno de los aportes de esta tesis doctoral fue la construcción del sistema experimental en condiciones semi-controladas, donde se seleccionó un genotipo de soja susceptible a la sequía con el objetivo de destacar mecanismos relacionados con la tolerancia a la sequía en plantas micorrizadas.

Dado que el efecto de esta simbiosis sobre la respuesta de defensa del hospedante también depende del HMA involucrado (Bezemer y van Dam 2005), y que es conocido el mayor beneficio de utilizar especies de HMA autóctonas por sobre las especies de banco (Querejeta et al. 2006; Marulanda et al. 2007), en esta tesis doctoral además elegimos probar tres especies de HMA abundantes y ampliamente distribuidas en suelos nativos y agrícolas (Urcelay et al. 2009; Grilli et al. 2012; Longo et al. 2014). Como aporte al conocimiento, se identificaron distintas morfoespecies de HMA en el suelo agrícola analizado: *Gigaspora* sp., *Glomus* sp., *Septoglomus constrictum*, *Glomus aggregatum* y *Acaulospora scrobiculata*, entre otras.

Estudios recientes muestran que los beneficios de los inóculos mixtos son en general mayores que los inóculos de aislamientos individuales (Hoeksema et al. 2010). Sin embargo, nuestros resultados están de acuerdo con otros estudios en los cuales el agrupamiento de aislamientos de HMA más rico no promovió una respuesta de mayor crecimiento de la planta (Doubková et al. 2013) ni mayor tolerancia frente un estrés por patógeno (Lewandowski et al. 2013) que los aislamientos individuales. Además, y como un aspecto novedoso en nuestro enfoque, se incluyeron mediciones fisiológicas y bioquímicas relacionadas con el estrés oxidativo, donde la mezcla de inóculos se comportó de modo similar a los aislamientos individuales.

A pesar del claro beneficio de un estado nutricional mejorado para la tolerancia al estrés, experimentos de administración de minerales han mostrado que el efecto protector observado en las plantas micorrizadas no puede ser atribuido únicamente al estado nutricional (Fritz et al. 2006; Liu et al. 2007). Las asociaciones MA provocan otros

cambios significativos en las plantas hospedadoras que intervienen en posibles mecanismos de tolerancia, los cuales no han sido completamente elucidados (Rapparini y Peñuelas 2014) y justamente esta tesis plantea aportes en ese aspecto.

En la simbiosis *S. constrictum*-soja se mitigó el daño oxidativo, y como aporte de la tesis doctoral, además de confirmar una regulación del estrés oxidativo a tiempos más largos de la sequía, los resultados sugieren fuertemente que a tiempos cortos la simbiosis HMA-soja en sequía estimula la inducción de la defensa antioxidante no enzimática más temprana que la reportada por otros autores en otras especies (Wu et al. 2006a; Wu et al. 2006b; Wu y Zou 2009; Ruiz-Sanchez et al. 2010).

Cabe destacar que es muy escasa la información que existe de la expresión génica de las enzimas de la defensa antioxidante en plantas micorrizadas y se limita a la enzima SOD. Ruiz-Lozano et al. (2001) reportó el incremento de un gen Mn-SOD II en raíces de plantas de lechuga inoculadas con *G. mosseae* y *G. intraradices*. En esta tesis, se observaron cambios en la expresión génica del sistema antioxidante enzimático específicamente en hojas, mostrando un efecto sistémico de la simbiosis.

De la comparación entre el estrés oxidativo y el metabolismo de las PAs en la simbiosis HMA-soja en sequía, en nuestros resultados se destaca la participación de las PAs a tiempos más largos de sequía. Considerando los cambios en el metabolismo de las PAs durante la sequía en la simbiosis micorrízica (Wu et al. 2013), sería de interés generar sistemas experimentales que relacionen los incrementos de la defensa antioxidante no enzimática y el metabolismo de las PAs.

Las investigaciones en osmorregulación en la simbiosis AM hasta el momento son escasas y contradictorias. El incremento en la acumulación de prolina podría depender del HMA involucrado (Ruiz Lozano et al. 2012), tal como fue observado en esta tesis en las plantas inoculadas con *Gsp* y *Ga* en comparación con los tratamientos *Mx* y *Sc*.

Finalmente, según nuestro conocimiento, en esta tesis se presenta el primer estudio de los perfiles metabólicos en la simbiosis HMA-soja bajo sequía. Hemos podido identificar metabolitos cuyos niveles variaron dependiendo si las plantas sometidas a 2 días de sequía estaban inoculadas o no con *S. constrictum*. Esta primera aproximación a nivel metabolómico ha mostrado ser muy rica en la identificación de mecanismos más específicos de las plantas micorrizadas en sequía. Queda por realizar un estudio más profundo y detallado, que permita confirmar los distintos mecanismos en plantas de soja micorrizadas en sequía.

Conclusiones generales

El trabajo realizado ha permitido confirmar la participación de la simbiosis MA en la mitigación de la sequía en plantas de soja.

Se han identificado morfoespecies de HMA en un suelo agrícola nativo. Nuestros resultados apoyan un efecto de selección sobre uno de complementariedad de cepas de HMA en una mezcla de aislamientos de un suelo nativo.

Se identificaron mecanismos bioquímicos y moleculares tempranos de mitigación de la sequía en HMA-soja relacionados con la regulación del estrés oxidativo y el metabolismo de las Poliaminas a tiempos más largos del estrés. El análisis de metabolómica abre nuevos caminos en el estudio de los mecanismos de mitigación de la sequía en la interacción HMA-soja.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbaspour H, Saeidi-Sarb S, Afsharia H, Abdel-Wahhabc MA (2012) Tolerance of Mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. *J Plant Physiol* 169:704-709
- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) Ethylene in plant biology. Academic Press, London
- Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
- Alguacil MM, Hernández JA, Caravaca F, Portillo B, Roldán A (2003) Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. *Physiol Plant* 118:562-570
- Allen RD (1995) Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants. *Plant Physiol* 107(4):1049-1054
- Aluru MR, Mazourek M, Landry LG, Curry J, Jahn M, O'Connell MA (2003) Differential expression of fatty acid synthase genes, Acl, Fat and Kas in Capsicum fruit. *J Exp Bot* 54:1655-1664
- Amir R (2008) Towards improving methionine content in plants for enhanced nutritional quality. *Functional Plant Science and Biotechnology* 2(1):36-46
- Andersen S, Bastola RD, Minocha SC (1998) Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Physiol* 116:299-307
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399
- Araus J, Slafer G, Reynolds M, Royo C (2002) Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* 89:925-940
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24:1-15
- Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol* 121:263-271
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol* 124(3):949-958
- Bagyaraj DJ, Manjunath A, Patil RB (1979) Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhiza and rhizobium and their effects on soybean in the field. *New Phytol* 82:141-145
- Bais HP, Ravishankar GA (2002) Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69:1-34
- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* 15:413-428
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205-207
- Bauwe H, Hagemann M, Kern R, Timm S (2012) Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 15(3):269-275

- Beauchamp CO, Fridovich I (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys Acta* 317(1):50-64
- Berruti A, Borriello R, Lumini E, Scariot V, Bianciotto V, Balestrini R (2013) Application of laser microdissection to identify the mycorrhizal fungi that establish arbuscules inside root cells. *Front. Plant Sci.* 4:135
- Bezemer TM, van Dam NM (2005) Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends Ecol Evol* 20:617–624
- Bloom AJ, Chapin FS III, Mooney H A (1985) Resource limitation in plants – an economic analogy. *Annu Rev Ecol Syst* 16:363-392
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Bressano M, Curetti M, Giachero L, Vargas Gil S, Cabello M, March G, Ducasse DA, Luna CM (2010) Mycorrhizal fungi symbiosis as strategy against oxidative stress in soybean plants. *J Plant Physiol* 167:1622–1626
- Capell T, Bassie L, Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *PNAS of USA* 101:9909-9914
- Comerford NB (1998) Soil phosphorus bioavailability. In Lynch JP, Deikman J (eds) *Phosphorus in Plant Biology*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA. pp 136–147
- Cruz C, Green JJ, Watson CA, Wilson F, Martins-Loução MA (2004) Functional aspects of root architecture and mycorrhizal inoculation with respect of nutrient uptake capacity. *Mycorrhiza* 14:177–184
- Cruz de Carvalho MH (2008) Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signal Behav* 3:156–165
- Daniels BA, Skipper HD (1982) Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In Schenck NC (ed) *Method and Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathological Soc y Press, St Paul, MN, pp 29–35
- Davies BJ (1964) Disc electrophoresis II—Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academy of Sciences* 121:404-427
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Ferjani AG, Sahraoui AL (2009) Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry* 70:1421-1427
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2013) *InfoStat versión 2013*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Doubková P, Kohout P, Sudová R (2013) Soil nutritional status, not inoculum identity, primarily determines the effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of *Knautia arvensis* plants. *Mycorrhiza* 23:561-572
- Douds DD, Nagahashi G, Reed Hepperly P (2010) On-farm production of inoculum of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculum production. *Bioresource Technol* 101:2326-2330

- Edathil TT, Manian S, Udaiyan K (1996) Interaction of multiple VAM fungal species on root colonization, plant growth and nutrient status of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Agr Ecosyst Environ* 59:63–68
- Edwards JT, Purcell LC (2005) Soybean Yield and biomass responses to increasing plant population among diverse maturity groups: I. agronomic characteristics. *Crop Sci* 45:1770–1777
- El Ghachtouli N, Paynot M, Morandi D, Martin-Tanguy J, Gianinazzi S (1995) The effect of polyamines on endomycorrhizal infection of wildtype *Pisum sativum*, cv. Frisson (nod+myc+) and two mutants (nod-myc+ and nod-myc-). *Mycorrhiza* 5:189-192
- Entry JA, Rygielwicz PT, Watrud LS, Donnelly PK (2002) Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research* 7:123-138
- Evans PT, Malmberg RL (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:235-269
- Fan QJ, Liu JH (2011) Colonization with arbuscular mycorrhizal fungus affects growth, drought tolerance and expression of stress-responsive genes in *Poncirus trifoliata*. *Acta Physiol Plant* 33:1533-1542
- Faust M, Wang S (1992) Polyamines in horticulturally important plants. *Horticultural Reviews* 14:333-356
- Fiehn O (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2:155–168
- Flores HE, Galston AW (1984) Osmotic stress induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol.* 75:102–109
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28:1056-1071.
- Foyer CH, Bloom A J, Queval G, Noctor G (2009) Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 60(1):455–484
- Fraire-Velázquez S, Rodríguez-Guerra R, Sánchez-Calderón L (2011) Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. In: Shanker AK, Venkateswarlu B (eds) *Abiotic stress response in plants- physiological, biochemical and genetic perspectives*. InTech, Rijeka, pp 3-26
- Freixas Coutin JA, Torres de la Noval W, Reynaldo Escobar IM, Nápoles García MC (2011) Niveles de ureidos en plantas de soya con diferentes inoculantes y sometidas a déficit hídrico. *Cultivos tropicales* 32(2):35-43
- Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjaer MF, Thordal-Christensen H, Pons-Kühnemann J (2006) Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16:413-419
- Galston AW (1983) Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* 33:382–388
- Galston AW, Kaur-Shawney R (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* 94: 406–410

- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48(12):909-930
- Giorda LM, Baigorri H (1997) El cultivo de la soja en Argentina. San Juan, AR, INTA, Editar
- Giovanelli JG, Mudd SH, Datko AH (1985) Quantitative analysis of pathways of methionine metabolism and their regulation in *Lemna*. *Plant Physiology* 78:555-560
- Goicoechea N, Szalai G, Antolín MC, Sanchez-Diaz M, Paldi E (1998) Influence of arbuscular mycorrhizae and Rhizobium on free polyamines and proline levels in water-stressed alfalfa. *J Plant Physiol.* 153:706–711
- Gong M, Tang M, Chen H, Zhang Q, Feng X (2013) Effects of two *Glomus* species on the growth and physiological performance of *Sophora davidii* seedlings under water stress. *New Forests* 44:399-408
- Grill D, Tauze M, Dekok L (2001) Significance of glutathione to plant adaptation to the environment. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Grilli G, Urcelay C, Galetto L (2012) Forest fragment size and nutrient availability: complex responses of mycorrhizal fungi in native-exotic hosts. *Plant Ecol.* 213:155-165
- Gustafson DJ, Casper BB (2006) Differential host plant performance as a function of soil arbuscular fungal communities: experimentally manipulating co-occurring *Glomus* species. *Plant Ecol.* 183:257-263
- Guye MG, Vigh L, Wilson JM (1986) Polyamine titre in relation to chilling-sensitivity in *Phaseolus* sp. *J Exp Bot.* 37:1036-1043
- Ha H, Sirisoma N, Kuppusamy P, Zweier J, Woster P, Casero R (1998) The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:11140-11145
- Haile FJ (2000) Drought stress, and yield loss. In: Peterson, R.D., Higley, L.G. (Eds.), *Biotic Stress and Yield Loss*. CRC Press LLC, pp 117-134
- Hanson J, Smeekens S (2009) Sugar perception and signaling - an update. *Curr Opin Plant Biol* 12:562-567
- Harrison MJ (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:361-389
- Hause B, Fester T (2005) Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* 221:184-196
- Heath R, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast.I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125(1):189-198
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604-611.
- Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC, Wilson GWT, Klironomos JN, and Umbanhowar J (2010) A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecol Letters* 13:394-407

- 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
- IPCC <http://www.ipcc.ch/>
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytol* 177: 779–789
- Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114:275–284
- Kalra YP (1998) Handbook of reference methods for plant análisis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA, pp 300
- Kiers E, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, et al. (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333, 880-882.
- Kohler J, Hernandez JA, Caravaca F, Roldan A (2008) Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology* 35:141–151
- Koide RT (2000) Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 147: 233-235
- Kothari S, Marschner H, George E (1990) Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. *New Phytologist* 116:303-311
- Kötting O, Kossman J, Zeeman SC, Lloyd JR (2010) Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment. *Curr Opin Plant Biol* 13: 320–328
- Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot* 63:1593-1608
- Kubikova E, Moore JL, Ownlew BH, Mullen MD, Augé RM (2001) Mycorrhizal impact on osmotic adjustment in *Ocimum basilicum* during a lethal drying episode. *Journal of Plant Physiology* 158:1227–1230
- Kuznetsov VV, Radyukina NL, Shevyakova NI (2006) Polyamines and Stress: Biological Role, Metabolism, and Regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* 53(5):583–604
- Lascano R, Antonicelli GE, Luna CM, Melchiorre M, Gomez LD, Racca RW, Trippi VS, Casano LM (2001) Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Austr J Plant Physiol* 28:1095-1102
- Latef AA, He CX (2011) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Sci Hortic* 127:228-233
- Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochem J.* 210(3):899-903

- Lesueur D, Sarr A (2008) Effects of single and dual inoculation with selected microsymbionts (rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi) on field growth and nitrogen fixation of *Calliandra calothyrsus* Meissn. *Agrofor Syst* 73:37-45
- Lewandowski TJ, Dunfield KE, Antunes PM (2013) Isolate Identity Determines Plant Tolerance to Pathogen Attack in Assembled Mycorrhizal Communities. *PLoS ONE* 8: e61329 doi:10.1371/journal.pone.0061329
- Lawn RJ, Likoswe AA (2008) Genotypic differences in leaf area maintenance contribute to differences in recovery from water stress in soybean. *Australian Journal of Agricultural Research* 59:1075-1085
- Linderman R (1994) Role of VAM fungi in biocontrol. *Mycorrhizae and plant health*. F Pflieger y R Linderman. St. Paul, Minn., APS Press: 1-26
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J* 50:529-544
- Longo S, Nouhra E, Goto B, Berbara R, Urcelay C (2014) Effects of fire on arbuscular mycorrhizal fungi in the mountain Chaco forest. *Forest Ecol Manag* 315:86-94
- López-Ráez JA, Verhage A, Fernández I, García JM, Azcón-Aguilar C, Flors V, Pozo MJ (2010) Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *J Exp Bot* 61:2589-2601
- Ludwig-Müller J (2010) Hormonal responses in host plants triggered by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Koltai, Kapulnik (eds). *Arbuscular Mycorrhizas: physiology and function*. Springer, pp 169–190
- Maherali H, Klironomos JL (2007) Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Sci* 316:1746-1748
- Marcé M, Brown DS, Capell-Figueras X, Tiburcio AF (1995) Rapid high performance liquid-chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives- application to plant and animal tissues. *J Chromatogr* 666(2):329-335
- Marino D, Frendo P, Ladrera R, Zabalza A, Puppo A, Arrese-Igor C, González EM (2007) Nitrogen fixation control under drought stress: localized or systemic?. *Plant Physiol* 143:1968-1974
- Marschner H (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London, UK.
- Marulanda A, Porcel R, Barea JM, Azcón R (2007) Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microb Ecol* 54:543–552
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115:495–501
- Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica (1991). *Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica*. San José, Costa Rica.
- 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

- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7(9):405-410
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9(10):490-498
- Miyazaki J, Yang SF (1987) The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 69:366-370
- Mokrasch LC (1954) Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *J BiolChem* 208:55-59
- Moumeni A, Satoh K, Kondoh H, Asano T, Hosaka A, Venuprasad R, Serraj R, Kumar A, Leung H, Kikuchi S (2011) Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. *BMC Plant Biology* 11:174
- Mullet JE, Whitsitt MS (1996) Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation* 20(2):119-124
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31-36
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* 22:867-880
- Ni QD, Zou YN, Wu QS, Huang YM (2013) Increased Tolerance of Citrus (*Citrus tangerine*) Seedlings to Soil Water Deficit after Mycorrhizal Inoculation: Changes in Antioxidant Enzyme Defense System. *Not Bot Horti Agrobi* 41(2):524-529
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279
- Nuss RF, Loewus FA (1978) Further studies on oxalic acid biosynthesis in oxalate accumulating plants. *Plant Physiol* 61:590-592
- Obata T, Fernie AR (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci* 69:3225–3243
- O'Toole JC, Ozbun JL, Wallace DH (1977) Photosynthetic response to water stress in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* 40:111-114
- Passioura JB (1996) Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regul* 20:79–83
- Paszkowski U (2006) A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 172(1):35-46
- Perez-Brandán C, Arzenoa JL, Huidobro J, Grümberg B, Conforto C; Hiltond S, Bending GD, Meriles JM, Vargas-Gil S (2012) Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Prot* 40:73-82
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:159–161
- Piatti FD, Ferreyra M (2013) Evaluación de grupos de madurez y fechas de siembra de cultivares comerciales de soja. Campaña 2012-2013, INTA EEA Manfredi. [en línea]. Manfredi, Córdoba (AR): INTA. Estación Experimental Agropecuaria. Cartilla Digital Manfredi no. 9, 14 p. ISSN on line 1851-7994.

- Polle A, Chakrabarti K, Schurmann W, Rennenberg H (1990) Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *Plant Physiol* 94:312-319
- Popp MP, Edwards JT, Purcell LC, Manning PM (2006) Profit-maximizing seeding rates and replanting thresholds for soybean: Maturity group interactions in the Mid-South. *Agricultural Systems* 91:211–228
- Porcel R, Barea JM, Ruiz-Lozano JM (2003) Antioxidant Activities in Mycorrhizal Soybean Plants under Drought Stress and Their Possible Relationship to the Process of Nodule Senescence. *New Phytologist* 157(1):135-143
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2004) Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential solute accumulation and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J Exp Bot* 55:1743–1750
- Querejeta JI, Allen MF, Caravaca F, Roldán A (2006) Differential modulation of host plant g13C and g18O by native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid environment. *New Phytologist* 169:379-387
- Rabie GH, Aboul-Nasr MB, Al-Humiany A (2005) Increased salinity tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* and a nitrogen-fixer *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 33:51–60
- Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Perotta C (2006) Drought stress responses in wheat: Physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Envir* 29:2143–2152
- Rapparini F, Peñuelas J (2014) Mycorrhizal Fungi to Alleviate Drought Stress on Plant Growth. In: Miransari M (ed) *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Volume 1: Springer New York, pp 21-42
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161:1189–1202
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer S, Morton J, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23(7):515-531
- Remy W, Taylor T, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci* 91:11841-11843
- Ritchie SW, Nguyen HT, Holaday AS (1990) Leaf Water Content and Gas-Exchange Parameters of Two Wheat Genotypes Differing in Drought Resistance. *Crop Sci* 30:105–111
- Rodziewicz P, Swarczewicz B, Chmielewska K, Wojakowska A, Stobiecki M (2014) Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol Plant* 36:1–19
- Ruiz-Lozano J, Azcón R (1995) Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiologia Plantarum* 95:472-478
- Ruiz-Lozano JM, Azcón R, Palma JM (1996) Superoxide Dismutase Activity in Arbuscular Mycorrhizal *Lactuca sativa* Plants Subjected to Drought Stress. *New Phytologist* 134(2):327-333

- Ruiz-Lozano JM, Collados C, Barea JM, Azcón R (2001) Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. *New Phytol* 151:493–502
- Ruiz-Lozano JM (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: new perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13:309–317
- 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
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Barzana B, Azcón R, Aroca R (2012) Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis to Plant Drought Tolerance: State of the Art. In: Aroca R (ed.). *Plant Responses to Drought Stress. From Morphological to Molecular Features*. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 335-362. ISBN 978-3-642-32652-3.
- Ruth B, Khalvati M, Schmidhalter U (2011) Quantification of mycorrhizal water uptake via high-resolution on-line water content sensors. *Plant Soil* 342:459–468
- Saia S, Amato G, Salvatore Frenda A, Giambalvo D, Ruisi P (2014) Influence of Arbuscular Mycorrhizae on Biomass Production and Nitrogen Fixation of Berseem Clover Plants Subjected to Water Stress. *PLoS ONE* 9(3):e90738
- Sannazzaro AI, Echeverria M, Alberto EO, Ruiz OA, Menendez AB (2007) Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry* 45:39-46.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413–1421
- Seiler N, Knödgen B, Bink G, Sarhan S, Bolkenius F (1983) Diamine oxidase and polyamine catabolism. *Adv Polyamine Res*, 135-154
- Serraj R, Sinclair T (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment* 25:333-341
- Sharma I, Ahmad P (2014) Chapter 4 - Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants, In Parvaiz A (ed) *Oxidative Damage to Plants*, Academic Press, San Diego, pp 131-148
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol* 115:527-532
- Sheptovitsky YG, Brudig GW (1996) Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry* 35:16255–16263
- Shukla A, Kumar A, Jha A, Salunkhe O, Vyas D (2013) Soil moisture levels affect mycorrhization during early stages of development of agroforestry plants. *Biol Fertil Soils* 49:545–554
- Sieverding E (1991) Vesicular Arbuscular Mycorrhizae management in Tropical Agroecosystems. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany. Eschborn; pp. 271

- Signorelli S, Casaretto E, Sainz M, Díaz P, Monza J, Borsani O (2013) Antioxidant and photosystem II responses contribute to explain the drought–heat contrasting tolerance of two forage legumes. *Plant Physiology and Biochemistry* 70:195-203
- Silvente S, Sobolev AP, Lara M (2012) Metabolite Adjustments in Drought Tolerant and Sensitive Soybean Genotypes in Response to Water Stress. *PLoS ONE* 7(6): e38554
- Singh S, Gupta AK, Kaur N (2012) Differential responses of antioxidative defence system to long-term field drought in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes differing in drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 198:185-195
- Sinha AK, Hofmann MG, Römer U, Köckenberger W, Elling L, Roitsch T (2002) Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiol* 128:1480-1489
- Smirnoff N (1993) Tansley review N°52: the role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125:27-58
- Smirnoff N (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil Trans Roy Soc B* 355:1455-1464
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn. London. Academic Press Ltd. ISBN 0123705266, 9780123705266.
- Smith SE, Facelli E, Pope S, Smith FA (2010) Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 326: 3–20
- Smith SE, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu Rev Plant Biol* 63:227–250
- Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understating and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 156:1050–1057
- Streeter JG, Lohnes DG, Fioritto RJ (2001) Pattern of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant Cell Environ.* 24:429-438
- Sudhakar C, Veeranagamallaiah G, Nareshkumar A, Sudhakarbabu O, Sivakumar M, Pandurangaiah M, Kiranmai K, Lokesh U (2015) Polyamine metabolism influences antioxidant defense mechanism in foxtail millet (*Setaria italica* L.) cultivars with different salinity tolerance. *Plant Cell Reports* 34:141-156
- Szöllősi R (2014) Chapter 3 - Superoxide Dismutase (SOD) and Abiotic Stress Tolerance in Plants: An Overview. In Parvaiz A (ed) *Oxidative Damage to Plants*, Academic Press, San Diego, 2014, pp 89-129
- Takahashi T, Kakehi JI (2010) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann. Bot.* 105:1–6
- Talaat NB, Shawky BT (2013) Modulation of nutrient acquisition and polyamine pool in salt-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Acta Physiologiae Plantarum* 35(8):2601-2610
- Talbi S, Romero-Puertas MC, Hernández A, Terrón L, Ferchichi A, Sandalio LM (2015) Drought tolerance in a Saharian plant *Oudneya africana*: Role of antioxidant defences. *Environmental and Experimental Botany* 111:114-126

- Tambussi EA (2004). Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. Departamento de Biología Vegetal. Barcelona, Universidad de Barcelona.
- Tausz M, Sircelj H, Dieter G (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany* 55:1955-1962
- Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55:2131–2145
- Troeh ZI, Loynachan TE (2009) Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Species in Soils of Cultivated Soybean Fields. *Agronomy Journal* 101(6):1453-1462
- Urcelay C, Díaz S, Gurvich DE, Chapin III FS, Cuevas E, Domínguez LS (2009) Mycorrhizal community resilience in response to experimental plant functional type removals in a woody ecosystem. *J Ecol* 97:1291-1301
- van der Heijden MGA, Wiemken A, Sanders IR (2003) Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytol* 157: 569–578
- Veresoglou SD, Meneses G, Rillig M (2012) Do arbuscular mycorrhizal fungi affect allometric partition of host plant biomass to shoots and roots? A meta-analysis of studies from 1990 to 2010. *Mycorrhiza* 22:227-235
- Verbruggen E, Kiers ET (2010) Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems. *Evol Appl* 3:547-560
- Vogelsang K, Reynolds HL, Bever J (2006) Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytol* 172: 554-562
- Wagg C, Jansa J, Schmid B, Van der Heijden MGA (2011) Belowground biodiversity effects of plant symbionts support aboveground productivity. *Ecol Lett* 14:1001-1009
- Wang Y, Beath M, Chalifoux M, Ying J, Uchacz T, Sarvas C, Griffiths R, Kuzma M, Wan J, Huang Y (2009) Shoot-specific down-regulation of protein farnesyl transferase (alpha-subunit) for yield protection against drought in canola. *Mol Plant* 2:191-200
- Wang X, Pan Q, Chen F, Yan X, Liao H (2011) Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza* 21:173–181
- Wu QS, Xia RX, Zou YN (2006a) Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. *J Plant Physiol* 163:1101–1110
- Wu QS, Zou YN, Xia RX (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
- Wu QS, Zou YN (2009) Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. *Plant, Soil and Environment* 55(10):436-442
- Wu QS, Zou YN, Xia RX, Wang MY (2007a) Five *Glomus* species affect water relations of *Citrus tangerine* during drought stress. *Bot Stud* 48:147-154

- Wu QS, Xia RX, Zou YN, Wang GY (2007b) Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings to drought stress. *Acta Physiol Plant* 29:543–549
- Wu QS, Srivastava AK, Zou YN (2013) AMF-induced tolerance to drought stress in citrus: A review. *Scientia Horticulturae* 164:77-87
- Yang JC, Loewus FA (1975) Metabolic conversion of L-ascorbic-acid to oxalic-acid in oxalate-accumalating plants. *Plant Physiology* 56:283-285
- Zacchini M, de Agazio M (2004) Spread of oxidative damage and antioxidative response through cell layers of tobacco callus after UV-C treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:445–450
- Zhang Y, Zhong CL, Chen Y, Chen Z, Jiang QB, Wu C, Pinyopusarerk K (2010) Improving drought tolerance of *Casuarina equisetifolia* seedlings by arbuscular mycorrhizas under glasshouse conditions. *New Forests* 40:261–70
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53:247-273
- Zhu X, Song F, Liu S (2011) Arbuscular mycorrhiza impacts on drought stress of maize plants by lipid peroxidation, proline content and activity of antioxidant system. *J Food Agric Environ* 9:583–587

ANEXO DE TÉCNICAS

Contenido

Anexo A: Estimación de los peróxidos de lípidos evaluados como contenido en malondialdehído (MDA)	125
Anexo B: Medición de glutatión total y reducido	127
Anexo C: Tinción de raíces y cuantificación de micorrizas	130
Anexo D: Estimación del contenido en clorofila total	132
Anexo E: Estimación del contenido en azúcares solubles.....	133
Anexo F: Estimación del contenido en prolina	135
Anexo G: Medición de ascorbato total y reducido	137
Anexo H: Extracción de material para la medición de enzimas antioxidantes	140
Anexo I: Técnica de medición de actividad total de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD)	141
Anexo J: Técnica de medición de actividad total de la enzima antioxidante Catalasa (CAT)	144
Anexo K: Técnica de cuantificación de proteínas	146
Anexo L: Protocolo de geles discontinuos- no desnaturalizantes	148
Anexo M: Geles de actividad de Superóxido dismutasa – Geles no desnaturalizantes ...	151
Anexo N: Geles de actividad de Ascorbato peroxidasa – Geles no desnaturalizantes.....	154
Anexo O: Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario.....	156
Anexo P: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) – Enzimas del sistema antioxidante y del metabolismo de las poliaminas	159

Anexo A: Estimación de los peróxidos de lípidos evaluados como contenido en malondialdehído (MDA)

Preparación de los reactivos

TCA 0,1%	Reactivo	Cantidad
	TCA 100%	0,1 ml
	Se completa a 100 ml con agua destilada	
TCA 20%	Reactivo	Cantidad
	TCA 100%	20 ml
	Se completa a 100 ml con agua destilada	
TCA 20% + TBA 0,5%	Reactivo	Cantidad
	TCA 100%	20 ml
	Ácido tiobarbitúrico	0,5 g
	Se completa a 100 ml con agua destilada	

Procedimiento

Se molieron con mortero y aire líquido 100 mg aproximadamente de hojas con 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Los homogenatos fueron centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos. El cromógeno se formó mezclando 0,5 ml del sobrenadante con 0,5 ml de una solución de TCA 20% y ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. La mezcla se incubó a 92 °C durante 20 minutos. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos cuando alcanzaron la temperatura ambiente y este sobrenadante se utilizó para las lecturas espectrofotométricas de absorbancia (Abs) a 532, 600 and 440 nm (Heath and Packer 1968). La lectura a 600 nm se utiliza para descontar la turbidez de la muestra y la lectura a 440 nm se incluyó 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 *et al.* (Hodges, *et al.* 1999).

Mezcla de reacción

- Problema (+TBA): 0,5 ml de muestra + 0,5 ml de TCA 20% / TBA 0,5%
- Testigo (-TBA): 0,5 ml de muestra + 0,5 ml de TCA 20%

Blancos:

- Problema (+TBA): 0,5 ml de TCA 0,1% + 0,5 ml de TCA 20% / TBA 0,5%
- Testigo (-TBA): 0,5 ml de TCA 0,1% + 0,5 ml de TCA 20%

Cálculos posteriores

$$A = [(Abs\ 532_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})]$$

$$B = [(Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) * 0,0571]$$

$$\text{Equivalentes de MDA (nmol/ml)} = [(A-B) / \epsilon] * 10^6$$

$$\text{MDA (nmoles/mg)} = \frac{\text{equivalentes MDA} \times \text{Vol. extracción} \times \text{dilución}}{\text{PF}}$$

Vol. de extracción: en este caso es 1,5 ml.

Dilución: Vol. Final de reacción/ vol. Alícuota (en este caso 1/0,5=2)

ϵ : Coeficiente de extinción molar $155\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$

PF (mg): peso fresco de muestra, en este caso va a ser entre 100 y 150 mg.

10^6 : para convertir de mM a nmoles/ml

Bibliografía

Heath R, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast.I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys 125(1):189-198

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207:604-611

Anexo B: Medición de glutatión total y reducido

Fundamento

Los tioles reaccionan con el compuesto ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) o DTNB, rompiendo el puente disulfuro para dar 3-tio-6-nitrobenzoato (TNB⁻) que se ioniza al dianión TNB²⁻ en agua a pH neutro y alcalino. Esta reacción es rápida y estequiométrica, liberándose un ion por cada tiol. El TNB²⁻ tiene un color amarillo lo que permite su cuantificación en un espectrofotómetro por la medición de la absorbancia de luz visible a 412 nm.

Preparación de los reactivos

TCA 3%	Reactivo	Cantidad
	TCA 100%	3 ml
	Se completa a 100 ml con agua destilada	
Cloruro de magnesio 60 mM	Reactivo	Cantidad
	MgCl ₂	5,71 mg
	Se completa a 1 ml con agua destilada	
NADPH 1mM	Reactivo	Cantidad
	NADPH	1,7 mg
	Se completa a 2 ml con Buffer Tris-Cl 25 mM pH8	
GSH 100 mM	Reactivo	Cantidad
	GSH	0,0307 g
	Se completa a 1 ml con TCA 3%	
EDTA 20 mM	Reactivo	Cantidad
	EDTA	0,37224 g
	Se completa a 50 ml con agua destilada	
Buffer Tris-Cl 2 M pH 8	Reactivo	Cantidad
	Tris Base	12,1 g
	Se lleva a pH 8 con HCl y se completa a 50 ml con agua destilada	
DTNB 5 mM	Reactivo	Cantidad
	DTNB	2 mg
	Se completa a 1 ml con Buffer Tris-Cl 1 M pH 8	
Mix GR	Reactivo	Cantidad
	Enzima GR 453,6 U/ml	0,1 µl
	MgCl ₂ 60 mM	5 µl
	NADPH 1 mM	15 µl
	EDTA 20 mM	5 µl
	Buffer Tris-Cl 2 M pH8	73 µl

Procedimiento

Se molieron con mortero y aire líquido 100 mg aproximadamente de hojas con 0,75 ml de ácido tricloroacético (TCA) 3%. Los homogenatos fueron centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio.

Se prepararon las mezclas de reacción para la medición de glutatión total (GST) y de glutatión reducido (GSH) de la siguiente manera:

	GST	GSH
Muestra	90 µl	90 µl
Mix GR	90 µl	//
Buffer Tris-Cl 1M pH8	//	120 µl
Agua	105 µl	75 µl

Estas mezclas de reacción se incubaron a 28°C durante 30 minutos. A continuación, sólo las mezclas de medición de GST se incubaron a 90°C durante 3 minutos, con el objetivo de inactivar la enzima glutatión reductasa (GR). Luego se agregaron 15 µl de 5-5'-ditiobis(-2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 5 mM, se incubaron las mezclas 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 412 nm. El contenido en glutatión se determinó por medio de una curva con estándares para GST y otra para GSH. Para la construcción de dicha curva se utilizó GSH 0.1 mM preparado en TCA 3% y se reemplazó el volumen de muestra por 90 µl de las distintas diluciones de GSH en las mezclas de reacción. Para el blanco de muestra se utilizaron 90 µl de TCA 3%.

Concentración de GSH (µM)	GSH 0,1 mM	TCA 3%
5	5 µl	95 µl
10	10 µl	90 µl
20	20 µl	80 µl
30	30 µl	70 µl
40	40 µl	60 µl

Cálculos posteriores

De las curvas con estándares se obtuvieron 2 funciones lineales que relacionan la absorbancia a 412 nm con la concentración de glutatión en la mezcla de reacción:

$$\text{Abs} = a \times [\text{GSH}] + b$$

La concentración de GSH o GST en la mezcla de reacción es:

$$[\text{GSH o GST}] = (\text{Abs} - b) / a$$

La concentración de la GSH o GST en la muestra analizada se calculó de la siguiente manera:

$$\text{GSH o GST (nmol/g)} = \frac{([\text{GSH o GST}] \times \text{Vol. reacción} \times \text{Vol. Extracción})}{(\text{Vol. alícuota} \times \text{PF} \times 1000)}$$

Vol. Reacción (μl): volumen de la mezcla de reacción, que en este caso va a ser 300.

Vol. Extracción (μl): volumen de extracción, que en este caso va a ser 750.

Vol. alícuota (μl): volumen de alícuota de extracto utilizada en la mezcla de reacción, que en este caso es 90.

PF (g): peso fresco de la muestra que en este caso va a ser alrededor de 0,1.

Bibliografía

Lascano R, Antonicelli GE, Luna CM, Melchiorre M, Gomez LD, Racca RW, Trippi VS, Casano LM (2001) Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Austr J. Plant Physiol.* 28:1095-1102

Anexo C: Tinción de raíces y cuantificación de micorrizas

Preparación de las soluciones

KOH 10%	Reactivo	Cantidad
	KOH	10 g
	A 100 ml de agua destilada agregar lentamente mientras se mezcla la droga sólida.	
HCl 1%	Reactivo	Cantidad
	Agua destilada	99 ml
	HCl	1 ml
Azul tripán	Reactivo	Cantidad
	Ácido láctico	475 ml
	Azul tripán	0,03 g
	Se completa a 500 ml con agua destilada y se conserva a temperatura ambiente en frasco color caramelo.	

Procedimiento

Las raíces seleccionadas fueron aclaradas colocándolas en una solución de KOH 10% e incubándolas a 80° C en baño térmico durante 20 min. Luego, fueron enjuagadas en agua corriente y colocadas en una solución de HCl al 1%, incubándolas a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se descartó el HCl y se colocó en la solución de Azul Tripán. Después de una incubación en baño térmico a 90° C durante 20 minutos, las raíces se enjuagaron con agua corriente y se conservaron en ácido láctico.

El porcentaje de micorrización de las diferentes muestras se determinó mediante la técnica de Magnified intersection method (McGonigle et al., 1990). Con tal fin se colocaron fragmentos de raíz en paralelo en portaobjetos con PVLG, y estos preparados semipermanentes se observaron usando un microscopio óptico (Olympus Optical, Modelo BX40F-3) con un aumento de 200X. Se realizaron 3 preparados por cada muestra, y en cada uno de ellos se contaron entre 80 y 100 intersecciones (I) entre el campo visual y un fragmento de raíz.

Se calculó la colonización total, por arbusculos y por vesículas:

Colonización total (%) = 100 * (n° de I con alguna estructura micorrícica/ n° de I totales)

Colonización por arbusculos o vesículas (%) = 100 * (n° de I con arbusculo o vesícula / n° de I con alguna estructura micorrícica)

Bibliografía

Phillips JM, Hayman DS (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

McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115:495–501

Anexo D: Estimación del contenido en clorofila total

Procedimiento

Se realizó la extracción del material foliar (50 mg) en etanol 80% (10 ml) con una incubación de 15 minutos a 80°C en baño térmico. Se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 652 nm. La concentración en clorofila total (CIT) fue calculada de acuerdo a Arnon (1949).

Cálculos posteriores

$$\text{CIT (mg clorofila/ mg PF)} = \frac{\text{Abs}_{652} \times \text{Vol. ext}}{34,5 \times \text{PF}}$$

Vol. Ext (ml): volumen del extracto (en este caso sería 10 ml)

PF (mg): peso fresco de muestra de hoja (en este caso sería 50 mg)

Bibliografía

Modificado a partir de:

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24:1–15

Anexo E: Estimación del contenido en azúcares solubles

Fundamento

La reacción de antrona es una prueba general para hidratos de carbono. El ácido sulfúrico concentrado hidroliza enlaces glicosídicos para dar monosacáridos que pueden ser luego deshidratados dando furfural y sus derivados. Estos productos se combinan luego con antrona (10-ceto-9, 10-dihidroantraceno) dando un complejo azul-verdoso.

Preparación de reactivos

	Reactivo	Cantidad
Reactivo de antrona 0,2%	Antrona	0,2 g
	H ₂ SO ₄ concentrado	100 ml
	Prepararlo en el momento en frasco color caramelo.	

Procedimiento

Se utilizaron los extractos donde se midió el contenido en clorofila total (50 mg de hoja en 10 ml de etanol 80 %; 15 minutos a 80 °C). Se prepararon 0,5 ml de muestra diluida mezclando 0,2 ml de extracto con 0,3 ml de agua destilada.

Se prepararon las mezclas de reacción con 0,5 ml de muestra diluida y 1 ml de Reactivo de Antrona, trabajando en hielo y agregando el reactivo de Antrona lentamente por las paredes del tubo por ser una reacción exotérmica.

Se mezcló con vortex y se hizo hervir durante 5 minutos. Se enfrió en hielo y se leyó la absorbancia a 620 nm (en cubeta de vidrio y usando pipeta de vidrio).

El contenido en azúcares solubles se determinó por medio de una curva con estándares utilizando una solución de glucosa 1 mg/ml para la preparación de las diluciones.

[Glucosa] (µg/ml)	Glucosa 1 mg/ ml (µl)	Agua (µl)
Blanco	-----	500
20	10	490
40	20	480
60	30	470
80	40	460

De la curva con estándares se obtuvo una función lineal que relaciona la absorbancia a 620 nm con la concentración de azúcares solubles (Az) en la mezcla de reacción:

$$Abs_{620} = a \times [Az] + b$$

La concentración de Az en la mezcla de reacción es:

$$[Az] = (Abs - b) / a$$

La concentración de azúcares solubles en la muestra analizada se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Az (mg/g PF)} = \frac{([Az] \times \text{Vol. Extracción})}{(\text{Dilución de muestra} \times \text{PF})}$$

[Az]: la concentración obtenida de la curva con estándares ($\mu\text{g/ml}$).

Dilución de muestra: Volumen de extracto / volumen total de la dilución (0,2/0,5)

Vol. Extracción (ml): volumen de extracción, que en este caso va a ser 10.

PF (g): peso fresco de la muestra que en este caso va a ser alrededor de 0,05.

Bibliografía

Modificado a partir de:

Mokrasch LC (1954) Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. J BiolChem 208:55-59

Anexo F: Estimación del contenido en prolina

Preparación de reactivos

Ácido sulfosalicílico 3%	Reactivo	Cantidad
	Ácido sulfosalicílico	3 g
	Se completa a 100 ml con agua destilada	
Ácido fosfórico 6 M	Reactivo	Cantidad
	Ácido fosfórico concentrado (85%)	34,6 ml
	Se completa a 100 ml con agua destilada	
Ninhidrina ácida	Reactivo	Cantidad
	Ninhidrina	1,25 g
	Ácido acético glacial	30 ml
	Ácido fosfórico 6 M	20 ml
	Se prepara en el momento. Disolver usando calentamiento y agitación.	

Procedimiento

Se molieron con mortero y aire líquido 100 mg aproximadamente de hojas con 1,5 ml de ácido sulfosalicílico 3%. Los homogenatos fueron centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante de pasó a un tubo limpio.

El contenido en prolina se determinó por medio de una curva con estándares usando dos concentraciones de prolina para la preparación de las distintas diluciones: 1 mM y 5 mM.

[Prolina] (mM)	Prolina 1 mM (μ l)	Prolina 5 mM (μ l)	Acido Sulfosalicílico 3% (μ l)
Blanco	//	//	500
0,015	7,5	//	492,5
0,03	15	//	485
0,06	//	6	494
0,125	//	12,5	487,5
0,25	//	25	475
0,50	//	50	450

Se prepararon las mezclas de reacción con 0,5 ml de muestra (o dilución de prolina de la curva de estándares), 0,5 ml de ácido acético glacial y 0,5 ml de Ninhidrina ácida. Se mezcló con vortex y se incubó a 100 °C durante 1 hora. Se dejó enfriar en baño de hielo y se agregó 1 ml de tolueno a cada tubo.

Para la lectura en espectrofotómetro, se mezcló con vortex hasta la formación de una emulsión, luego se dejó reposar hasta la separación de las 2 fases y posteriormente se tomó la fase superior de tolueno con coloración rosada-fucsia que es proporcional a la cantidad de prolina para la lectura de la absorbancia a 520 nm en cubeta de vidrio.

Si el valor de absorbancia medido para una muestra es superior al valor más alto de la curva de calibración se debe agregar más tolueno, mezclar y volver a medir la fase de tolueno.

Cálculos posteriores

De la curva con estándares se obtuvo una función lineal que relaciona la absorbancia a 520 nm con la concentración de prolina (Pro) en la mezcla de reacción:

$$\text{Abs}_{520} = a \times [\text{Pro}] + b$$

La concentración de Pro en la mezcla de reacción es:

$$[\text{Pro}] = (\text{Abs}_{520} - b) / a$$

La concentración de prolina en la muestra analizada se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Prolina } (\mu\text{moles/g PF}) = \frac{[\text{Pro}] \times \text{Vol. Extracción}}{\text{PF}}$$

[Pro]: la concentración obtenida de la curva con estándares (mM).

Vol. Extracción (ml): volumen de extracción, que en este caso va a ser 1,5.

PF (g): peso fresco de la muestra que en este caso va a ser alrededor de 0,1.

Para expresarlo en mg/g PF:

$$\text{Prolina (mg/g PF)} = \frac{\text{Prolina } (\mu\text{moles/g PF}) \times 115,5}{1000}$$

Tener en cuenta que si en lugar de 1 ml de tolueno, agrego otro volumen, debo multiplicar los valores de prolina por esos valores.

Bibliografía

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39:205–207

Anexo G: Medición de ascorbato total y reducido

Fundamento

Este ensayo se basa en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por ascorbato en solución ácida. El Fe^{2+} luego forma complejos con bipyridyl, dando un color rosa que absorbe a 525 nm. El ascorbato total se determina por la reducción del dihidroascorbato a ascorbato por ditiotreititol (DTT).

Preparación de los reactivos

TCA 3%	Reactivo	Cantidad
	TCA 100%	3 ml
	Se completa a 100 ml con agua destilada	
Bipyridyl 4%	Reactivo	Cantidad
	Bipyridyl	200 mg
	Se completa a 5 ml con etanol 70%	
DTT 10 mM	Reactivo	Cantidad
	DTT	1,5 mg
	Se completa a 1 ml con agua destilada	
NEM 0,5%	Reactivo	Cantidad
	NEM	5 mg
	Se completa a 1 ml con agua destilada	
Cloruro férrico 3%	Reactivo	Cantidad
	FeCl_3	300 mg
	Se completa a 10 ml con agua destilada	
Fosfato diácido de potasio 75 mM	Reactivo	Cantidad
	KH_2PO_4	0,51 g
	Se completa a 50 ml con agua destilada	
Fosfato dibásico de potasio 75 mM	Reactivo	Cantidad
	K_2HPO_4	0,65 g
	Se completa a 50 ml con agua destilada	
Buffer fosfato de potasio 75 mM pH 7	A la solución de K_2HPO_4 75 mM ir agregando la solución de KH_2PO_4 75 mM hasta llegar a pH 7	
Mix	Reactivo	Cantidad
	TCA 3%	100 μl
	Acido fosfórico 50%	100 μl

	Bipyridyl 4%	100 µl
Ácido ascórbico 100 mM	Reactivo	Cantidad
	Ácido ascórbico	17,6 mg
	Se completa a 1 ml con TCA 3%	

Procedimiento

Se molieron con mortero y aire líquido 100 mg aproximadamente de hojas con 0,75 ml de ácido tricloroacético (TCA) 3%. Los homogenatos fueron centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante de pasó a un tubo limpio.

Se prepararon las mezclas de reacción para la medición de ascorbato total y de ascorbato reducido de la siguiente manera:

	Ascorbato total	Ascorbato reducido
Muestra	75 µl	75 µl
Buffer fosfato de potasio 75 mM pH 7	25 µl	25 µl
DTT 10 mM	25 µl	//
Agua	//	50 µl

Estas mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se adicionaron 25 µl de NEM 0.5% sólo las mezclas de medición de ascorbato total y 300 µl de Mix a ambas reacciones. Por último, se agregaron 50 µl de cloruro férrico 3% a todas las mezclas de reacción que luego se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Se midió la absorbancia a 525 nm.

El contenido en ascorbato se determinó por medio de una curva con estándares para la medición de ascorbato total y otra para ascorbato reducido, utilizando una solución de ácido ascórbico 1 mM preparado en TCA 3% y reemplazando el volumen de muestra por 75 µl de las distintas cantidades de ácido ascórbico. Para los blancos de muestra se utilizaron 75 µl de TCA 3% en lugar de la muestra.

Cantidad (nmol)	Acido ascórbico 1 mM	TCA 3%
5	5 µl	70 µl
10	10 µl	65 µl
15	15 µl	60 µl
20	20 µl	55 µl
25	25 µl	50 µl

Cálculos posteriores

De las curvas con estándares se obtuvieron 2 funciones lineales que relacionan la absorbancia a 525 nm con la cantidad de ascorbato en la mezcla de reacción:

$$\text{Abs} = a \times \text{Ascorbato} + b$$

La cantidad de ascorbato en la mezcla de reacción es:

$$\text{Ascorbato} = (\text{Abs} - b) / a = \text{Asc}$$

La concentración de ascorbato en la muestra analizada se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Ascorbato (nmol/g)} = \frac{(\text{Asc} \times \text{Vol. Extracción})}{(\text{Vol. alícuota} \times \text{PF})}$$

Vol. Extracción (μl): volumen de extracción, que en este caso va a ser 750.

Vol. alícuota (μl): volumen de alícuota de extracto utilizada en la mezcla de reacción, que en este caso es 75.

PF (g): peso fresco de la muestra que en este caso va a ser alrededor de 0,1.

Bibliografía

Modificado a partir de:

Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochem J.* 210(3):899-903

Anexo H: Extracción de material para la medición de enzimas antioxidantes

Preparación de los reactivos

Fosfato diácido de potasio 0,5 M	Reactivo	Cantidad
	KH ₂ PO ₄	17 g
	Se completa a 250 ml con agua destilada	
Fosfato dibásico de potasio 0,5 M	Reactivo	Cantidad
	K ₂ HPO ₄	21,8 g
	Se completa a 250 ml con agua destilada	
Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4	A la solución de K ₂ HPO ₄ 0,5 M ir agregando la solución de KH ₂ PO ₄ 0,5 M hasta llegar a pH 7,4	
Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) tetra sódico 10 mM	Reactivo	Cantidad
	EDTA	0,760 g
	Se completa a 200 ml con agua destilada	
Buffer de extracción 0.05 M	Reactivo	Cantidad
	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4	1 ml
	EDTA 10 mM	1 ml
	Agua destilada	8 ml

Procedimiento

Se molieron con mortero y aire líquido 100 mg aproximadamente de hojas con 0,75 ml de buffer de extracción 0,05 M y una cucharadita de PVPP (polivinil pirrolidona), el cual actúa como atrapador de radicales libres que pudieran oxidar los fenoles de la muestra y luego precipita en la centrifugación. Se homogenizaron, se colocaron en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante de pasó a un tubo limpio y se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Luego se mantuvieron todas las muestras en hielo.

Para la determinación de la composición isoenzimática de las enzimas superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa, mediante geles de actividad ND-PAGE, se utilizó el mismo buffer de extracción (Buffer fosfato de potasio 0.05 M pH 7,4) con el agregado de 5 mM de ácido ascórbico (PM: 198,1).

Anexo I: Técnica de medición de actividad total de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD)

Fundamento

La luz ultravioleta (UV) influye sobre la riboflavina, la cual se oxida reduciendo el oxígeno a ión superóxido. Éste, a su vez, en presencia de metionina como catalizador, se oxida reduciendo el Nitro Blue Tetrazolium (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

EDTA 1 μ M	Reactivo	Cantidad
	EDTA 10 mM	2,5 μ l
	Agua destilada	25 ml
Metionina 130 mM	Reactivo	Cantidad
	Metionina	48,5 mg
	Se completa a 2,5 ml con agua destilada. Debe prepararse en el momento.	
NBT 750 μ M	Reactivo	Cantidad
	NBT	1,5 mg
	Se completa a 2,5 ml con agua destilada. Debe prepararse en el momento.	
Riboflavina 40 μ M	Reactivo	Cantidad
	Riboflavina	3,8 mg
	Llevar a 250 ml con agua destilada. Debe prepararse en el momento.	

Se preparó una mezcla general (Mix) de los reactivos de la cual se agregaron 400 μ l en el momento de la lectura. Esta mezcla se debe mantener en oscuridad, sin ponerla en hielo porque precipita.

Reactivo	Cantidad
Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,8	2,5 ml
EDTA 1 μ M	2,5 ml
Metionina 130 mM	2,5 ml
NBT 750 μ M	2,5 ml

Mezcla de reacción

Tratamiento	Mix	Riboflavina	Extracto vegetal	Agua 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	5 – 30 μ l	470-495 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 volumen final en la cubeta. Se expuso a luz UV durante 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 0,25. La Riboflavina debe agregarse como último reactivo, mezclando bien, y colocando en la luz UV inmediatamente.

3°- La concentración óptima del extracto vegetal debió determinarse haciendo una curva. Se eligió uno de los tubos problema, se colocó 5, 10, 20 y 30 μ l de muestra, con la concentración de Riboflavina elegida en el paso 2, 400 μ l 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, que debe dar 0,25 aprox.

La densidad óptica de los problemas debe ser superior a 0,030. Elegir la cantidad de muestra problema para que la DO se encuentre entre 0,25 y 0,03.

4°- 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 posteriores

Una unidad SOD (USOD) se define como la cantidad de enzima que causa el 50% de inhibición de la reducción fotoquímica del NBT.

USOD = (DO Testigo / 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.

$$\text{USOD/g} = \frac{(\text{USOD} * \text{Vol. extracción})}{(\text{PF} * \text{Vol. alícuota})}$$

Vol. Extracción (μl): volumen de extracción, que en este caso va a ser 750.

Vol. alícuota (μl): volumen de alícuota de extracto utilizada en la mezcla de reacción, que en este caso va a estar entre 5 y 30.

PF (g): peso fresco de la muestra que en este caso va a ser alrededor de 0,1.

La actividad SOD se refiere finalmente a 1 mg de proteína presente en la muestra:

$$\text{USOD/mg de proteína} = \frac{\text{USOD/g}}{\text{Proteína en extracto}}$$

Proteína en extracto (mg de proteína/ g de peso fresco): la cuantificación de proteína en los extractos se realizó por el método de Bradford (Anexo K)

Bibliografía

Beauchamp CO, Fridovich I (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. Biochim Biophys Acta 317:50-64

Anexo J: Técnica de medición de actividad total de la enzima antioxidante Catalasa (CAT)

Fundamento

En el espectrofotómetro se mide la cinética de disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El extracto vegetal contiene CAT, la cual reacciona con el H_2O_2 . A medida que aumenta la cantidad de enzima CAT en el extracto, aumenta la velocidad de reducción del H_2O_2 y se observa una mayor pendiente de caída de DO.

Preparación de los reactivos

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 molar: $38 M^{-1} \times cm^{-1}$

Molaridad H_2O_2 puro = $38 / \text{Absorbancia a 240 nm}$

Alícuota a extraer = $(\text{Vol. Solución buscada} \times [H_2O_2] \text{ buscada}) / ([H_2O_2] \text{ puro}) = (10 \text{ ml.} \times 0,050 \text{ M}) / M H_2O_2 \text{ puro}$

Mezcla de reacción

Tratamientos	Agua destilada	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4	Extracto vegetal	H_2O_2 50 mM
Blanco	900 μ l	100 μ l	//	//
Testigo	800 μ l	100 μ l	//	100 μ l
Problema		100 μ l	10 – 50 μ l	100 μ l

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.

Procedimiento

Se mide en cubetas de cuarzo. Se trabaja con una longitud de onda de 240 nm (coeficiente de extinción molar $43,6 M^{-1} cm^{-1}$). Se mide durante 30 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 se debe modificar la concentración de H_2O_2 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 μ l de muestra. Se

comprobó que ante un aumento del extracto, aumenta el delta de absorbancia a 240 nm (ΔA_{240}). Se buscó seleccionar una alícuota de extracto en la cual la relación con el delta sea lineal, esto es que los aumentos de concentración del extracto lleven a un aumento directo en la caída de la DO. De esta manera nos aseguramos estar dentro de la curva de sensibilidad de la técnica.

Cálculos posteriores

CAT (mmoles H_2O_2 /min x g) = $\frac{(\Delta A_{240} \cdot \text{min}^{-1}) \times \text{Vol. Extracción} \times \text{Dilución}}{(43,6 \times \text{peso fresco de muestra})}$

(43,6 x peso fresco de muestra)

$\Delta A_{240} \cdot (\text{min}^{-1})$: Es la diferencia entre la densidad óptica inicial y la final a 240 nm en un min (si lo evaluamos en 30 segundos, debemos multiplicar por 2).

Vol. Extracción (ml): en este caso 0,75.

Dilución: Volumen final de reacción / volumen alícuota (1000 μl / entre 10 y 50 μl)

43,6 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$: Coeficiente de extinción molar (factor de relación entre DO y concentración)

Peso fresco de muestra (g): 0,1 g.

La actividad CAT se refiere finalmente a 1 mg de proteína presente en la muestra:

CAT ($\mu\text{moles } H_2O_2$ /min x mg de proteína) = $\frac{\text{CAT (mmoles } H_2O_2 \text{ /min x g)} \times 1000}{\text{Proteína en extracto}}$

Proteína en extracto (mg de proteína/ g de peso fresco): la cuantificación de proteína en los extractos se realizó por el método de Bradford (Anexo K)

Bibliografía

Aebi H (1984). Catalase in vitro. Methods Enzymol 105:121-126

Anexo K: Técnica de cuantificación de proteínas

Fundamento

El método de Bradford es un método de determinación de proteínas que involucra la unión del colorante azul brillante de Coomasie a las proteínas. Este colorante 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 en la muestra.

Se utilizó un protocolo Microassay que permite cuantificar entre 1 a 10 μg de proteínas en un volumen total de reacción de 300 μl en una placa de elisa.

Preparación de los reactivos

	Reactivo	Cantidad
Reactivo de Coomasie	Azul brillante de Coomasie (G-250)	10 mg
	Etanol 95%	5 ml
	Ácido fosfórico 85% (p/v)	10 ml
	Llevar a 100 ml con agua destilada. Filtrar con papel Whatman N°1. Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.	

Procedimiento

Se preparó una solución de Albúmina sérica bovina (BSA) de 1 mg/ml. A partir de esta solución se prepararon las distintas concentraciones de BSA para construir una curva estándar, con las que se compararon las muestras para determinar la concentración de proteína total.

Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. de estándar (μl)	Fuente de estándar	Vol. de agua
25	20	BSA 1 mg/ml	780
20	20	BSA 1 mg/ml	980
15	12	BSA 1 mg/ml	788
10	500	Tubo 2	500
5	500	Tubo 4	500
2.5	500	Tubo 5	500
1.25	500	Tubo 6	500

Las mezclas de reacción se prepararon por triplicado en una placa de elisa:

Tratamientos		Reactivo de Coomasie
Blanco	150 µl de agua	150 µl
Estándar (1,25 – 25 µg/ml)	150 µl de estándar preparado	150 µl
Muestra	150 µl de extracto	150 µl

Se mide la absorbancia a 595 nm en un lector de elisa luego de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente.

Si la concentración de la muestra supera a la máxima concentración de la curva se debe hacer una dilución de la muestra y utilizar 150 µl de esta dilución para una nueva medición.

De la curva con estándares se obtuvo una función lineal que relaciona la absorbancia a 595 nm con la concentración de proteína en la mezcla de reacción:

$$\text{Abs}_{595 \text{ nm}} = a \times [\text{proteína}] + b$$

La concentración de proteína en la mezcla de reacción es:

$$[\text{proteína}] = (\text{Abs}_{595 \text{ nm}} - b) / a$$

La concentración de proteína en la muestra analizada se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Proteína (mg/g)} = \frac{([\text{proteína}] \times \text{Vol. Extracción} \times \text{dilución})}{\text{PF}}$$

[proteína](µg/ml): concentración de proteína en la mezcla de reacción (obtenida de la curva de estándares)

Vol. Extracción (ml): volumen de extracción, que en este caso va a ser 0,75.

Dilución: Dilución de la muestra en el caso que el valor de $\text{Abs}_{595 \text{ nm}}$ sea mayor al correspondiente al estándar de mayor concentración en la curva (150 µl/ volumen alícuota de extracto)

PF (g): peso fresco de la muestra que en este caso va a ser alrededor de 0,1.

Bibliografía

Modificado a partir de:

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254

Sedmark J, Grossberg JE (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for proteins using Coomasie Brilliant Blue G-250. *Anal Biochem* 79:544-552

Anexo L: Protocolo de geles discontinuos- no desnaturalizantes

Preparación de los geles

Preparación de soluciones stock

Buffer de corrida 10X	Reactivo	Cantidad
	Tris base	30 g
	Glicina	144 g
	Se completa a 1 litro con agua destilada	
Buffer de separación Tris-Cl 1,3 M pH 8,8	Reactivo	Cantidad
	Tris base	18,15 g
	Se disuelve en 50 ml de agua destilada, se ajusta el pH con HCl y luego se completa a 100 ml con agua destilada.	
Buffer de concentración Tris-Cl 0,22 M pH 7	Reactivo	Cantidad
	Tris base	2,66 g
	Se disuelve en 50 ml de agua destilada, se ajusta el pH con HCl y luego se completa a 100 ml con agua destilada.	
Acrilamida / Bisacrilamida 30:0,8% para el gel de separación	Reactivo	Cantidad
	Acrilamida	30 g
	Bis acrilamida	0,8 g
	Se completa a 100 ml con agua destilada y se conserva en heladera.	
Acrilamida / Bisacrilamida 10:2% para el gel de concentración	Reactivo	Cantidad
	Acrilamida	10 g
	Bis acrilamida	2
	Se completa a 100 ml con agua destilada y se conserva en heladera.	
Azul de bromofenol	Reactivo	Cantidad
	Azul de bromofenol	0,003 g
	Se completa a 10 ml con agua destilada y se conserva en heladera cubierto con papel aluminio.	
Buffer muestra 4X	Reactivo	Cantidad
	Buffer de concentración	2 ml
	Glicerol	2 ml
	Azul de bromofenol	2 ml
	Conservar a temperatura ambiente cubierto con papel aluminio	

	Reactivo	Cantidad
Persulfato de amonio (APS) 10%	Persulfato de amonio	1 g
	Se completa a 10 ml con agua destilada. Se separa en alícuotas en tubos epp que se mantienen a -20°C.	

Preparación de las soluciones de uso

	Reactivo	Cantidad
Gel de separación 11%	Agua	2,18 ml
	Acril/Bis 30:0,8%	2,93 ml
	Buffer separación	2 ml
	Glicerol	0,8 ml
	En el momento de preparar el gel agregar:	
	TEMED	0,012 ml
	APS 10%	0,12 ml
	Gel de concentración	Reactivo
Agua		0,556 ml
Acril/Bis 10:2%		2 ml
Buffer concentración		1 ml
Glicerol		0,4 ml
En el momento de preparar el gel agregar:		
TEMED		0,008 ml
APS 10%		0,08 ml
Buffer de corrida 1X con 2mM de ácido ascórbico	Reactivo	Cantidad
	Buffer de corrida 10X	50 ml
	Acido ascórbico	0,198 g
	Se completa a 500 ml con agua destilada	

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 11 %

Una vez finalizada la solución, se añadieron los catalizadores APS 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 μ l) 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, se agregó 150 ml de buffer de corrida 1X con 2 mM de ácido ascórbico en el espacio entre los geles y se retiró el peine cuidadosamente. Lavar todos los pocillos ya formados con chorro suave del mismo buffer. Colocamos 200 ml de buffer corrida 1X con 2 mM de ácido ascórbico en el exterior de los geles.

Se pre corrió el gel por al menos 20 min, a amperaje constante $I=12,5$ mA por gel.

Bibliografía

Davis BJ (1962) Disc electrophoresis II—Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academy of Sciences* 121:404-427

Anexo M: Geles de actividad de Superóxido dismutasa – Geles no desnaturalizantes

Preparación de soluciones stock

Fosfato diácido de potasio 0,5 M (pH 4,33)	Reactivo	Cantidad
	KH ₂ PO ₄	17 g
	Se completa a 250 ml con agua destilada	
Fosfato dibásico de potasio 0,5 M (pH 9)	Reactivo	Cantidad
	K ₂ HPO ₄	21,8 g
	Se completa a 250 ml con agua destilada	
Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,8	A la solución de K ₂ HPO ₄ 0,5 M ir agregando la solución de KH ₂ PO ₄ 0,5 M hasta llegar a pH 7,8	
Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4	A la solución de K ₂ HPO ₄ 0,5 M ir agregando la solución de KH ₂ PO ₄ 0,5 M hasta llegar a pH 7,4	

Preparación de las soluciones de uso

Buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,4 + EDTA 1 mM + ácido ascórbico 5 mM	Reactivo	Cantidad
	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4	1 ml
	EDTA 10 mM	1 ml
	Ácido ascórbico	0,01 g
	Se completa a 10 ml con agua destilada	
Preparación de las muestras	Reactivo	Cantidad
	Extracto	X µl para la cantidad de proteína deseada
	Agua	(30 – X) µl
	Buffer muestra 4X	10 µl

Procedimiento

Se molieron 0.1 g de hoja en mortero con aire líquido. Se colocaron 0.75 ml de buffer fosfato de potasio 0.05 M pH 7,4 con el agregado de 5 mM de ácido ascórbico y una cucharadita de PVPP como se describió en el anexo H.

Realizamos la cuantificación de las proteínas en los extractos por el método de Bradford (Anexo K). En hojas de soja la concentración de proteínas estuvo alrededor de 2-6 µg por µl de extracto.

Se preparó el gel discontinuo – no desnaturalizante como se detalla en el anexo L.

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.

Las muestras a sembrar se prepararon calculando 1 parte de buffer muestra 4X y tres de muestra, diluyendo con agua hasta completar el volumen final de 40 µl. Se depositó cuidadosamente este volumen en cada pocillo, 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.

Revelado del gel

Fundamento

La luz ultravioleta (UV) influye sobre la riboflavina, la cual se oxida reduciendo el oxígeno a ión superóxido. Éste, a su vez, en presencia de TEMED como catalizador, se oxida reduciendo el Nitro Blue Tetrazolium (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 observan bandas de mayor intensidad por la inhibición de la reacción de coloración azul.

Soluciones de uso

Solución de preincubado	Reactivo	Cantidad
	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,8	8 ml
	EDTA 10 mM	8 ml
	Se completa a 80 ml con agua destilada	
Riboflavina 6,6 mM	Reactivo	Cantidad
	Riboflavina	2,5 mg
	Se completa a 1 ml con agua destilada. Puede durar 1 semana en heladera y cubierto con papel aluminio.	

	Reactivo	Cantidad	Concentración final
Solución de tñido	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,8	2 ml	0,05 M
	EDTA 10 mM	2 ml	1 mM
	TEMED	0,027 ml	0,135 %
	Riboflavina 3,3 mM	0,2 ml	66 µM
	NBT	0,01 g	0,61 mM
	Se completa a 20 ml con agua destilada		

Se colocó el gel en la solución de preincubado durante 30 min, con un cambio de solución a los 15 minutos, en oscuridad con agitador rotatorio, mientras se preparaba la solución de tñido. Se incubó el gel en la solución de tñido 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 et al. (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 tñido. Las enzimas que contienen Cu/Zn son inhibidas por KCN e inactivadas por H₂O₂, mientras que las enzimas Fe-SOD son resistentes a KCN e inhibidas por H₂O₂. Las Mn-SOD son resistentes tanto a KCN como a H₂O₂.

Bibliografía

- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44(1):276-287
- Beauchamp CO, Fridovich I (1973) Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys Acta* 317(1):50-64
- Sandalio, LM, Palma, JM y 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 y Alscher, RG (1997) Responses of Antioxidants to Paraquat in Pea Leaves (Relationships to Resistance). *Plant Physiol* 113(1):249-257

Anexo N: Geles de actividad de Ascorbato peroxidasa – Geles no desnaturalizantes

Procedimiento

Para la obtención del extracto, la preparación de la muestra y la corrida electroforética se procedió de igual manera que para los geles de actividad de superóxido dismutasa, presentado en el anexo M.

Revelado del gel

Fundamento

En ausencia de la enzima ascorbato peroxidasa (APX), el Nitro Blue Tetrazolium (NBT) es reducido a blue formazan en presencia de H_2O_2 , dando color azul en el gel. La enzima APX impide el paso del NBT a blue formazan, al secuestrar el H_2O_2 usando ascórbico como sustrato, visualizándose como bandas por falta de color azul.

Soluciones de uso

Solución de equilibrado	Reactivo	Cantidad	Concentración final
	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7	10 ml	50 mM
	EDTA 10 mM	10 ml	1 mM
	Ácido ascórbico	0,0326 g	2 mM
	Se completa a 100 ml con agua destilada		
Solución de peróxido	Reactivo	Cantidad	Concentración final
	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7	3 ml	50 mM
	EDTA 10 mM	3 ml	1 mM
	Ácido ascórbico	0,012	4 mM
	H_2O_2 8,66 M	0,007 ml	2 mM
	Se completa a 30 ml con agua destilada		
Solución de teñido	Reactivo	Cantidad	Concentración final
	Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,8	2 ml	50 mM
	EDTA 10 mM	2 ml	1 mM
	TEMED	0,085 ml	28 mM
	NBT	0,04 g	2,45 mM
	Se completa a 20 ml con agua destilada		

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 min. Se detuvo la reacción lavando el gel con agua. La actividad APX fue observada como una banda sin color en un fondo azul.

Bibliografía

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 O: Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

Procedimiento

A partir de un pool de hojas para cada tratamiento se extrajo ARN total mediante el método de TRIZOL[®], según el siguiente protocolo especificado por el fabricante y utilizando materiales libres de ARNasas. Se molieron 100 mg de muestra en mortero con aire líquido y se mezclaron con 1,5 ml de TRIZOL[®] e incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, continuando mezclando cada 2 minutos. Luego se agregó 0,3 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Se dejó reposar 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm a 4 °C. Se recuperó la fase superior en un nuevo tubo para repetir los pasos de agregado de cloroformo y centrifugación. A la nueva fase acuosa recuperada se agregó 0,8 ml de isopropanol y se incubó 10 minutos en hielo con el objetivo que precipite el ARN. Luego de una centrifugación de 12 minutos a 12000 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante. Al pellet obtenido se lo lavó dos veces con etanol, agregando 1 ml de etanol 75%, vortereando y centrifugando 5 minutos a 10000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet al aire 5 a 10 min. No permitir que seque demasiado porque decrece su solubilidad. Finalmente se resuspendió en 25 µl de agua MilliQ estéril, se incubó 5 minutos a 65 °C y se mantuvo a -80 °C.

Purificación del ARN

Con el fin de eliminar restos de ADN de las muestras de ARN se realizó un tratamiento con una ADNasa (RQ1 RNase-Free DNase, Promega).

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

2 µg de ARN + 1 µl de DNasa (1 U/ µl) + 1 µl de buffer 10X + agua MilliQ estéril hasta un volumen final de 10 µl.

Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego se agregó 1 µl de Solución de stop y se incubó a 65 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

Se realizó la cuantificación de las muestras a través de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop. También se calcularon las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza de la muestra, ya que las proteínas poseen una absorbancia máxima a 280 nm y otros contaminantes presentes en la muestra como carbohidratos tienen su pico de absorción a 230 nm. Una relación de 2 es generalmente aceptado como un ARN “puro”.

Gel de ARN

Las muestras de ARN fueron corridas en gel desnaturizante de agarosa al 1,2% para comprobar su integridad.

Preparación de soluciones

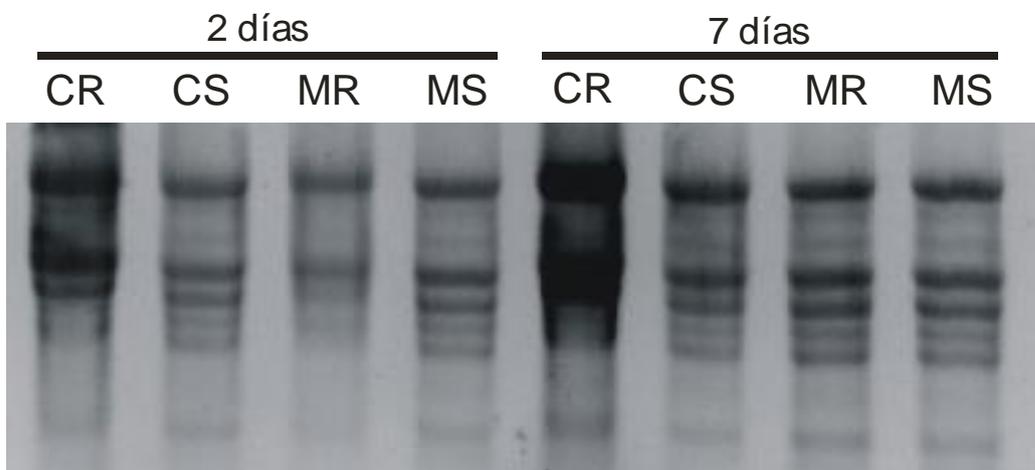
TAE 50X	Reactivo	Cantidad
	Tris base	121 g
	Ácido acético glacial	28,55 ml
	EDTA 0,5 M pH 8	50 ml
	Se completó a 500 ml con agua MilliQ estéril.	
TAE 1X	Reactivo	Cantidad
	TAE 50X	6 ml
	Se completa a 300 ml con agua MilliQ estéril.	
EDTA 0,5 M pH 8	Reactivo	Cantidad
	EDTA	9,305 g
	Se completa a 50 ml con agua MilliQ estéril.	
Gel de ARN 1,2%	Reactivo	Cantidad
	Agarosa	0,3 g
	TAE 1X	25 ml
	Se disolvió la agarosa en microondas.	

Se prepararon todas las soluciones usando materiales libres de ARNasas, esterilizando las probetas, vasos y espátulas en estufa. Se volcó la preparación del gel en el soporte y se dejó gelificar.

Las muestras se prepararon mezclando 2 µl de muestra de ARN con 2 µl de buffer muestra con formaldehído (comercial). Incubamos 5 minutos a 65°C en baño seco y sembramos todo el volumen en el gel.

Corrimos en cuba de electroforesis 20 minutos a 100 V usando TAE 1X como buffer de corrida. Finalmente teñimos las bandas incubando el gel en bromuro de etidio durante 10 minutos y luego lavándolo en agua para su observación.

En la figura se visualizan para los distintos tratamientos, el bandeo característico de una extracción de ARN total de planta en un gel de agarosa.



Síntesis de ADN complementario

Se utilizó la enzima Transcriptasa reversa MMLV (Promega) y se procedió según el protocolo especificado por el fabricante.

Se comenzó mezclando 11 μl de ARN tratado con ADNasa con 1 μl de oligo dT 100 pmol/ μl y 1 μl de agua MilliQ estéril. Se incubó a 70 °C durante 5 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo.

Se agregó la mezcla de reacción (12 μl = 5 μl de Buffer 5X + 1,25 μl de dNTPs 10 mM + 1 μl de RNAsin + 1 μl de Transcriptasa reversa MMLV + 3,75 μl de agua MilliQ estéril), se incubó a 1 hora a 42 °C y luego 10 minutos a 70 °C.

Se realizó una dilución 1/5 del producto de esta reacción para utilizar como molde en las reacciones de PCR.

Anexo P: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) – Enzimas del sistema antioxidante y del metabolismo de las poliaminas

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron las siguientes:

Enzima	Cebador F	Cebador R
TEF	5' TGTTGCTGTTAAGGATTTGA AG CG 3'	5' AACAGTTTGACGCATGTCCCTA AC 3'
Fe-SOD	5' AGGTGGAAAGCCATCCGGG GA 3'	5' CCTCATGACGCCATCCAATTCA TC A 3'
Mn-SOD	5' TCATTCACGCGGGTTGCACG T 3'	5' CAGTGGGTCTGGTTGGCAGTG 3'
Cu/Zn-SOD	5' TCCCTCTGCTCTCCACATGG AC C 3'	5' TCCTGGCGACAGCCCCTAAA 3'
CAT1	5' GTGGRARGCGTGAAAGTG 3'	5' CAAATTAATACTGTGCCACAA 3'
CAT3	5' GTGGRARGCGTGAAAGTG 3'	5' ACTCCTAGAAGCTATGGTA 3'
CAT5	5' GTGGRARGCGTGAAAGTG 3'	5' ATGGATAAGTTCTTTCAAATTG 3'
APX	5' TTGAGGTCACCGGTGGACC TG A 3'	5' GGGCGGAACACAGGGTCAGAC 3'
ADC	5' GAATGTTTTTGGGTGGGGCT TA C 3'	5' CCTTTGACAGAATGCCTTATCTG CTG 3'
SAMDC	5' GGC GCGCCACTAGTCTAAT GGAGTCTAAAGGTGG 3'	5' ATT TAAATGGATCCTGTGCTT TCTCTCTATCCAG 3'
SPDS	5' ACAGAAAGGGATGAATGTG CC 3'	5' TATGCTTTGCTCAACTGAGGG 3'
SPMS	5' CCAGGAGAAGCCCATTCAAT 3'	5' GGGTTTGAAGATTCTCGAGT 3'
DAO	5' CAGGATGGAAAGATAGAA GC 3'	5' GGAAGACTGGCCAGTTATGC 3'

Mezcla de reacción

Reactivos	Cantidad
Agua MilliQ estéril	5,8 µl
Buffer 5X	4 µl
dNTPs 2 mM	2 µl
Cebador F 2 µM	3 µl
Cebador R 2 µM	3 µl
Enzima Taq polimerasa	0,2 µl
ADN complementario (dil 1/5)	2 µl

Procedimiento

Se preparó la mezcla de reacción y se amplificaron las secuencias en un termociclador con un protocolo de temperaturas y ciclos que tuvo algunas variaciones para los genes de las distintas enzimas.

Protocolo general:

- 1) 94 °C – 2 minutos
- 2) 94 °C – 1 minuto
- 3) Ta – 30 segundos
- 4) 72 °C – 1 minuto
- 5) Repetición de los pasos 2, 3 y 4 (Número de ciclos)
- 6) 72 °C – 10 minutos

Variaciones del protocolo para cada gen:

Gen	Producto de amplificación (pb)	Ta (°C)	Número de ciclos
TEF	358	58	30
Fe-SOD	472	58	25
Mn-SOD	465	58	28
Cu/Zn-SOD	400	50	40
CAT1	320	50	28
CAT3	270	50	28
CAT5	350	50	25
APX	343	58	28
ADC	326	64	25
SAMDC	500	60	35
SPDS	590	64	30
SPMS	397	66	25
DAO	679	60	35

Las bandas de expresión se observaron en geles de agarosa al 1,2 %, luego de una corrida electroforética a 100 V usando buffer de corrida TAE 1X durante 20 minutos o hasta que el frente de corrida llegó hasta el final del gel. Cada corrida se realizó en presencia de un marcador de tamaño molecular (Cien Marker Promega®) que cuenta con fragmentos desde 100 a 100 pb.

La tinción se realizó con bromuro de etidio y las bandas se cuantificaron utilizando el software ImageJ. Se realizó una cuantificación relativa al factor de elongación de la transcripción $\alpha 1$ (TEF) y el valor obtenido para cada tratamiento se relacionó con el obtenido para el tratamiento CR en cada tiempo de muestreo

Bibliografía

Aluru MR, Mazourek M, Landry LG, Curry J, Jahn M, O'Connell MA (2003) Differential expression of fatty acid synthase genes, Acl, Fat and Kas in Capsicum fruit. J Exp Bot 54:1655-1664