



*Universidad Nacional de Córdoba*  
*Facultad de Ciencias Agropecuarias*  
*Escuela para Graduados*



**INDUCCIÓN DE RESISTENCIA  
COMO ESTRATEGIA DEFENSIVA ANTE  
LA INVASIÓN PATÓGENA EN SOJA  
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

**Laura Inés Vargas**

Tesis

Para optar al Grado Académico de  
Magister en Ciencias Agropecuarias

**Córdoba, 2015**

**INDUCCIÓN DE RESISTENCIA  
COMO ESTRATEGIA DEFENSIVA ANTE  
LA INVASIÓN PATÓGENA EN SOJA  
(*Glycine max* (L.) Merr.)**

**Laura Inés Vargas**

Comisión asesora de tesis

Director: Dr. Ricardo Román Madoery

Asesor: MSc. Julio Oscar Muñoz

Asesora: Dra. Mariana Cecilia Minchiotti

Tribunal examinador de Tesis

Dra. Mariana Cecilia Minchiotti .....

Dra. Liliana Di Feo .....

Dr. Marcelo Doucet .....

**Presentación formal académica:** Junio 2015

Escuela para Graduados  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de Córdoba

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mariana Minchiotti por su comprensión, colaboración y tiempo.

Al Dr. Ricardo Madoery por su apoyo y paciencia para la realización de este trabajo.

Al Ingeniero MSc. Julio Muñoz y a todas las personas que son parte, de una o de otra manera, del Laboratorio de Fitopatología.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias, donde desarrollé la actividad de investigación, al Lic. Diego Palacios del Laboratorio de Microbiología (INTI Mar del Plata, Buenos Aires), a la Dra. Martha Cuniberti del INTA Marcos Juárez y al Ing. Agr. Rubén Toledo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias UNC.

## DEDICATORIA

A Luis, Rocío y Francisco.

A mis padres.

A los que ya no están y siempre me acompañaron.

## RESUMEN

El genoma de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) incluye sistemas de defensa latentes contra el ataque patogénico que pueden ser activados por moléculas inductoras. Las respuestas defensivas se inician con la exposición de la planta a microorganismos virulentos, avirulentos o de forma artificial, frente a ciertos compuestos químicos. En este trabajo se evaluó el potencial inductor de quitosano y oligoglucosamina (OGA). La solubilidad en agua del biopolímero disminuye significativamente por encima de pH 6, por lo cual se sintetizó OGA, mezcla de pentámeros y hexámeros, libremente soluble. El efecto inductor fue evaluado a través del contenido total de fitoalexinas y nivel de actividad de fosfolipasa A2 (PLA2) como parámetros indicadores. Las semillas de soja fueron embebidas en la solución de inductores, luego sembradas en sustrato estéril y mantenidas bajo condiciones controladas. Se determinó la concentración total de fitoalexinas en extractos de infiltrados de hojas, mediante espectrofotometría UV de segunda derivada. La actividad lipolítica PLA2 en semillas se determinó aplicando un método espectrofotométrico continuo para el seguimiento de la hidrólisis de fosfolípidos catalizada por la enzima. El tratamiento con quitosano incrementó el contenido de fitoalexina en hojas en un 39 %, mientras que la aplicación de OGA produjo un aumento 41 veces superior. Se obtuvieron aumentos de actividad PLA2 de 45 % en semillas y 70 % en semillas pregerminadas inoculadas con el biopolímero. En cuanto a actividad enzimática PLA2, se registró aumento del 23 % en semillas y del 200 % en semillas pregerminadas tratadas con solución OGA. Los aumentos alcanzados en niveles de fitoalexinas y de activación de PLA2 indican que el biopolímero quitosano y especialmente, derivados OGA grado de polimerización 5-6 son efectivos en la inducción de resistencia en soja.

### Palabras clave

Oligoglucosaminas, Soja, Inducción de resistencia, Fitoalexinas, Fosfolipasa A2

## ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genome includes latent defense systems against pathogen attack which could be activated by inductor molecules. The defensive responses start when plants are exposed to virulent or non virulent microorganisms or artificially, against certain chemical compounds. In this work, it was evaluated the inductor potential of chitosan polymer and oligo-glucosamine (OGA). The aqueous solubility of the polymer decrease significantly above pH 6, therefore OGA, a mixture of freely soluble pentamers and hexamers was synthesized. The inductor effect was evaluated through the phytoalexin content and the phospholipase A2 (PLA2) activity level as inductor parameters. Soybean seeds were imbibed with inductor solutions, sowed in sterile substrate and maintained under controlled conditions. The total phytoalexin content was determined in extracts of leave infiltrates applying second derivative ultraviolet spectrophotometry. The lipolytic PLA2 activity in seeds was determined by a continuous spectrophotometric method. Chitosan treatment increased 39 per cent the phytoalexin content in leaves, while the application of oligoglucosamine lead to an increase of 41 folds. It was registered PLA2 activity increases of 45 per cent in seeds and 70 per cent in pregerminated seeds inoculated with the biopolymer. The PLA2 activity was enhanced 23 per cent in seeds and 200 per cent in pregerminated seeds treated with OGA. The increase in phytoalexin content and PLA2 activity level shows that chitosan biopolymer, and specially oligo-glucosamine derivatives of 5-6 polimerization degree, are effective as soybean resistance inductors.

### Key words

Oligoglucosamines, Soybean, Resistance induction, Phytoalexin, Phospholipase A2

# TABLA DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
<b>El cultivo de soja y su importancia económica.....</b>	<b>5</b>
<b>Factores que afectan la producción de soja.....</b>	<b>6</b>
<b>Enfermedades en el cultivo de soja.....</b>	<b>7</b>
<b>Control.....</b>	<b>8</b>
<b>Control químico.....</b>	<b>8</b>
<b>Alternativas de control.....</b>	<b>8</b>
<b>Interacción planta-patógeno.....</b>	<b>9</b>
<b>Tipos de defensa de plantas.....</b>	<b>11</b>
<b>Defensas pasivas.....</b>	<b>11</b>
<b>Defensas inducidas.....</b>	<b>11</b>
<b>Inducción de resistencia sistémica.....</b>	<b>13</b>
<b>Resistencia Sistémica Inducida (RSI).....</b>	<b>13</b>
<b>Resistencia Sistémica Adquirida (RSA).....</b>	<b>13</b>
<b>Fitoalexinas.....</b>	<b>14</b>
<b>Fosfolipasa A2.....</b>	<b>16</b>
<b>Moléculas inductoras de defensa.....</b>	<b>19</b>
<b>Quitosano.....</b>	<b>20</b>
<b>Oligosacarinas.....</b>	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>Materiales.....</b>	<b>24</b>
<b>Material vegetal.....</b>	<b>24</b>
<b>Quitosano.....</b>	<b>24</b>
<b>Oligómeros de glucosamina (OGA).....</b>	<b>24</b>

Reactivos.....	25
Instrumental principal.....	25
Metodología.....	25
Preparación de semillas embebidas.....	25
Preparación de semillas pregerminadas.....	26
Preparación de plántulas de soja.....	26
Poder germinativo (PG) de semillas tratadas con inductores.....	26
Preparación de quitosano.....	27
Preparación de OGA.....	27
Evaluación del efecto antimicrobiano directo de los inductores.....	28
Extracción de fitoalexinas.....	28
Medición de fitoalexinas.....	29
Extracción de PLA2.....	30
Medición de actividad PLA2.....	30
Diseño experimental y análisis estadístico.....	32
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
Evaluación del efecto de quitosano y OGA sobre el poder germinativo (PG)..	34
Evaluación de efectos antimicrobianos directos.....	34
Contenido de fitoalexinas.....	34
Actividad de fosfolipasa A2.....	40
Estudio de la acción de OGA como efector.....	45
<b>CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFIA CITADA.....</b>	<b>54</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>58</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Aplicaciones del quitosano en agricultura (Lárez Velázquez).....	21
Tabla 2.3 Contenido de fitoalexinas plantas de semillas tratadas con quitosano.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación del reconocimiento molecular entre el inductor y el receptor.....	2
Figura 2.1. Fórmula general de isoflavona.....	14
Figura 3.1. Sitios de acción de las diferentes PLA2 en fosfolípidos.....	16
Figura 4.1. Hidrólisis de fosfolípido mediada por PLA2.....	17
Figura 5.1. Representación de poli-glucosamina.....	20
Figura 6.3. Espectro segunda derivada (la flecha indica la absorción a 268nm) obtenido con el equipo HP 845.....	35
Figura 7.3. Curva de calibración. Intensidad Relativa 268 nm vs std isoflavona.....	36
Figura 8.3. Efecto de quitosano sobre concentración de fitoalexinas en hojas de plantas de 3 semanas.....	37
Figura 9.3. Efecto de quitosano sobre concentración de fitoalexinas a dos tiempos de embebido de semillas.....	38
Figura 10.3. Comparación del efecto de quitosano y OGA.....	39
Figura 11.3. Niveles de expresión de Gms PLA2 en función del estadio fenológico de la soja.....	41
Figura 12.3. Localización de los niveles de expresión de Gms PLA2.....	42
Figura 13.3. Efecto de quitosano sobre actividad PLA2.....	43
Figura 14.3. Efecto de OGA sobre actividad PLA2 en semillas.....	44
Figura 15.3. Efecto de OGA sobre actividad PLA2 en semillas pregerminadas.....	44
Figura 16.3. Efecto de la concentración de OGA sobre actividad PLA2.....	46
Figura 17.3. Representación de biomembrana Modelos de organización supramolecular de fosfolípidos bajo la forma de bicapas (liposoma y bicapa planar) y micela.....	47
Figura 18.3. Representación del desarreglo de las bicapas lipídicas por la acción de OGA y subsiguiente hidrólisis catalizada por PLA2 con formación de lisofosfolípidos y ácidos grasos.....	47

## ABREVIATURAS

APG: agar papa glucosado

cPLA2: PLA2 citosólica

ERO: especies reactivas de oxígeno

*Gms*PLA2: PLA2 secretoria de *Glycine max*

GP: grado de polimerización

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

HPTLC: cromatografía en capa fina de alta resolución

iPLA2: PLA2 intracelular

ISDV: Inductores de los Sistemas de Defensa Vegetal

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido

OGA: oligoglucosamina

PAL: fenilalanina amonio liasa

PG: poder germinativo

PLA2: fosfolipasa A2

proteínas PR : proteínas relacionadas con la patogénesis

RH: reacción de hipersensibilidad

RPCP: rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta

RSA: Resistencia Sistémica Adquirida

RSI: Resistencia Sistémica Inducida

sPLA2: PLA2 secretoria

U: unidad de actividad enzimática

### INTRODUCCIÓN GENERAL

En Argentina, el fuerte incremento en la superficie sembrada con soja (*Glycine max*) ha transformado a esta oleaginosa vulnerable al ataque de microorganismos patógenos. Las condiciones climáticas y edáficas influyen en el desarrollo de diversas enfermedades, cuya importancia económica varía según región, patógeno, manejo del cultivo y susceptibilidad del cultivar (Baigorri y Navarro, 2012). Entre otras, se conocen enfermedades producidas por hongos patógenos del suelo que pueden permanecer en el rastrojo de un año a otro y causar pérdidas de rendimiento y calidad comercial del grano de soja (Giorda y Baigorri, 1997; Baigorri y Croatto, 2000). Los hongos pueden localizarse interna o externamente en la semilla. La acción fúngica puede disminuir el poder germinativo y vigor de las semillas (Agrios, 2005), provocando síntomas en plántulas tales como: necrosis vasculares, podredumbres, manchas, cambios de coloración y atrofiaciones diversas. Las alteraciones fisiológicas que sufren las plantas afectadas determinan cambios en el contenido de biomoléculas: aminoácidos, proteínas y lípidos (Boca *et al.*, 2003). Las especies de los géneros *Phytophthora* (Sharma *et al.*, 2004), *Phomopsis*, *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Macrophomina* (Bressano *et al.*, 2010) constituyen las principales causales de pérdidas económicas en la soja argentina (Baigorri y Croatto, 2000).

Generalmente, para enfrentar esta problemática, se utilizan fungicidas de elevado impacto ambiental, por lo que la investigación sobre estimulación de mecanismos defensivos en soja adquiere una gran relevancia (C.A.S.A.F.E., 2013).

La base genética vegetal incluye sistemas defensivos latentes contra la invasión patógena. Los mecanismos constitutivos de defensa proveen de forma pasiva, resistencia estructural contra patógenos. Por otro lado, los procesos defensivos que son inducidos por compuestos específicos liberados desde el patógeno o desde el hospedante durante la infección, son caracterizados por numerosas reacciones incluyendo las que llevan a la

activación de proteínas extracelulares, producción de compuestos con acción antibiótica y formación de barreras físicas (Amorabé *et al.*, 2008; Badawy and Rabea, 2011). En ese marco se inscriben los mecanismos inducidos de defensa.

En la interacción planta-patógeno, el reconocimiento molecular juega un rol central (Fig.1.1.) y, si la defensa puede ser previamente activada, la infección podrá ser controlada (Edreva, 2004; Newman, 2007).

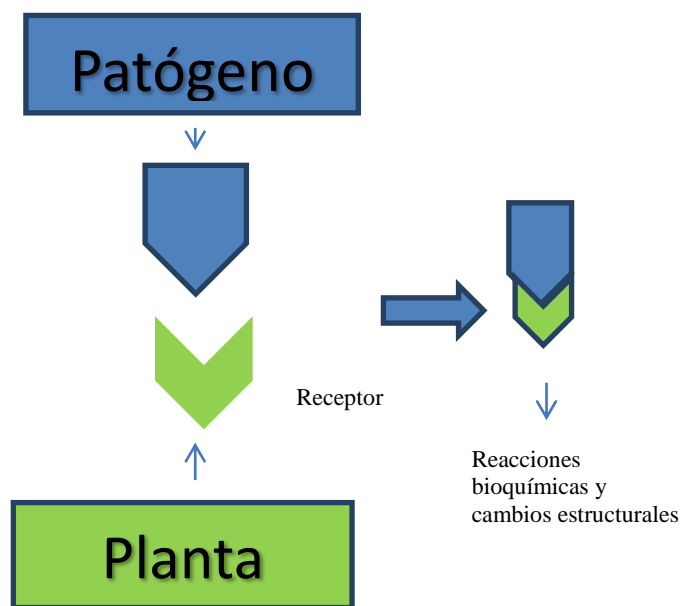


Figura 1.1. Representación del reconocimiento molecular entre el inductor y el receptor.

Las defensas pueden ser estimuladas artificialmente en el hospedante por aplicación de sustancias inductoras como glucanos, polisacáridos, lipopolisacáridos y glicoproteínas, también presentes en la pared celular de hongos patógenos (Badawy y Rabea, 2011). De esta manera, la inducción de resistencia mediante agentes químicos naturales puede constituir una estrategia de control efectiva, económica y sustentable. Existen antecedentes sobre la utilización de sustancias inocuas para el medio ambiente y la salud humana, con el fin de activar defensas frente a la invasión patógena (Benhamou *et al.*, 1998). Entre los más promisorios disparadores se encuentra el quitosano, polímero de glucosamina, el mayor derivado de acetilado de la quitina que se encuentra en las paredes celulares de

varias clases de hongos. Éste indujo resistencia a *Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici* en plantas susceptibles de tomate, cuando se aplicó como un película en las raíces, por pulverización del follaje, por cobertura de semillas e incorporado al suelo como enmienda. El pretratamiento con el biopolímero favoreció las respuestas de resistencia de las plántulas de tomate restringiendo el crecimiento del patógeno hacia los tejidos exteriores de las raíces y disparando reacciones defensivas (Benhamou y Thériault, 1992; Benhamou *et al.*, 1994).

En principio, la habilidad de inductores para suprimir infecciones virales en plantas no depende del tipo de agente patógeno porque el inductor afecta a la planta misma mediante inducción de resistencia a la infección viral. Imitando el contacto de la planta con un fitopatógeno, el inductor es capaz de disparar un amplio espectro de reacciones protectoras en la planta. Dicha protección limita la expansión patógena sobre la planta y genera una resistencia sistémica adquirida (Badawy and Rabea, 2011).

Las plantas responden rápidamente a una variedad de condiciones de estrés ambiental y la transducción de señales en cascada está asociada a la actividad de enzimas glucanasas y fosfolipasas. La percepción de los patógenos y la aparición de respuestas defensivas indirectas parece involucrar específicamente la activación de fosfolipasas A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) y la consiguiente síntesis de metabolitos mensajeros disparadores de mecanismos defensivos (Laxalt y Munnik, 2002). PLA2 promueve la ruptura por hidrólisis de la unión éster en la posición sn-2 de 1,2-diacil-sn-fosfoglicéridos dando lugar a la formación de lisofosfoglicéridos y ácidos grasos (Six y Dennis, 2000). Se han encontrado evidencias acerca de la participación de PLA2 en la cascada de señalización que regula la expresión de genes como respuesta defensiva en diversas especies vegetales (Narváez-Vásquez *et al.*, 1999; Chapman, 1998).

Por otro lado, en una posible acción directa, ciertas enzimas presentes en el vegetal pueden ser activadas por la presencia de carbohidratos (glucanos) componentes de la cubierta externa de hongos. Así, enzimas quitosanasas y quitinasas pueden destruir la cubierta externa de los hongos patógenos y, a continuación, la acción lipolítica de PLA2 es

capaz de degradar membranas biológicas (Sharma *et al.*, 2004). Ha sido comprobado que la percepción de patógenos y la aparición de respuestas defensivas involucra la activación de fosfolipasas (Chandra *et al.*, 1996). En tabaco, los tratamientos con disparadores derivados de *Phytophthora sp* aumentaron la actividad PLA2. En tomate, ácido oligogalacturónico y quitosano promovieron la estimulación de la actividad PLA2 en pocos minutos (Gross *et al.*, 1992).

Múltiples genes de sPLA2 han sido identificados en plantas y se han estudiado características moleculares, bioquímicas y función en la señalización de distintas isoenzimas sPLA2. Además, se ha comprobado concluyentemente que esta enzima de plantas es secretada en los intersticios del espacio extracelular en una forma madura (Lee *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, sólo una isoforma de sPLA2 fue secretada al espacio extracelular o apoplasto, en una acción modulada por el estadio en el desarrollo del tejido vegetal (Jung *et al.*, 2012). En nuestro laboratorio, a partir de semillas de soja, hemos purificado y caracterizado una nueva PLA2 secretoria (*GmsPLA2*), una enzima con elevado potencial catalítico hacia bicapas en vesículas multilaminares de fosfolípidos de lecitina de soja (Minchiotti *et al.*, 2008). Este tipo de agregados, representan una organización supramolecular similar a las bicapas en las membranas biológicas. Moléculas inductoras podrían estimular la acción de *GmsPLA2* que actuaría indirectamente modulando respuestas defensivas o incluso, en determinadas condiciones, podría actuar directamente degradando membranas de patógenos.

La acumulación de fitoalexinas, moléculas con acción antibiótica, es una respuesta temprana bien conocida en la interacción soja-patógenos (Ebel y Grisebach, 1988). Así, la inducción de la biosíntesis de fitoalexinas en plantas es considerada como un importante mecanismo de autodefensa contra hongos patógenos. Dichas moléculas antibióticas actúan como intermediarios reactivos de oxígeno en la defensa celular. La inducción de la síntesis y la regulación funcional de estas moléculas con acción antibiótica en soja ha sido estudiada en profundidad (Ahuja *et al.*, 2012) y es conocido que la inducción de mecanismos de defensa naturales es una importante estrategia de control en el caso de diversos organismos perjudiciales (Benhamou *et al.*, 1998). De esta manera, la resistencia inducida puede ser promovida por sustancias químicas, microorganismos no patogénicos o

patógenos avirulentos y oligosacáridos fúngicos, todos ellos denominados “disparadores o moléculas inductoras” (Benhamou *et al.*, 1994; Prapagdee *et al.*, 2007).

## **ANTECEDENTES**

### **El cultivo de soja y su importancia económica**

La soja es una especie originaria de China, pertenece a la familia de las leguminosas (*Fabaceae*) y es utilizada por la plasticidad que ofrece su cultivo, por la calidad industrial del grano y su elevado contenido de proteína (37 a 46 %) y aceite (19 %). Es la única leguminosa cuya proteína, calificada como de alta calidad, contiene los nueve aminoácidos esenciales; aquellos que el organismo no puede sintetizar por sí mismo por lo que la única fuente es la ingesta directa a través de la dieta.

La importancia de la soja deriva fundamentalmente de su estrecha relación con la producción de alimentos (Cuniberti *et al.*, 2013). Los granos son considerados muy versátiles ya que de los mismos se puede obtener gran cantidad de productos con usos muy diversos a nivel industrial, para la alimentación humana y animal. Las isoflavonas, compuestos fenólicos, poseen gran interés farmacéutico como hormonas vegetales. Los principales subproductos son la harina (fuente de proteína y carbohidratos) y el aceite (Baigorri y Navarro, 2012). Las harinas, a su vez, son procesadas para obtener aislados y concentrados de proteína de soja.

El cultivo está ampliamente difundido en el mundo. Se produce un promedio de 200 millones de toneladas métricas al año. Estados Unidos, Argentina y Brasil conforman el 80 % de este volumen, siendo América el continente con mayor producción a nivel mundial con el 85,32 %, seguido por Asia que representa el 12,78%. China es el principal consumidor de soja; importa porotos de soja (60 millones de toneladas en 2012/2013 y se prevén 70 millones para 2014) que luego transforma en aceite o en harina (FAO, 2013).



La agroindustria es una actividad estratégica en Argentina y, dentro del complejo de oleaginosas, la soja es el principal producto que aporta aceites. A esto se le suman las harinas y derivados, destinados a la elaboración de raciones para la alimentación de animales y la producción de carnes rojas y blancas. Los aceites vegetales además de su uso comestible son transformados de manera creciente en biodiesel. Cabe destacar que en la provincia de Santa Fe se encuentra ubicado el polo aceitero más importante del mundo.

En nuestro país, la soja se cultiva en una amplia zona, que se extiende desde los 23° a los 38° de latitud sur aproximadamente (Vallone y Giorda, 1997). La mayor superficie de siembra se concentra en la región pampeana, con un 91 % del total, en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba, distribuyéndose el resto entre las provincias de Tucumán, Santiago del Estero, Chaco, Entre Ríos, Corrientes y Misiones. Esta inmensa área productiva aumentó, campaña tras campaña, desde la década de 1970 y se ha incrementado hasta alcanzar un papel fundamental en la economía del país. Este crecimiento ha convertido a la Argentina en el tercer productor del mundo de grano, primer exportador de aceite y harina y tercer exportador de poroto de soja (USDA WASDE, 2014). Durante la última década de la historia del desarrollo del cultivo en nuestro país, el componente más significativo responsable de los incrementos productivos fue el aumento de la superficie dedicada a la actividad por desplazamiento de otros cultivos, desmontes de vegetación natural y por traslado de actividades ganaderas hacia áreas marginales. Al mismo tiempo, la productividad muestra una tendencia muy creciente; en los últimos doce años el incremento en promedio, significó 3,4 millones de toneladas por año.

### **Factores que afectan la producción de soja**

Numerosos factores, tanto abióticos como bióticos, pueden limitar la producción de soja. Las condiciones climáticas y edáficas influyen en el desarrollo de las enfermedades. Su importancia varía según la región, el patógeno, el manejo del cultivo y la susceptibilidad del cultivar que se utiliza (Vallone y Giorda, 1997).

Se estima que, anualmente, en Argentina los daños causados por las enfermedades de soja alcanzan el 8 % de la producción nacional. Esta estimación no considera las pérdidas indirectas, como el incremento de inóculo en el lote, reduciendo la vida útil del mismo y los mayores costos derivados del control. (Sillon, 2012, Carmona *et al.*, 2008).

## **Enfermedades en el cultivo de soja**

Se define enfermedad como el proceso a lo largo del cual ocurre una progresión de cambios morfo-fisiológicos que inciden en forma negativa sobre el rendimiento y la calidad del producto cosechable.

El panorama fitosanitario de la soja en Argentina ha cambiado en los últimos 20 años, ya que inicialmente se consideraba un cultivo sano. El desarrollo de las enfermedades se ve favorecido por el monocultivo, el aumento del área sembrada, las condiciones ambientales, el empleo de germoplasma de escasa variabilidad y el uso de nuevas técnicas de manejo del cultivo (Barreto *et al.* 1995, Satorre *et al.*, 2008).

Las enfermedades foliares afectan la generación del rendimiento por los siguientes motivos: los patógenos aprovechan la energía producida por la planta, la mayoría producen clorosis, necrosis, afectando así la fotosíntesis, y por último, defoliación y senescencia anticipada. Los patógenos involucrados en este complejo denominado “enfermedades de final de ciclo” son: *Cercospora kikuchii* (T. Matsu & Tomoyasu) Gardner, *Colletotrichum truncatum* (Schw) Andrews & W.D. Moore, *Septoria glycines* Hemmi, *Phomopsis sojae* Lehman, *Peronospora manshurica* (Naum) Syd: Gäum, *Cercospora sojina* Hara, *Alternaria spp.*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Nakano) y *Pseudomonas siringae* pv. *glycinea* (Cooper) Young Dye & Wilkie (Carmona *et al.*, 2003). Otra enfermedad foliar de alto potencial destructivo es la roya de la soja, *Phakopsora pachyrhizi*, parásito biotrofo que fue detectado inicialmente en la campaña 2001/2002 en la provincia de Chaco (Carmona *et al.*, 2005).

Entre las enfermedades producidas por hongos patógenos de suelo, que pueden permanecer en el rastrojo de un año a otro y afectan tallo y raíces provocando pudriciones, se encuentran: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora sojae*, *Sclerotium bataticola*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium tucumaniae* y *F. virguliforme* (Giorda y Baigorri, 1997).

## **Control**

El concepto de *control* es aplicable a un número limitado de situaciones, porque conlleva la aplicación de medidas tendientes a “erradicar”. En los últimos años se intenta reemplazar este concepto por el de *manejo integrado de enfermedades*, el cual consiste en un programa que selecciona, integra y aplica técnicas tendiendo a un uso racional de los productos fitosanitarios, causando el mínimo impacto ambiental y económico, y que los productos cosechados resulten inocuos.

## **Control químico**

La agricultura actual tiene una alta dependencia del uso de los productos químicos, tales como herbicidas, insecticidas y fungicidas, usados en la aplicación foliar o como cura-semillas. Sin este tipo de control, en muchos cultivos, es casi imposible obtener cosecha. La ventaja de estos productos radica en que es una medida de control de efecto inmediato y rápido y se pueden tratar enfermedades o eliminar plagas con seguridad y utilizando poca mano de obra. La desventaja es la toxicidad que puede afectar a la salud de los que se encargan de la fumigación, además de los que consumen los productos agrícolas, así como la potencial contaminación del ambiente, particularmente cuando los residuos o los productos de degradación alcanzan niveles inaceptables en aguas subterráneas.

## **Alternativas de control**

Teniendo en cuenta los factores que inciden en el desarrollo de las enfermedades, el manejo de las mismas se logra de diferentes modos:

- 1- Uso de semilla certificada
- 2- La secuencia de cultivos y rotación es una herramienta efectiva para limitar las poblaciones de organismos fitopatógenos habitantes del suelo.
- 3- Incorporación de labranza conservacionista puede modificar el balance de la población de microorganismos del suelo y posibilitar la restauración del equilibrio biológico del mismo.
- 4- Factores como densidad, fecha de siembra, elección de cultivares, riego y fertilidad, entre otros, también pueden contribuir a eficientizar el manejo de enfermedades.
- 5- Uso de cultivares que expresen su resistencia de diferentes maneras y que impidan el establecimiento y/o avance del patógeno.

### **Interacción planta-patógeno**

La planta detecta en su entorno una gran cantidad de señales originadas por los patógenos y el ambiente que le permiten discriminar lo propio de lo ajeno y responder a ellos activando sus mecanismos de defensa.

Las plantas se ven expuestas a numerosos organismos potencialmente patógenos. Éstos están obligados a obtener nutrientes y para ello, necesitan invadir y adaptarse a los tejidos del hospedante a los fines de eventualmente, reproducirse. Los dos grupos principales son los patógenos biotrofos y los patógenos necrotrofos. Los primeros son capaces, la mayoría de ellos, de desarrollarse y reproducirse solamente en tejidos de hospedantes vivos, han desarrollado una íntima relación con sus hospedadores vegetales. Los patógenos denominados necrotrofos, antes de que colonicen a su hospedador, necesitan provocar heridas, debilitamiento, envejecimiento o incluso la muerte del tejido vegetal (Agrios, 2005).

A pesar de esto, frecuentemente, fracasan los intentos de invasión y la mayoría de las plantas permanecen sanas. Keen señala que en las plantas que se desarrollan bajo

condiciones naturales, esto es así sobre todo en ecosistemas silvestres, la enfermedad es la excepción y no la regla (Keen, 1992).

Las plantas han desarrollado una gran cantidad de mecanismos de defensa para reconocer, resistir y contrarrestar la colonización por parte de los patógenos. Estos procesos están basados en la combinación de varios factores y son, generalmente complejos.

Sobre este aspecto se definen algunos términos relacionados con estos mecanismos que implican la respuesta de una especie vegetal específica frente a un patógeno determinado.

**Susceptibilidad:** es la aptitud de la planta para ser invadida por el patógeno.

**Resistencia:** es la capacidad de una planta dada para impedir la penetración del patógeno o para frenar su multiplicación en los tejidos.

**Tolerancia:** es la forma de resistencia que presentan aquellos cultivares que a pesar de estar severamente infectados, no muestran reducción en su producción.

La virulencia y avirulencia de un parásito es su capacidad para colonizar los tejidos de una planta dada, o sea, un mismo patógeno puede ser virulento (capaz de colonizar rápidamente) con respecto a una dada variedad vegetal, mientras que en otra variedad no se propaga en los tejidos de la planta (avirulento).

Por todo esto, podemos decir que la resistencia que muestran las especies vegetales se puede atribuir a los diversos mecanismos de defensa de las plantas a los patógenos.

La resistencia comprende dos grupos de factores: los pasivos y los activos, pudiendo ser a su vez: físicos o químicos. Los factores pasivos están presentes en la planta

antes de la llegada del patógeno, mientras que, los otros son de carácter dinámico, se inducen ante la presencia del patógeno no sólo proporcionando protección en el sitio de infección, sino sistémicamente a toda la planta (Vallad y Goodman, 2004).

## **Tipos de defensa de plantas**

### **Defensas pasivas**

Las plantas pueden desarrollar mecanismos constitutivos de defensa o defensa preformada que confiere resistencia frente a los patógenos, antes que éstos intenten la infección, de forma pasiva e inespecífica.

Las barreras estructurales o físicas de las plantas constituyen la primera línea de defensa de las mismas y son, por ejemplo: presencia de pelos, cantidad y calidad de la cera cuticular, grosor de la cutícula y de la pared celular, composición de la pared celular, suberificación, lenticelas, tejido interno de la planta y forma, tamaño y comportamiento de estomas (Agrios, 2005).

Las plantas también poseen gran variedad de exudados fungitóxicos. De éstos, varios compuestos son fenólicos, saponinas, taninos, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, que son inhibidores de las enzimas hidrolíticas de los patógenos e inhibidores proteicos. Los factores constitutivos, presentes antes de la infección, están asociados con la resistencia no hospedante, ya que lo más frecuente es que no coincida el patógeno con su especie hospedera.

### **Defensas inducidas**

Los mecanismos inducidos de defensa, también llamados resistencia inducida, a diferencia de la defensa constitutiva, sólo se activan como respuesta al ataque del

patógeno. Involucran cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes (Madriz Ordeñana, 2002).

Si ocurre una penetración por parte de microorganismos, entonces, los sistemas de defensa inducibles son activados. Esto supone la existencia de mecanismos de reconocimiento, los cuales están basados en el modelo de la teoría del gen por gen (Flor, 1971), la que postula que los inductores específicos son proteínas codificadas por genes *Avr* de avirulencia del patógeno invasor y que son capaces de activar un gen de resistencia **R** en la planta. El reconocimiento se produce cuando ocurre una interacción entre las proteínas codificadas por los genes **R** y los correspondientes productos de los genes del patógeno. En este sentido, si la planta posee un gen **R** específico para cierto patógeno se produce una reacción incompatible, dando origen a señales que se manifiestan como resistencia. Estas incluyen una rápida generación de especies reactivas de oxígeno, cambios en los polímeros de la pared celular, síntesis de compuestos de bajo peso molecular como las fitoalexinas, producción de proteínas relacionadas con las defensas, y muerte celular hipersensitiva (Agrios, 2005).

En combinaciones incompatibles entre plantas y patógenos, se suceden cambios fisiológicos en las células infectadas que se manifiestan en una reacción local y necrótica. Esto es resultado de la muerte celular programada o respuesta de hipersensibilidad. Los cambios comprenden alteración en la permeabilidad de las membranas y explosión oxidativa, donde se liberan intermediarios reactivos de oxígeno, tales como, el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La reacción hipersensible se relaciona en forma simultánea a otros mecanismos de defensa, incluyendo, acumulación de fitoalexinas, aumento en la síntesis de etileno, proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), deposición de lignina, callosa, suberina y sílice. Todos estos mecanismos mencionados se asocian al fenómeno conocido como resistencia sistémica adquirida o RSA.

## **Inducción de resistencia sistémica**

La resistencia inducida es un fenómeno natural, que se manifiesta en respuesta a la infección de un patógeno. El término identifica el fenómeno en su forma general, sin ahondar en un tipo específico de expresión o regulación de las defensas en las plantas. En la inducción de la defensa, el reconocimiento planta-patógeno juega un rol central. Las plantas han desarrollado respuestas que se activan de manera sistémica luego de la infección local, con el fin de aumentar la magnitud y velocidad de la respuesta defensiva.

Los tipos de respuestas sistémicas que se conocen son: la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA), activada por patógenos necrotrofos; la Resistencia Sistémica Inducida (RSI), disparada tras la colonización de las raíces vegetales por parte de rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (RPCP); y la Resistencia Inducida por Heridas, que tiene lugar tras el daño ocasionado a los tejidos por herbívoros.

### **Resistencia Sistémica Inducida (RSI)**

Las rizobacterias RPCP mejor caracterizadas son cepas de varias especies de *Pseudomonas* que no causan daños visibles en las raíces de las plantas. RSI utiliza las vías reguladas por el ácido jasmónico y el etileno, no se acumulan proteínas relacionadas a la patogénesis ni ácido salicílico ni tampoco asociada a la reacción de hipersensibilidad (RH) (Vallad y Goodman, 2004).

### **Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)**

La Resistencia Sistémica Adquirida es una respuesta de defensa activa e implica la existencia de algún sistema de señales capaces de transmitirse a través de los tejidos. Los tejidos vegetales y las células de la planta reaccionan contra el patógeno, a través de cambios en la expresión de los mecanismos de defensa, mediante una serie de reacciones bioquímicas que tienden a aislar al agente causal. Una de las primeras manifestaciones es



la reacción de hipersensibilidad (RH), que deriva en muerte celular localizada en el sitio de la infección, dando lugar a lesiones necróticas. A nivel celular se observa pérdida de la permeabilidad de la membrana, fuga de electrolitos, producción de especies reactivas de oxígeno, peroxidación de lípidos, refuerzo de la pared celular y presencia de fitoalexinas (Agrios, 2005, Rodríguez *et al.*, 2006).

En partes de la planta no afectada, las primeras reacciones tipo RSA son la rápida activación transcripcional de genes relacionados con la patogénesis, que promueven la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis llamadas proteínas PR (glucanasas, endohidrolasas, quitinasas, inhibidores de amilasa y fosfolipasas).

La RSA es una respuesta inespecífica, transitoria, de amplio espectro, y desencadenada tanto por el ataque de un patógeno como por una molécula inductora.

## Fitoalexinas

Las fitoalexinas, compuestos orgánicos polifenólicos, son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, fungitóxicos, que las plantas producen y acumulan en cantidades apreciables después del ataque de un patógeno. En la actualidad se conoce la estructura molecular de numerosos componentes de la gran familia fitoalexina (Grayer y Kokubun, 2001). En soja, una subfamilia muy representativa está constituida por las isoflavonas, que responden a la fórmula general (Fig. 2.1.):

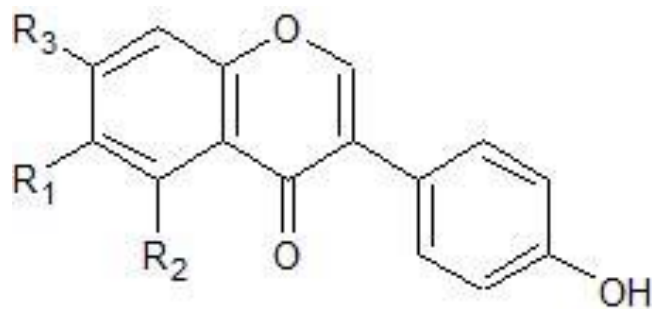


Figura 2.1. Fórmula general de isoflavona

En soja, las isoflavonas más importantes son: Genisteína (donde:  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=OH$ ), Daidzeína (donde:  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ ) y Gliciteína (donde:  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ ).

Las fitoalexinas se producen en las células sanas adyacentes a las células que reaccionan con RH, en respuesta a sustancias que difunden a partir de células dañadas (Agrios, 2005; Madriz Ordeñana, 2002). La producción de fitoalexinas se estimula en la planta por la presencia de ciertas sustancias del patógeno denominadas “inductores”. La mayoría de los compuestos potencialmente inductores de fitoalexinas por lo general son sustancias de alto peso molecular que forman parte de la pared celular del hongo, como glucanos, glucoproteínas y polisacáridos. También existen sustancias producidas por las células vegetales en respuesta a la infección o que se liberan de la pared celular después que ésta es degradada por las enzimas del patógeno.

La acumulación de fitoalexinas, moléculas con acción antibiótica, es una respuesta temprana bien conocida en la interacción soja-patógenos (Ebel y Grisebach, 1988). La inducción de la biosíntesis de estos compuestos polifenólicos en plantas es considerada como un importante mecanismo de autodefensa contra los hongos patógenos. Dichas moléculas antibióticas actúan como intermediarios reactivos de oxígeno en la defensa celular. La inducción de la síntesis y la regulación funcional de estas moléculas con acción antibiótica en soja ha sido estudiada en profundidad (Ahuja *et al.*, 2012). Es conocido que la inducción de mecanismos de defensa naturales es una importante estrategia de control en el caso de diversos patógenos (Benhamou *et al.*, 1998). Así, la resistencia inducida puede ser producida por sustancias químicas, microorganismos no patogénicos o patógenos avirulentos y oligosacáridos fúngicos, todos ellos denominados “disparadores” (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Prapagdee *et al.*, 2007).

## Fosfolipasa A2

Las proteínas tienen diversos roles en la defensa de los vegetales, tanto como factores constitutivos de resistencia, como formando parte de la compleja cascada de señales en la respuesta resistente.

Las enzimas fosfolipasas, que son lipolíticas, definidas con las denominaciones A1, A2, B, C y D en función del sitio de acción en la estructura del fosfolípido sustrato (Figura 3.1).

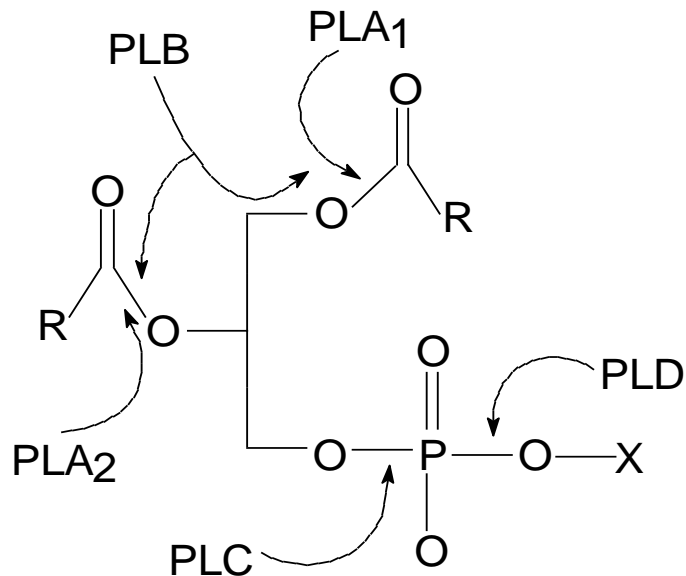


Figura 3.1. Sitios de acción de las diferentes PLA2 en fosfolípidos

La superfamilia de las fosfolipasas A2 (PLA2 su sigla, del inglés *Phospholipase A2*) incluye una amplia gama de enzimas definidas por su capacidad de catalizar la hidrólisis de la unión éster sn-2 de un fosfolípido, dando como productos ácidos grasos libres y liso fosfolípidos (Fig. 4.1.).

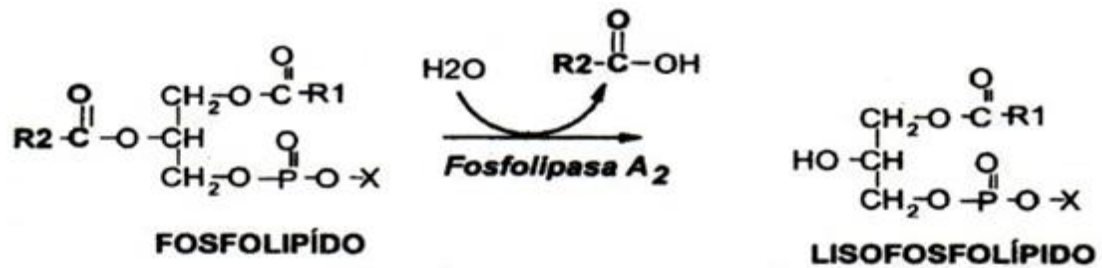


Figura 4.1. Hidrólisis de fosfolípido mediada por PLA2

Las PLA2 son enzimas que pertenecen a una gran familia de proteínas, actualmente clasificadas en 12 grupos, que comparten función enzimática y características estructurales. De acuerdo con las propiedades bioquímicas y de origen celular, las fosfolipasas se clasifican como: citosólica (cPLA2), secretoria (sPLA2) e intracelular (iPLA2) (Jiménez *et al.*, 2005).

La primera PLA2 de semillas de soja fue purificada y caracterizada en el laboratorio de Química Orgánica de FCA (Minchiotti *et al.*, 2008). Esta PLA2 es una enzima de reducida masa molecular: 14,2 kDa, con requerimiento milimolar de calcio, pH óptimo ligeramente básico, estabilidad elevada frente al calor y a solventes orgánicos y ha mostrado elevada actividad hacia liposomas multilaminares, organización supramolecular de fosfolípidos similar a la matriz de membranas biológicas. Reúne muchas características de las PLA2 del tipo secretorio (sPLA2) de origen animal. Más recientemente, en trabajos conjuntos con CIQUIBIC-CONICET, se obtuvieron por vía recombinante y purificaron hasta homogeneidad, dos isoformas *Gms*PLA2, que fueron caracterizadas estructural y cinéticamente (Mariani *et al.*, 2012).

La presencia de PLA2 en plantas ha sido sugerida desde hace tiempo y su actividad se ha relacionado con diversos procesos fisiológicos. Recién en la última década se realizaron avances importantes en la purificación y estudio estructural de estas enzimas en plantas. Los productos de la actividad de PLA2, ácidos grasos y lisofosfolípidos, estimulan diversas enzimas plasmáticas de membrana, tales como, ATPasa, NADH oxidasa y proteína kinasa; además los lisofosfolípidos participan en la señalización celular y en el

remodelamiento fosfolipídico de la membrana. Se ha propuesto que los productos de PLA2 son mensajeros secundarios en señales de transducción (Lee *et al.*, 2005).

Las plantas responden rápidamente a una variedad de condiciones de estrés ambiental y la transducción de señales en cascada está asociada a la actividad de enzimas glucanasas y fosfolipasas. La percepción de los patógenos y la aparición de respuestas defensivas indirectas parece involucrar específicamente la activación de fosfolipasas A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) y la consiguiente síntesis de metabolitos mensajeros disparadores de mecanismos defensivos (Laxalt y Munnik, 2002). PLA2 promueve la ruptura por hidrólisis de la unión éster en la posición sn-2 de 1,2-diacil-sn-fosfoglicéridos dando lugar a la formación de lisofosfoglicéridos y ácidos grasos (Six y Dennis, 2000). Se han encontrado evidencias acerca de la participación de PLA2 en la cascada de señalización que regula la expresión de genes como respuesta defensiva en diversas especies vegetales (Narváez-Vásquez *et al.*, 1999; Chapman, 1998). Por otro lado, en una posible acción directa, ciertas enzimas presentes en el vegetal pueden ser activadas por la presencia de carbohidratos (glucanos) componentes de la cubierta externa de hongos. Así, enzimas quitosanasas y quitinasas pueden destruir la cubierta externa de los hongos patógenos y, a continuación, la acción lipolítica de PLA2 puede degradar membranas biológicas (Sharma *et al.*, 2004). Ha sido comprobado que la percepción de patógenos y la aparición de respuestas defensivas involucra la activación de fosfolipasas (Chandra *et al.*, 1996). En tabaco, tratamientos con disparadores derivados de *Phytophthora sp* aumentaron la actividad PLA2. En tomate, ácido oligogalacturónico y quitosano promovieron la estimulación de la actividad PLA2 en pocos minutos (Gross *et al.*, 1992). Múltiples genes de sPLA2 han sido identificados en plantas y se han estudiado características moleculares, bioquímicas y función en la señalización de distintas isoformas. Además, se ha comprobado concluyentemente que sPLA2 de plantas es secretada en los intersticios del espacio extracelular en una forma madura (Lee *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, sólo una isoforma de sPLA2 fue secretada al espacio extracelular o apoplasto, en una acción modulada por el estadio en el desarrollo del tejido vegetal (Jung *et al.*, 2012).

El apoplasto o espacio extracelular entre la pared celular y la membrana plasmática representa el primer campo de batalla entre la planta y los patógenos. Así la región

apoplástica es considerada una interfase en la interacción entre el hospedante y el patógeno. En ese contexto interactúan proteínas secretorias y metabolitos derivados del hospedante y del patógeno y constituye el foco de los estudios secretómicos (Gupta *et al.*, 2015).

## **Moléculas inductoras de defensa**

Compuestos denominados inductores (disparadores) desencadenan en la planta una serie de mecanismos bioquímicos que la inducen a producir compuestos activos en su defensa, dando como resultado una RSA más allá del sitio de infección. Se presentan cambios en las reacciones de oxidación, movimiento de iones entre células, alteración de las membranas, engrosamiento de las paredes celulares, producción PR y fitoalexinas.

Desde un inicio el concepto de molécula activadora o inductora de defensa, fue utilizado para las que son capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en la planta en ausencia del patógeno. Actualmente, se acepta esta definición para cualquier molécula química que pueda estimular mecanismos de defensa o se asocie con la respuesta de defensa de la planta (Riveros Angarita, 2001).

Existe un amplio espectro de sustancias, que pueden ser: derivados de macromoléculas presentes en la pared celular de la planta y se las denomina activadoras endógenas; o también las de origen parasitario o producidas por algún agente físico externo, siendo conocidas como activadoras exógenas. Estas últimas pueden ser clasificadas en bióticas y abióticas. Las moléculas activadoras bióticas se obtienen a partir de la pared de microorganismos patógenos o de los filtrados de cultivos de microorganismos. En cuanto a las moléculas activadoras abióticas podemos mencionar entre otros compuestos: ácido salicílico, metiléster del ácido jasmónico, etileno, polisacáridos y especies reactivas de oxígeno. De todos modos, la naturaleza química de las moléculas activadoras de inducción de resistencia es diversa, encontrándose también: ácidos grasos, RNA levaduras, glicoproteínas, proteínas, péptidos, glicolípidos, lípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, y oligosacáridos (Cheong *et al.*, 1991)

## Quitosano

La quitina es un polisacárido lineal compuesto de residuos de 2-acetamida-2-deoxi-D-glucopiranosido unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4); es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, el mismo está presente en la pared celular de hongos, levaduras y en el exoesqueleto de los invertebrados artrópodos. La principal fuente de de quitina la constituyen los desechos de crustáceos.

El quitosano es el principal derivado de la quitina y se obtiene por desacetilación parcial o total de esta última; es un copolímero lineal formado por unidades de glucosamina y en menor medida de 2-amino-2-deoxi- $\alpha$ -D-glucosa (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009) (Fig. 5.1.).

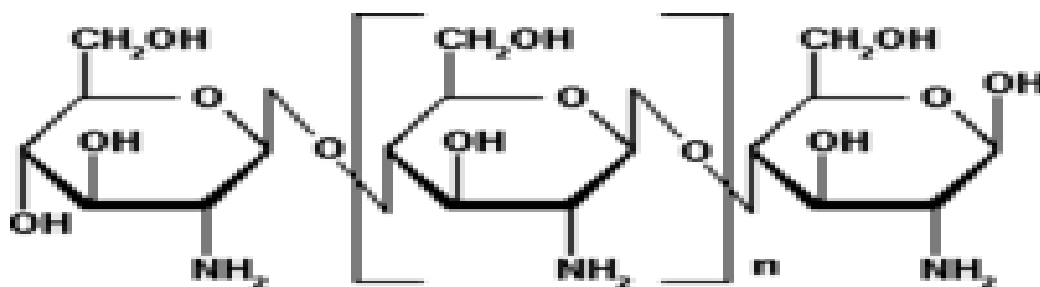


Figura 5.1. Representación de poli-glucosamina

Este biopolímero es utilizado en la industria, en cosmetología (aditivos y cremas), nutrición (preservante, antioxidante y antimicrobiano), farmacología y medicina (fibras, membranas, órganos artificiales), biotecnología (agente quelante, emulsificador, floculante) y en actividades agrícolas (modificadores de suelo, películas, fungicidas y elicitors) (Lárez Velásquez, 2008; Bautista-Baños *et al.*, 2006). El quitosano es biocompatible, completamente biodegradable y no tóxico.

El uso del quitosano en la agricultura es reciente y la tabla 1.1. muestra algunas aplicaciones que se han ensayado con este biopolímero (Lárez Velásquez, 2008).

Uso	Biopolímero	Propiedades aprovechadas	Cultivo
Películas para recubrimiento de frutos, hojas, semillas y vegetales frescos	Quitosano	Antimicrobiana	Cítricos, mango, toronja, lechosa (papaya), fresa, tomate
Clarificación de jugos de fruta	Quitosano	Coagulante-floculante	Pera, toronja, limón, manzana
Protección de plántulas	Quitosano	Fungicida	Uva de vino, tomate
Liberación controlada de agroquímicos	Quitina y quitosano	Formación de hidrogeles, labilidad de derivados	Arándano
Estimulación del crecimiento	Quitosano	Bioestimulante	Orquídea
Inhibidor del oscurecimiento de frutos y tubérculos	Quitosano	Biocida	Banana, papa
Biocidas	Quitosano	Antimicrobiana	Tomate, papa, hortalizas
Corrección de sustratos de crecimiento	Quitina y quitosano	Fungicida, nematocida	Lupino blanco (altramuz), guisante, tomate, papa, apio
Inductor de mecanismos de defensa	Oligómeros de quitina y quitosano	Inductor de resistencia	Tomate

Tabla 1.1. Aplicaciones del quitosano en agricultura (Lárez Velásquez)

Bautista-Baños *et al.* (2003; 2004) reportaron la inhibición completa del crecimiento de hongos como *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* y *Colletotrichum gloeosporoides* utilizando quitosano 3%. Otros autores midieron el efecto del quitosano sobre la germinación de las esporas de algunos de estos hongos. Rivero *et al.* (2004) comprobaron la inhibición de la germinación de los conidios del hongo *Fusarium sp* con quitosano 1g/l. Rodríguez-Pedroso *et al.* (2009) confirmaron que las respuestas de defensa que se activan en plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) tratadas con quitosano son: la inducción de la fenilalanina amonio liasa (PAL),  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitosanasa y quitinasa.

El quitosano indujo resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en plantas susceptibles de tomate, cuando se aplicó como un película en las raíces, por pulverización del follaje, por cobertura de semillas e incorporado al suelo como enmienda (Benhamou y Thériault, 1992; Benhamou *et al.*, 1994). El pretratamiento con quitosano



favoreció las respuestas de resistencia de las plántulas de tomate restringiendo el crecimiento del patógeno a los tejidos exteriores de las raíces y disparando reacciones defensivas. Las plantas responden rápidamente a una variedad de condiciones de estrés ambiental y la transducción de señales en cascada que parece involucrar la actividad de fosfolipasas específicas. La percepción de los patógenos y la aparición de respuestas defensivas a ellos involucran la activación de fosfolipasas y rápida producción de fitoalexinas, intermediarios reactivos de oxígeno para la defensa celular en soja (Chandra *et al.*, 1996). Existen evidencias del rol de PLA2 y sus metabolitos en la activación de respuestas defensivas de las plantas. En tabaco, tratamientos con disparadores derivados de *Phytophthora sp* aumentaron la actividad PLA2. En tomate, ácido oligogalacturónico y quitosano promovieron la estimulación de la actividad PLA2 en pocos minutos (Gross *et al.*, 1992).

## **Oligosacarinas**

Las oligosacarinas son oligosacáridos, formados por cadenas cortas (de grado de polimerización (GP) reducido) de azúcares. Pueden derivar tanto de la pared celular de plantas (derivadas de xiloglucanos y pectina) como de la pared celular de hongos (derivadas de glucano y quitina). Las oligosacarinas son pequeñas moléculas liberadas de la pared celular que funcionan como mensajeros químicos hormonales, se originan por hidrólisis enzimática de la pared celular. El estudio de las oligosacarinas es relevante ya que estas participan en la activación de mecanismos de resistencia en plantas (Guevara *et al.*, 2010).

Los oligosacáridos de quitosano (oligoglucosaminas) son solubles en agua a diferencia del quitosano que sólo es soluble a pH ácido. Por otra parte, se ha reportado que la actividad antimicrobiana y antifúngica podría estar relacionada con la longitud de la cadena (Badawy y Rabea, 2011). Quitosanos de bajo peso molecular, podrían alterar la permeabilidad de la membrana celular y penetrar el citosol de microorganismos e incluso se especula con su posible interacción con el ADN interfiriendo con la síntesis de mRNA y proteínas (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Badawy y Rabea, 2011).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó la siguiente hipótesis:

“El quitosano y derivados oligoméricos actúan como disparadores de respuestas defensivas frente a la invasión patógena en soja (*Glycine max*), mediadas por la acción de una enzima fosfolipasa A2 secretoria.”

Como marco de referencia y orientación de la investigación, se formularon los siguientes objetivos:

## Objetivo General

Investigar la capacidad de poli y oligo-glucosaminas como inductores de mecanismos de resistencia contra patógenos en soja (*Glycine max*).

## Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad de quitosano y oligómeros como inductores de resistencia, a través de la estimulación de la biosíntesis de fitoalexinas.
- Evaluar la capacidad de quitosano y oligómeros como inductores de actividad fosfolipasa A2.
- Identificar relaciones entre el parámetro químico (nivel de fitoalexinas) y el parámetro enzimático (actividad PLA2).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## **Materiales**

### **Material vegetal**

Se emplearon semillas de soja, variedad 4990 procedentes del banco de germoplasma de semillas de la EEA INTA Marcos Juárez y de la Red Nacional de evaluación de cultivares de soja.

### **Qitosano**

Se empleó un polímero de qitosano obtenido por el Laboratorio de Microbiología de INTI Mar del Plata, perteneciente al lote A 2041. Las características fisicoquímicas fueron: porcentaje del grado de acetilación 85,7 % (NMR) y peso molecular promedio 500 kDa (viscosimetría).

### **Oligómeros de glucosamina (OGA)**

Se obtuvieron a partir de qitosano INTI; en Metodología se detalla el procedimiento de obtención.

## **Reactivos**

Genisteína de soja  $\geq 97,0$  % Sigma-Aldrich, fue utilizado como estándar en la determinación de fitoalexinas. Lisofosfatidilcolina (Sigma) se empleó como estándar en la determinación de sn-2-lisofosfolípidos, mediante cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC). Lecitina de soja (LS) pura es una mezcla de fosfolípidos (PL) neutros (PC y PE) y aniónicos (PI y PA). La composición analítica determinada según Madoery *et al.* (1995) fue: PC 33,4 %; PE 28,6 %; PI 29,6 % y PA 8,3 %. LS fue el sustrato en la reacción de hidrólisis para la determinación de actividad PLA2. Peróxido de Hidrógeno 30 %, Ácido Acético Glacial, tampón Tris/HCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KCl y todos los solventes utilizados (etanol, acetato de etilo, hexano, acetona) fueron de grado analítico.

## **Instrumental principal**

Espectrofotómetro UV-Visible Hewlett-Packard HP-8452 A (USA).

Agitador movimiento circular, rango 0 a 700 rpm.

Evaporador rotatorio Büchi RE-111 (Suiza).

Centrífuga Sorvall (USA). Rotor SS-34.

Centrífuga Arcano 80-2B.

pHMetro digital Hanna (USA).

Motocompresor para vacío Sylfab.

Agitadores magnéticos.

## **Metodología**

### **Preparación de semillas embebidas**

Las semillas fueron remojadas en los compuestos inductores: quitosano 1 mg/ml y OGA 3 mg/ml durante una hora, antes de ser colocadas en bandejas sobre papel embebido con agua destilada durante 12 horas.

## **Preparación de semillas pregerminadas**

Las semillas de soja fueron remojadas en los compuestos inductores quitosano 1mg/ml y OGA 3 mg/ml durante una hora, antes de ser colocadas en bandejas sobre papel embebido con agua destilada, para su germinación a 25° C durante 5 días, hasta el desarrollo de 15-20 mm de raíz emergente.

## **Preparación de plántulas de soja**

Las semillas fueron desinfectadas previamente con etanol (70 %) e hipoclorito de sodio (2 %) durante diez minutos, enjuagadas tres veces con agua destilada estéril y embebidas en los compuestos inductores durante una hora, antes de ser colocadas en bandejas sobre papel empapado con agua destilada, para su germinación a 25° C durante 5 días. Las semillas pregerminadas (15-20 mm de raíz emergente) fueron colocadas en macetas de 10 cm de diámetro, cuatro por macetas, con una mezcla de tres partes de tierra estéril, una de perlita y una de vermiculita. Las plantas crecieron en cámara de crecimiento, en condiciones controladas de luz artificial/oscuridad de 16/8 horas, a 25° C y 70 % de humedad.

Se seleccionaron de forma aleatoria plántulas de soja entre 21 y 28 días, con la primera hoja trifoliolada.

## **Poder germinativo (PG) de semillas tratadas con inductores**

Se realizó la prueba de germinación para establecer si los inductores, quitosano y OGA, afectan el poder germinativo de las semillas. Esta prueba establece el número máximo de estas que pueden germinar bajo condiciones óptimas de luz, humedad y temperatura según normas ISTA (2006).

Como sustrato se utilizó arena, donde se sembraron 400 semillas por tratamiento y se incubó en cámara de cultivo a 25° C y 12 horas de luz. El recuento se realiza a los 8 días después de la siembra.

### **Preparación de quitosano**

Para preparar solución del biopolímero 1 mg/ml, ácido acético 0,6 N (2 ml) se adicionó a un erlenmeyer conteniendo 50 ml de agua destilada, siendo colocado en un baño a 40° C. Quitosano (50 mg) se espolvoreó con permanente agitación hasta alcanzar completa disolución a pH 3,0. Completada la disolución se llevó a pH 5,0 con NaOH 1N.

### **Preparación de OGA**

El polímero quitosano es soluble en medio ácido y precipita por encima de pH 6, lo cual plantea una limitante en su aplicación; y por otro lado, el tamaño molecular puede influir en las propiedades biológicas de este tipo de compuestos (Badawy y Rabea, 2011). Oligómeros de glucosamina (OGA) solubles en agua pueden ser obtenidos por diversas vías de reacción. La hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática no permiten un adecuado control del grado de polimerización deseado en el producto de reacción final. Por este motivo, la obtención de oligómeros en este trabajo se llevó a cabo mediante degradación oxidativa de quitosano por irradiación con microondas, en base al método de Shao *et al.* (2003).

A los efectos de obtener inductor OGA, quitosano (2 g) fue colocado en contacto con peróxido de hidrógeno 15 % (50 ml) en un frasco de vidrio cilíndrico (8 cm diámetro, 18 cm altura) tapado con cápsula de Petri. Después de 20 minutos, el recipiente con la mezcla de reacción fue colocado en el centro de un horno de microondas (700 W) e irradiado durante 4 minutos. A continuación, se filtró sobre papel de filtro a presión reducida obteniéndose un filtrado claro. Para acelerar la descomposición de peróxido de hidrógeno residual, se adicionó 1 N NaOH hasta pH 7,0. Por gravimetría del residuo

(polímero no reaccionado) se determinó el rendimiento de la reacción. Bajo condiciones experimentales cuidadosamente controladas, el método de degradación oxidativa por irradiación con microondas, es altamente reproducible y permite obtener una mezcla de pentámeros y hexámeros de glucosamina a partir del quitosano polimérico (Shao *et al.*, 2003). La fase líquida filtrada constituyó la solución madre de OGA, a partir de la que se prepararon las soluciones inductoras utilizadas en los experimentos de inducción.

### **Evaluación del efecto antimicrobiano directo de los inductores**

Se empleó el método de “envenenamiento”, para lo cual se adicionaron iguales volúmenes de medio de cultivo y soluciones madre de quitosano a la concentración 2000 mg/l y de oligómero 6000 mg/l, de manera de obtener las concentraciones efectivas usadas de 1000 mg/l de quitosano y 3000 mg/l de oligosacarina.

Se sembró un disco por placa de micelio de 0,6 cm de diámetro de *Fusarium sp* en el centro de la placa. Los discos miceliales se obtuvieron de la periferia del cultivo puro del hongo de cinco días de edad, en medio de agar papa glucosado (APG), incubado en condiciones controladas, fotoperiodo 16 horas de luz y a una temperatura de 22° C. Se utilizó como control un tratamiento que en lugar de los inductores contenía agua destilada estéril a igual volumen de medio APG. Se incubaron 7 días en las condiciones descriptas previamente y se midió el diámetro de la colonia en centímetros.

### **Extracción de fitoalexinas**

La extracción de fitoalexinas se llevó a cabo aplicando una técnica denominada “difusión facilitada”, basada en el método de Keen (1978). Al material colectado de hojas (1g de masa fresca por muestra) se le adicionó 20 ml de etanol 40% (p/p) en kitasato de 125 ml y se le aplicó vacío (560 mm Hg equivalente a 75 kPa) con un motocompresor durante 30 minutos. La aplicación de vacío genera presión negativa que remueve aire ocluido en el tejido foliar y luego, al ser interrumpido el vacío, la recuperación de la

presión atmosférica promueve la infiltración del tejido por parte del solvente extractor (infiltración con vacío). Posteriormente, se movió ligeramente el medio completo en agitador durante 5 horas a 100 rpm para forzar el pasaje del extracto ubicado en el interior del tejido, hacia el medio acuo-etanólico externo. Este extracto acuo-etanólico fue luego concentrado en evaporador rotatorio hasta la mitad del volumen, asegurando la evaporación de la totalidad del etanol. A continuación, la fase acuosa se extrajo dos veces, con acetato de etilo en ampolla de decantación. El conjunto de fases orgánicas fue deshidratado con sulfato de magnesio, filtrado y luego evaporado hasta sequedad (Keen, 1978; Minchiotti *et al.*, 2012).

### **Medición de fitoalexinas**

Se determinó el total de fitoalexinas mediante espectrofotometría UV de segunda derivada. La característica más distintiva de este método, es la presencia de una banda negativa con un mínimo a la misma longitud de onda en que se observa un máximo en el espectro de absorción convencional (Fukutake *et al.*, 1996). La derivada segunda también muestra dos posibles bandas satélites a ambos lados de la banda principal. La espectrofotometría se utiliza para resolver bandas superpuestas y fundamentalmente, para eliminar o atenuar efectos de interferencia en el análisis cuantitativo. La derivación de espectros constituye una herramienta para amplificar la estructura fina de las curvas espectrales haciendo posible la observación de cambios en pequeños intervalos de longitud de onda y realzando la estructura del espectro de absorción, obteniéndose mayor resolución de los detalles y datos más significativos. Las dos ventajas más importantes que ofrece la derivación de espectros son: i) aumento en la resolución; ii) discriminación de las estructuras finas del espectro (Perkampus, 1992; Owen, 1996). Para la determinación de fitoalexinas, se midió la intensidad relativa a 268 nm en el resolubilizado etanólico (6 ml etanol y dilución 12,5 veces con el mismo solvente) del extracto obtenido según 4.3.8, utilizando un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A con sistema de arreglo diodos (Minchiotti *et al.*, 2012).



## **Extracción de PLA2**

Para la obtención de homogenatos de semillas embebidas en agentes inductores y respectivos ensayos testigo, las muestras fueron sometidas a sucesivos pasos de purificación, siguiendo un protocolo para proteínas extracelulares (Minchiotti *et al.*, 2008).

Las semillas de soja (50g) previamente hidratadas durante 12 horas fueron tratadas con un equipo homogenizador. Para obtener un homogenato se agregó 30 % en volumen de agua y se calentó a 95° C durante 5 minutos a fin de eliminar proteasas. Este homogenizado se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue tratado con hexano, en una relación de volúmenes 4:1 sobrenadante/hexano, para remover los lípidos y asegurar la eliminación de sustrato libre endógeno. A la fase acuosa se le agregó un volumen de acetona, en relación 3:1 con la muestra, enfriando el medio a una temperatura final de entre 0 y 5° C para asegurar la precipitación de las proteínas. Las proteínas precipitadas fueron redisueltas en tampón Tris-HCl pH 7 y esta solución fue centrifugada a 12000 g. A continuación, se llevó a pH 4,5 para precipitar gran parte de proteínas no deseadas. Con este paso se separan fundamentalmente, proteínas de elevado peso molecular responsables de la turbidez. Se realizó cromatografía de afinidad con utilización del colorante sintético *Cibacron Brilliant Blue FN-G*, como ligando inmovilizado al polímero acrílico *Eupergit C*. Se sembró el extracto en la columna de afinidad y luego de lavado con agua se llevó a cabo la elución de la proteína aplicando alícuotas de KCl 0,05 N. Para detectar la presencia de la proteína deseada, se determinó actividad PLA2 en las fracciones colectadas (Minchiotti *et al.*, 2008).

## **Medición de actividad PLA2**

Se determinó actividad PLA2, aplicando un método espectrofotométrico continuo basado en el estudio cinético de la absorción aparente  $\lambda$  340 nm por parte de liposomas multilaminares (Madoery y Minchiotti, 2006). El sustrato utilizado en la reacción fue lecitina de soja (LS, fosfolípidos totales 98 %) 0,2 mg/ml en tampón Tris 8,0 y 3 mM CaCl<sub>2</sub>. A efectos de ensayar la actividad de PLA2 de soja, 0,5 ml de extracto o volumen

equivalente que incluya enzima pura, fueron adicionados al medio de reacción, conformando un volumen total de 2,5 ml. La reacción se inició con el agregado de la enzima y se desarrolló a 30° C con agitación suave intermitente en el lapso entre irradiaciones efectuadas por el espectrofotómetro.

Se utilizó un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP 8452A con sistema de arreglo de diodos y el programa Multicell Kinetic UV Vis. La actividad lipolítica conduce a la formación de *sn*-2-lisofosfolípidos, los cuales tienden a formar agregados micelares de menor tamaño con la consecuente disminución (pendiente negativa  $-\Delta A/\Delta t$ ) de la absorción aparente. A los efectos de confirmar la hidrólisis estereoespecífica en la posición *sn*-2 de fosfolípidos, se evaluó la formación de lisoderivados mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) contra estándar de *sn*-2 lisofosfatidilcolina (Sigma) (Madoery y Minchiotti, 2006). La unidad de actividad enzimática es definida en términos de velocidad de disminución de la absorción aparente a 340 nm. Los agregados voluminosos (liposomas o vesículas multilaminares) dispersan la radiación en mayor medida que los agregados pequeños (micelas, donde predomina el producto: lisofosfolípidos). Dicha dispersión de radiación es registrada por el espectrofotómetro como absorción aparente. Es “aparente” porque no es absorbida por las moléculas, sino que más bien es desviada por los agregados, con lo cual no llega al sistema de detección del espectrofotómetro. Una unidad de actividad (U) PLA2 es aquí definida como *la cantidad de proteína que produce un cambio de 0,001 en unidades de absorbancia por minuto* en las condiciones del ensayo enzimático. Entonces, la ecuación aplicada para el cálculo de actividad en la expresión de los resultados es la siguiente:

$$\text{Actividad PLA2} = (\Delta A/\Delta t) 6.10^4 \text{ U}$$

Donde:  $\Delta A$  es la variación en unidades de absorbancia a 340 nm y  $\Delta t$  el lapso de tiempo (en segundos) en el estudio cinético, siendo  $t_1$  el tiempo inicial y  $t_2$  el tiempo final de reacción.

## **Diseño experimental y análisis estadístico**

Los ensayos se condujeron en un diseño experimental totalmente aleatorizado con 3 repeticiones por tratamiento y los datos se analizaron mediante ANOVA y se determinaron las diferencias entre las medias de los tratamientos (Madden *et al.*, 2007).

Los resultados reportados son promedios de tres experimentos independientes realizados en duplicado.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación, se aplicó un diseño experimental comparativo con 1 factor primario (tipo de agente inductor) y 3 replicaciones para cada experimento. Las variables de respuesta fueron: actividad enzimática PLA2 y contenido de fitoalexinas totales.

A los efectos de comprobar la influencia del grado de polimerización en el efecto inductor, se realizaron ensayos con quitosano (polímero, PM promedio 500 kDa) y OGA (oligómeros de glucosamina aprox. 1 kDa). El inductor polimérico presenta limitaciones para su aplicación bajo la forma de solución acuosa, ya que su solubilidad decae fuertemente por encima de pH 6. Por este motivo, se prepararon soluciones a pH 5 en medio de ácido acético diluido. Dicho pH podría resultar contraindicado si el inductor fuera aplicado en algunas especies vegetales. La mezcla de oligómeros OGA GP 5-6 es libremente soluble en medios acuosos en todo el rango de pH, lo cual le otorga una gran versatilidad en diversas formas de aplicación (inoculación, atomización, etc.), y en principio sin limitaciones en cuanto a la especie vegetal a ser tratada.

OGA consistió en una mezcla de pentámeros y hexámeros de glucosamina (OGA GP 5-6), que fue sintetizada por degradación oxidativa del quitosano polimérico en horno microondas. El método de síntesis resultó simple, reproducible y factible de trasladar a mayor escala. Existen otros métodos para obtener oligoglucosaminas solubles. La hidrólisis catalizada por ácidos inorgánicos, lleva a la formación de monómeros u oligómeros de menos de cuatro unidades ( $GP < 4$ ). En principio, solamente oligómeros en el rango de tetrámeros a heptámeros ( $GP 4-7$ ) poseen capacidad de reconocimiento molecular (Badawy y Rabea, 2011). Mientras que la hidrólisis enzimática, si bien permite obtener oligómeros de mayor GP, presenta problemas de reproducibilidad y dificultades para una producción en mayor escala.

## **Evaluación del efecto de quitosano y OGA sobre el poder germinativo (PG)**

El PG fue 87 % para las semillas control y 88 % en las que se aplicó OGA como inductor; y de 84 % en el control y 83 % en semillas tratadas con quitosano. Estos resultados demuestran que tanto quitosano como OGA no poseen efectos fitotóxicos en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Cabe aclarar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el posterior desarrollo normal de la planta.

## **Evaluación de efectos antimicrobianos directos**

Posibles efectos antimicrobianos directos por parte de quitosano y OGA fueron investigados *in vitro* contra *Fusarium sp.* El resultado fue negativo en las condiciones experimentales del ensayo (fundamentalmente: concentración inductor: 3 mg/ml y tiempo embebido), lo cual permitió descartar efectos antimicrobianos directos que de algún modo interfirieran y/o complicaran el estudio de la inducción de resistencia pura. En ciertas condiciones, quitosano puede desarticular las membranas de los hongos, provocar la liberación de sustancias hacia el exterior y de esta manera ocasionar así su destrucción (Badawy y Rabea, 2011). No se registró inhibición del crecimiento micelial aplicando el ensayo indicado en sección Materiales y Métodos (4.6). Luego de 7 días, el patógeno colonizó todo el diámetro de la placa en el ensayo experimento con inductores al igual que la placa del ensayo control.

## **Contenido de fitoalexinas**

La principal ventaja de la técnica de difusión facilitada es que permite la extracción eficiente de fitoalexinas de las hojas de soja con mínima remoción de compuestos

interferentes y se obtiene un elevado nivel de recuperación (Keen, 1978). En el extracto obtenido se determinó fitoalexinas totales mediante espectrofotometría de segunda derivada, midiendo intensidad relativa a  $\lambda$  268 nm (Fig. 6.3.).

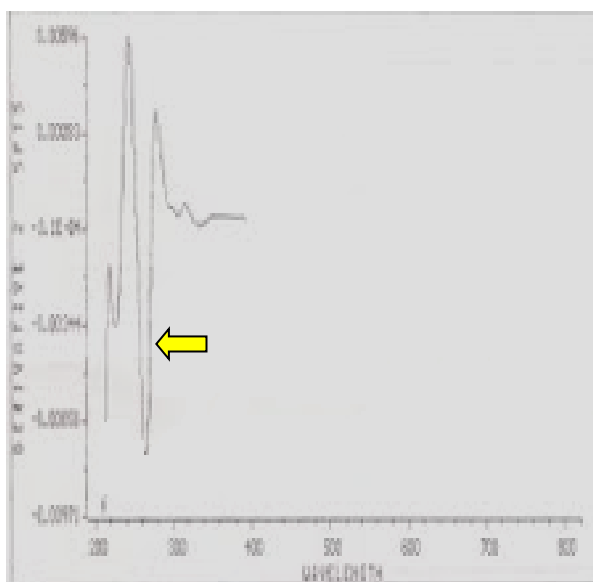


Figura 6.3. Espectro segunda derivada (la flecha indica la absorción a 268 nm) obtenido con el equipo HP 8452.

Se obtuvo la curva de calibración usando genistéina de soja como estándar. La misma es la isoflavona biológicamente más activa y la única encontrada en hojas de soja. Posee actividad antimicrobiana y es clasificada como una fitoalexina preformada e inducible (Romari *et al.*, 2003). Aplicando regresión lineal con el programa GraFit (Leatherbarrow, R. *GraFit* Version 2.0 Erithacus Software Ltd., Staines, UK) se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9984 (Fig. 7.3.).

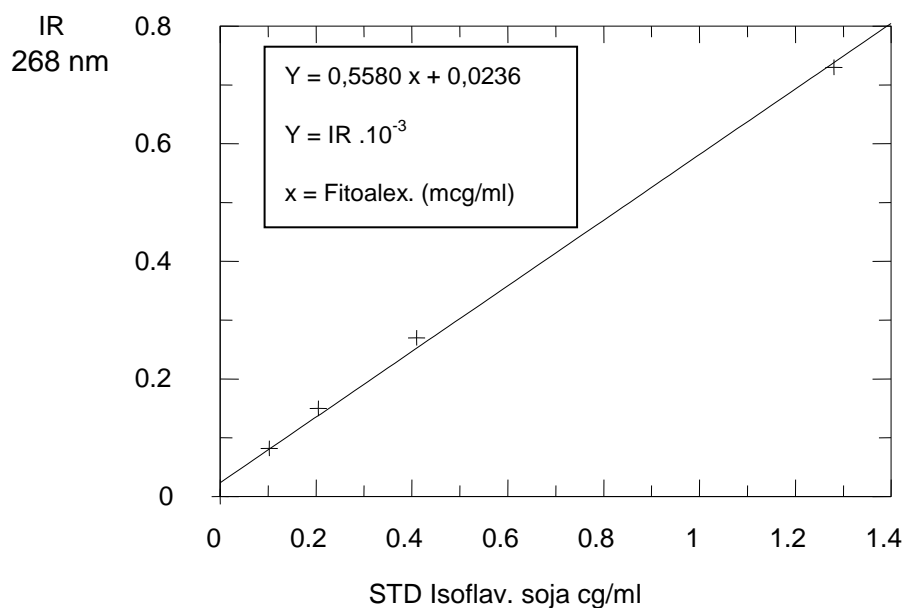


Figura 7. 3. Curva de calibración. Intensidad Relativa 268 nm vs std isoflavona (Genisteína)

Los resultados fueron expresados como mcg de fitoalexina por g de tejido vegetal, aplicando los cálculos que se indican a continuación. Despejando  $x$  ([fitoalexinas] en mcg/ml) en la ecuación de la curva de calibración resulta:

$$x = \frac{Y - 0,0236}{0,5580}$$

Luego, multiplicando por 75 (el valor de este factor surge de las diluciones realizadas sucesivamente), se expresa el resultado como mcg Fitoalexinas/g hojas frescas.

A los efectos de validar el procedimiento global de extracción y medición de fitoalexinas, se realizó un ensayo de recuperación. Se utilizó Genisteína de soja en lugar de muestra problema, obteniéndose un nivel de recuperación de 93,4 %.

Los experimentos de inducción se desarrollaron aplicando los inductores en un rango de concentraciones de 1-3 mg/ml. Este rango fue seleccionado teniendo en cuenta que se ha reportado efecto microbiano directo aplicando concentraciones de quitosano del

orden de 4 mg/ml (Bautista-Baños *et al.*, 2003, 2004). Y por otra parte, utilizando una concentración de inductor menor a 1 mg/ml, no se registró aumento en concentración de fitoalexinas, parámetro indicador de inducción de resistencia.

La aplicación de Quitosano produjo un incremento del 39 % respecto del ensayo de control en la concentración de fitoalexina en hojas frescas enteras, después de tres semanas del embebido de las semillas (Fig. 8.3.).

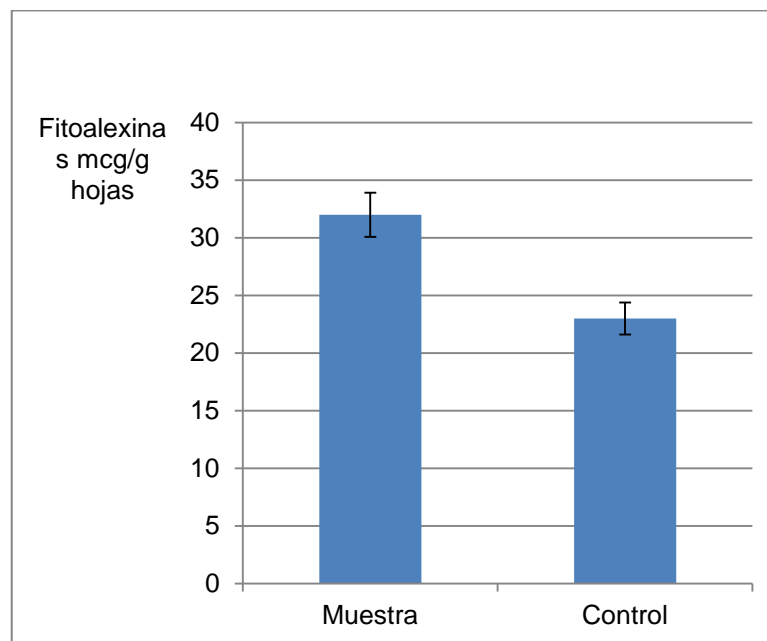


Figura 8.3. Efecto de quitosano sobre concentración de fitoalexinas en hojas de plantas de 3 semanas. Las barras representan las desviaciones del promedio.

Dos semanas después (cinco semanas desde el embebido), se registró en el mismo lote de plantas, un nuevo incremento en el contenido de fitoalexinas en coincidencia con evidentes signos de invasión patógena (Tabla 2.3.).



Muestra	IR x 10 <sup>-3</sup>	Fitoalexinas mcg/ml	Fitoalexinas mcg/g hojas frescas
Soja GM 4990			
Ctrl sin/Q	0,20	0,316	23±1
c/Quitosano (3 semanas)	0,26	0,424	32±2
c/Quitosano (5 semanas)	0,38	0,639	48±2

Tabla 2.3. Contenido de fitoalexinas plantas de semillas tratadas con quitosano

A los efectos de definir un tiempo apropiado de imbibición de la semilla, los experimentos fueron realizados a 30 y 60 minutos. Un incremento de 144 % en el nivel de fitoalexinas se observó al mayor tiempo de embebido (Fig. 9.3.). Se seleccionó dicho tiempo, ya que promovió la respuesta más intensa. Un mayor tiempo de embebido no se consideró conveniente ante la aparición de signos de deterioro en la anatomía de la semilla tal como degeneración y desprendimiento de la cubierta seminal.

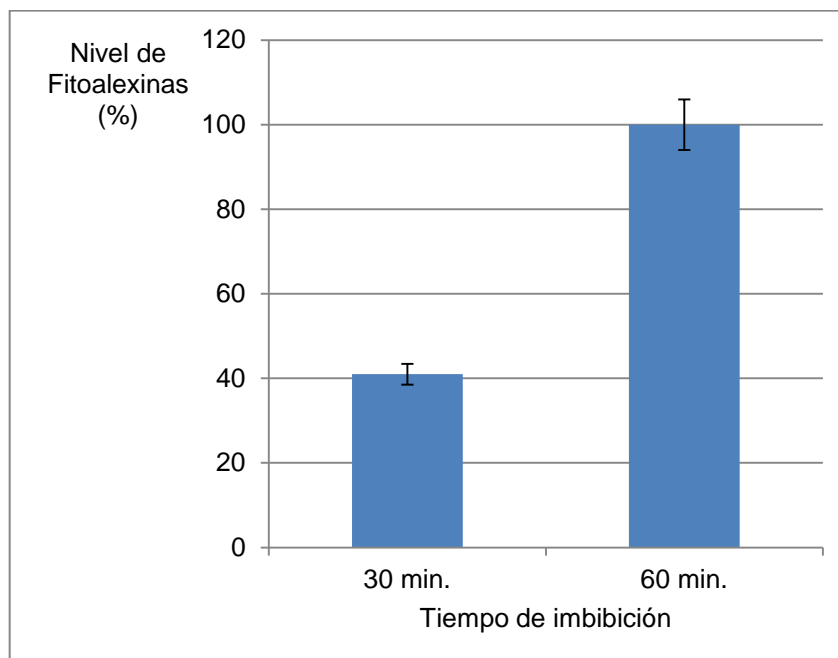


Figura 9.3. Efecto de quitosano sobre concentración de fitoalexinas a dos tiempos de embebido de semillas. Las barras representan las desviaciones del promedio.

Es conocido que debido a su naturaleza policationica, el quitosano puede penetrar la pared celular para interactuar con la membrana plasmática de la semilla. Ha sido reportado que quitosano puede penetrar las células de plantas, siendo detectado en el citoplasma 15 minutos después de su aplicación en la superficie del tejido vegetal. Más aún, existen evidencias que amplios poros pueden ser producidos por la acción del biopolímero. Tratamientos con el aminopolisacárido incrementaron la permeabilidad de membrana, siendo esto demostrado por la liberación de proteínas de bajo y alto peso molecular al medio extracelular. La explicación de dicho efecto residiría en la naturaleza policationica del quitosano, ya que otros policationes produjeron similares efectos mientras que polímeros acídicos o neutros y bases monoméricas no mostraron esa actividad (Young *et al.*, 1982; Hadwiger, 2013).

La aplicación de OGA promovió un fuerte incremento en el nivel de fitoalexina, resultando 41 veces superior al efecto inductor del biopolímero (Fig. 10.3.). Ésta marcada diferencia se puede explicar en términos de tamaño molecular (grado de polimerización).

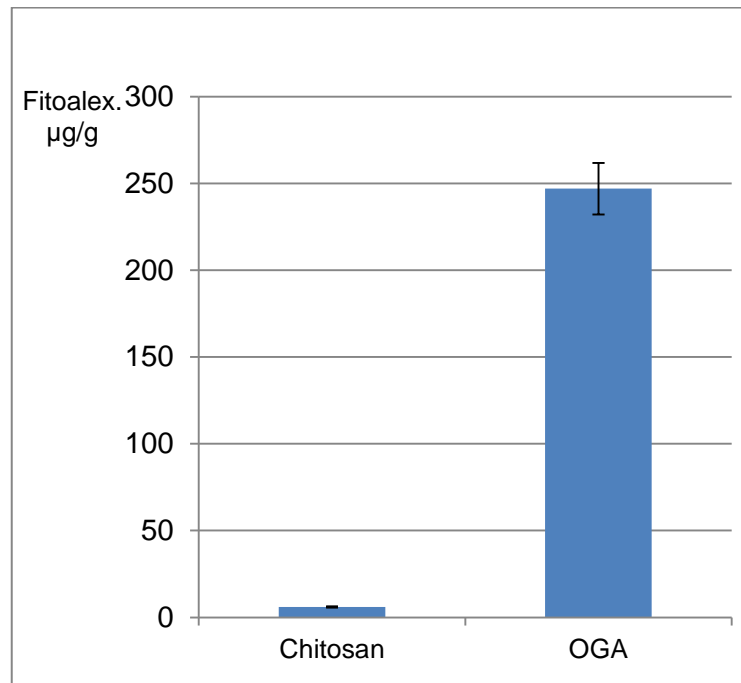


Figura 10.3. Comparación del efecto de quitosano y OGA. Las barras representan las desviaciones del promedio.

OGA es libremente soluble en medios acuosos permitiendo su aplicación sin coadyuvantes de solubilización ni modificación del pH. Es sabido que el grado de polimerización (GP) afecta la solubilidad de los oligómeros y además su actividad biológica; y aparentemente, la respuesta biológica óptima de los oligómeros de glucosamina se da en el rango de tetrámeros-heptámeros (GP 4-7) (Badawy y Rabea, 2011). En este caso, OGA es una mezcla de pentámeros y hexámeros. Este grado de polimerización sería adecuado no sólo por la solubilidad del inductor, sino también por las interacciones intermoleculares en el contexto de los eventos de reconocimiento molecular de la elicitación biosintética de fitoalexina en la soja.

## **Actividad de fosfolipasa A2**

El apoplasto está conformado por las paredes celulares de las células adyacentes y el espacio extracelular asociado y constituye un ambiente para la interacción entre la planta y los patógenos. Es también un sitio para la comunicación entre células (Witzel *et al.*, 2011). En *Arabidopsis thaliana*, la secreción de la isoforma alfa de la enzima PLA2 al apoplasto fue modulada por las etapas de desarrollo de tejidos vegetales. La expresión de dicha isoforma fue elevada en hojas jóvenes y en general en tejidos en activo desarrollo, disminuyendo en hojas maduras. El nivel de expresión de sPLA2 $\alpha$  también fue elevado en raíces desarrolladas. En *Arabidopsis* la expresión del gen sPLA2 isoforma alfa es controlado en un estado de desarrollo y de una manera específica. Más aún, se encontró elevada actividad del promotor de expresión sPLA2 alfa en plántulas en activo crecimiento pertenecientes a esta especie (Jung *et al.*, 2012). De todos modos, el mecanismo de regulación de defensa de la planta mediado por sPLA2 puede extenderse más allá de su actividad lipolítica, actuando sobre genes relacionados con la defensa.

En un trabajo anterior, se aplicaron herramientas informáticas para investigar los niveles de expresión de sPLA2 en soja. *Affymetrix Expression Console Version 1.1* es un programa de computación diseñado para la realización de análisis genéticos ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). Aplicando esta tecnología en soja, se registraron los más elevados

niveles de expresión de enzima PLA2 secretoria (*GmsPLA2*) en las etapas más tempranas de desarrollo (Mariani *et al.*, 2012).

A continuación, se reproducen imágenes suministradas por Mariani *et al.* sobre resultados obtenidos mediante *Genevestigator* v.3 que es una plataforma *on line* utilizada como base de datos en la investigación de expresión de genes. En coincidencia con el trabajo de Jung *et al.* (2012), los niveles de expresión más elevados fueron observados en los primeros estadios (Fig. 11.3.). En la segunda imagen (Fig. 12.3.) generada por el programa, se brinda información detallada sobre la localización precisa de los niveles de expresión. Así, los números en rojo de la segunda columna, revelan que la mayor presencia de *GmsPLA2* se da en raíces y hojas trifoliadas. Cabe destacar que el análisis de fitoalexinas se realizó precisamente en plantas que fueron cosechadas luego que desarrollaran las hojas trifoliadas.

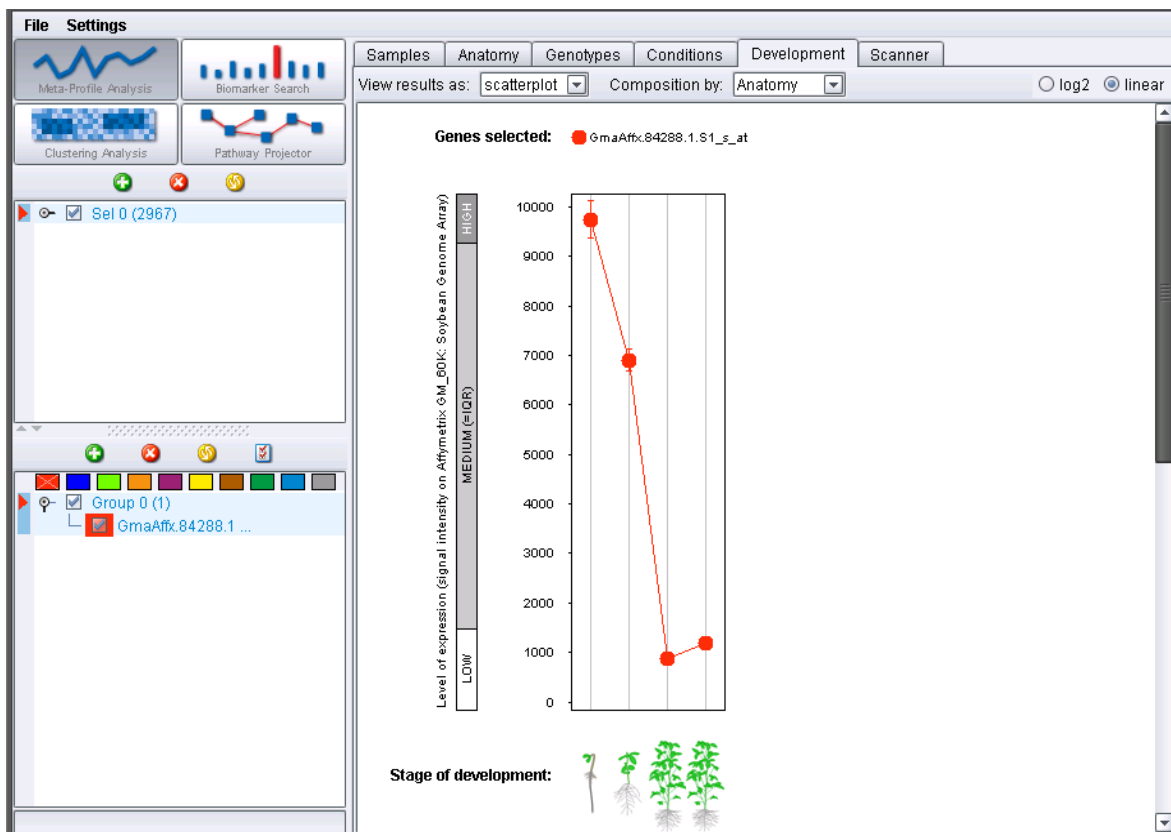


Figura 11.3. Niveles de expresión de Gms PLA2 en función del estadio fenológico de la soja.

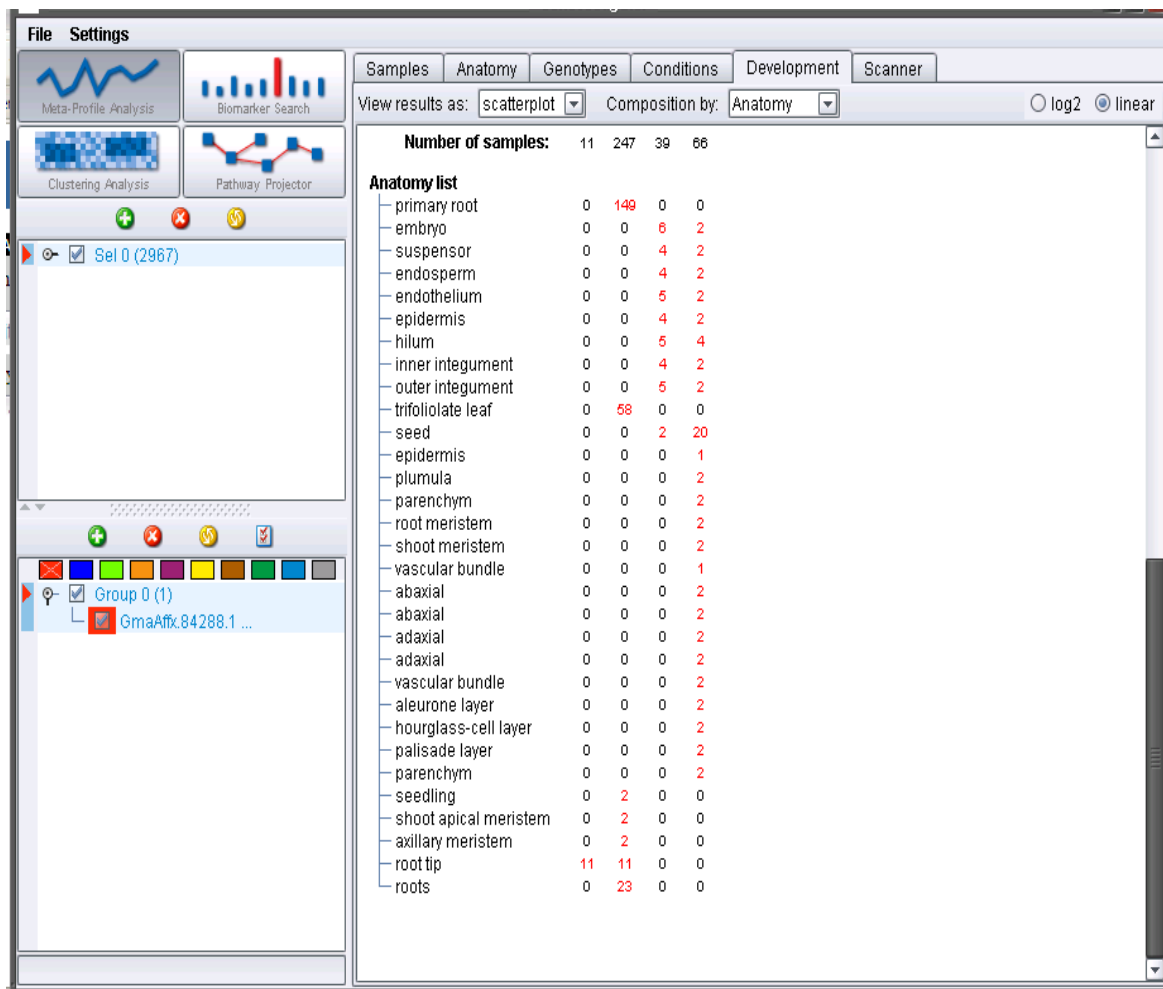


Figura 12.3. Localización de los niveles de expresión de Gms PLA2.

En el presente trabajo, la inducción de la PLA2 mediante quitosano fue evaluada en semillas embebidas y semillas pregerminadas de soja (cinco días de desarrollo) como fue descrito en la sección de Materiales y Métodos. Se registraron incrementos de 45 % (semillas) y 70 % (semillas pregerminadas) en la actividad de PLA2 con respecto a ensayos control (sin inductor), cuando fue aplicado el polímero quitosano. En el gráfico de fig. 13.3., se muestran estos resultados incluyendo el descuento del control respectivo.

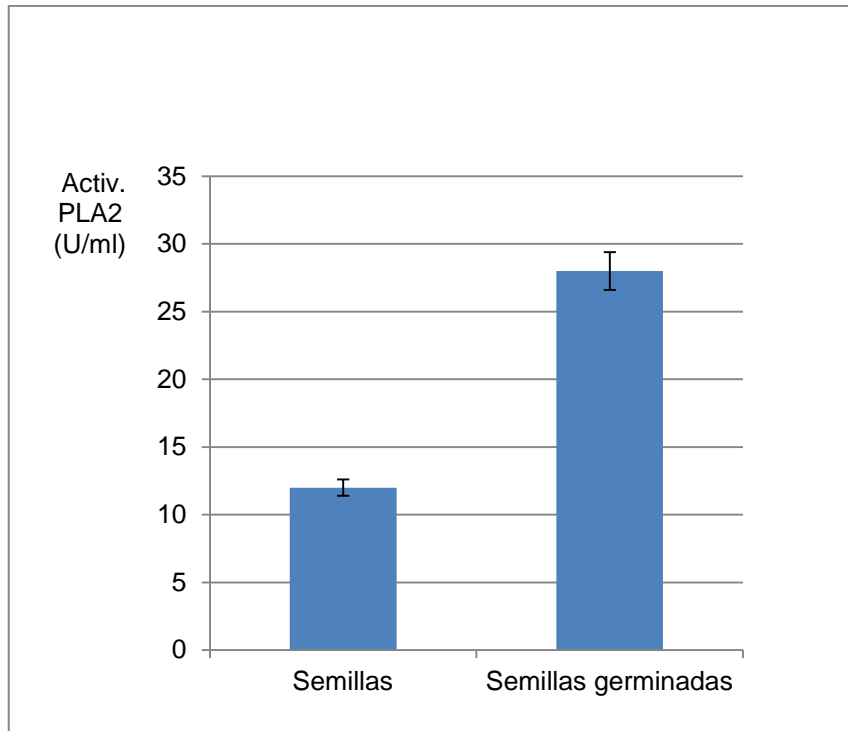


Figura 13.3. Efecto de quitosano sobre actividad PLA2. Los datos incluyen el descuento del control. Las barras representan las desviaciones del promedio.

La actividad de la PLA2 aumentó 200 % respecto al control, cuando el inductor ensayado fue el OGA actuando sobre semillas pregerminadas. En cambio, en el ensayo con semillas embebidas, el incremento en actividad respecto al control, alcanzó sólo al 23%. Por lo tanto, OGA fue más efectivo disparador de la expresión de PLA2 que quitosano y el estadio de germinación de las semillas favoreció el proceso de inducción (Fig. 14.3. y 15.3.).

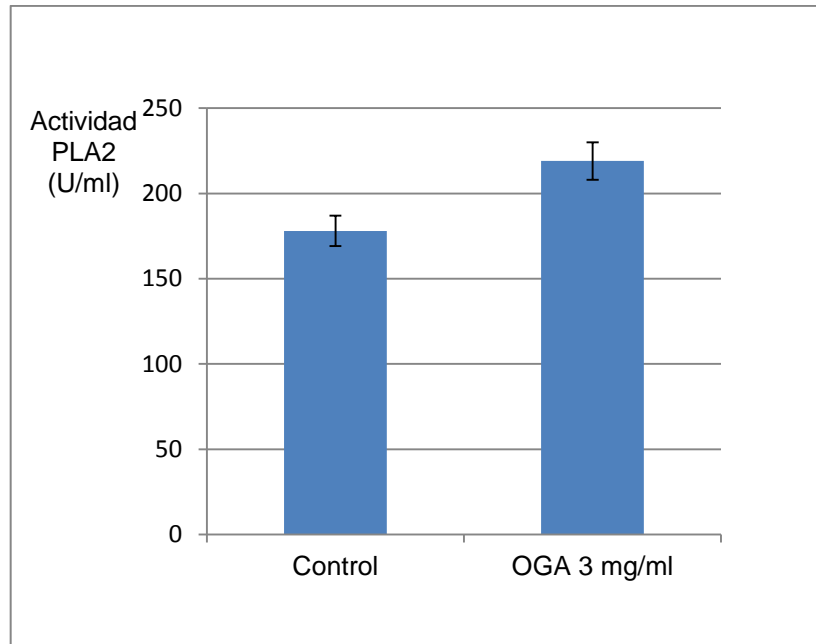


Figura 14.3. Efecto de OGA sobre actividad PLA2 en semillas

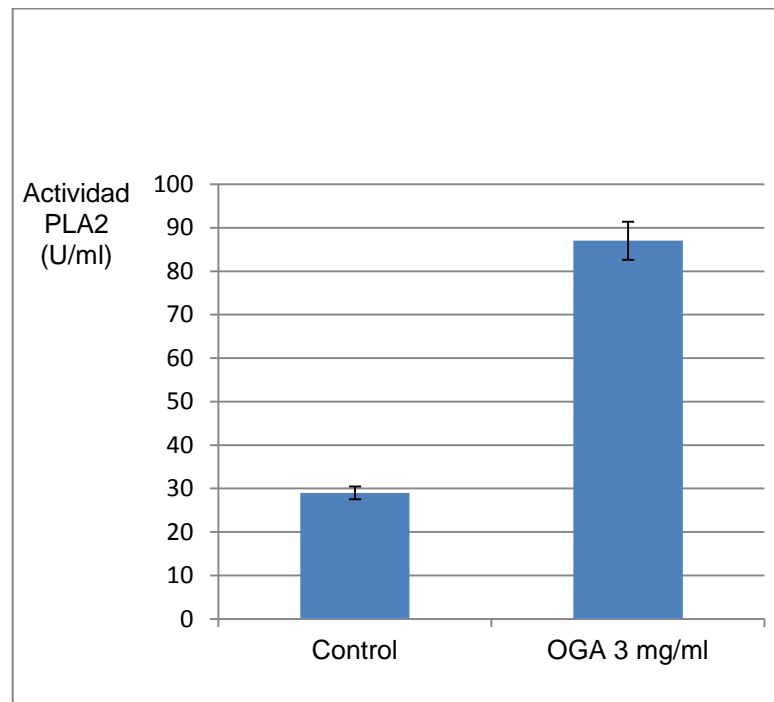


Figura 15.3. Efecto de OGA sobre actividad PLA2 en semillas germinadas

Estos resultados indican que sPLA2 está involucrada en la respuesta de la planta de soja a los disparadores, pero la naturaleza detallada de esa participación permanece aún por elucidar. El efecto inductor de OGA fue marcadamente superior al del biopolímero, tanto en la biosíntesis de fitoalexinas como en la expresión de sPLA2. Esto se interpreta como una mayor efectividad de OGA en la interacción, debido a la menor dimensión molecular y/o a determinados aspectos estructurales. La naturaleza catiónica por sí sola, si bien explica la interacción de los derivados de glucosaminas con las biomembranas, no sería entonces la principal causa de la acción inductora de estos **bioproductos**.

Por otra parte, se comprobó que la presencia de ácido acético en la solución inductora de quitosano afectó negativamente la actividad PLA2 en semillas embebidas y semillas pregerminadas. Iones acetato en el equilibrio con el ácido acético actuarían bloqueando la característica asociación interfacial de sPLA2 con su sustrato (fosfolípidos). Dicho efecto se explicaría como un modo de inhibición no específica por la cual ciertos aniones bloquean la interacción a nivel de la superficie de reconocimiento interfacial de PLA2 (Jain y Berg, 1989). Este efecto de inhibición de PLA2 por la presencia de ácido acético en la solución de quitosano, podría explicar también la marcadamente menor estimulación en la biosíntesis de fitoalexinas con respecto a OGA (Fig. 10.3.). Más aún, estaría indicando que la producción de fitoalexinas en el marco del mecanismo de autodefensa en soja, se trata efectivamente de un proceso mediado por la enzima sPLA2, ya que un menor nivel de actividad de la enzima se tradujo en una menor producción de fitoalexinas (Vargas *et al.*, 2012).

### **Estudio de la acción de OGA como efector**

En el marco de un mecanismo defensivo en el que participan inicialmente quitinasas y quitosanasas degradando la pared celular de hongos patógenos, fosfolipasa A2 secretoria (sPLA2, EC 3.1.1.4) puede atacar las membranas de dichos hongos desarrollando una acción directa (Sharma *et al.*, 2004). Es conocido el hecho que ciertas moléculas producen desarreglos en las bicapas fosfolipídicas, estimulando la actividad de fosfolipasas (De Tullio *et al.*, 2013). Fosfolípidos organizados supramolecularmente como



liposomas representan un modelo de biomembrana. Con el objetivo de estudiar *in vitro* el rol de posibles efectores en la acción directa de sPLA2 de soja (*GmsPLA2*), se realizaron experimentos con oligo-glucosamina grado de polimerización 5-6 (OGA 5-6) obtenido en el Laboratorio de Química Orgánica. Para la determinación de actividad sPLA2 en la hidrólisis de fosfolípidos, se estudió la cinética de disminución de la absorción aparente a 340 nm. Este método no pudo ser aplicado a quitosano, porque el polímero actuaría promoviendo la agregación de liposomas (agregados fosfolipídicos estructurados bajo la forma de vesículas multilaminares), aumentando la absorción aparente a 340 nm. De esta manera, obstaculiza la evaluación de actividad PLA2. Se determinó una actividad sPLA2 de  $296 \pm 15$  U/ml adicionando OGA 1 mM que significó un aumento de 38 % respecto al control, probablemente debido a alteraciones en la topología y/o empaquetamiento de liposomas (Fig. 16.3.). A los efectos de descartar efectos “no enzimáticos” o no estrictamente relacionados con la reacción de hidrólisis de fosfolípidos, se llevaron a cabo ensayos en ausencia de ión calcio, activador esencial de las PLA2s. Hasta un tiempo 3 minutos, no se registró cambio en la absorción aparente (pendiente = 0), indicando que OGA por sí solo (por un efecto “no enzimático”) no es capaz de degradar liposomas en la condición del ensayo.

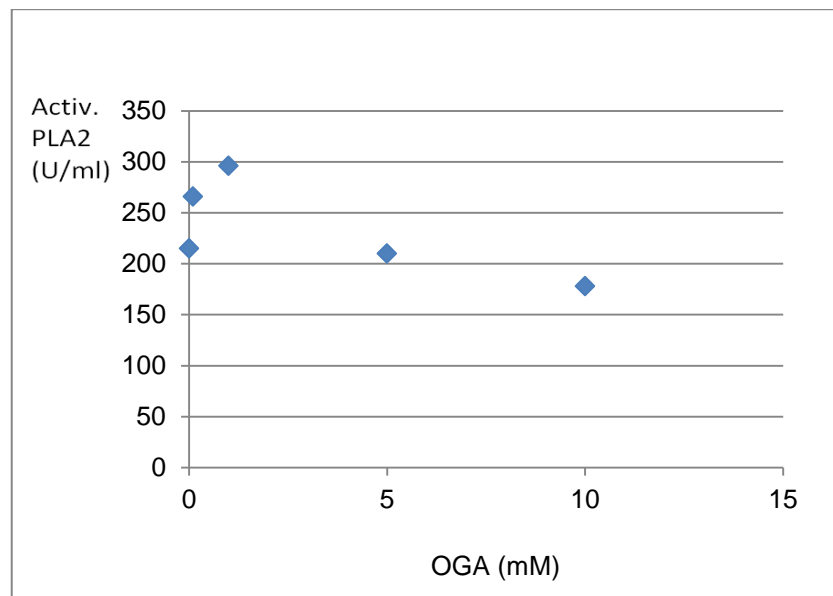


Figura 16.3. Efecto de la concentración de OGA sobre actividad PLA2

El aumento en la actividad sPLA2 se interpreta en el sentido que la inserción de OGA produce desarreglos en la bicapa fosfolipídica, favoreciendo el acceso de la enzima interfacial para el desarrollo de la catálisis (Fig. 17.3. y 18.3.).

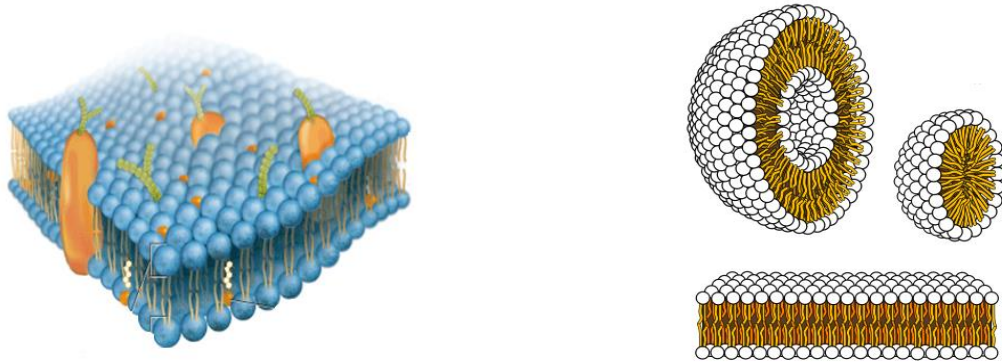


Figura 17.3. Representación de biomembrana (izq.). Modelos de organización supramolecular de fosfolípidos bajo la forma de bicapas (liposoma y bicapa planar) y micela (der.) [http://en.wikipedia.org/wiki/Biological\\_membrane](http://en.wikipedia.org/wiki/Biological_membrane)

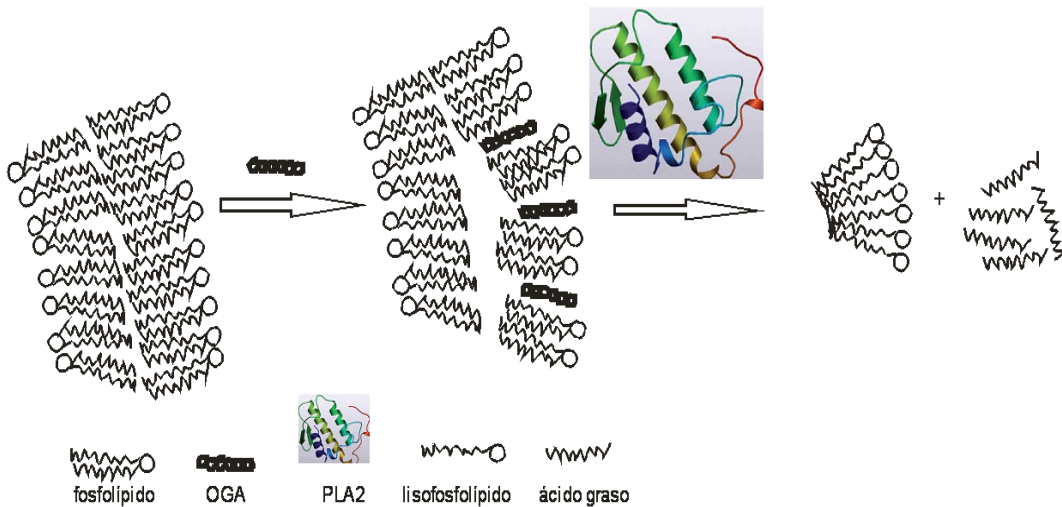


Figura 18.3. Representación del desarreglo de las bicapas lipídicas por la acción de OGA y subsiguiente hidrólisis catalizada por PLA2 con formación de lisofosfolípidos y ácidos grasos.

Concentraciones muy superiores de OGA en el medio, condujeron a una disminución en la actividad sPLA2 respecto al control. Esto indicaría un efecto de inhibición de la reacción de hidrólisis por efecto de OGA que compite con el sustrato por

el sitio activo de sPLA2. En conclusión, concentraciones del orden 1 mM OGA promovieron la activación de sPLA2 en la lipólisis de bicapas fosfolipídicas de composición similar a las membranas de hongos patógenos.

### CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis, se desarrolló un procedimiento seguro y sensible para la determinación de fitoalexinas en hojas de soja (*Glycine max*). Se aplicó un método de extracción por difusión facilitada modificado, consistente en la generación de presión negativa que remueve aire ocluido en el tejido foliar. La recuperación de la presión atmosférica provoca la infiltración del tejido por parte del solvente extractor. Se trata de un ensayo no-destructivo ya que en principio, el solvente ingresa solamente al apoplasto o espacio intercelular, evitando en gran medida la extracción de sustancias interferentes. Luego de etapas de extracción líquido-líquido se realizó la determinación cuantitativa de fitoalexinas por espectrofotometría ultravioleta de segunda derivada. Esta metodología permitió aumentar considerablemente la resolución en la medición con respecto a la determinación por medición directa de absorbancia.

Con el objeto de disponer de un inductor libremente soluble en todo el rango de pHs, se ajustó un procedimiento de síntesis de OGA a partir del polímero quitosano. Una mezcla de pentámeros y hexámeros de oligo-glucosamina (OGA GP 5-6) fue obtenida por degradación oxidativa del biopolímero bajo irradiación en horno de microondas. Este método de síntesis de laboratorio resultó simple, rápido, reproducible y la escala de obtención puede ser fácilmente aumentada (Ravichandran y Karthikeyan, 2011; Shao *et al.*, 2003). La técnica de aplicación de los inductores consistió en la inoculación por embebido de las semillas de soja. Pero en principio, otras alternativas, como la aplicación en raíces o la atomización foliar son factibles.

Quitosano y OGA activaron mecanismos de autodefensa en la planta al promover la síntesis de fitoalexinas, compuestos con actividad antimicrobiana. Como otra respuesta defensiva, ambos inductores exógenos promovieron la expresión de PLA2, una enzima involucrada en rutas metabólicas y en la transducción de señales. Se sabe que ésta y otras

enzimas como glucanasas, quitinasas etc., participan en la producción de compuestos inhibidores de la acción patogénica o en el reforzamiento de paredes y cubiertas de la planta para resistir la invasión patógena (Baustista-Baños *et al.*, 2006).

Las primeras etapas en la acción de poli y oligo-glucosaminas tendrían que ver con el carácter policationico de estas moléculas cuando se encuentran en soluciones de pH inferior a 6,0. En dicha condición, los grupos aminos cargados positivamente pueden interactuar con fosfolípidos aniónicos presentes en las membranas celulares y alterar así su permeabilidad.

Tanto quitosano como OGA aumentaron los niveles de fitoalexinas y expresión de sPLA2, indicadores representativos de respuestas protectoras frente a la infección viral. Esta habilidad no depende del tipo de patógeno porque el inductor desarrolla sistémicamente su acción sobre la planta. Ambos, indujeron aumentos sobre la concentración de fitoalexinas y actividad PLA2, pero OGA produjo claramente los efectos más marcados. Dicha mayor efectividad se relacionaría con el tamaño molecular (quitosano 500 kDa, OGA 1 kDa) y consecuentemente con la capacidad de interacción y de reconocimiento molecular. Las semillas de soja tratadas con biopolímeros y oligómeros de quitosano, aumentaron la concentración de fitoalexina en las hojas y los niveles de actividad de PLA2 en semillas, tanto pregerminadas como no germinadas. Los incrementos de ambos, el indicador químico y el enzimático, fueron mayores en las semillas pregerminadas, en coincidencia con un estadio de elevada actividad biológica. El inductor OGA (peso molecular alrededor de 1 kDa) obtenido en este trabajo de tesis, fue aplicado por primera vez como agente inductor de defensa. Cabe destacar que OGA resultó notablemente más efectivo que el polímero quitosano, indicando que el tamaño molecular o la estructura tridimensional son factores decisivos en la acción del inductor. Así, imitando el contacto de la semilla de soja con fitopatógenos, quitosano y principalmente OGA, indujeron la biosíntesis de fitoalexinas y la expresión de sPLA2 en el marco de la respuesta defensiva.

La acción de los inductores dispararía ambos mecanismos defensivos (biosíntesis de fitoalexinas y expresión de PLA2) en forma independiente uno de otro, o bien podría tener lugar una acción sinérgica o mutuamente condicionada. Es conocido el efecto inhibitorio sobre sPLA2 de serpiente por parte de la isoflavona genisteína (Dharmappa *et al.*, 2010). Las isoflavonas son un tipo de fitoalexinas presentes en elevada concentración en soja y precisamente, en ensayos con extractos apoplásticos de soja realizados últimamente en nuestro laboratorio, se registraron efectos inhibitorios (resultados no publicados). En ese sentido, cabría pensar entonces en un mecanismo autorregulado, por el cual sPLA2 promueve la biosíntesis de fitoalexinas hasta un cierto nivel en que dichas moléculas polifenólicas comenzarían a actuar como inhibidores reversibles, atenuando transitoriamente la actividad sPLA2.

La habilidad de estos inductores para contener la infección viral en plantas no depende del tipo de agente patógeno porque tanto quitosano como OGA afectan a la planta misma, promoviendo la activación de mecanismos de resistencia. Simulando un contacto de la planta con patógenos, estos bioproductos inducen reacciones autoprotectivas en la planta, limitando la expansión patógena y generando resistencia sistémica adquirida. A diferencia de los fungicidas y agroquímicos en general, este tipo de inductores de resistencia no afectan el medio ambiente. Los mecanismos de inducción de defensas, por otra parte, no alteran la información genética del vegetal. Actúan solamente activando esa base genética. En contraposición, las manipulaciones genéticas pueden fortalecer a la planta frente a un patógeno específico pero debilitarla frente a otro.

## **PERSPECTIVAS**

Futuras investigaciones sobre propiedades de reconocimiento molecular de polímeros y oligómeros de quitosano, permitirán profundizar la dilucidación de los mecanismos de inducción de defensa contra patógenos en soja y extender este conocimiento generado a otras especies.

El estudio de los factores que influyen en la expresión de sPLA2 de soja (*GmsPLA2*), su traslocación al apoplasto y el estudio mecanístico a través de la cinética enzimática, aportarán al conocimiento y propuesta de modelos de regulación de la actividad sPLA2 en soja y especies similares en el marco de las respuestas defensivas contra patógenos.

Como una continuidad de este proyecto, y como complemento de la investigación ya realizada en soja, se aplicará la microscopía óptica confocal de alta resolución para evaluar el efecto patogénico de hongos como *Macrophomina* y se estudiarán también posibles efectos de los inductores sobre la anatomía del vegetal, como por ejemplo la formación de barreras físicas para la defensa.

Es importante destacar que los compuestos inductores utilizados en este trabajo de tesis se encuadran en la categoría de **bioproductos**. Se trata de productos naturales que están presentes en los agroecosistemas, por lo que no atentan contra la salud humana y ambiental. Su acción se basa en el estímulo o fortalecimiento del sistema inmune del vegetal, a diferencia del agroquímico que elimina al organismo nocivo. El uso de agroquímicos convencionales hace que en el tiempo, los patógenos se vuelvan indiferentes a su acción porque el empleo persistente de los mismos favorece la proliferación de genotipos del patógeno virulentos para el mismo. La inoculación de semillas de soja con quitosano y OGA reforzaría el sistema inmunológico de la planta, actuando como una *vacuna vegetal*. Estos inductores basados en glucosamina, se encuadran en el grupo de los Inductores de los Sistemas de Defensa Vegetal (ISDV). Este tipo de bioinsumo, aumenta la sustentabilidad de un sistema productivo en el conjunto de los agroecosistemas. Por su origen natural, los **bioproductos** se degradan sin alterar el ecosistema, a diferencia de los compuestos sintéticos que permanecen y contaminan el ambiente.

Finalmente, se prevé realizar contactos con el medio, apuntando a la transferencia tecnológica del conocimiento generado. El polisacárido quitina, la materia prima a partir de la cual se obtiene industrialmente el quitosano, proviene de desechos de animales marinos, aunque está ampliamente distribuida en toda la biósfera, incluyendo las paredes celulares

de hongos y algas. La quitina forma un esqueleto estructural externo en invertebrados y posee similitudes estructurales con la celulosa. El Laboratorio de Microbiología de INTI Mar del Plata (Centro Regional Sur, Pcia. Buenos Aires), único centro nacional productor de quitosano en escala planta piloto, aportó los lotes del polímero para la realización de la presente investigación. De este modo, si es garantizada la provisión de materia prima a nivel nacional, se podría avanzar en la producción de OGA en escala planta piloto. En los últimos años dicho centro ha ido avanzado también en la caracterización de polímeros de quitosano. En ese sentido, será importante contar con datos precisos de peso molecular, ya que el mismo varía en un amplio rango (desde 2 a  $> 200$  kDa). También es necesario tener en cuenta el grado de deacetilación (si es alto significa que posee elevado número de grupos aminos). Ambos parámetros son importantes ya que estarían relacionados con la actividad antimicrobiana del quitosano.



## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Academic Press, London.
- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. Review. *Trends Plant Science* 17: 73-90.
- Amborabé, B., Bonmort, L., Fleurat-Lessard, P. and Roblin, G. 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. *J. Exp. Botany* 59: 2317-2324.
- Badawy, M. and Rabea, E. 2011. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. Review. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2011: 1-29.
- Baigorri, H. and Croatto, D. 2000. Manejo del cultivo de la soja en Argentina. EEA Marcos Juárez 96 pp.
- Baigorri, H. and Salado Navarro, L. 2012. El cultivo de soja en Argentina. 1a. Ed. Agroeditorial. 400 pp.
- Barreto, D., Stegman de Gurfinkel, B. and Fortugno, C. 1995. Races of *Phytophthora sojae* in Argentina and reaction of soybean cultivars. *Plant Dis.* 79: 599-600.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.* 25: 108-118.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M. and Bosquez-Molina, E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Mexican Journal of Phytopathology* 22: 178-186.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C.L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
- Benhamou, N. and Thériault, G. 1992. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen, *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathology* 41: 33-52.
- Benhamou, N., Kloepper, J. and Tuzun, S. 1998. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with and endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204: 153-168.
- Benhamou, N., Lafontaine, P. and Nicole, M. 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84: 1432-1444.
- Boca, R., Pacin, A., González, H., Resnik, S. y Souza, J. 2003. Soja y micotoxinas: flora fúngica, variedades y prácticas agronómicas. *Aceites & Grasas* 53: 510-515.
- Bressano, M., Giachero, M. L., Luna, C. and Ducasse, D. 2010. In vitro method for examining infection of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74: 201-204

- Carmona, M., Gally, M. y Lopez, S. 2005. Asian Soybean Rust: Incidence, severity, and morphological caracterización of *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinia and Telia) in Argentina. *Plant Disease* 89: 109.
- Carmona, M., Ploper, D. L., Grijalba, P., Gally, M. y Barreto, D. 2003. Enfermedades de fin de ciclo del cultivo de soja. 22pp.
- Carmona, M., Sautua, S., Perelman, S., Gally, M. 2008. Enfermedades de fin de ciclo de soja. Asociación entre fungicidas, rendimiento y lluvia. Resumen 1º Congreso Argentino de Fitopatología AAF. Córdoba. pp.225.
- CASAFE Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. 2013. Estudio de mercado de fitosanitarios.
- Chandra, S., Heinstein, P. and Low, P. 1996. Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol.* 110: 979-986.
- Chapman, K. 1998. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. Review. *Trends in Plant Science* 3: 419-426.
- Cheong, J., Birberg, W., Fugedi, P., Pilotti, A., Garegg, P., Hong, N., Ogawa, T. and Hahn, M. 1991. Structure-activity relationships of oligo-beta-glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. *The Plant Cell* 3: 127-136.
- Cuniberti, M., Herrero, R., Mir, L., Berra, O. y Macagno, S. 2013. Rendimiento y calidad comercial e industrial de la soja en la región núcleo-sojera. Cosecha 2012-2013. *Aceites & Grasas* 93: 610-614.
- De Tullio L., Fanani, M. and Maggio, B. 2013. Surface mixing of products and substrate of PLA2 in enzyme-free mixed monolayers reproduces enzyme-driven structural topography. *Biochim. et Biophys. Acta* 1828: 2056–2063.
- Dharmappa, K., Mohamed, R., Shivaprasad, H. and Vishwanath, B. 2010. Genistein, a potent inhibitor of secretory phospholipase A2: a new insight in down regulation of inflammation. *Inflammopharmacol.* 18: 25-31.
- Ebel, J. and Grisebach, H. 1988. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma f.sp. glycinea*: a molecular analysis. *Trends Biochem. Sci.* 13: 23-27.
- Edreva, A. 2004. A novel strategy for plant protection: Induced resistance J. Cell. Moll. Biol. 3: 61-69.
- FAO (2013) <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/197003/> (consulta 22/06/2014).
- Flor, H. H. 1971. Currents status of gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. 1996. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and Chem. Toxicol* 34: 457-461.
- Giorda, L. y Baigorri, H. 1997. El cultivo de la soja en Argentina. INTA C. R. Córdoba.
- Grayer, R. and Kokubun, T. 2001. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 56: 253-263.
- Gross, W., Yang, W. and Boss, W. 1992. Release of carrot plasma membrane-associated phosphatidylinositol kinase by phospholipase A and activation by a 70 kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 1134: 73-80.
- Guevara, E., Enrique, A., Hernández, A., Arispuro, I. and Tellez, M. 2010. Oligosacarinas derivadas de pared celular: Actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 28: 144-155.

- Gupta, R., Lee, S., Agrawal, G., Rakwal, R., Park, S., Wang, Y. and Kim S. 2015. Understanding the plant-pathogen interactions in the context of proteomics-generated apoplastic proteins inventory. *Front. Plant Sci.* 6:352.
- Hadwiger, L. 2013. Plant science review: Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype. *Plant Sci.* 208: 42-49.
- ISTA. 2006. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing.
- Jain, M. and Berg, O. 1989. The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. *Biochim. Biophys. Acta* 1002: 127-156.
- Jiménez, K.L., Zavaleta, A.I., Izaguirre, V. y Yarleque, A. 2005. Biología Celular y molecular de las Fosfolipasas A2. *Ciencia e Investigación VIII* (1) Facultad de Farmacia y Bioquímica. Págs. 17-32.
- Jung, J., Kumar, K., Lee, H., Park, Y. and Ryu, S. 2012. Translocation of phospholipase A2 alfa to apoplast is modulated by developmental stages and bacterial infection in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 3: 1-7.
- Keen, N. 1978. Phytoalexins: efficient extraction from leaves by facilitated diffusion technique. *Phytopathology* 68: 1237-1239.
- Keen, N. 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Molecular Biology* 19: 109-122.
- Lárez Velásquez, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *UDO Agrícola* 8: 1-22.
- Laxalt, A. and Munnik, T. 2002. Phospholipid signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 332-338.
- Leatherbarrow, R. GraFit 2.0 Erithacus Software Ltd., Staines, UK.
- Lee, H. Y., Bahn, S. C., Shin, J.S., Hwang, I., Back, K., Doelling, J. H. and Ryu, S. B. 2005. Multiple forms of secretory phospholipase A2 in plants. *Progress in Lipid Research.* 44: 52-67.
- Madden, L., Hughes, G. and van den Bosch, F. 2007. The study of plant disease epidemics. St. Paul, APS.
- Madoery, R. y Minchiotti, M. 2006. Un método espectrofotométrico directo y continuo para la determinación de actividad fosfolipasa A2. *LabCiencia* 1: 13-15
- Madoery, R., González Gattone, C. and Fidelio, G. 1995. Bioconversion of phospholipids by immobilized phospholipase A2. *J. Biotechnol.* 40: 145-153
- Madriz Ordeñana, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas.* 63: 22-32.
- Mariani, M., Villareal, M., Cheung, F., Leiva, E., Madoery, R. and Fidelio, G. 2012. In silico and in vitro characterization of phospholipase A2 isoforms from soybean (*Glycine max*). *Biochimie* 94: 2608-2619.
- Minchiotti, M., Scalambro, M., Vargas, L., Coronel, C. and Madoery, R. 2008. Isolation of phospholipase A<sub>2</sub> from soybean (*Glycine max*) seeds. The study of its enzymatic properties. *Enzyme & Microbial Technology* 42: 389-394.
- Minchiotti, M., Vargas, L. and Madoery, R. 2012. Resistance induction in soybean: Phytoalexins determination. *Biocell* 35 (3) A224, Abstract BV 14.
- Narváez-Vásquez, J., Florin-Christensen, J. and Ryan, C. 1999. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *The Plant Cell* 11: 2249-2260.
- Newman, M. 2007. Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides (Review). *Journal of Endotoxin Research* 13: 69-84.

- Owen, T. 1996. Fundamentals of modern UV-Visible Spectroscopy. Hewlett-Packard Co. Alemania.
- Perkampus, H. 1992. UV-Vis Spectroscopy and Applications. Springer-Verlag, Berlin Gmbtt, Alemania.
- Prapagdee, B., Kotchadat, K., Kumsopa, A., Visarathanont, N. 2007. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *Glycines*. *Bioresource Tecnology* 98: 1353-1358.
- Ravichandran, S. and Karthikeyan, E. 2011. Microwave synthesis. A potential tool for green chemistry. *International Journal of ChemTech Research* 3: 466-470.
- Rivero, D., Cruz, A., Martinez, B., Rodríguez, A. y Cárdenas, R. 2004. Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium* sp. *Protección vegetal* 19: 140-144.
- Riveros Angarita, Alba E. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en el programa de agricultura sostenible. M.I.P. 61: 4-11.
- Rodríguez, A. T., Ramírez, M. A., Cárdenas, R. M., Falcón, A. y Bautista, S. 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 1-7.
- Rodríguez-Pedroso, A., Ramírez-Arrebato, M., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. y Bautista-Baños, S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo* 15: 307-317.
- Romari, A., Vignolini, P., Galardi, C., Aroldi, C., Vazzana, C. y Heimler, D. 2003. Polyphenolic content in diferent plant parts of soy cultivar grown under natural conditions. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5301-5306.
- Satorre, E., Katolic, A. y Gutiérrez, F. 2008. Producción de soja. Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola (AACREA). pp. 176.
- Shao, J., Yang, Y., Zhong, Q. 2003. Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative degradation under microwave irradiation. *Polymer Deg. Stability* 82: 395-398.
- Sharma, N., Gruszewski, H., Park, S., Holm, D. and Vivanco, J. 2004. Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol. And Biochemistry* 42: 647-655.
- Sillon, M. 2012. Enfermedades del cultivo de soja. En: El cultivo de soja en Argentina. Baigorri, H., Salado Navarro, L, Eds. Agroeditorial, Buenos Aires, pp. 303-316.
- Six, D. and Dennis, E. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: clasification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 1-19.
- USDA. WASDE. 2014. World Agricultural Supply and Demand Estimate (Wasde) May.
- Vallad, G. E. and Goodman, R. M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- Vallone, S. y Giorda, L. 1997. El cultivo de la soja. Eds. Giorda, L. y H. Baigorri. INTA Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez-EEA Manfredi. 448pp.
- Vargas L.I., Minchiotti M.C., Muñoz J.O. y Madoery R.R. 2012. El biopolímero quitosano y derivados como inductores de resistencia contra patógenos en soja (*Glycine max* (L.) Merr.). V Jornadas Integradas de Investigación y Extensión FCA - UNC. 31/10 al 01/11 2012

- Witzel, K., Shahzad, M., Matros, A., Mock, H. and Mühling, K. 2011. Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods* 7:48
- Xu, J., Zhao, X., Han, X., Du, Y. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 87: 220-228.
- Young, D., Köhle, H. and Kauss, H. 1982. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. *Plant Physiol.* 70: 1449-1454.

## PUBLICACIONES

En el marco de este trabajo de tesis se realizó la siguiente publicación internacional y las siguientes presentaciones a congresos:

### Publicación internacional:

**Chitosan biopolymer and oligomer derivative as elicitors for resistance induction against pathogens in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.).** Vargas L.I., Minchiotti M.C., Muñoz J.O., Madoery R.R. (2014) *Journal of Chitin and Chitosan Science* 2 (4), 267-272. Impreso: Diciembre 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/jcc.2014.1071>.

### Congresos:

**Inducción de resistencia en soja: determinación de fitoalexinas.** Minchiotti, MC.; Vargas, LI.; Madoery RR. Trabajo presentado en la 2da Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina (XIII Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología – XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo – XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba). 17 al 19 de agosto de 2011 – San Juan

**El biopolímero quitosano y derivados como inductores de resistencia contra patógenos en soja (*Glycine max* (L.) Merr.).** Vargas L.I., Minchiotti M.C., Muñoz J.O., Madoery R.R. V Jornadas Integradas de Investigación y Extensión FCA - UNC. Córdoba,

31 de Octubre al 1ro. Noviembre de 2012. II Circuito Agro-Alimentario Jornadas Agroalimentarias Facultad de Ciencias Agropecurias UNC. Presentación de Posters stand.

**Lipasas en Soja.** 16 de Agosto 2013. “El biopolímero quitosano y la inducción de mecanismos defensivos contra patógenos en soja” e “Inmunopurificación de fosfolipasa A2 de soja (*Glycine max*). Expositora.

**Síntesis de oligo-glucosamina y evaluación como elicitador en la inducción de resistencia contra patógenos en soja (*Glycine max*).** L. I. Vargas, M. C. Minchiotti, J. O. Muñoz y R. R. Madoery. 3° Congreso Argentino de Fitopatología – San Miguel de Tucumán, 4 al 6 de junio de 2014.

**Oligómero de glucosamina: un efector en la acción de Fosfolipasa A2 contra la invasión patógena en soja (*Glycine max*).** L. I. Vargas, M. C. Minchiotti, J. O. Muñoz y R. R. Madoery. 3° Congreso Argentino de Fitopatología – San Miguel de Tucumán, 4 al 6 de junio de 2014.