

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**IDENTIFICACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y  
METABOLISMO SECUNDARIO IMPLICADOS EN LA  
DEFENSA DE LA SOJA (*Glycine max*) CONTRA EL  
HONGO *Macrophomina phaseolina***

**AMELIA ADRIANA ORREGO DURAÑONA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas, mención Biotecnología

**San Lorenzo – Paraguay**

**Diciembre de 2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**IDENTIFICACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y  
METABOLISMO SECUNDARIO IMPLICADOS EN LA  
DEFENSA DE LA SOJA (*Glycine max*) CONTRA EL  
HONGO *Macrophomina phaseolina***

**AMELIA ADRIANA ORREGO DURAÑONA**

**Orientador: Dr. JULIO CÉSAR MASARU IEHISA OUCHI**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas, mención Biotecnología

**San Lorenzo – Paraguay**

**Diciembre de 2020**

**Orrego Durañona, Amelia Adriana.**

**Identificación de vías de señalización y metabolismo secundario implicados en la defensa de la soja (*Glycine max*) contra el hongo *Macrophomina phaseolina* / Amelia Adriana Orrego Durañona . - - San Lorenzo: La Autora, 2020.**

**VIII, 93 p.: fig.; 30 cm.**

**Tesis presentada a la Dirección General de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas, mención Biotecnología.**

**1. FITOHORMONAS - SOJA    2. CULTIVOS - MACROPHOMINA  
PHASEOLINA    I. Título**

**CDD: 633.34  
O75i**

**IDENTIFICACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y  
METABOLISMO SECUNDARIO IMPLICADOS EN LA  
DEFENSA DE LA SOJA (*Glycine max*) CONTRA EL  
HONGO *Macrophomina phaseolina***

**AMELIA ADRIANA ORREGO DURAÑONA**

Aprobado en fecha: 16 de diciembre de 2020

Tribunal Examinador:

Prof. Dra. María Eugenia Flores Giubi	FCQ/UNA
Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga Sosa	FCQ/UNA
Ing. Agr. (M. Sc.) Cinthia Carolina Cazal Martínez	CEMIT/UNA
Ing. Agr. (Ph.D.) Marcelo Sebastián Albornó Jover	SENAVE

---

Dr. Julio César Masaru Iehisa Ouchi  
Tutor

---

Prof. Lic. Laura Joy Ramírez  
Directora de Postgrado

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis amigos y compañeros, por el incondicional apoyo durante el curso del postgrado, por ser los cimientos de mi desarrollo, por brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida.

A los docentes de la maestría, por sus enseñanzas, dedicación y la experiencia brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el patrocinio del programa y beca otorgada, y en conjunto con la Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO) por el financiamiento y gestión del Proyecto CONACYT PINV15-315 que posibilitó el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Julio Masaru Iehisa, por sus invaluable enseñanzas y acompañamiento como tutor del trabajo.

Al Prof. Dr. Pablo Sotelo, por abrirnos las puertas del departamento de Biotecnología, y su constante labor como maestro.

Agradecida también con Dios, por todas sus bendiciones que he recibido durante el transcurso de la maestría.

**IDENTIFICACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y METABOLISMO  
SECUNDARIO IMPLICADOS EN LA DEFENSA DE LA SOJA (*Glycine max*)  
CONTRA EL HONGO *Macrophomina phaseolina***

Autor: Amelia Adriana Orrego Durañona

Orientador: Dr. Julio César Masaru Iehisa Ouchi

**RESUMEN**

*Macrophomina phaseolina* es un hongo fitopatógeno necrotrófico transmitido por el suelo que causa la enfermedad de la pudrición carbonosa en varias especies vegetales; entre ellas la soja (*Glycine max*), cultivo económicamente importante para varios países, incluyendo a Paraguay. Actualmente, poco se sabe sobre el mecanismo molecular asociado a la resistencia a este patógeno. Para ello, primeramente se evaluó el proceso de infección utilizando dos métodos de inoculación: en sustrato estéril y por *cut-stem*. En el método de inoculación por *cut-stem* se pudo reproducir el fenotipo resistente/susceptible observado en el campo de las dos variedades estudiadas de soja, por lo que fue utilizado para análisis posteriores. Se analizó el perfil de expresión de genes implicados en vías de señalización de fitohormonas y metabolitos secundarios en los tallos de soja de las variedades DT974290 y A4910, resistente y susceptible a *M. phaseolina* respectivamente en dos tiempos posterior a la inoculación. Los resultados revelaron que en la variedad susceptible A4910, la vía del ácido salicílico se encontró activa en la fase temprana de la infección, se indujeron genes de enzimas del metabolismo secundario principalmente en la fase temprana y una inducción del represor de la vía de auxinas tanto en la fase temprana como tardía. Mientras que en la variedad resistente DT974290, la señalización del ácido jasmónico/etileno podría estar activada en la fase tardía y asociarse a este fenotipo. Por lo tanto, la selección de líneas o genotipos de soja con mayor expresión de genes de respuesta a ácido jasmónico/etileno durante la fase tardía de infección por el método de *cut-stem* podría ayudar a la obtención de variedades con mayor resistencia a *M. phaseolina*.

**Palabras clave:** *Macrophomina phaseolina*, soja, fitohormonas

**IDENTIFICATION OF SIGNALING PATHWAYS AND SECONDARY METABOLISM BIOSYNTHETIC PATHWAYS INVOLVED IN THE DEFENSE OF SOYBEAN (*Glycine max*) AGAINST *Macrophomina phaseolina***

Author: Amelia Adriana Orrego Durañona

Advisor: Dr. Julio César Masaru Iehisa Ouchi

**SUMMARY**

The fungus *Macrophomina phaseolina* is a soil-borne necrotrophic plant pathogen that causes charcoal rot in several plant species such as soybean (*Glycine max*) which is an economically important crop worldwide, including Paraguay. The molecular mechanism associated with tolerance to this pathogen is still unknown. For this purpose, the infection process was first evaluated using the cut-stem and sterile substrate inoculation methods. The resistant/susceptible phenotype of the two soybean varieties observed in field conditions was also reproduced with cut-stem inoculation method, but not with the other method. Therefore, the former was used for subsequent analyses. The expression profile of genes involved in phytohormone signaling pathways and secondary metabolites biosynthesis in soybean stems of varieties DT974290 and A4910, resistant and susceptible to *M. phaseolina* respectively, was analyzed at two points after inoculation. The results revealed that in the susceptible A4910 variety, salicylic acid pathway was activated at the early stage of infection, genes involved in secondary metabolism were induced mainly at the early stage and a repressor of the auxin pathway was induced both in the early and late phase. While in the resistant DT974290 variety, jasmonic acid/ethylene signaling is probably active at the late phase of infection and could be associated with tolerance. Therefore, selection of soybean lines or genotypes with higher expression of jasmonic acid/ethylene-responsive genes during the late phase of infection with cut-stem method could help the obtention of new varieties with higher resistance to *M. phaseolina*.

**Keywords:** *Macrophomina phaseolina*, soybean, phytohormone

## ÍNDICE

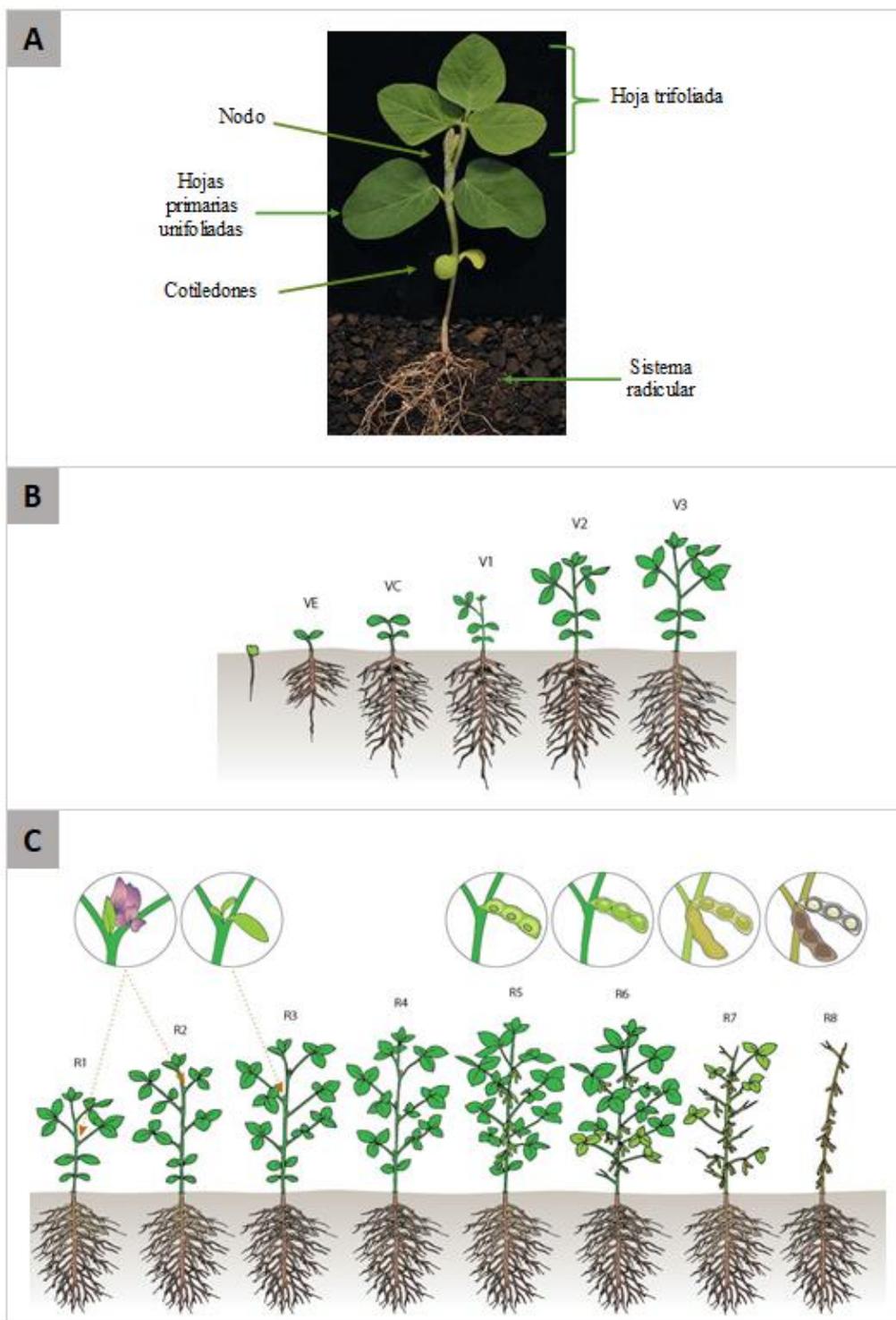
1	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	Soja: Características agronómicas y producción en Paraguay .....	1
1.2	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goidanich .....	3
1.2.1	Características biológicas y ciclo de infección .....	3
1.2.2	Impacto de la Pudrición Carbonosa en Soja (PCS) y métodos de control 5	5
1.3	Mecanismos de defensa vegetal .....	6
1.3.1	Fitohormonas y metabolismo secundario en la defensa vegetal .....	7
1.4	Respuestas de defensa vegetal frente a <i>M. phaseolina</i> .....	9
1.5	Genes considerados para el análisis en el presente trabajo .....	12
2	OBJETIVOS .....	15
2.1	Objetivo General .....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
3.1	Material vegetal y fúngico.....	16
3.2	Infección en sustrato estéril.....	16
3.2.1	Germinación de semillas de soja.....	16
3.2.2	Preparación del inóculo de arroz.....	17
3.2.3	Inoculación.....	18
3.2.4	Evaluación de la infección y preparación de la muestra .....	19
3.3	Infección por corte al tallo “ <i>Cut-stem</i> ” .....	19
3.3.1	Evaluación de la infección y preparación de la muestra .....	20
3.4	Extracción de ácidos nucleicos.....	21
3.5	Síntesis de ADN complementario (ADNc) .....	21
3.6	Selección de genes y cebadores utilizados .....	21
3.7	Determinación de carga fúngica relativa.....	24
3.8	Análisis de expresión de genes implicados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario .....	24
3.9	Asuntos estadísticos .....	25
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Infección en sustrato estéril.....	27
4.1.1	Evaluación del proceso de infección.....	28
4.1.2	Análisis de expresión de genes involucrados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundarios.....	31
4.2	Resultados del método de infección por <i>Cut-stem</i> .....	38
4.2.1	Evaluación del proceso de infección.....	38
4.2.2	Análisis de expresión de genes involucrados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundarios.....	42
5	DISCUSIÓN .....	69
5.1	Caracteres macroscópicos asociados a resistencia y susceptibilidad frente a <i>M. phaseolina</i> de las variedades de soja DT974290 y A4910 observados en ambos métodos de infección.....	69
5.2	La carga fúngica relativa determinada en muestras de ambos métodos de infección no refleja el fenotipo resistente y susceptible de cada variedad.....	71

5.3	Perfil de expresión de genes implicados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario en soja frente a la infección por <i>M. phaseolina</i> .....	72
5.3.1	Implicancia de la señalización de JA/ET en soja en defensa a la infección por <i>M. phaseolina</i> .....	73
5.3.2	Señalización de SA en la defensa de la soja frente <i>M. phaseolina</i> .....	77
5.3.3	Metabolismo secundario en la defensa de la soja frente a <i>M. phaseolina</i>	79
5.3.4	Otras fitohormonas: Auxinas y ABA en la defensa de la soja frente <i>M. phaseolina</i> .....	80
5.3.5	<i>M. phaseolina</i> como un patógeno hemibiotrofo .....	81
6	CONCLUSIÓN .....	84
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

## 1 MARCO TEÓRICO

### 1.1 Soja: Características agronómicas y producción en Paraguay

La soja (*Glycine max* (L.) Merr) es una leguminosa (familia Fabaceae) originaria de Asia cuyo desarrollo se favorece en climas tropicales y subtropicales, con una temperatura óptima de crecimiento entre 20 a 35°C. Es una planta herbácea anual, con un ciclo vegetativo de tres a siete meses y de 40 a 100 cm de envergadura con hojas, tallos y vainas pubescentes. Posterior a su emergencia, su morfología exhibe dos cotiledones, hojas alternas; donde las primarias son hojas unifoliadas, y las demás son trifoliadas en los nudos posteriores y folíolos primarios en la base de las ramas laterales, además de un sistema radicular nodulado, una raíz principal de la cual emerge un sistema radicular lateral (**Figura 1A**). Luego de un estadio vegetativo (**Figura 1B**); que comprende desde la emergencia del suelo hasta el desarrollo de las hojas trifoliadas a partir del segundo nudo, las plantas de soja entran en etapas reproductivas (**Figura 1C**) caracterizada por la floración, formación de vainas y posterior maduración (Chung & Singh, 2008).



**Figura 1. Fases del desarrollo del cultivo soja.** A) Estado V1 de planta de soja, con sus estructuras de crecimiento. Adaptado de Valladares (2010). Estadios del cultivo de soja B) vegetativos; comprendidos entre VE (emergencia de la plántula) a V3 (tres hojas trifoliadas) y C) reproductivos, entre R1 (inicio de la floración) a R6 (semilla completamente desarrollada). Adaptado de Manitoba Pulse & Soybean Growers (2018).

La importancia en la agricultura del cultivo de soja radica principalmente por sus propiedades alimenticias e industriales. Las semillas presentan un contenido medio de aceite y alto de proteínas, la soja procesada es la fuente más grande del mundo de alimento para proteínas animales y la segunda fuente más grande de aceite (USDA, 2020a).

A nivel nacional, según los datos de la zafra 2019/2020 el cultivo de soja ocupa el primer lugar en términos de superficie total de siembra (3.631.000 hectáreas) y producción (11.024.460 toneladas) (DCEA-MAG, 2020). Actualmente Paraguay se encuentra entre los cinco mayores países productores y el cuarto exportador de soja del mundo (USDA, 2020b), por lo tanto constituye el principal cultivo de importancia agrícola y uno de los puntales de la economía del país.

## **1.2 *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich**

Existen factores que limitan el rendimiento y la calidad del cultivo de soja, entre los cuales se encuentran las enfermedades causadas por numerosos fitopatógenos. La capacidad de ciertos patógenos de formar estructuras de resistencias han hecho que los mismos puedan sobrevivir en el suelo; incluso en condiciones desfavorables, constituyéndose en uno de los medios de transmisión (Koike et al., 2003). Entre éstos, se cita a *M. phaseolina*, agente causal de la Pudrición Carbonosa (PC).

### **1.2.1 Características biológicas y ciclo de infección**

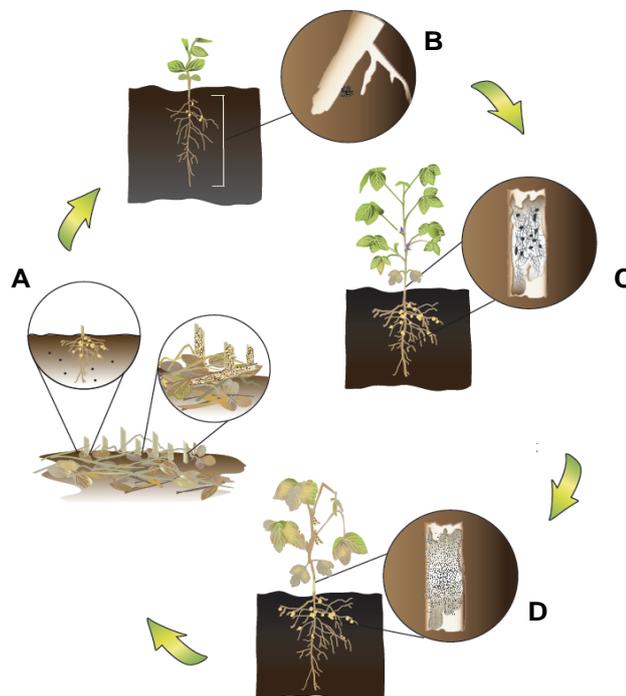
*M. phaseolina* es un hongo fitopatógeno necrotrófico; es decir, aquellos que invaden y matan el tejido de la planta rápidamente y luego viven saprotróficamente en los restos muertos (Lewis, 1973), y causa la enfermedad de la Pudrición Carbonosa (PC) en un amplio rango de hospederos que abarca más de 500 especies vegetales (Mihail & Taylor, 2008). Pertenece al grupo de hongos ascomicetos anamórficos de la familia Botryosphaeriaceae (Crous et al. 2011). La fuente principal de inóculo de *M. phaseolina* son las estructuras de resistencias formadas por el acúmulo de hifas denominadas microesclerocios (**Figura 2**) y pueden persistir en el suelo incluso por años, generalmente distribuidos en grupos en la superficie del suelo

pudiendo sobrevivir en condiciones ambientales adversas, como niveles bajos de nutrientes y temperaturas superiores a 30°C, los cuales son característicos de países tropicales y subtropicales. El rango de temperatura para la germinación de microesclerocios es de 28 – 35°C.



**Figura 2. Microesclerocios de *M. phaseolina* (flechas rojas) en: A) Tallo de soja (flechas rojas) B) Inmersos en medio de cultivo. Adaptado de Velazquez (2017) y Trakunsukharat & Songsang (2011).**

El ciclo de infección inicia cuando un apresorio formado por los tubos germinales penetra directamente a través de la epidermis del huésped mediante la secreción de enzimas que degradan la pared celular o de forma indirecta a través de lesiones en el tejido del huésped (**Figura 3**). Los micelios forman ramificaciones y colonizan el tejido vascular a través de la corteza y luego pasan a los vasos del xilema. Una vez dentro de los tejidos vasculares, el hongo se propaga a través de la raíz del apresorio obstruyendo los vasos, lo cual produce un corte en el suministro de nutrientes en el vegetal produciendo el marchitamiento de este y por consecuencia la muerte de este. A su vez, la producción de toxinas y la degradación enzimática también pueden dar lugar a este fenómeno (Kaur et al., 2012).



**Figura 3. Ciclo de infección de *M. phaseolina*.** **A)** Los microesclerocios sobreviven en el suelo o en los residuos de vegetales. **B)** La infección ocurre cuando el sistema radicular crece cerca o se encuentra en contacto con los microesclerocios, que luego germina y forma estructuras que penetrarán en el tejido de la raíz. **C)** Crecimiento del hongo y obstrucción del tejido vascular a medida que se forman hifas y nuevos microesclerocios. **D)** Numerosos microesclerocios le dan al tallo inferior y al tejido principal una apariencia similar al carbón y proporcionan inóculo para propagación. Adaptado de Smith et al. (2014).

### 1.2.2 Impacto de la Pudrición Carbonosa en Soja (PCS) y métodos de control

La PCS ha causado pérdidas importantes tanto en la calidad como en el rendimiento del cultivo en países los principales países productores y exportadores como Brasil, Argentina y EEUU; así como en Paraguay (Wrather et al. 2010). Las condiciones favorables de temperatura y humedad en nuestro país para el desarrollo de este patógeno han permitido su diseminación en los principales departamentos productores de soja (Orrego-Fuente 2009).

La limitada efectividad de los métodos tradicionales de control integrado utilizando rotación de cultivos, fertilización adecuada, sistemas controlados de riego (Gupta et al., 2012) y otras estrategias como el control biológico y químico sugieren

que la resistencia genética del huésped se constituiría estrategia clave para el manejo de esta enfermedad (Mengistu et al., 2007).

Actualmente se cuentan con pocos genotipos de soja descritos que exhiben resistencia frente a la infección por *M. phaseolina* (Cosser et al., 2017; Paris et al., 2006; Pawlowski & Hill, 2015), sin embargo no son atribuidos con buenos rasgos agronómicos.

Un estudio de asociación de genoma completo (*Genome-wide association study*, GWAS por sus siglas en inglés) para 463 accesiones de soja ha identificado cuatro loci asociados con la resistencia a este patógeno derivadas de pruebas de campo y ocho loci asociados con la resistencia determinada en el invernadero, pero ningún locus fue común entre los dos ambientes ensayados (Cosser et al., 2017). A pesar de la identificación de los posibles genes asociados a la resistencia, no se ha estudiado el rol de los mismos en la defensa contra el hongo.

### **1.3 Mecanismos de defensa vegetal**

La naturaleza sésil de las plantas hace que éstas se encuentren en constante exposición a diversas condiciones de estrés biótico y abiótico a lo largo de su ciclo vital. En respuesta a estas adversidades ambientales, los vegetales han desarrollado una amplia gama de mecanismos de defensa preformadas e inducibles de alta complejidad, las cuales actúan de acuerdo con la naturaleza y estilo de vida del patógeno (Jones & Dangl, 2006).

Las respuestas de defensa a ataques de hongos fitopatógenos comprenden mecanismos de defensa local y sistémicos; entre la cuales se incluyen a una muerte celular localizada por especies reactivas de oxígeno (ROS) conocida como respuesta hipersensible (HR) en el sitio de infección; además la de una o varias señales móviles que están involucradas en la activación de los mecanismos de resistencia en tejidos no infectados denominado resistencia sistémica adquirida (RSA), producción y acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y de diversas familias de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) (Ahuja et al., 2012; Glazebrook, 2005).

### 1.3.1 Fitohormonas y metabolismo secundario en la defensa vegetal

Los mecanismos citados en el apartado anterior son resultado de una compleja red de interacciones en donde las fitohormonas actúan como mensajeros químicos en varios procesos fisiológicos del vegetal entre los cuales se incluye la regulación de vías de señalización implicadas en la defensa (Schenk et al., 2000), entre ellas se citan al ácido jasmónico (JA), etileno (ET), ácido salicílico (SA), auxinas (AUX), ácido abscísico (ABA) entre otras.

La biosíntesis de *novo* de fitohormonas o la conversión a la forma activa (estado con actividad biológica) de éstas se induce en el vegetal como respuesta al estrés; ya sea de naturaleza biótica y/o abiótica. A continuación, las fitohormonas son reconocidas por sus receptores lo cual conlleva a la liberación de la represión o inhibición de la vía de señalización o bien el reclutamiento de factores de transcripción activadores de la expresión de los genes de respuesta (Miyakawa & Tanokura, 2017) (**Figura 4**). Las complejas interacciones entre la señalización mediada por fitohormonas, así como las señales externas y endógenas que las regulan dificultan realizar generalizaciones sobre la intervención de una vía específica.

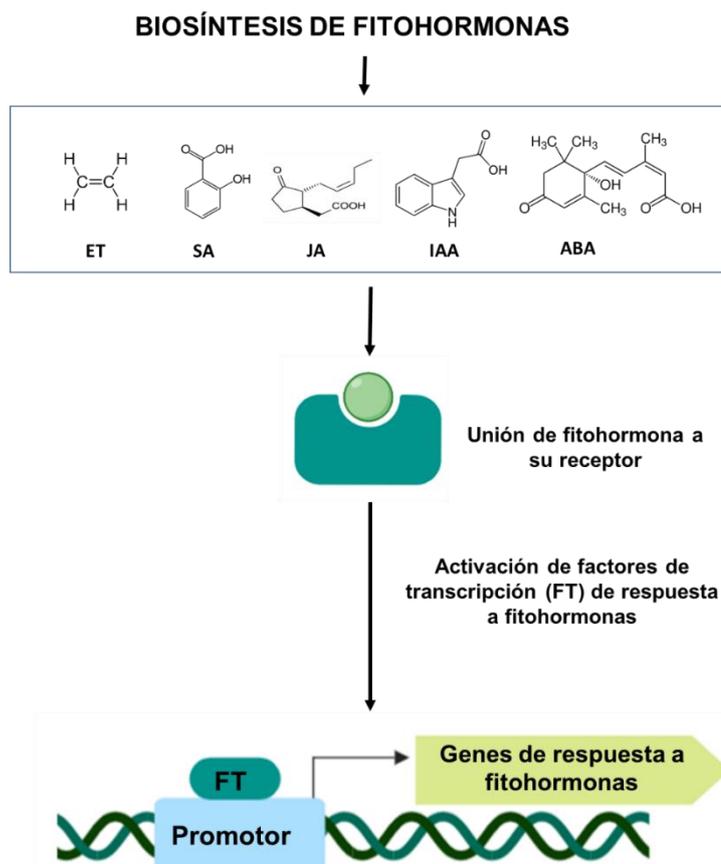
La señalización mediada por JA, ET y SA constituye un componente integral de la defensa vegetal contra patógenos fúngicos; y la activación diferencial de las mismas depende del estilo de vida del hongo, pudiendo éste manipular el sistema para la colonización exitosa (Kazan & Lyons, 2014). Las fitohormonas JA y ET funcionan sinérgicamente en defensa contra los necrotróficos en antagonismo directo a las defensas mediadas por SA (Glazebrook, 2005), sin embargo el SA es capaz de mediar la resistencia local contra necrotróficos (Ferrari et al., 2003) además de la RSA, un mecanismo que brinda defensa contra un amplio espectro de patógenos fúngicos y bacterianos (Delaney et al., 1994; Wally et al., 2009).

Las AUX se encuentran implicadas principalmente en el desarrollo de las plantas, siendo la auxina natural más importante el ácido indol-3-acético (IAA). Sin embargo, la evidencia señala su participación también en la regulación de la defensa. Al igual que el antagonismo entre las vías de SA y JA/ET en la activación de respuestas de defensa según el estilo de vida del patógeno al cual se enfrenta el

vegetal (Glazebrook, 2005), se ha sugerido un antagonismo entre las vías de SA y AUX, mientras señalización de AUX y JA comparten muchos puntos en común durante la defensa de la planta (Naseem et al., 2015). Además de manera indirecta, las AUX también afectan el progreso de la enfermedad a través de los efectos sobre el desarrollo (Kazan & Manners, 2009).

Por otra parte, ABA es una fitohormona que regula la adaptación a condiciones de estrés de tipo abiótico como sequía, la baja temperatura y la salinidad (Shinozaki et al., 2003); sin embargo, la evidencia sugiere la interconexión entre las redes que controlan la resistencia al estrés abiótico y biótico, dentro de la cual se encuentra la señalización mediada por ABA (Mauch-Mani & Mauch, 2005).

Para protegerse frente a microorganismos patógenos las plantas sintetizan una gran diversidad de metabolitos secundarios que actúan contra éstos de acuerdo a su naturaleza (bacteriano, fúngico) y/o estilo de vida (biotrófico hemibiotrófico o necrotrofico) (Schäfer & Wink, 2009), encontrándose implicados en funciones que varían desde barreras físicas o químicas preformadas e inducibles y como moléculas señal involucradas en la inducción de genes de defensa (Dixon et al., 2002) y en otros procesos como la interacción de las plantas organismos no patógenos y la respuesta vegetal frente al estrés abiótico (Schäfer & Wink, 2009). Los metabolitos secundarios pueden estar presentes constitutivamente, producto de componentes preexistentes (fitoanticipinas) o ser sintetizados de *novo* en respuesta al ataque patógeno (fitoalexinas) (VanEtten et al., 1994). Los derivados de compuestos indólicos, glucosinolatos, fenilpropanoides, ácidos grasos y flavanoides se han implicado en la defensa contra los necrotrofos (Laluk & Mengiste, 2010).



**Figura 4. Esquema de mecanismo de activación de genes de respuesta a fitohormonas.** Luego de síntesis o conversión a la forma activa de la fitohormona inducida por el ataque del patógeno (u otro tipo de estrés) ésta se une a su receptor, lo cual provoca la liberación de la represión o inhibición de la vía de señalización (JA, ET, ABA y AUX) (Chang & Stadler, 2001; Katsir et al., 2008; Miyakawa & Tanokura, 2017) o bien el reclutamiento de factores de transcripción activadores de la expresión de los genes de respuesta (SA) (Wu et al., 2012). A parte de la regulación de la transcripción, la activación de las vías de señalización de fitohormonas puede participar otros mecanismos de transducción de la señal como fosforilación de proteínas, modificación de la concentración celular de calcio, cambio en el estado redox de la célula, degradación de proteínas, entre otros.

#### 1.4 Respuestas de defensa vegetal frente a *M. phaseolina*

Los primeros estudios a nivel molecular de la interacción planta – *M. phaseolina* han sido llevados a cabo en un modelo de infección con *Medicago truncatula*, en el cual se observó una alteración de la expresión de genes implicados en las vías de señalización de las fitohormonas como el ET, JA y AUX (Mah et al., 2012). Como se ha mencionado, la señalización de JA/ET juegan un rol importante en la defensa contra patógenos necrotróficos pudiéndose observar aumento de la resistencia luego del tratamiento con metil-jasmonato y ET (Gaige et al., 2010) y que

la supresión de la respuesta a AUX; a través de la inducción de factores represores de la vía IAA20 e IAA30 frente a la infección, podría contribuir a la susceptibilidad hacia este patógeno observándose resistencia inducida luego del tratamiento con AUX (Mah et al., 2012). Además, para este sistema patogénico, como respuesta a la infección se verificó un aumento de la expresión de genes que codifican a enzimas implicadas en los primeros pasos del metabolismo fenilpropanoide (Gaije et al., 2010). Sin embargo, estos hallazgos se han basado en el análisis de una sola variedad con susceptibilidad desconocida o no caracterizada a *M. phaseolina*.

Experimentos recientes han revelado que la resistencia a este patógeno no solo resulta de la activación de las vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario, sino que más importante es que esta respuesta fue más rápida en una variedad de sésamo (*Sesamum indicum*) resistente que en la susceptible (Chowdhury et al., 2017), lo cual indica que las respuestas en el huésped resistente se activan con mayor eficiencia, por mecanismos desconocidos, que finalmente influye en la gravedad de la enfermedad. Además, se ha propuesto que *M. phaseolina* es capaz de cambiar su estilo de vida, pasando por un corto periodo biotrófico antes de pasar a la etapa necrotrófica, para evadir los sistemas de defensa vegetal; por lo cual la resistencia a su vez depende de la capacidad del huésped de adaptarse al comportamiento del hongo (Chowdhury et al., 2017).

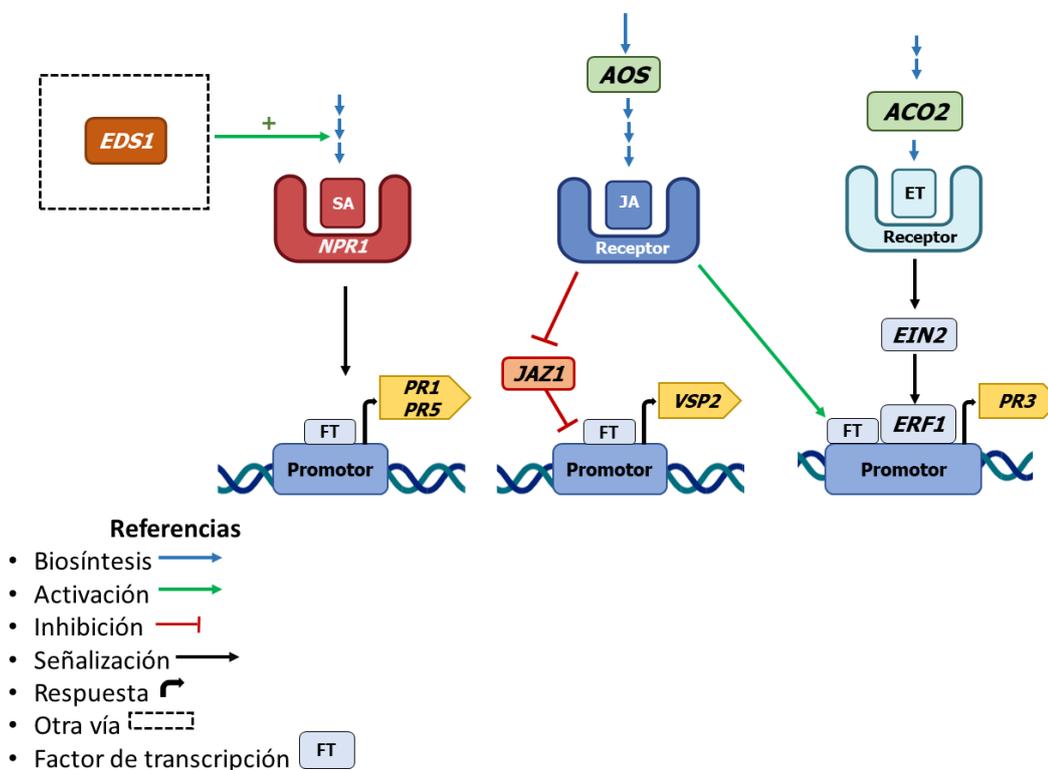
En el caso de la soja, los resultados preliminares del perfil transcriptómico de la interacción con *M. phaseolina* de una sola variedad muestran la implicancia de mecanismos generales de defensa como la inducción de la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs), proteínas de resistencia a enfermedades, factores de transcripción y genes relacionados con el metabolismo secundario, así como aquellos que codifican componentes de las vías de señalización de SA, JA, ET, AUX y ABA (Marquez et al., 2018). Además, se ha demostrado que la supresión de la vía de síntesis de flavonoides en una variedad de soja aumentaba la susceptibilidad hacia *M. phaseolina* lo cual se encontraba asociado a la disminución de gliceolina; fitoalexina de soja implicada en la defensa a múltiples patógenos (Hill et al., 2010). Por lo tanto, la gliceolina podría actuar como un componente importante en la defensa contra este patógeno (Lygin et al., 2013).

Un estudio reciente del transcriptoma de *A. thaliana* silvestre, así como mutantes comprometidos en la señalización de ET, JA y SA; los cuales exhibían mayor susceptibilidad a *M. phaseolina*, reveló la cooperación de múltiples respuestas mediadas por fitohormonas en la resistencia del huésped contra este patógeno (Schroeder et al., 2019). El análisis comparativo del perfil transcriptómico de raíces infectadas en el huésped del tipo silvestre y el doble mutante deficiente en la señalización de JA/ET; el cual exhibió el mayor grado de susceptibilidad frente a *M. phaseolina*, identificó cientos de genes implicados en la biosíntesis, regulación y respuesta a JA, ET y SA que potencialmente contribuyeron a la defensa frente *M. phaseolina* coordinadas por una compleja de red de interacción entre las vías de fitohormonas (Schroeder et al., 2019).

Por otra parte, se han propuesto modelos vegetales con resistencia mejorada hacia *M. phaseolina* mediante la sobreexpresión de genes de proteínas relacionadas a la patogénesis, que responden a fitohormonas. La sobreexpresión del gen *TLP* (*Thaumatine like protein, PR5*) de la planta del té (*Camellia sinensis*) *CsTLP* en papa (*Solanum tuberosum*) demostró el papel potencial de la proteína *CsTLP* en la resistencia a *M. phaseolina* (Acharya et al., 2013). Se ha demostrado la inducción del gen *PR-10a* en respuesta a SA, metil-JA y frente a la infección con *M. phaseolina* en *Jatropha curca*, que a su vez exhibió actividad antifúngica contra este patógeno (Agarwal et al., 2013). Esta observación sentó las bases para el desarrollo de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que sobreexpresan este gen y como consecuencia mostraron resistencia mejorada hacia *M. phaseolina* (Dabi et al., 2016). Se ha informado que tras la infección por *M. phaseolina* en dos variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*); resistente y susceptible, los niveles de expresión de quitinasa en el cultivar resistente fueron significativamente más altos y de expresión más temprana (Sharma et al., 2014). Este hecho sentó las bases para el desarrollo de plantas de yute transgénico resistentes a *M. phaseolina* mediante la introducción del gen *chitinase11* (Datta et al., 2018). Por lo tanto, la búsqueda de variedades con mayor acumulación de las proteínas PRs podría ser una alternativa para aumentar en parte la resistencia al patógeno.

## 1.5 Genes considerados para el análisis en el presente trabajo

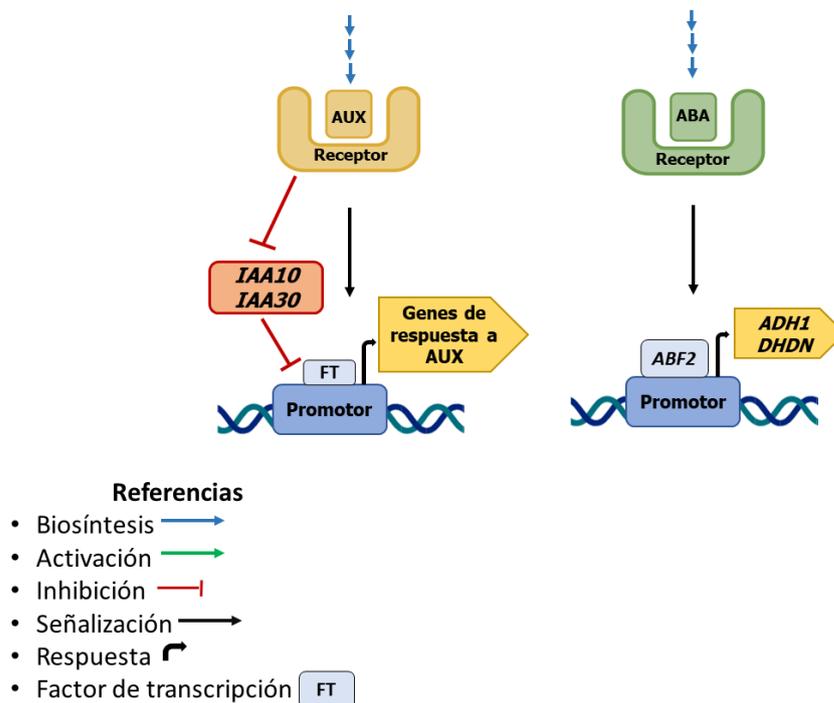
De acuerdo con lo anteriormente mencionado, la señalización mediada por fitohormonas y la acción de metabolitos secundarios constituyen mecanismos claves para la defensa del vegetal hacia *M. phaseolina*; sin embargo, aún queda por dilucidar cuáles son las vías implicadas para lograr la resistencia hacia este patógeno. Por lo tanto, en el presente trabajo se analizó el proceso de infección y la expresión de los genes componentes de la señalización de fitohormonas asociadas a la defensa frente a *M. phaseolina* y de enzimas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios en dos puntos luego de la infección en dos variedades de soja, resistente y susceptible a este patógeno. La vía del JA fue analizada mediante la expresión de genes implicados en la biosíntesis (*AOS*), regulación (*JAZ1*, represor de la vía de JA) y respuesta (*VSP2* y *PR3*) (**Figura 5, medio**). Como se ha mencionado, la defensa frente a necrotrofos es mediada en gran parte por el sinergismo entre el JA y ET; por lo cual se ha determinado el nivel de expresión del gen de biosíntesis de ET (*ACO2/ACCO2*); así como dos componentes de la señalización (*EIN2* y *ERF1*) (**Figura 5, derecha**). La activación de *ERF1* a su vez es mediada por JA, y como consecuencia se activan genes de respuesta a JA/ET como *PR3*. La implicancia del SA en la defensa de la soja frente a *M. phaseolina* fue investigada mediante el análisis de expresión de *NPR1* que codifica al receptor del SA, así como los genes *PR1* y *PR5* (respuesta a SA) (**Figura 5, izquierda**). Así mismo, se determinaron los niveles de expresión del gen *EDS1* que media la defensa basal y regula de manera positiva la acumulación de SA para inducir una respuesta sistémica.



**Figura 5. Componentes de vías de señalización de SA, JA y ET estudiados en soja frente a la infección por *M. phaseolina*.** Señalización de SA (izquierda), la unión de SA a su receptor (NPR1) activa una cascada de señalización que evoca la activación de genes de respuesta (*PR1* y *PR5*) además, *EDS1* componente de la defensa local es capaz de inducir la acumulación de SA. Señalización de JA (medio), un aumento de la concentración de JA (*AOS*) provoca la liberación de la represión de la vía (*JAZ1*) lo cual permite la activación de genes de repuesta a JA (*VSP2*). Señalización de ET (derecha), la regulación positiva de la biosíntesis de ET (*ACO2*) y la unión a su receptor activa la señalización a través de *EIN2*, además se requiere de la participación de JA para activar *ERF1* y dar lugar a la respuesta mediada por JA/ET (*PR3*).

Por otra parte, se llevó a cabo el análisis de expresión de dos genes que codifican a factores represores de la señalización de AUX; *IAA10* e *IAA30* (**Figura 6, izquierda**). La implicancia de ABA en la defensa frente a *M. phaseolina* fue evaluada mediante la determinación de los niveles de expresión del factor de respuesta a ABA (*ABF2*) y los genes de respuesta; *ADH1* y *DHDN* (**Figura 6, derecha**).

Por último, se analizaron los genes *CHI*, *PAL1* y *FS*, que codifican a enzimas biosintéticas de metabolitos secundarios derivados de la ruta fenilpropanoide.



**Figura 6. Componentes de la señalización de AUX y ABA estudiados en soja frente a la infección por *M. phaseolina*.** Señalización de AUX (izquierda), la unión de AUX a su receptor provoca la liberación de la represión por parte de factores como IAA10 e IAA30, dando lugar a la respuesta a esta fitohormona. Señalización ABA (derecha), la activación de la respuesta a ABA se encuentra mediada por factores como ABF2 que se unen al promotor y se induce la transcripción de genes de respuesta (*ADH1* y *DHDN*).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Identificar las vías de señalización y metabolismo secundario implicadas en la defensa de la soja frente a la infección por el hongo *Macrophomina phaseolina*

### **2.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el proceso de infección de las variedades de soja DT974290 y A4910 infectadas con aislado proveniente de Naranjal de *M. phaseolina*.
- Determinar la biomasa fúngica relativa de los sistemas patogénicos en estudio mediante la amplificación y cuantificación de los genes de soja de las variedades propuestas en este estudio y *M. phaseolina*.
- Analizar la expresión de genes implicados en las vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario asociado a la defensa vegetal.

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material vegetal y fúngico**

Semillas de soja de variedades susceptible (A4910) y resistente (DT974290) a *M. phaseolina*, así como el aislado proveniente del distrito de Naranjal (departamento de Alto Paraná) de *M. phaseolina* (aislado Naranjal) de rastrojos de soja proveídos por la Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO) en el marco del proyecto CONACYT PINV15-315 fueron utilizados en el presente estudio. El fenotipo resistente y susceptible de estas variedades fueron descritas en trabajos anteriores (Castagnaro, 2010; Paris et al., 2006).

#### **3.2 Infección en sustrato estéril**

##### **3.2.1 Germinación de semillas de soja**

La desinfección de las semillas de ambas variedades se llevó a cabo por inmersión en solución de etanol al 70 % durante un minuto y 30 segundos en solución de hipoclorito de sodio (5 % de cloro activo), seguidos de 4-5 lavados de un minuto con agua destilada esterilizada a 121 °C por 20 minutos. A continuación, fueron puestas a germinar 5-6 semillas de soja en frascos de vidrio de 400 mL de capacidad que contenían la mitad de su capacidad con sustrato CAROLINA SOIL (Carolina Soil do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil) dos veces esterilizado a 121°C por 20 minutos, previo agregado de 30-50 mL de agua destilada y posterior

riego con agua destilada esterilizada 121°C por 20 minutos. El sistema fue sellado a fin de mantener la esterilidad y posteriormente fue puesto bajo condiciones de días largos (fotoperiodo de 16 h luz/8h de oscuridad) a temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  (**Figura 7**).



**Figura 7. Germinación de ejemplares de soja para el sistema de infección en sustrato estéril.**

### **3.2.2 Preparación del inóculo de arroz**

La preparación del inóculo de arroz fue llevada a cabo según la metodología descrita por Claudino (2013) (Claudino, 2013) con ciertas modificaciones. En un erlenmeyer de 200 mL fueron esterilizados a 121°C por 20 minutos 100 g de arroz parbolizado con 100 mL de agua destilada (proporción 1:1). Posterior enfriamiento se colocaron cinco discos de 6 mm de diámetro de micelio de aislado Naranja de *M. phaseolina* crecido en Papa Dextrosa Agar (PDA) cortados con la boquilla de una punta de pipeta de 200  $\mu\text{L}$  en cada erlenmeyer y puesto en estufa a 28°C y oscuridad. A fin de garantizar una colonización uniforme, se agitaron diariamente en forma manual los erlenmeyers. Luego de la completa colonización verificado por el color negro de los granos de arroz debido a la formación de microesclerocios, el inóculo fue fraccionado en porciones de 0,2 g en microtubos de 1,5 mL en condiciones estériles y mantenidos a 4°C hasta su uso.

### 3.2.3 Inoculación

Una vez que las plantas alcanzaron 2-3 cm de tallo posterior emergencia fueron trasplantados a frascos de vidrio (15 cm de altura, 7 cm de diámetro) conteniendo 90 g sustrato CAROLINA SOIL (Carolina Soil do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil) (dos esterilizaciones de 121°C por 20 minutos, previo agregado de 50 mL de agua destilada) con 0,2 g de arroz parbolizado colonizado con aislado Naranjal de *M. phaseolina* y un riego de 75 mL agua destilada estéril (121°C por 20 minutos).

Posteriormente, fueron puestas a fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  para la progresión de la infección. Para los controles se utilizó la misma cantidad de arroz parbolizado estéril según descrito en el apartado anterior sin colonizar, utilizando discos de PDA sin micelio para su preparación. Como mínimo se obtuvieron tres réplicas biológicas con 2-3 ejemplares en cada una (**Figura 8**).

Para asegurar la esterilidad del sistema patogénico los pasos de desinfección de semillas hasta el sellado del sistema de germinación, la preparación del inóculo y la inoculación fueron llevados a cabo bajo campana de flujo laminar.



**Figura 8. Montaje del sistema de infección en sustrato estéril.** Se observa una réplica biológica con tres ejemplares de soja de variedad DT974290 (resistente a *M. phaseolina*) luego del pasaje al sustrato con 0,2 g de arroz colonizado con *M. phaseolina*.

### 3.2.4 Evaluación de la infección y preparación de la muestra

Parámetros de crecimiento y desarrollo como longitud de la raíz principal, longitud del tallo y número de raíces secundarias fueron medidos para la evaluación de la infección y posterior comparación entre condiciones control e infectados de ambas variedades a los cuatro días post inoculación. Posteriormente, se procedió a la maceración de las raíces con nitrógeno líquido para la extracción de ácidos nucleicos.

Además, como parte del proceso de evaluación de la infección se determinó la cantidad relativa de ADN fúngico en raíces infectadas con *M. phaseolina* de ambas variedades a los cuatro días luego de la inoculación, descrito más adelante en: Determinación de biomasa fúngica relativa.

### 3.3 Infección por corte al tallo “Cut-stem”

Fueron sembradas semillas de soja de las variedades A4910 (susceptible a *M. phaseolina*) y DT974290 (resistente a *M. phaseolina*) en macetas de 0,5 L de capacidad conteniendo sustrato para planta CAROLINA SOIL (Carolina Soil do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil) y puestas para crecimiento durante dos semanas en una sala a 22-24°C bajo condiciones de días largos (fotoperiodo controlado de 16 h luz/8 h oscuridad) y posteriormente dos semanas a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  bajo el mismo fotoperiodo. A continuación, fueron seleccionadas para la inoculación por corte al tallo “cut-stem” (Twizeyimana et al., 2012). A fin de evitar la pérdida de virulencia del hongo debido a repiques consecutivos en medio de cultivo, para la infección se utilizó el primer repique de hongo aislado de raíces de soja infectadas por el método descrito por Bressano et al. (2010). Los discos de micelio crecidos en PDA fueron obtenidos insertando la boquilla de una punta de micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  en los márgenes de la colonia del, posteriormente fueron colocados en tallos recién cortados con tijera a 25 mm por encima del nodo unifoliar. Para las plantas controles se colocaron discos de medio PDA sin el hongo. Tanto las plantas inoculadas y controles se mantuvieron en una sala de cultivo a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  bajo el mismo fotoperiodo. Se obtuvieron al menos tres réplicas biológicas de cada variedad (Figura 9).



**Figura 9. Método de infección por corte de tallo “cut-stem”.** Inoculación de una planta de soja de cuatro semanas de crecimiento.

### **3.3.1 Evaluación de la infección y preparación de la muestra**

Luego de tres días de inoculación se retiraron las puntas de pipeta y se procedió a la evaluación del proceso de infección. La longitud en mm de la necrosis lineal fue registrada cada dos días durante 15 días para posterior comparación entre variedades. La formación de microesclerocios fue evaluada mediante la observación bajo microscopio estereoscópico Leica EZ4 D (Leica Microsystems, Alemania) de cortes longitudinales de tallos infectados.

A partir de los resultados de la evaluación del proceso de infección se tomaron como tiempos de colecta de muestras para la extracción de ácidos nucleicos el tercer y sexto día post inoculación (3dpi y 6dpi). El motivo de la elección de estos tiempos se encuentra descrito en el apartado 4.2. Las muestras consistieron en el tallo principal de plantas infectadas y controles de ambas variedades considerando el doble de la longitud de la lesión en los infectados y el promedio de la lesión de los infectados para los controles. Posteriormente las muestras fueron maceradas con nitrógeno líquido.

Así mismo, se determinó la cantidad relativa de ADN fúngico en los tallos infectados con *M. phaseolina* de ambas variedades a los tres días luego de la inoculación, descrito más adelante en: Determinación de biomasa fúngica relativa.

### 3.4 Extracción de ácidos nucleicos

En ambos métodos de infección, luego de la maceración de las muestras con nitrógeno líquido, el pulverizado fue fraccionado en dos partes para la extracción de ADN y ARN, respectivamente. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo por el método de Bromuro de hexadecil trimetilamonio (CTAB) (Murray & Thompson, 1980) y la extracción de ARN total utilizando el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, E.E.U.U.) basado en el método descrito por Chomczynski & Sacchi (1987). La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm y para el control de calidad se realizó un barrido espectral de 220 a 330 nm utilizando el equipo Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific). Las relaciones de absorbancia 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm aportan información acerca de la pureza del ácido nucleico extraído.

### 3.5 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

A partir de 1 µg de ARN total se procedió a la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando la Transcriptasa Reversa M-MuLV (New England Biolabs, E.E.U.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.6 Selección de genes y cebadores utilizados

Para la determinación de la carga fúngica relativa se utilizaron cebadores que amplifiquen genes específicos de especie. El *FACTOR DE ELONGACIÓN 1 ALFA* (*GmEF1a*) para el caso de la soja (*Forward* GmEF1a 5'GCTCTTCTTGCTTTCACCCTT 3' y *Reverse* GmEF1a-R 5'TTCCTTCACAATTCATCATACC 3') y una región amplificada caracterizada por secuencia (*SCAR*) para *M. phaseolina* utilizado para detección y cuantificación del mismo (*Forward* MpK-F: 5' CCGCCAGAGGACTATCAAAC 3' y *Reverse* MpK-R 5' CGTCCGAAGCGAGGTGTATT 3') (Babu et al., 2011).

La selección de genes para el análisis de expresión se llevó a cabo mediante búsqueda de genes de soja homólogos (búsqueda BLAST) a genes de *Arabidopsis thaliana* implicados en vías de señalización de las fitohormonas JA, ET, SA y ABA y metabolismo secundario mediante BlastP de las secuencias de *A. thaliana* contra la base de datos de proteínas de soja en Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Los genes de la vía de AUX evaluados se seleccionaron en base al trabajo realizado por Mah et al. (2012), homólogos de soja a *Medicago truncatula*. Se utilizó como normalizador para el análisis de expresión al gen *GmEF1a* en muestras de infección de sustrato estéril y al gen del *FACTOR DE ELONGACIÓN 1 BETA* (*GmEF1b*, *Forward* GmEF1b-F 5´TGGTGATGAGACAGAGGAGGA3´ y *Reverse* GmEF1b-R 5´AACATCGAGAAGGACAGAAGA 3´) para las del *cut-stem*, debido a que el primero no presentó una expresión estable en todas las muestras de tallo. El diseño de cebadores se llevó a cabo utilizando el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) restringiendo el tamaño del amplicón entre 100 a 150 pares de base (pb) y la temperatura de desnaturalización entre 57-60°C. La lista de cebadores de los genes seleccionados para el análisis de expresión se describe en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Lista de cebadores utilizados para el análisis de expresión**

<b>Locus</b>	<b>Nombre del Gen</b>	<b>Forward 5'→3'</b>	<b>Reverse 5'→3'</b>
Glyma.04g035000	<i>AOS</i>	TCCCCTCTTTCACACCT TCC	CACGCTTCTTCTCTGGGA AC
Glyma.13G112000	<i>JAZ1</i>	TTACCCTCGGGATGAC TTGC	GTTCCGTTGCGTGATGAT CG
Glyma.07g014600	<i>VSP2</i>	TTCCCTTTGCGAATGA AAAC	CGCAATCTTGAGGAATG GTT
Glyma.07g264200	<i>ACO2</i>	CTCAAAGATGGCCACT GGAT	ATCACACGGTGCATCACA CT
Glyma.20G203700	<i>ERF1</i>	ACAACGAAGAAGGGT GCTCC	CGGTACTACTTTGTAGTT TGCTGT
Glyma.13g145100	<i>EIN2</i>	GGCCTGTTTGTGTCAG GTTT	TCAGCACAAATGCACTCT CC
Glyma.09g064700	<i>NPR1</i>	CAGGGGATGATTTGCG CATG	TGGAAACTCAGATGTGCC ATCA
Glyma.04g177700	<i>EDS1</i>	CGCAAAGAGATTCGAT CGCG	ATTGCAGCACCAGAGGA GTG
Glyma.15g062400	<i>PR1</i>	TTGTGAGTCACGTTGC CAAT	GTGTCATCCCAAGCCAAG TT
Glyma.03g132700	<i>PR2</i>	GATGCACAATCCGGGG TA	TGGCTAGATGCTAGGTTT CTG
Glyma.16g119200	<i>PR3</i>	CAGGAGGGAGATTGCT GCTT	CCTGGTTGCGTTCGTTGA TA
Glyma.14g077300	<i>PR5</i>	GTGTTCCGCCGACGCTT TATT	TCCAGAACAAGTGCAAA TGCT
Glyma.19g182300	<i>PAL1</i>	CAAACAAGGTGGTGCT CTGC	TGGTTGCAGTGTGTGGCA
Glyma.20g241700	<i>CHI</i>	CAGAGGCTGTGTTGGA GTCA	AAACCCCAGGCTCTTTGA AT
Glyma.05g088100	<i>FS</i>	AAGGCTTGGGCTTAGA GAGG	TGGTAAGGGCACTCATGT CA
Glyma.10g040400	<i>IAA10</i>	AAAAAGAGATGCAAG CCCATA	CTATACTTTTCTGTTTCG GTTTTTCC
Glyma.02g007300	<i>IAA30</i>	CGGAGTGCAACCAGAT AGGT	CGCTTTTATCACCCGAAT GT
Glyma.04g039300	<i>ABF2</i>	TGTACTCGCTGACGTT CGAC	CGCGGTCCAGATGTTCTT CA
Glyma.06g122600	<i>ADH1</i>	GAATGATAGGGCCTTT GCTG	TTGGACATGCGTTGAACA AT
Glyma.09g185500	<i>DHDN</i>	ACGTACGTACAGTGTC TTGTCA	AGTGAACAACCCTGCTCC AC

### 3.7 Determinación de carga fúngica relativa

La determinación de la carga fúngica relativa se llevó a cabo mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) del gen *GmEF1a* y *SCAR* de *M. phaseolina*, utilizando como templado 40 ng de ADN genómico extraído de muestras controles e infectados de ambos métodos de infección y SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, E.E.U.U.) que contiene SYBR Green como agente intercalante. Los componentes de la mezcla para la reacción se describen en la **Tabla 2**. Las reacciones de amplificación de muestras del método de infección en sustrato estéril se llevaron a cabo en el termociclador LightCycler® Nano (Roche, Alemania) y para las correspondientes al método *cut-stem* en el StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de qPCR se describen en la **Tabla 3**.

Se obtuvieron los valores de ciclos de cuantificación (Cq), así como los valores de temperatura de desnaturalización de los productos de amplificación (Tm). La carga fúngica relativa fue expresada como  $2^{-\Delta Cq}$  donde  $\Delta Cq$  corresponde a diferencia entre los valores de Cq para *SCAR* de *M. phaseolina* y *GmEF1a* de soja ( $Cq_{Mpk} - Cq_{GmEF1a}$ ), de forma similar a lo descrito por Chowdhury et al. (2017) y Schroeder et al. (2019).

### 3.8 Análisis de expresión de genes implicados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario

Los niveles de expresión de genes involucrados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario fueron determinados por RT-qPCR, utilizando iguales componentes de reacción que en el apartado anterior (**Tabla 2**) y dilución 1:3 y 1:5 de ADNc sintetizado a partir del ARN total extraído de muestras de infección en sustrato estéril y *cut-stem*, respectivamente. Se utilizó el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System y las mencionadas en la **Tabla 3**.

El nivel de expresión relativa para cada gen ha sido expresado como  $2^{-\Delta Cq}$  donde  $\Delta Cq$  a la diferencia entre los valores de  $Cq$  del gen de interés (“X”) y el gen de referencia para una misma muestra ( $Cq_X - Cq_{GmEF1b}$ ) (Livak and Schmittgen 2001).

**Tabla 2. Componentes de reacción para qPCR y RT-qPCR**

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	2X	1X	5,0 $\mu$ L
Cebadores (forward y reverse)	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	--	--	3,5 $\mu$ L
ADN (40 ng/ $\mu$ L) *	--	--	1,0 $\mu$ L
ADNc (dilución 1:3 y 1:5)**	--	--	
<b>Total</b>			<b>10,0 <math>\mu</math>L</b>

\*Templado para determinación de carga fúngica

\*\* Templado para determinación del nivel de expresión

**Tabla 3. Condiciones de qPCR y RT-qPCR**

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	180	
Desnaturalización	95	15	40
Hibridación y extensión	65	30	

El análisis de  $T_m$  para las corridas realizadas en LightCycler® Nano el análisis de  $T_m$  consistió en una inicial a 65 °C por 20 segundos y una final a 95 °C durante 20 segundos; aumentando 0,1 °C por segundo hasta llegar a 95 °C. En el caso de StepOnePlus™ Real-Time PCR System, dicho análisis se llevó a cabo inicialmente a 60 °C durante 1 minuto, luego 15 segundos a 95°C, aumentando 0,6°C por segundo hasta llegar a 95 °C.

Para cada corrida de qPCR y RT-qPCR se incluyó un control negativo que contiene agua libre de nucleasas en lugar del volumen de muestra.

### 3.9 Asuntos estadísticos

Se aplicó la prueba  $t$  de Student a los resultados de cuantificación relativa de ADN fúngico (Biomasa fúngica relativa) y de mediciones de necrosis lineal del

método de infección *cut-stem* utilizando Microsoft Excel, definiendo como significativo la diferencia con un valor de  $p < 0,05$ .

Los resultados obtenidos de las medidas de parámetros de desarrollo y crecimiento de muestras de método de infección en sustrato estéril y los datos de cuantificación del nivel de expresión relativa fueron sometidos a análisis de varianza de dos colas y prueba de Tukey (*Honestly significant difference, HSD*) considerando como significativo la diferencia con un valor de  $p < 0,05$ . Ambos análisis fueron llevados a cabo utilizando el paquete “*agricolae*” del software estadístico R versión 3.5.1. Los gráficos de barra y línea fueron realizados en Microsoft Excel.

El *heatmap* fue llevado a cabo a partir de los valores normalizados de la expresión relativa (valor *Z*) utilizando el paquete “*pheatmap*” software estadístico R versión 3.5.1.

## 4 RESULTADOS

Con el fin de estudiar la interacción soja-*M. phaseolina*, se realizaron la infección en sustrato estéril y la infección en tallo cortado, evaluando el proceso de la infección, la biomasa fúngica y el nivel de expresión de los genes de las vías de señalización de las fitohormonas en la variedad A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente).

### 4.1 Infección en sustrato estéril

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por el método de infección en sustrato estéril luego de cuatro días de inoculación (4 dpi). En la **Figura 10** se observa la fotografía de una de las réplicas biológicas del grupo control (plantas sin inocular) y del grupo infectado con *M. phaseolina*.



**Figura 10. Plántulas de soja a 4 dpi en el método de infección en sustrato estéril.** Se muestra la fotografía de una de las réplicas biológicas del grupo control (izquierda) e infectado con *M. phaseolina* (derecha) de la variedad DT974290 (resistente), con dos ejemplares de soja cada una.

#### 4.1.1 Evaluación del proceso de infección

##### 4.1.1.1 Comparación de parámetros de crecimiento y desarrollo vegetal

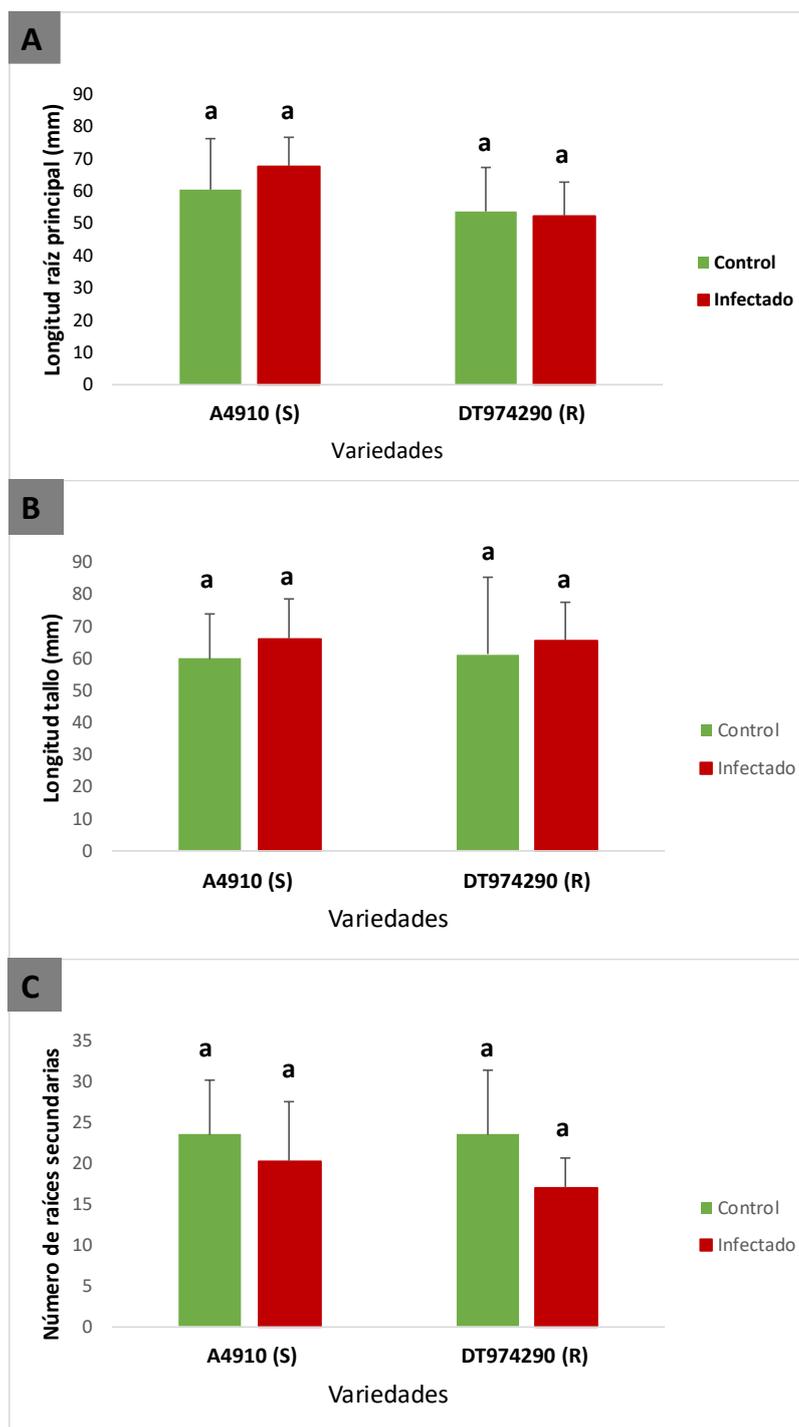
A los 4 dpi se realizaron mediciones de la longitud del tallo y la raíz principal, así como el recuento del número de raíces secundarias en los ejemplares controles e infectados con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (S) y DT974290 (R), se obtuvieron al menos tres réplicas biológicas con 2-3 ejemplares por réplica.

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de crecimiento y desarrollo analizados (**Figura 11A-C**).

En general, la longitud de la raíz principal fue similar entre control e infectado de una variedad, siendo ligeramente mayor en infectados de la variedad susceptible con respecto al control. Tanto el grupo control como infectado de la variedad resistente presentaron una longitud ligeramente menor en comparación con la variedad susceptible (**Figura 11A**).

Tanto en A4910 (S) como en DT974290 (R) la longitud del tallo se encontró levemente aumentada en los infectados con respecto a los controles. La longitud del tallo de A4910 (S) no infectada y DT974290 (R) no infectada fueron similares entre sí, pudiendo decir lo mismo entre las plantas infectadas de las dos variedades (**Figura 11B**).

El número de raíces secundarias disminuyó con la infección en ambas variedades con respecto a los controles. Así mismo, se observó similares valores en este parámetro entre ambas variedades infectadas, como también entre el grupo control de ambas variedades (**Figura 11C**).

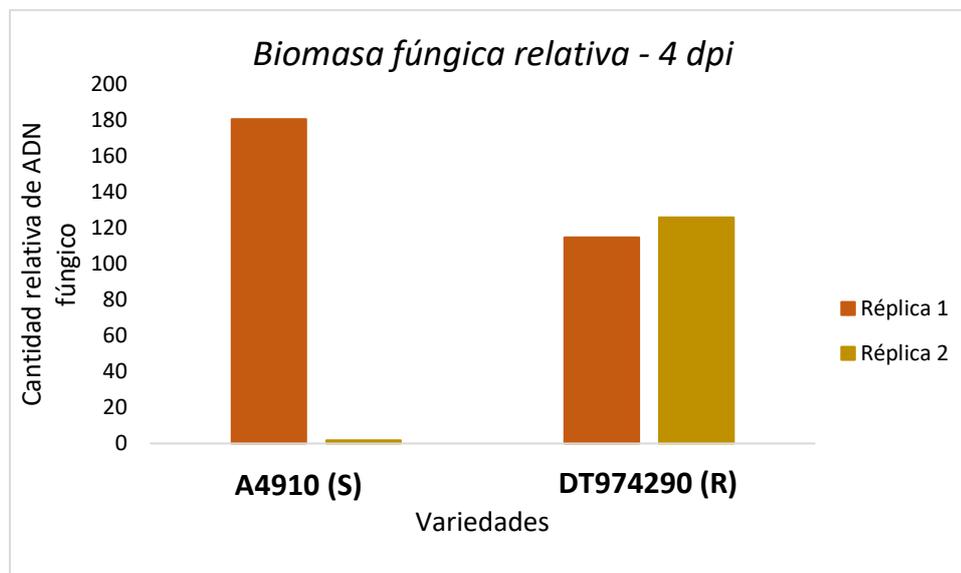


**Figura 11. Evaluación del proceso de infección.** Comparación del crecimiento y desarrollo entre plantas infectadas y controles de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) a los 4 dpi con *M. phaseolina* por el método de infección en sustrato estéril: A) longitud de la raíz principal, B) longitud del tallo y C) número de raíces secundarias. Se ensayaron al menos tres réplicas biológicas con 2-3 ejemplares por réplica. Las barras representan la desviación estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1.2 Biomasa fúngica relativa

Como una medida del grado de colonización se estimó la biomasa fúngica relativa presente en ambas variedades a partir del ADN genómico extraído de raíces (raíz principal y secundarias) a los 4 dpi. Para ello, se cuantificó el ADN del hongo mediante qPCR de SCAR de *M. phaseolina* y se normalizó con respecto a la cantidad de ADN de la soja de cada muestra (mediante la cuantificación del gen *GmEF1a*). Debido a la escasez del material de partida se obtuvieron solamente dos réplicas para cada variedad.

En la variedad A4910 (susceptible a *M. phaseolina*), la réplica 1 presentó una carga fúngica relativa de 180 en comparación a su réplica 2 que posee el menor valor entre las réplicas de ambas variedades. El caso de la variedad DT974290 (resistente a *M. phaseolina*) ambas réplicas presentaron poca diferencia en sus valores de carga fúngica relativa (valores entre 114 y 126 aproximadamente) los cuales fueron menores que la réplica 1 de A4910; sin embargo, mayores con respecto a la réplica 2 de esta última (**Figura 12**). Estos datos preliminares sugieren la dificultad de establecer una asociación entre la biomasa fúngica y el fenotipo observado en el campo. Además, el bajo número de muestras dificulta la emisión de conclusiones claras.



**Figura 12. Estimación de la biomasa fúngica en las raíces infectadas de soja.** Medida de colonización determinada mediante la cuantificación por qPCR de una región SCAR de *M. phaseolina* y posterior normalización con la cantidad de ADN de soja (mediante la cuantificación del gen *GmEF1a*) de cada muestra. Se utilizó como templado, ADN extraído de raíces de soja infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) a los cuatro días luego de la inoculación por el método de infección en sustrato estéril. Se presentan datos individuales de dos réplicas biológicas con 2-3 ejemplares en cada réplica.

#### 4.1.2 Análisis de expresión de genes involucrados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundarios

Con el objeto de identificar las vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario que se encuentran activadas o no en respuesta a la infección por *M. phaseolina* y su asociación con la resistencia/susceptibilidad, se determinaron los niveles de expresión relativa de genes implicados en la biosíntesis, señalización y respuesta a fitohormonas, así como aquellos de biosíntesis de metabolitos secundarios. En la **Tabla 4** se describen los genes analizados a partir de ARN extraído de raíces control e infectados de las variedades A4910 (susceptible a *M. phaseolina*) y DT974290 (resistente a *M. phaseolina*) a los 4 dpi por la metodología de infección en sustrato estéril.

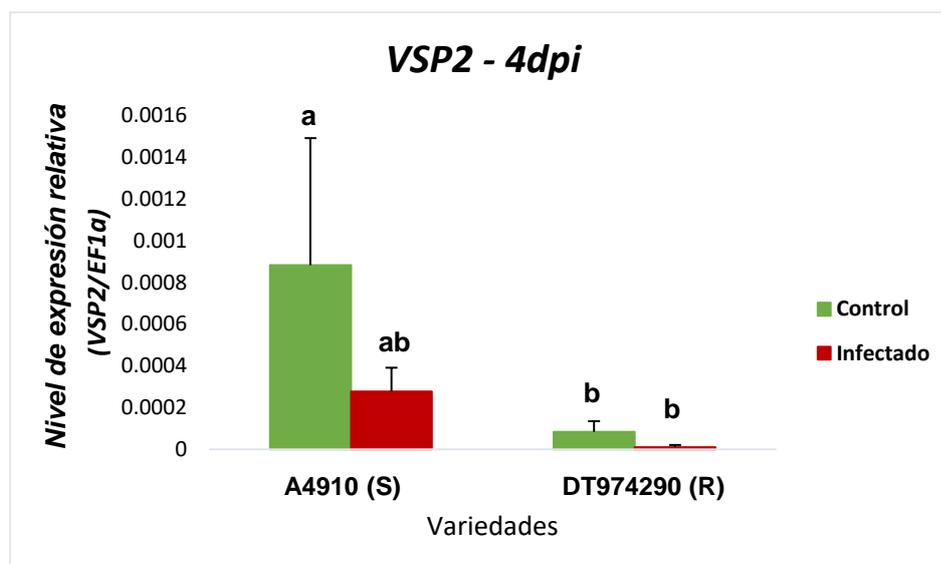
**Tabla 4. Genes analizados en raíces de plantas infectadas por el método de sustrato estéril a los 4 dpi**

Vía	Gen	Función en:
<b>Ácido Jasmónico (JA)</b>	<i>AOS</i> *	Biosíntesis
	<i>VSP2</i>	Respuesta
<b>Etileno (ET)</b>	<i>ACO2/ACCO2</i>	Biosíntesis
	<i>EIN2</i> *	Señalización
<b>Ácido Salicílico (SA)</b>	<i>PR1</i>	Respuesta
	<i>PR2</i>	
<b>Auxina (AUX)</b>	<i>IAA10</i>	Señalización
	<i>IAA30</i> *	
<b>Metabolismo Secundario</b>	<i>CHI</i>	Biosíntesis
	<i>FS</i> *	

\*No se detectó expresión

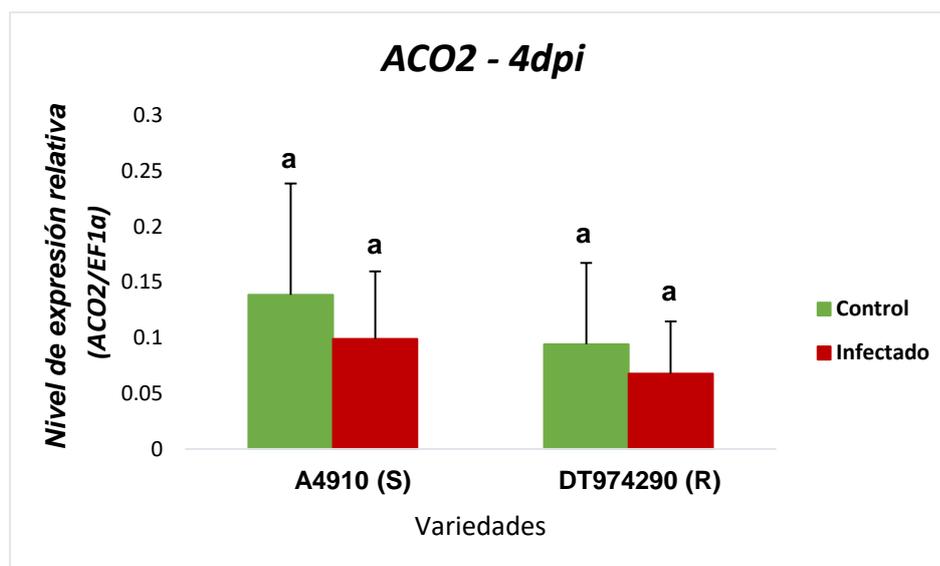
La cuantificación de la expresión relativa de los genes *AOS* y *VSP2*; implicados en la biosíntesis y respuesta de JA respectivamente, fue llevada a cabo. No se detectó expresión para el gen de *AOS*.

No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen *VSP2* entre control e infectado para una misma variedad y entre variedades en condición de infección. Los ejemplares infectados de ambas variedades presentaron expresión disminuida de *VSP2* con respecto a los controles. Se verificó menor nivel de expresión significativo en controles de la variedad resistente con respecto a la susceptible en dicha condición. Durante la infección, DT974290 (R) presentó también una menor expresión con respecto a A4910 (S), sin embargo, esta diferencia no fue significativa (**Figura 13**).



**Figura 13. Análisis de expresión del gen de la vía de señalización de JA a 4 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *VSP2* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de raíces de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) a los cuatro días luego de la inoculación por el método de infección en sustrato estéril. La expresión del gen fue normalizada con el nivel del gen de factor de elongación alfa (*GmEF1a*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas con 2-3 ejemplares cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las condiciones y las variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

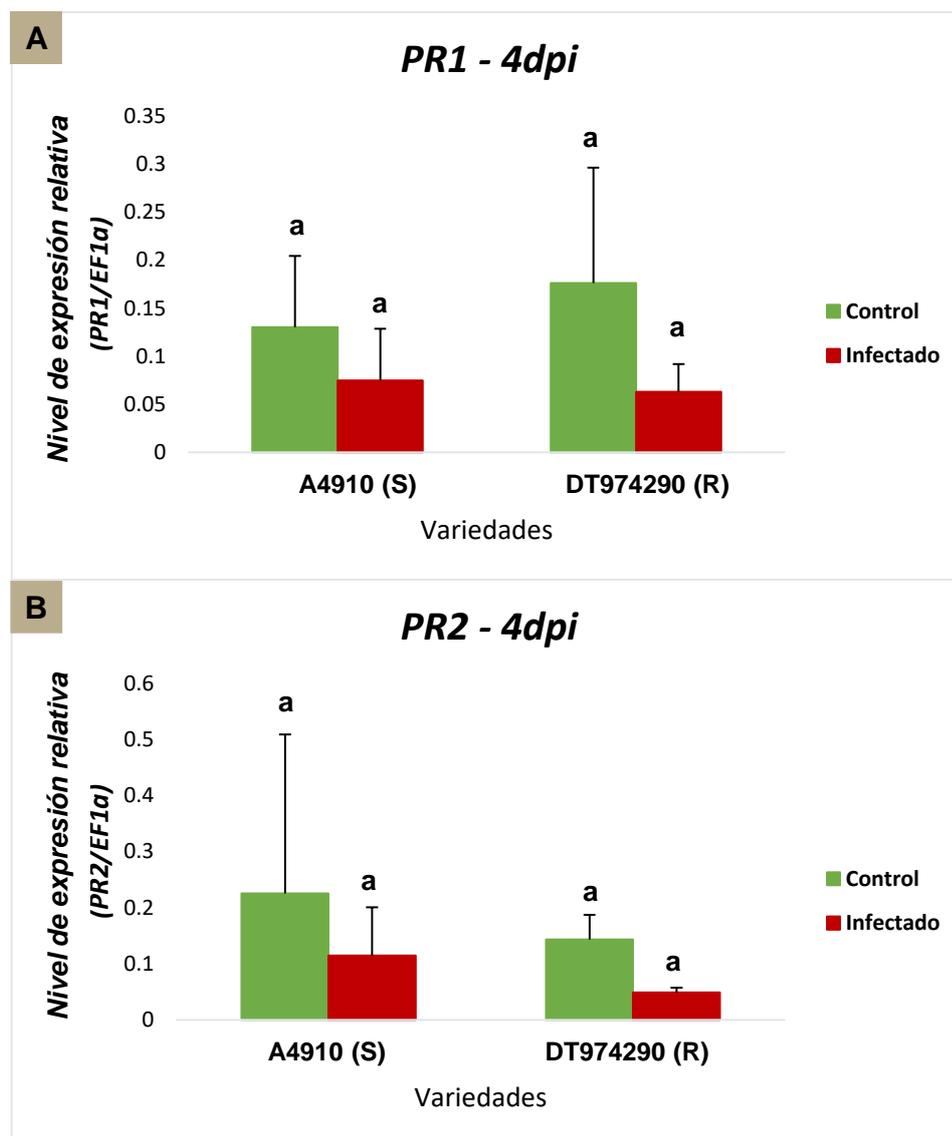
El nivel de expresión de los genes de biosíntesis y señalización de ET; *ACO2/ACCO2* y *EIN2* respectivamente, fueron determinados. No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen *ACO2/ACCO2* entre control e infectado de una misma variedad ni entre variedades en ambas condiciones (**Figura 14**). La expresión en los infectados de ambas variedades se encontró ligeramente disminuida en comparación al respectivo control. Así mismo, se observó una expresión ligeramente menor en la variedad resistente con respecto a la susceptible en ambas condiciones. No se verificó expresión del gen *EIN2*.



**Figura 14. Análisis de expresión del gen de la vía de señalización de ET a 4 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *ACO2/ACCO2* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de raíces de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) a los cuatro días luego de la inoculación por el método de infección en sustrato estéril. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación alfa (*GmEF1a*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas con 2-3 ejemplares cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las condiciones y las variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

La expresión de dos genes de respuesta SA fue evaluada. En primer lugar, se observó una disminución no significativa del nivel de expresión de *PRI* en los infectados con respecto al control para una misma variedad, además de un similar nivel de expresión entre infectados de ambas variedades. En el caso de los controles, la variedad resistente presentó una expresión ligeramente mayor que la susceptible; sin embargo, esta diferencia no es significativa (**Figura 15A**).

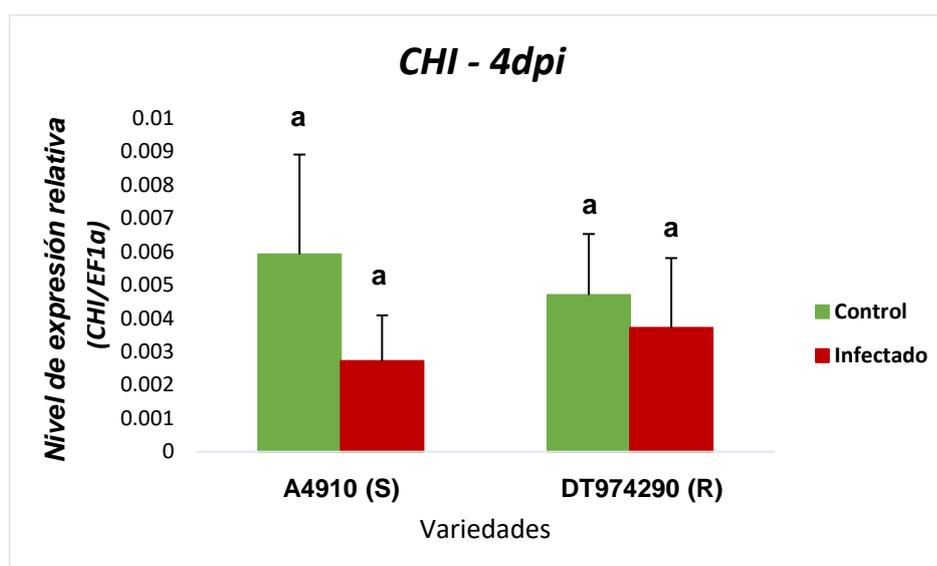
El segundo gen evaluado corresponde a *PR2*, para el cual similar al caso de *PRI* se observó una disminución no significativa del nivel de expresión en los ejemplares infectados con respecto al control para una misma variedad. La expresión entre infectados fue menor en DT974290 (R) con respecto a A4910 (S). Para los controles, la variedad susceptible presentó mayor nivel de expresión con respecto a la resistente. Sin embargo, las diferencias observadas no son significativas (**Figura 15B**).



**Figura 15. Análisis de expresión de genes de vía de señalización de SA a 4 dpi.** Nivel de expresión relativa de los genes A) *PR1* y B) *PR2* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de raíces de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) a los cuatro días luego de la inoculación por el método de infección en sustrato estéril. La expresión de los genes fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación alfa (*GmEF1α*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas con 2-3 ejemplares cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

La expresión de los genes codificantes de las enzimas biosintéticas de metabolitos secundarios; *CHI* y *FS*, fueron determinados. Las diferencias observadas en los niveles de expresión de *CHI* entre ejemplares controles e infectados para una misma variedad y entre variedades a dichas condiciones no fueron significativas. Los

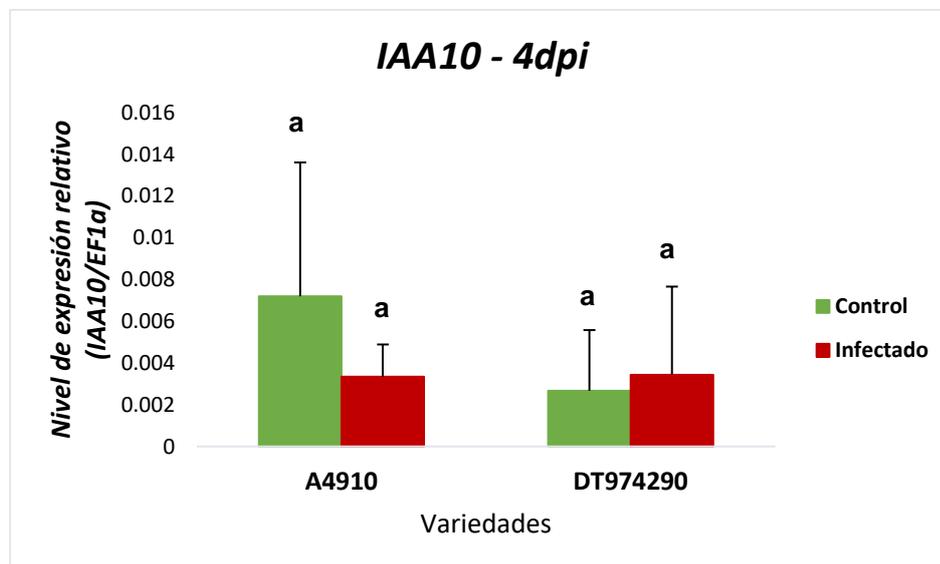
ejemplares infectados de la variedad susceptible presentaron menor nivel de expresión en comparación a su respectivo control, mientras que la expresión en la variedad resistente fue similar entre los controles e infectados. En los controles se verificó una expresión ligeramente menor en DT974290 (R) y mayor en el caso de los infectados, con respecto a A4910 (S) (**Figura 16**). No se detectó la expresión del gen *FS*.



**Figura 16. Análisis de expresión del gen implicado en la síntesis de metabolitos secundarios a 4 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *CHI* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de raíces de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) a los cuatro días luego de la inoculación por el método de infección en sustrato estéril. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación alfa (*GmEF1a*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas con 2-3 ejemplares cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Se analizó la expresión de genes que codifican a dos factores de transcripción implicados en la regulación de la señalización de AUX; *IAA10* e *IAA30*. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *IAA10* entre control e infectado para una variedad y entre condiciones de ambas variedades. El grupo infectado de la variedad susceptible presentó menor nivel de expresión que el grupo control; no obstante, la expresión en la variedad resistente fue similar entre el infectado y su respectivo control. Similares niveles de expresión se detectaron entre

infectados de ambas variedades, y en los controles mayor expresión en A4910 (S) (Figura 17). No se verificó expresión para el gen *IAA30*.



**Figura 17. Análisis de expresión del gen de la vía de señalización de AUX a 4 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *IAA10* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de raíces de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) a los cuatro días luego de la inoculación por el método de infección en sustrato estéril. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación alfa (*GmEF1a*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas con 2-3 ejemplares cada uno. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Si bien se observaron diferencias en los niveles de expresión de los genes evaluados, éstas no fueron significativas y el conjunto de datos presentó una desviación estándar alta. Así mismo, los resultados de mediciones de parámetros de crecimiento y desarrollo vegetal no se estableció una diferencia en el comportamiento resistente/susceptible, así como en los resultados parciales de biomasa fúngica relativa. Lo cual indica la dificultad de la metodología de infección en sustrato estéril en reproducir el fenotipo resistente/susceptible observado en el campo. Por lo tanto, de manera alternativa se ensayó un segundo método de infección.

## 4.2 Resultados del método de infección por *Cut-stem*

Mediante el método de infección por corte al tallo o *cut-stem* primeramente, se evaluó el progreso de la infección durante 15 días y luego se realizó el análisis de la biomasa fúngica y el análisis de expresión de los genes a los 3 y 6 dpi.

### 4.2.1 Evaluación del proceso de infección

#### 4.2.1.1 Medición de la longitud de necrosis

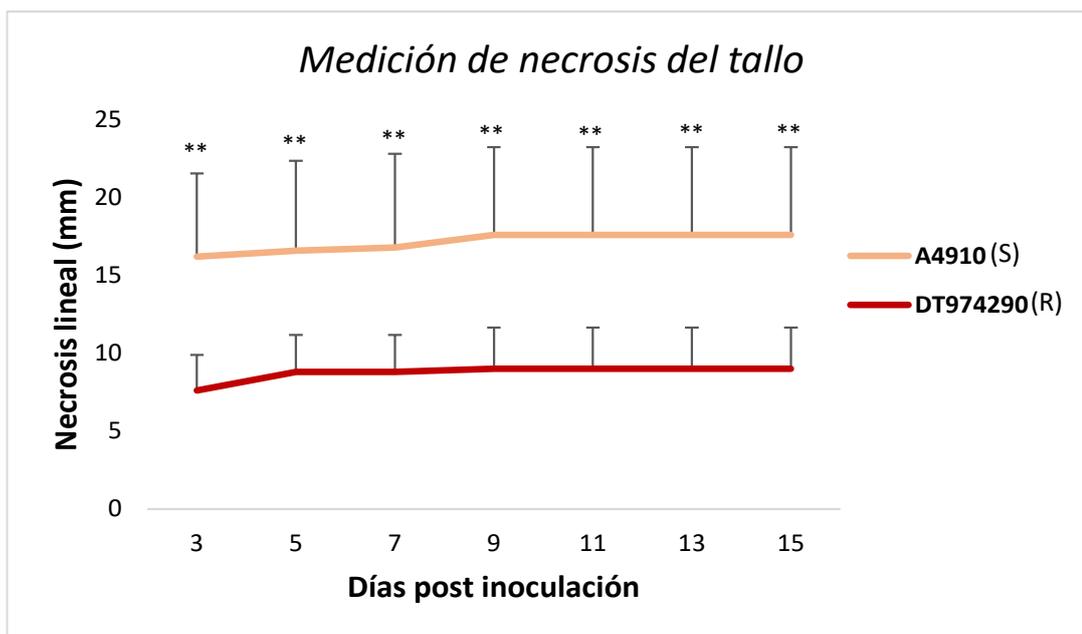
A fin de observar y comparar el comportamiento frente a la infección por *M. phaseolina* en ambas variedades de estudio; A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente), al tercer día post inoculación por el método *cut-stem* (Twizeyimana et al. 2012) se retiró el inóculo que estuvo en contacto con cada ejemplar y se registró la extensión de la necrosis causada por el hongo. A partir del punto de inoculación en el ápice del tallo cortado (**Figura 18**), la extensión de la necrosis fue registrada cada dos días durante quince días. No se observó lesión necrótica en los ejemplares controles (inoculados con disco de medio PDA sin el hongo) durante el desarrollo del experimento.



**Figura 18.** Lesión necrótica (recuadro rojo) presente en un ejemplar de soja infectado por *M. phaseolina* luego de quince días de inoculación.

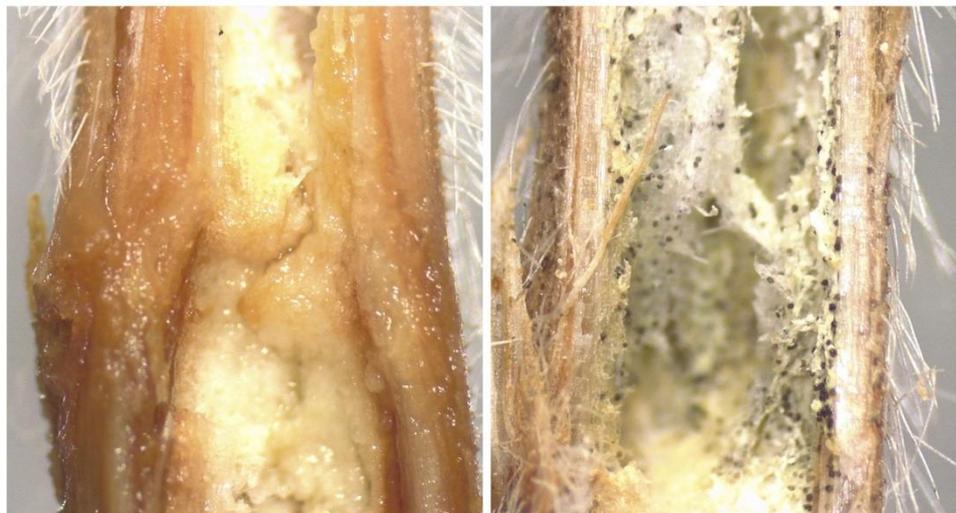
A los 3 dpi, momento en que se retiró el inóculo, ya se observó una diferencia significativa en la longitud de necrosis entre la variedad susceptible y resistente (**Figura 19**), siendo menor la extensión de necrosis en la variedad DT974290 (R) con

respecto a A4910 (S). Además, se registró un ligero aumento de la extensión de la necrosis entre los 3 dpi y 5 dpi para DT974290 y entre 7 dpi y 9 dpi para A4910, a partir de estos tiempos post inoculación se mantuvo constante para ambas variedades durante el periodo del ensayo.

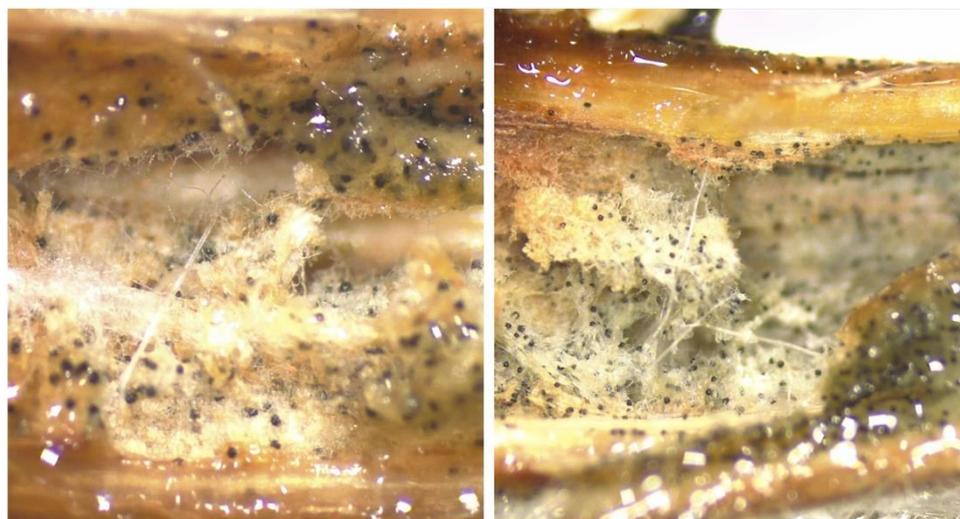


**Figura 19. Evaluación del proceso de infección por método de *Cut-stem*.** Comparación de la longitud de la necrosis (mm) a partir de 3 dpi hasta 15 dpi entre las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente). Se ensayaron al menos tres réplicas biológicas. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Se aplicó la prueba *t* de Student de dos colas donde \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y ns = no significativo.

A partir de los 3 dpi se observó microesclerocios en el corte longitudinal de tallos infectados de la variedad resistente mientras que en la variedad susceptible la extensión de la lesión necrótica fue mayor no se verificó la formación de estos en este punto (**Figura 20**). A los 6 dpi, la formación de microesclerocios se verificó en ambas variedades (**Figura 21**). En base a estas observaciones, se consideraron 3 dpi y 6 dpi como puntos de estudio para la extracción ácidos nucleicos.



**Figura 20. Evaluación de la infección en soja por *M. phaseolina* a mayor magnitud.** Corte longitudinal de tallos de soja infectados con *M. phaseolina* a los 3 dpi observados en microscopio estereoscópico a un aumento de 16X. Se observó la formación de microesclerocios (puntos negros sobre el tallo) en la variedad DT974290 (resistente, derecha) y no en A4910 (susceptible, izquierda) en este punto.



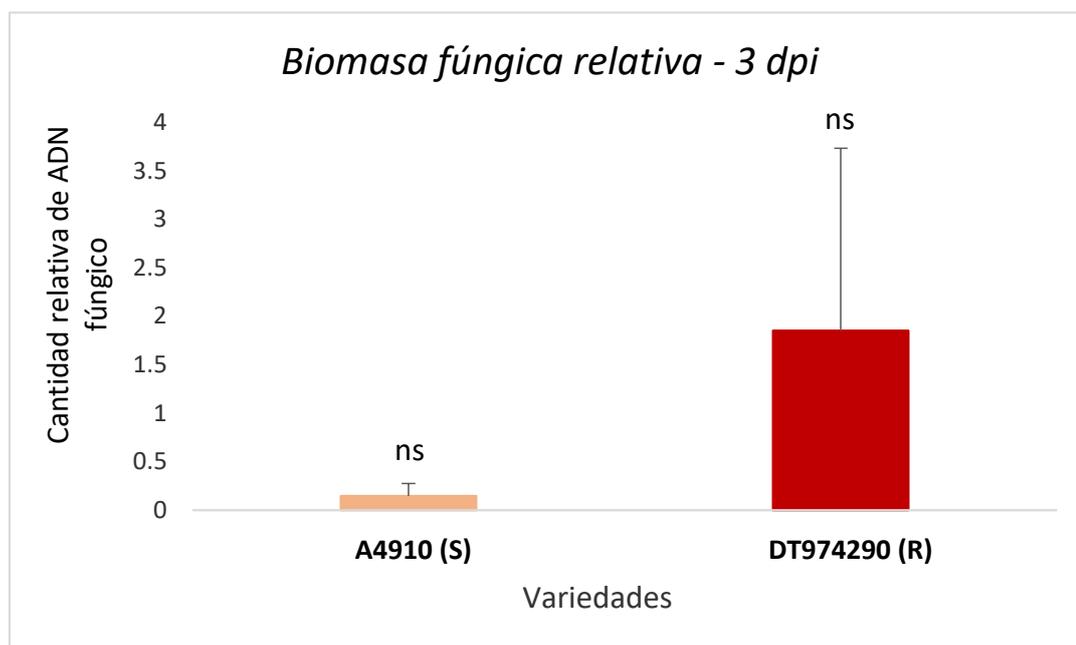
**Figura 21. Evaluación de la infección en soja por *M. phaseolina* a mayor magnitud.** Corte longitudinal de tallos de soja infectados con *M. phaseolina* a los 6dpi observados en microscopio estereoscópico a un aumento de 32X. Se observó la formación de microesclerocios (puntos negros sobre el tallo) en ambas variedades DT97490 (resistente, derecha) A4910 y (susceptible, izquierda)

#### 4.2.1.2 Biomasa fúngica relativa

Como se ha mencionado anteriormente la biomasa fúngica relativa puede dar una medida de la colonización del hongo en el vegetal, por ello se extrajo ADN genómico de muestras de tallos infectados con *M. phaseolina* por *cut-stem* a los 3 dpi de las variedades A4910 (S) y DT974290 (R).

No se observaron diferencias significativas entre la cantidad de relativa de ADN de *M. phaseolina* (estimada mediante la amplificación por qPCR de SCAR) entre ambas variedades. Se verificó mayor acumulación en la variedad resistente con respecto a la susceptible, sin embargo, los valores individuales exhibieron una alta desviación con respecto a la media en la variedad DT974290 (R) (**Figura 22**).

Como se ha observado, tanto con las muestras derivadas de *cut-stem* así como las de infección por sustrato estéril estos resultados presentaron alta variabilidad y no permitieron establecer una asociación con el fenotipo resistente y susceptible, por diversos factores que serán discutidos más adelante. Debido a esto, no se prosiguió con la determinación de la biomasa fúngica relativa a los 6 dpi.



**Figura 22. Estimación de la carga fúngica relativa por método de inoculación *cut-stem* a 3 dpi.** Medida de colonización por cuantificación relativa de biomasa fúngica por qPCR a partir de ADN extraído de tallos de soja infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) a los tres días luego de la inoculación. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Se aplicó prueba *t* de Student de dos colas donde \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y ns = no significativo.

#### 4.2.2 Análisis de expresión de genes involucrados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundarios

Al igual a lo expuesto anteriormente, el análisis de expresión de genes implicados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario tiene como objetivo la identificación de vías activadas o no en soja en respuesta a la infección por *M. phaseolina* y su posible asociación con la resistencia.

Se ha realizado el análisis de expresión de los genes descritos en la **Tabla 6** en la variedad A4910 (susceptible a *M. phaseolina*) y DT974290 (resistente a *M. phaseolina*) de ejemplares controles e infectados. La inoculación con *M. phaseolina* en plantas de soja de cuatro semanas de edad fue llevada a cabo por el método de *cut-stem*, descrito anteriormente. Se procedió a la extracción del ARN total de las muestras de tallos infectados y controles a los 3 y 6 dpi, considerando un tiempo más temprano y otro tardío luego de la inoculación. Debido a que la expresión del gen

*GmEF1a* no fue estable en todas las muestras, se utilizó al gen del factor de elongación beta (*GmEF1b*) como normalizador.

**Tabla 6. Lista de genes analizados en muestras de *cut-stem* en respuesta a *M. phaseolina*, a los 3 y 6 dpi**

Vía	Gen	Codifica a:	Función en:
<b>Ácido Jasmónico (JA)</b>	<i>AOS</i>	Aleno óxido sintasa	Biosíntesis
	<i>JAZ1</i>	Proteína miembro de la familia de Jasmonate Zim Domain	Señalización
	<i>VSP2</i>	Proteína de almacenamiento vegetativo 2	Respuesta
	<i>PR3</i>	Proteína Relacionada a la Patogénesis 3, con actividad quitinasa	Respuesta
<b>Etileno (ET)</b>	<i>ACO2/ACCO2</i>	1-Aminociclopropano - 1-carboxílico oxidasa	Biosíntesis
	<i>ERF1</i>	Factor de Respuesta a ET	Señalización
	<i>EIN2</i>	Proteína Insensible a ET 2	Señalización
	<i>NPR1</i>	Non-Expresser of Pathogenesis Related Gene 1	Señalización
<b>Ácido Salicílico (SA)</b>	<i>EDS1</i>	Enhanced disease susceptibility 1	Componente de defensa basal y resistencia mediada por genes R
	<i>PR1</i>	Proteína Relacionada a la Patogénesis 1	Respuesta
	<i>PR5*</i>	Proteína Relacionada a la patogénesis 5	Respuesta
<b>Metabolismo secundario</b>	<i>PAL1</i>	Fenilalanina amonio liasa 1	Biosíntesis
	<i>CHI</i>	Chalcona isomerasa	
	<i>FS*</i>	Flavona sintasa	

\*No se detectó expresión

**Tabla 6. Lista de genes analizados en muestras de *cut-stem* en respuesta a *M. phaseolina*, a los 3 y 6 dpi (cont.)**

Vía	Gen	Codifica a:	Función en:
Auxinas (AUX)	<i>IAA10</i>	Proteína de respuesta a AUX IAA10	Señalización
	<i>IAA30</i>	Proteína de respuesta a AUX IAA30	
Ácido Abscísico (ABA)	<i>ABF2</i>	Factor de unión de elementos respuesta de ABA 2	Señalización
	<i>ADH1</i>	Alcohol Deshidrogenasa 1	Respuesta
	<i>DHDN</i>	Dehidrina	Respuesta

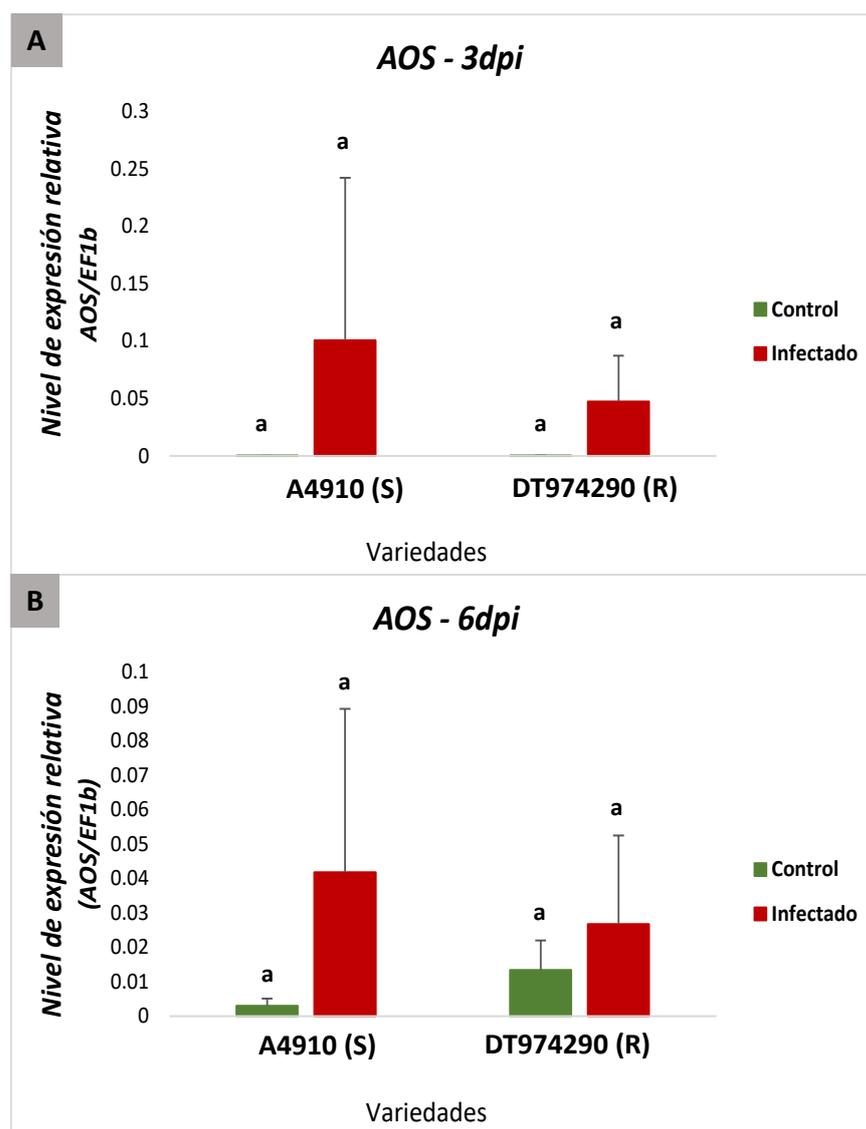
\*No se detectó expresión

#### 4.2.2.1 Jasmonato (JA): Biosíntesis, señalización y respuesta

La expresión de los genes *AOS*, *JAZ1*, *VSP2* y *PR3*; implicados en la biosíntesis, señalización y respuestas de JA respectivamente (**Tabla 6**), fueron evaluados en los puntos de estudio en la variedad A4910 (S) y DT974290 (R) en ejemplares infectados y controles (plantas sin inocular).

A los 3 dpi, el nivel de expresión de *AOS* tendió a elevarse en plantas infectadas de ambas variedades, con respecto a los controles (**Figura 23A**). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Entre ejemplares infectados, esta tendencia es mayor en la variedad susceptible. Similar nivel de expresión se observó en controles de ambas variedades.

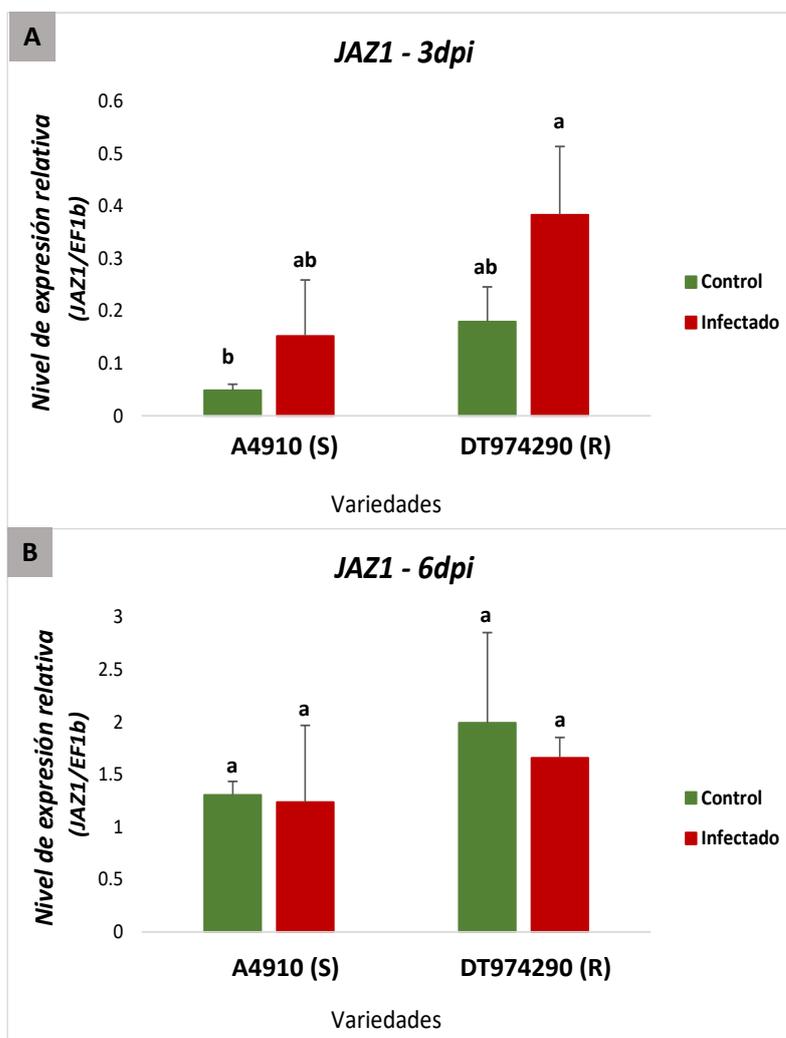
Así mismo, a los 6 dpi las diferencias observadas en el nivel de expresión de ambas variedades en ambas condiciones no fueron significativas (**Figura 23B**). Los ejemplares infectados de ambas variedades presentaron mayor expresión con respecto a los controles. Entre los infectados de ambas variedades, A4910 (S) presentó una expresión ligeramente mayor frente a DT974290 (R); mientras que entre los controles se observó ligera mayor expresión en la variedad resistente que en la susceptible.



**Figura 23. Análisis de expresión del gen de biosíntesis de de JA a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *AOS* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A) 3 y B) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para el gen *JAZ1*, a los 3 dpi se indujo la expresión en infectados con respecto a los controles tanto en A4910 (S) y DT974290 (R) (**Figura 24A**). Esta diferencia no fue significativa, así como las diferencias de los niveles de expresión entre las variedades en una misma condición; control e infectado. Entre controles e infectados la variedad resistente presentó mayor expresión que la susceptible.

En contraste a lo observado a 3 dpi, a los seis días de inoculación no se observó una inducción de este gen en los infectados comparados con el control (**Figura 24B**). Entre controles e infectados, DT974290 (R) presenta mayor expresión, aunque ligera, que A4910 (S).



**Figura 24.** Análisis de expresión del gen implicado en la señalización de JA a 3 y 6 dpi. Nivel de expresión relativa del gen *JAZ1* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A) 3 y B) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

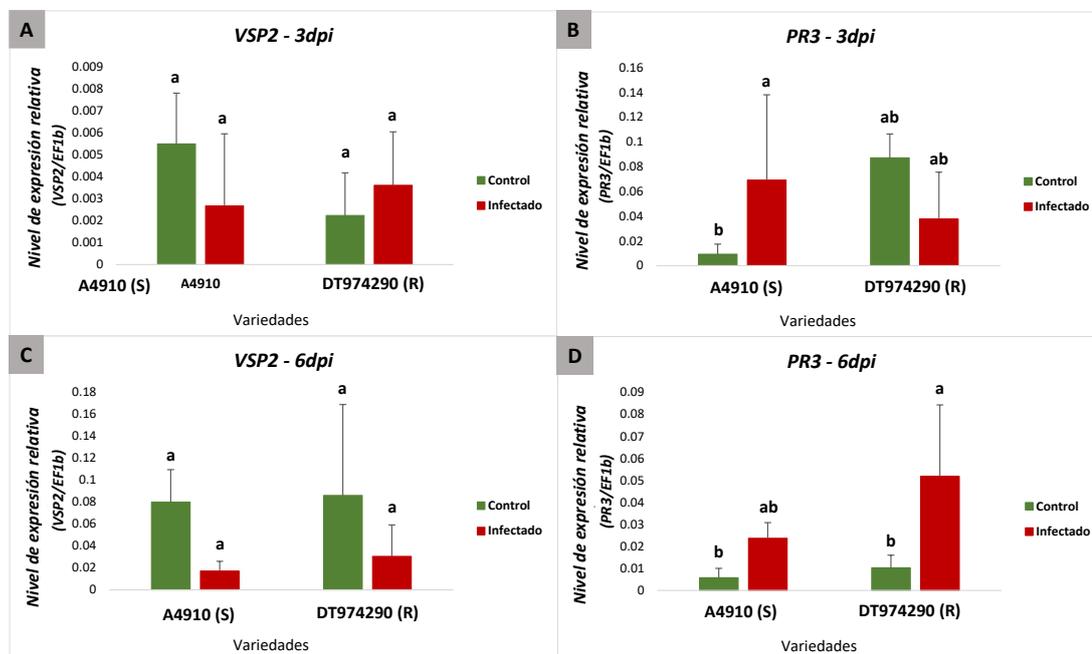
La respuesta a JA fue evaluada cuantificando los niveles de expresión del gen *VSP2* y *PR3*. Las diferencias en los niveles de expresión de *VSP2* entre control e infectado para una misma variedad, así como entre variedades para una misma condición no fueron significativas a los 3 dpi (**Figura 25A**). En DT974290 (R), la infección indujo un ligero aumento en la expresión con respecto al control mientras que en A4910 (S) la expresión se encontró disminuida para la misma comparación. Entre infectados, la expresión fue ligeramente superior en la variedad resistente que en la susceptible y en los controles se observó mayor nivel de expresión en A4910 (S).

Los niveles de expresión de *VSP2* a los 6 dpi tampoco presentaron diferencias significativas entre una misma condición para ambas variedades y entre control e infectado para una misma variedad (**Figura 25C**). Se verificó una disminución de la expresión en los infectados con respecto a los controles en ambas variedades. Entre los controles, el nivel de expresión fue similar entre ambas variedades; mientras que, en los infectados, se registró un ligero aumento del nivel de expresión en DT974290 (R) que en A4910 (S).

El análisis de expresión del gen *PR3* a los 3 dpi reveló que en la variedad susceptible la infección provoca un aumento significativo con respecto al control, mientras que en la variedad resistente infectada ocurrió una disminución no significativa de la expresión respecto a su control (**Figura 25B**). Diferencias no significativas en los niveles de expresión se observaron para una misma condición entre variedades. Entre los controles, DT974290 (R) presentó mayor expresión que A4910 (S); en cambio, el nivel de la primera fue ligeramente inferior al de la variedad susceptible durante la infección.

En contraste a lo observado a 3 dpi, a los 6 dpi la infección aumentó significativamente el nivel de expresión de *PR3* en la variedad resistente con respecto a los controles (**Figura 25D**). Además, DT974290 (R) infectado demostró mayor nivel de expresión que A4910 (S) infectado. No se observaron diferencias significativas en una misma condición entre ambas variedades y entre las dos condiciones para la variedad susceptible. Se presentó un incremento no significativo

en infectado de A4910 (S) con respecto al control. También se observó similares niveles de expresión en ambas variedades no infectadas.



**Figura 25. Análisis de expresión de genes de respuesta al JA a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa de los genes *VSP2* y *PR3* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A y B) 3 y C y D) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión de los genes fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

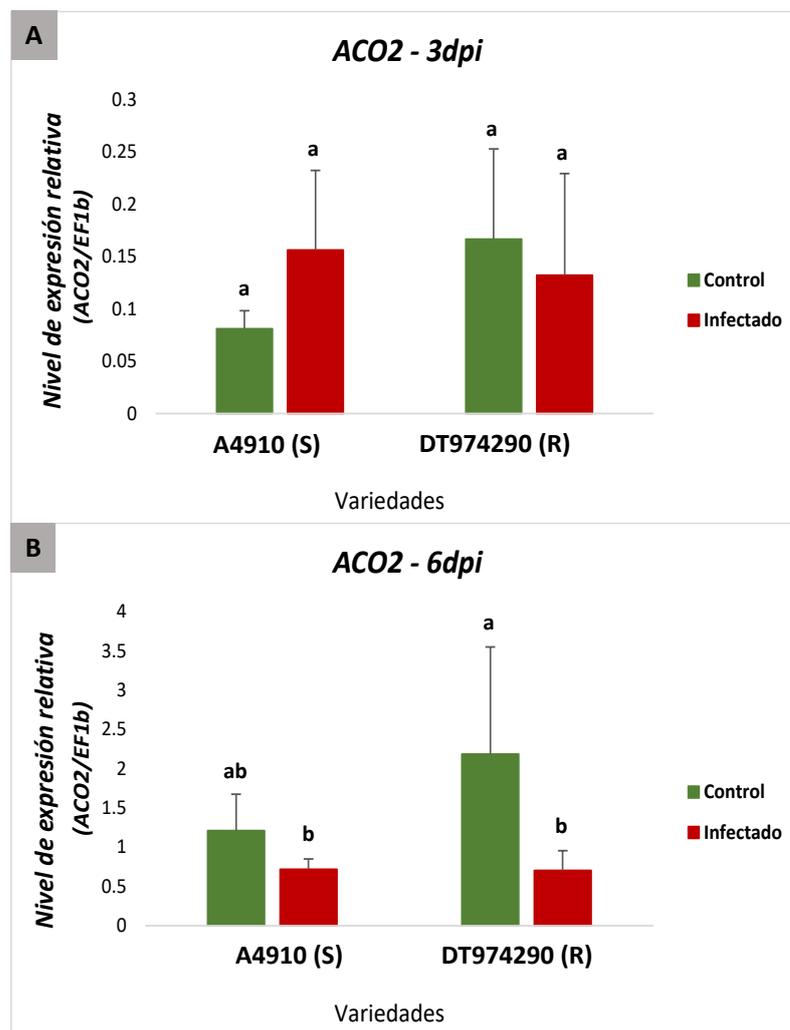
#### 4.2.2.2 Etileno (ET): Biosíntesis y señalización

El análisis de expresión del gen *ACO2/ACCO2* implicado en la biosíntesis de ET, así como de los genes *ERF1* y *EIN2*, ambos componentes de la señalización del ET (**Tabla 6**) fueron llevados a cabo en ambos tiempos de infección en estudio.

Luego de tres días de inoculación, las diferencias en los niveles de expresión de *ACO2/ACCO2* entre variedades para una misma condición y entre control e infectado de una variedad no fueron significativas (**Figura 26A**). En A4910 (variedad susceptible a *M. phaseolina*) la infección indujo la expresión con respecto al control. Para DT974290 (variedad resistente a *M. phaseolina*) la expresión se

encontró ligeramente disminuida en infectados con respecto al control. Se verificó mayor expresión en control de DT974290 (R) y levemente menor en los infectados de ésta con respecto a A4910 (S).

A los 6 dpi, no se presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *ACO2/ACCO2* entre ambas variedades para una misma condición y entre control e infectado de la variedad susceptible (**Figura 26B**). Sin embargo, en la variedad resistente, la infección provocó una disminución significativa del nivel de expresión con respecto al control. Se observó mayor expresión en DT974290 (R) entre controles y similar nivel de expresión en infectados de ambas variedades.



**Figura 26. Análisis de expresión del gen de biosíntesis de ET a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *ACO2/ACCO2* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A) 3 y B) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

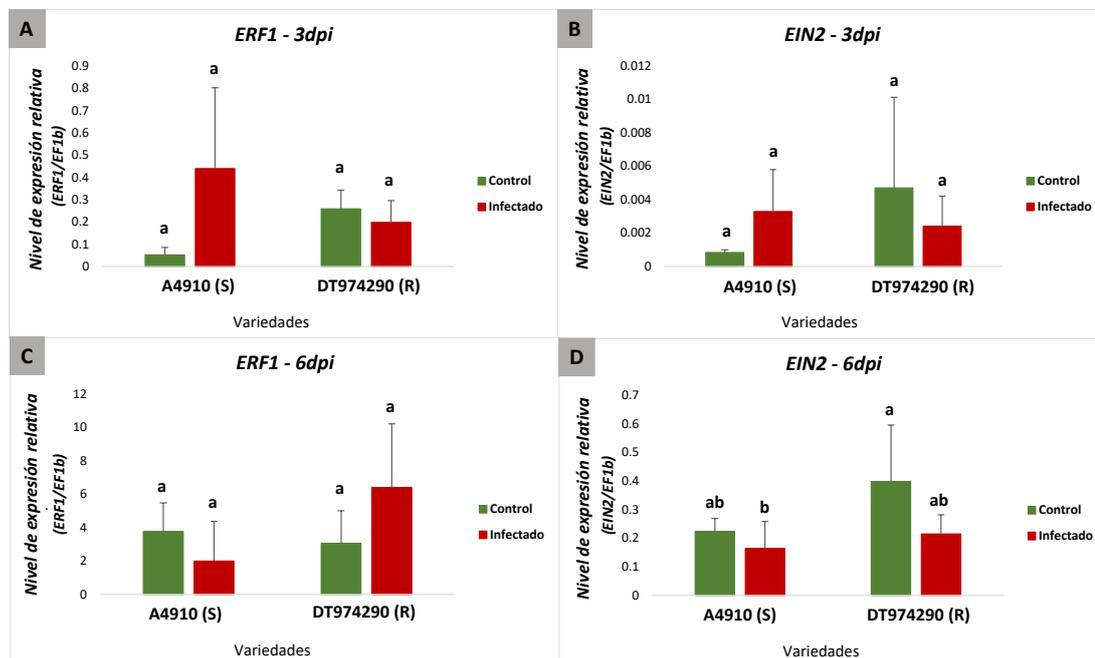
Los niveles de expresión del gen *ERF1* a los 3 dpi no difirieron significativamente entre ambas variedades en una misma condición y entre control e infectado de una variedad (**Figura 27A**). Se observó mayor nivel de expresión en A4910 (S) infectado con respecto al control, y una ligera disminución de la expresión en infectados de DT974290 (R) con respecto al control. En los controles, la variedad

resistente presentó mayor nivel de expresión, caso contrario en los infectados donde la variedad susceptible presentó mayor nivel de expresión.

Las diferencias en los niveles de expresión de *ERFI* entre controles e infectados para una variedad, así como entre variedades para una misma condición tampoco fueron significativas al sexto día post inoculación (**Figura 27C**). Con respecto al control, la expresión se encontró disminuida en infectados de A4910 (S), sin embargo, DT974290 (R) en condición de infección presentó mayor expresión que el respectivo control. Entre controles, se observó una menor expresión en la variedad resistente que en la susceptible, pero fue mayor en condiciones de infección.

El segundo gen implicado en la señalización de ET evaluado corresponde a *EIN2*. A los 3 dpi, no se presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *EIN2* entre variedades en una condición dada y controles e infectados de una variedad (**Figura 27B**). En A4910 (S), los ejemplares infectados expresaron en mayor grado que el respectivo control, opuesto a DT974290 (R) en donde se observó una leve disminución del nivel de expresión en infectado con respecto al control. Se observó mayor expresión en controles la variedad resistente y ligeramente menor en infectados con respecto a la susceptible.

Los niveles de expresión de *EIN2* a los 6 dpi no presentaron diferencias significativas entre variedades en ambas condiciones, así como control e infectado de A4910 (S) o DT974290 (R) (**Figura 27D**). Niveles de expresión disminuidos en ejemplares infectados de la variedad resistente se observaron al comparar con el respectivo control. Por otro lado, se encontró una mayor expresión en controles de DT974290 (R) que A4910 (S) no infectado mientras que el nivel de expresión fue similar entre los infectados de ambas variedades.



**Figura 27. Análisis de expresión de los genes implicados en la señalización de ET a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa de los genes *ERF1* y *EIN2* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A y B) 3 y C y D) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión de los genes fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

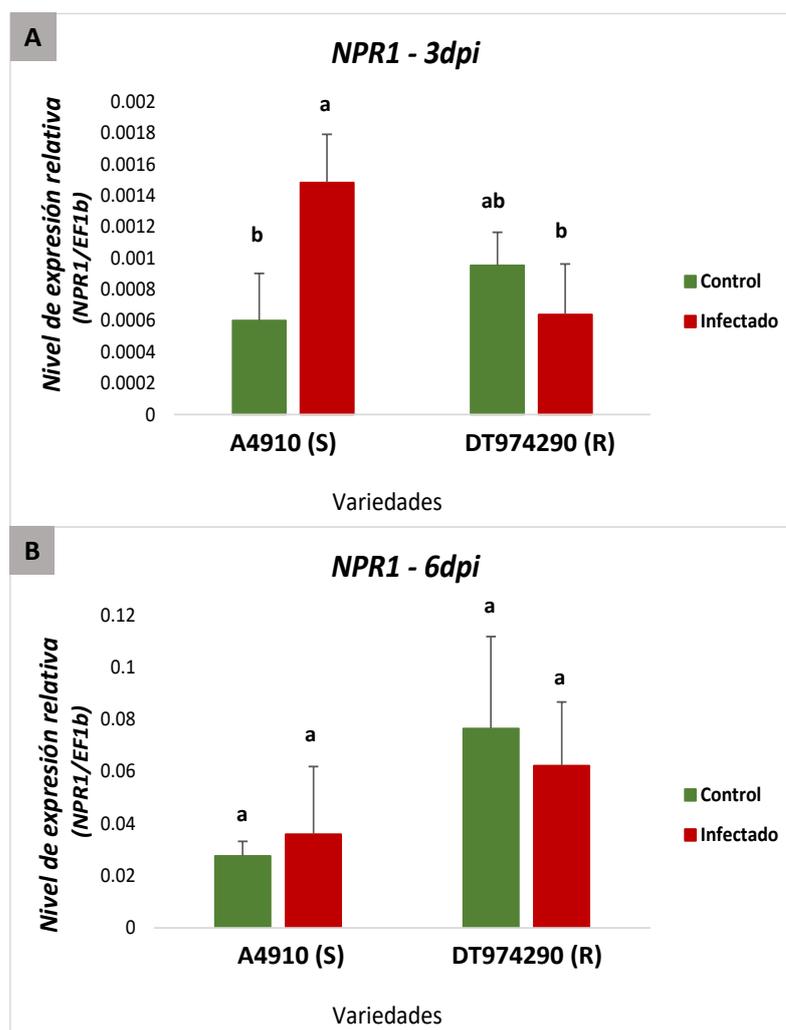
#### 4.2.2.3 Ácido salicílico (SA): señalización y respuesta

El análisis de expresión de los genes que codifican a proteínas implicadas en la señalización de SA *NPR1* y *EDS1*, así como a los genes *PR1* y *PR5* implicadas en la respuesta a SA (**Tabla 6**) fue llevado a cabo a los 3 y 6 dpi.

A los 3dpi, un aumento significativo del nivel de expresión de *NPR1* fue observado en A4910 (susceptible a *M. phaseolina*) infectado con respecto al control; siendo este nivel significativamente mayor con respecto a DT974290 (resistente a *M. phaseolina*) infectado (**Figura 28A**). Además, una disminución no significativa de la expresión de *NPR1* en la variedad DT974290 infectado con respecto a su control fue

verificada. Entre los controles, DT974290 presentó mayor expresión, aunque la diferencia no fue significativa.

Los niveles de expresión de *NPRI* a los 6dpi no presentaron diferencias significativas entre variedades para una misma condición y entre control e infectado para una misma variedad (**Figura 28B**). A4910 (S) infectado presentó un leve incremento del nivel de expresión con respecto al control, y se verificó una ligera disminución del nivel de expresión en condición de infectado de la variedad DT974290 (R) con respecto a su control. La variedad resistente presentó mayor nivel de expresión de *NPRI* tanto como en los infectados como no infectados comparados con la variedad susceptible.

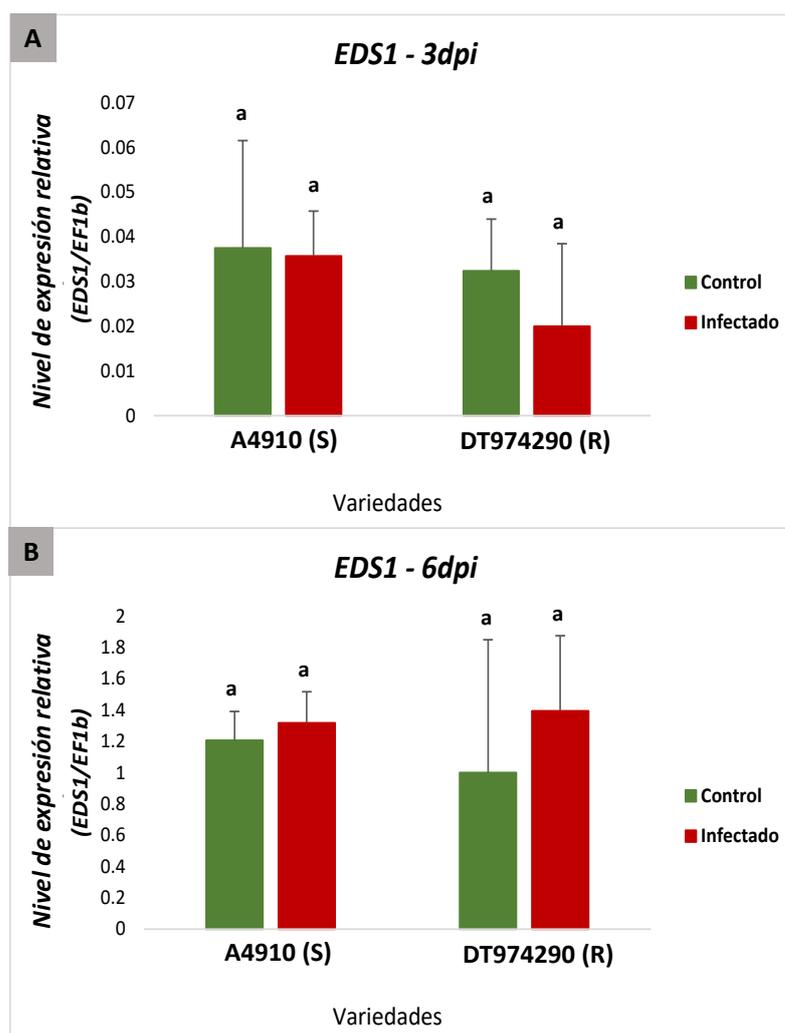


**Figura 28. Análisis de expresión del gen implicado en la señalización de SA a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *NPR1* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A) 3 y B) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Las diferencias observadas en el nivel de expresión de *EDSI*, a los 3 dpi en las comparaciones entre variedades para una misma condición; control e infectado, así como entre éstas para una variedad no fueron significativas (**Figura 29A**). Similares niveles de expresión se verificaron en la variedad A4910 (S) entre condición control e infectado. Mientras que en DT974290 (R) se observó menor nivel de expresión en infectado con respecto al control. Entre los controles, la

variedad resistente presentó ligero menor grado de expresión que la susceptible y esta diferencia fue más acentuada entre los infectados.

A los 6 dpi, en A4910 (S) se observó un ligero incremento del nivel de expresión de *EDSI* en infectado con respecto al control (**Figura 29B**). La infección en DT97290 (R) tiende a elevar el nivel expresión de *EDSI* con respecto a su control. Entre los controles de ambas variedades, DT974290 (R) presentó menor nivel expresión que A4910 (S) y similar nivel de expresión entre infectados de ambas variedades fue observada. No obstante, las diferencias observadas en las comparaciones descritas no son significativas.

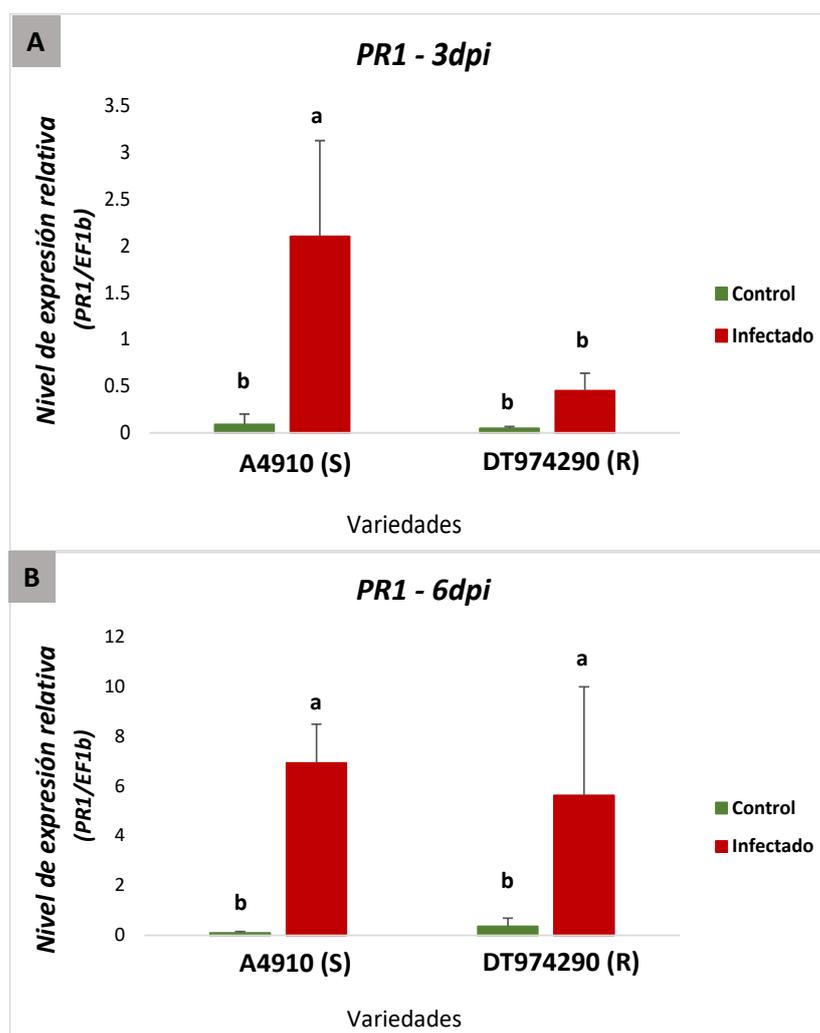


**Figura 29.** Análisis de expresión del gen implicado en la defensa basal de la planta y en la vía de señalización de SA a 3 y 6dpi. Nivel de expresión relativa del gen *EDS1* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A) 3 y B) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Con respecto al gen de respuesta al SA, luego de tres días de inoculación, se observó un aumento significativo en el nivel de expresión de *PRI* en infectado de A4910 (S) con respecto al control, siendo también significativamente superior al de la variedad DT974290 ® infectada (**Figura 30A**). Además, se observaron otras diferencias no significativas en cuanto al nivel de expresión de *PRI* al punto de infección citado. Para la variedad resistente, con respecto al control el infectado

presentó un ligero incremento. Los niveles de expresión de *PR1* en los controles de ambas variedades fueron bajos y similares entre sí.

A los 6 dpi, la infección por *M. phaseolina* produjo un incremento significativo del nivel de expresión en ambas variedades con respecto a sus controles (**Figura 30B**). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *PR1* entre las variedades en una misma condición. En infectados, la variedad susceptible presentó una expresión ligeramente mayor que la resistente; mientras que en los controles, la expresión en esta última fue ligeramente mayor.



**Figura 30. Análisis de expresión del gen de respuesta al SA a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *PR1* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A) 3 y B) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

En ambos puntos de estudio, no se detectó expresión para el gen *PR5* en ambas variedades y condiciones.

#### 4.2.2.4 Metabolismo secundario: Biosíntesis

Para estimar el estado de síntesis de metabolitos secundarios en respuesta a la infección, se cuantificaron los niveles de expresión relativa de los genes *CHI*, *PAL1* y *FS*, que codifican a enzimas biosintéticas (**Tabla 6**).

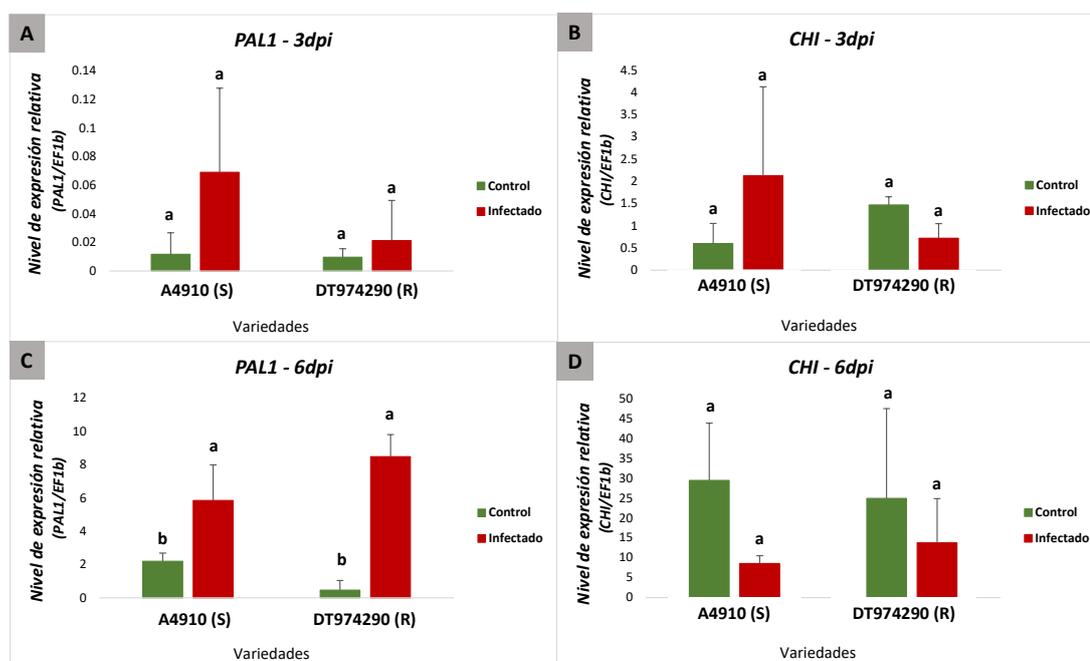
No se presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *PAL1* para una misma condición entre variedades, así como entre control e infectado para una misma variedad, a los 3 dpi (**Figura 31A**). Tanto en DT974290 (variedad resistente a *M. phaseolina*) así como en A4910 (variedad susceptible), se observó un aumento del nivel de expresión en infectados con respecto al control, siendo mayor la diferencia en A4910 (S). Los controles presentaron similar nivel de expresión de *PAL1* en entre ambas variedades. Por otro lado, en condiciones de infección la variedad susceptible presentó mayor nivel de expresión que la resistente en esta condición.

Luego de seis días de inoculación se verificó que la infección aumenta significativamente la expresión de *PAL1* en ambas variedades con respecto a sus controles (**Figura 31C**). No hubo diferencias significativas de los niveles de expresión de *PAL1* en una misma condición entre variedades. La variedad susceptible presentó mayor nivel de expresión con respecto a la resistente en los controles; sin embargo, para los infectados se verificó mayor nivel de expresión en DT974290 (R) con respecto a A4910 (S) para dicha condición.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *CHI* para una misma condición entre variedades, así como entre control e infectado para una misma variedad, a los 3 dpi (**Figura 31B**). Con respecto a los controles, se observó un aumento del nivel de expresión de *CHI* en infectados de A4910 (S) y una disminución en DT94290 (R) en dicha condición. Entre controles, la variedad resistente presentó mayor expresión en comparación a A4910.

A los 6 dpi, se observó que los infectados de ambas variedades presentan menor nivel de expresión de *CHI* con respecto a los controles (**Figura 31D**), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas al igual que las observadas al

comparar las variedades en una misma condición. A4910 (S) presentó un ligero mayor nivel de expresión con respecto a DT974290 (R) en los controles; sin embargo, el nivel de expresión fue similar en los infectados, siendo levemente mayor en la variedad resistente.



**Figura 31. Análisis de expresión de genes implicados en la síntesis de metabolitos secundarios a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa de los genes *PAL1* y *CHI* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A y B) 3 y C y D) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión de los genes fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

No se verificó la expresión del gen *FS*, a los 3 y 6 dpi tanto en los controles como en los infectados de ambas variedades.

#### 4.2.2.5 Auxinas (AUX): Señalización

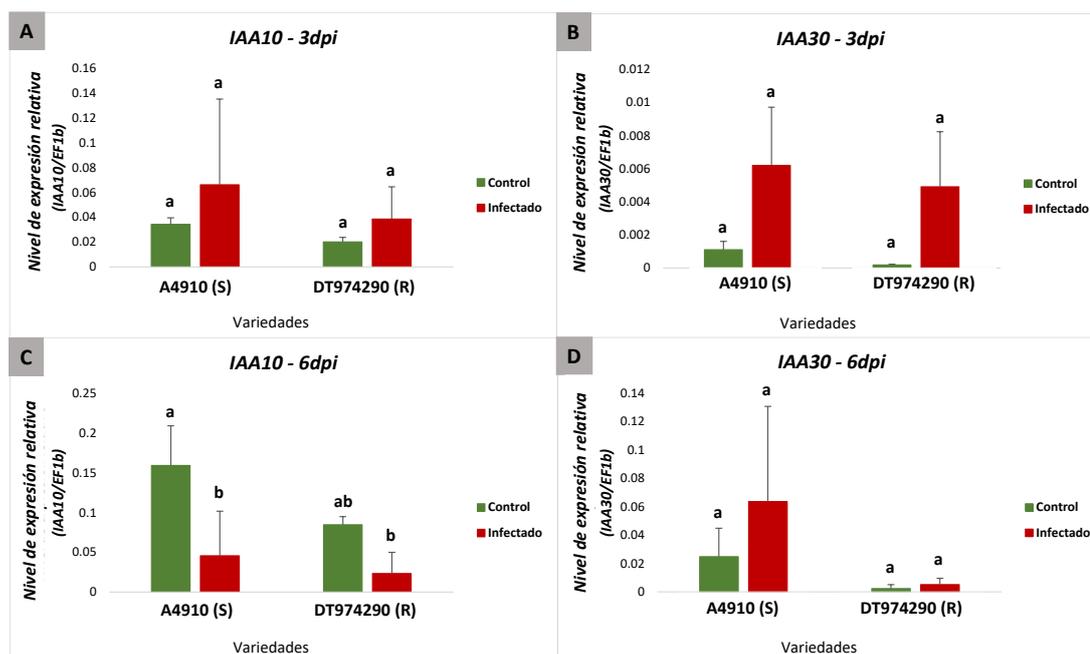
Los niveles de expresión de dos genes que codifican a factores de transcripción represores de la vía de AUX; *IAA10* e *IAA30* (Tabla 6), fueron determinados a los 3 y 6 dpi, en condiciones control e infectado de las variedades de soja A4910 (S) y DT974290 (R).

A los 3 dpi, los niveles de expresión del gen *IAA10* no presentaron diferencias significativas para una misma condición entre variedades y entre control e infectado de una variedad (**Figura 32A**). Se observó mayor nivel de expresión en infectados para ambas variedades con respecto a sus controles. Entre variedades, se observó mayor y ligeramente mayor expresión de *IAA10* en A4910 (S) con respecto a DT974290 (R) en condiciones infectado y control, respectivamente.

Se verificó a los 6 dpi una disminución significativa de los niveles de expresión de *IAA10* en ejemplares infectados de la variedad susceptible con respecto al control (**Figura 32C**). Así mismo, en la variedad resistente en condición infectado se verificó una disminución del nivel de expresión, pero no significativa, con respecto al control. Además, las diferencias observadas entre variedades para una misma condición no fueron significativas. En una condición, A4910 (S) presentó mayor expresión que DT974290 (R), siendo mayor esta diferencia en los controles.

En el caso del gen *IAA30*, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre variedades en una condición dada, así como entre control e infectado para una misma variedad a los 3 dpi (**Figura 32B**). En ambas variedades, se observó mayor nivel de expresión en ejemplares infectados con respecto a los controles. Tanto en los controles como infectados, se verificó una expresión ligeramente mayor en A4910 (S) con respecto a DT974290 (R).

Así mismo, a los 6 dpi los niveles de expresión de *IAA30* no presentaron diferencias significativas entre variedades en una condición dada, así como entre control e infectado para una variedad (**Figura 32D**). En ambas condiciones, la variedad resistente, presentó menor nivel de expresión que la susceptible, siendo mayor esta diferencia con los ejemplares infectados. En este punto, la expresión de *IAA30* se indujo frente a la infección en A4910 (S).



**Figura 32. Análisis de expresión de genes implicados en la señalización de AUX a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *IAA10* e *IAA30* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A y B) 3 y C y D) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión de los genes fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

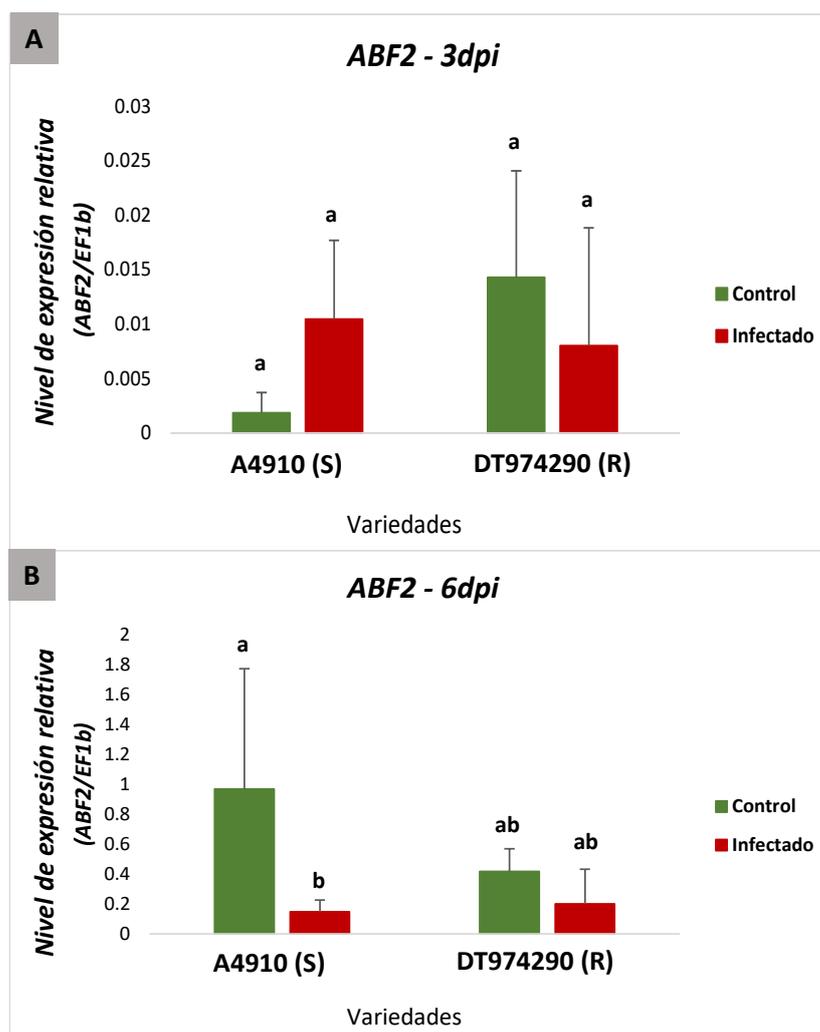
#### 4.2.2.6 Ácido Abscísico (ABA): Señalización y respuesta

Para evaluar la implicancia de la vía del ABA frente a la infección por *M. phaseolina* se cuantificaron los niveles de expresión de *ABF2*, *ADH1* y *DHDN*; genes que codifican a un factor de transcripción implicado en la señalización y dos proteínas de respuesta, respectivamente. Este análisis fue llevado a cabo a los 3 y 6 dpi en controles e infectados de las variedades A4910 y DT974290; susceptible y resistente a *M. phaseolina* respectivamente.

En DT974290 (R) se observó una disminución en el nivel de expresión de *ABF2* en ejemplares infectados con respecto al control a los 3 dpi (**Figura 33A**), caso contrario en A4910 (S) donde se verificó mayor nivel de expresión en infectado con respecto al control. Sin embargo, estas diferencias observadas entre condiciones para

una variedad no fueron significativas, así como aquellas observadas entre variedades para una condición al mismo punto de infección. Se verificó un nivel ligeramente mayor en A4910 (S) infectado con respecto a DT974290 (R) en la misma condición, mientras que en los controles, fue menor en la primera.

La infección por *M. phaseolina* disminuye significativamente el nivel de expresión de *ABF2* en la variedad susceptible con respecto al control, a los seis días luego de la inoculación (**Figura 33B**). Así mismo, en la variedad resistente se observó disminución en infectado con respecto al control, no obstante, no significativo. Además, a los 6 dpi no se presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre variedades en una misma condición. Al comparar los controles, el nivel de expresión fue mayor en A4910 (S) que en DT974290 (R). Por otro lado, los infectados presentaron similar nivel de expresión de *ABF2*.



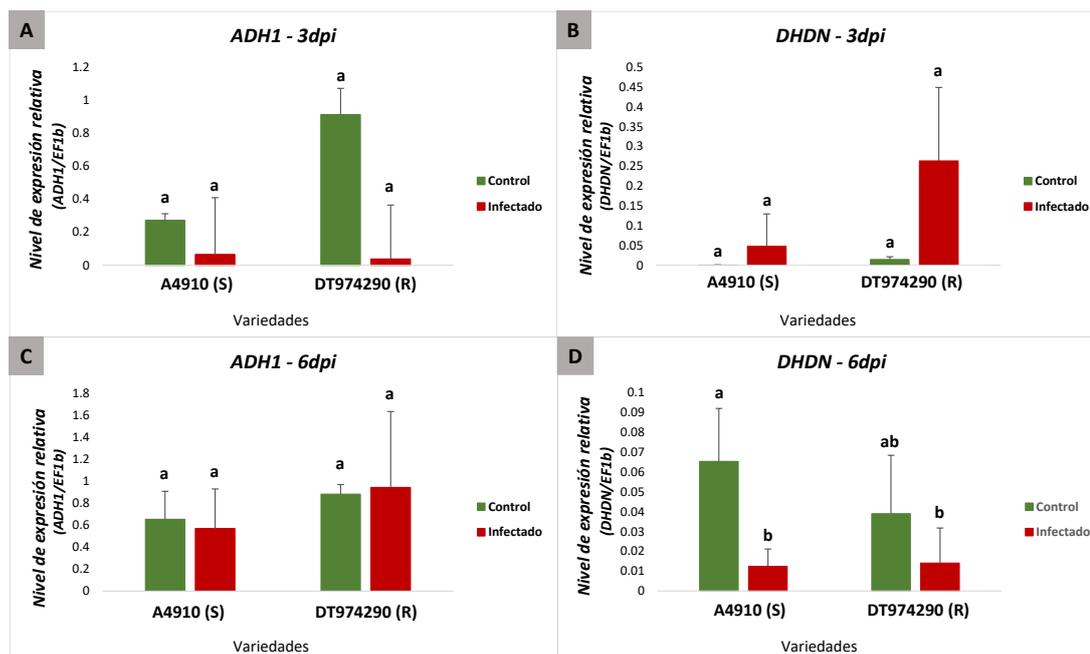
**Figura 33. Análisis de expresión del gen implicado en la señalización de ABA a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa del gen *ABF2* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A) 3 y B) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión del gen fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

En ambas variedades se observó un menor nivel de expresión de *ADHI* en ejemplares infectados con respecto a sus controles a los 3 dpi (**Figura 34A**). Al comparar los controles, DT974290 (R) presentó mayor expresión que A4910 (S) y en infectados similares niveles de expresión se verificaron entre ambas variedades. Sin embargo, las diferencias descritas no fueron significativas.

Los niveles de expresión de *ADHI* a los 6 dpi, no presentaron diferencias significativas entre ambas variedades en una misma condición y entre control e infectado para A4910 (S) o DT974290 (R) (**Figura 34C**). Similares niveles de expresión se observaron entre control e infectado tanto en la variedad resistente como en la susceptible. En una misma condición; control o infectado, DT974290 (R) presentó mayor nivel de expresión que A4910 (S).

Con respecto al otro gen de respuesta al ABA, *DHDN*, se observó un aumento no significativo del nivel de expresión en ejemplares infectados con respecto a los controles en ambas variedades a los tres días luego de la inoculación (**Figura 34B**). Además, a los 3 dpi no se establecieron diferencias significativas de los niveles de expresión entre variedades en una misma condición. En los controles, se verificó similar expresión en ambas variedades siendo ligeramente mayor en DT974290 (R). En condiciones de infección, la variedad resistente presentó mayor expresión con respecto a la susceptible.

Al contrario, a lo observado a los 3 dpi, los niveles de expresión de *DHDN* a los 6 dpi disminuyeron en los ejemplares infectados de ambas variedades con respecto a los controles; siendo esta diferencia significativa para la variedad de A4910 (S) (**Figura 34C**). No se observaron diferencias significativas entre variedades para una misma condición. Al comparar los controles, se verificó mayor nivel de expresión en A4910 (S) con respecto a DT974290 (R). Similares niveles de expresión fueron observados en infectados de ambas variedades.



**Figura 34. Análisis de expresión de genes de respuesta al ABA a 3 y 6 dpi.** Nivel de expresión relativa de los genes *ADH1* y *DHDN* obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de soja controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A y B) 3 y C y D) 6 días de inoculación por *cut-stem*. La expresión de los genes fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de al menos tres réplicas biológicas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones para una variedad o en una condición entre variedades según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

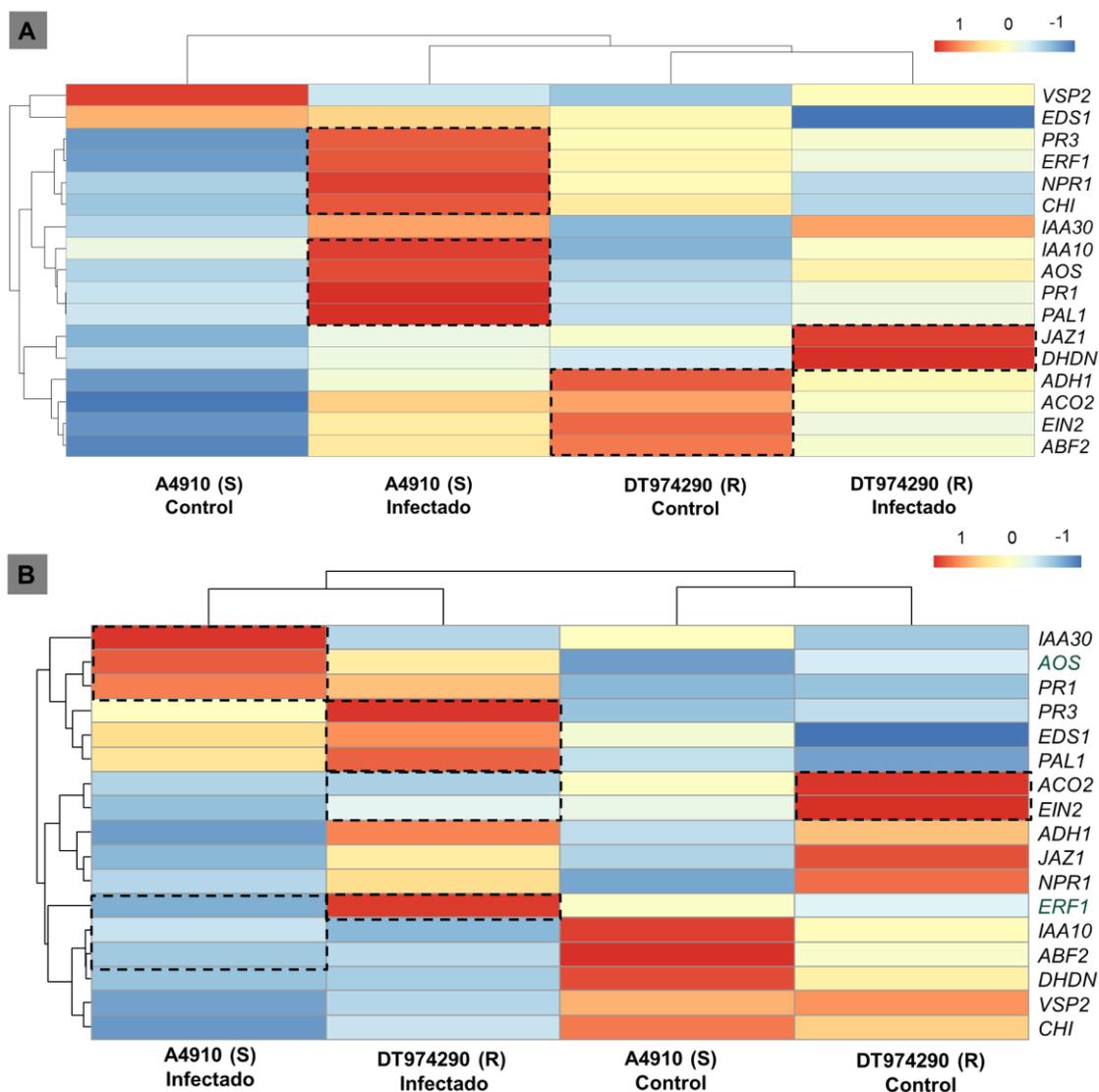
#### 4.2.2.7 Genes implicados en la respuesta de la infección por *M. phaseolina* en soja

El perfil de expresión global de los genes analizados demostró una respuesta diferencial en ambas variedades en ambos puntos luego de la inoculación con *M. phaseolina*.

A los 3 dpi se verificó mayor inducción frente a infección en A4910 (S) de los genes *AOS*, *PR3*, *ERF1*, *NPR1*, *PR1*, *PAL1*, *CHI*, e *IAA10*; y una disminución en la expresión de *VSP2* (Figura 35A). En este punto, en DT974290 (R) entre los genes inducidos frente a la infección más representativos se encuentran *JAZ1* y *DHDN* y al gen *EDS1* entre aquellos regulados a la baja en dicha condición. También es notable

la mayor expresión de los genes *ADH1*, *ACO2*, *EIN2* y *ABF2* en la variedad resistente no infectada.

A los 6 dpi, se observó mayor inducción de los genes *IAA30*, *AOS* y *PRI* en infectados de A4910 (S), mientras que la expresión de los genes *IAA10*, *ABF2* y *DHDN* disminuyó en mayor medida (**Figura 35B**). En DT974290 (R) los genes más inducidos fueron *PR3*, *EDS1*, *PAL1* y *ERF1* frente a la infección; por otra parte, los genes *ACO2* y *EIN2* disminuyeron su expresión en mayor grado en dicha condición.



**Figura 35. Heatmap de la expresión de genes implicados en señalización de fitohormonas y metabolismo secundario a 3 y 6 dpi.** Patrón de expresión de genes implicados en señalización de fitohormonas y metabolismo secundario obtenido por RT-qPCR a partir de ARN de tallos de sojas controles e infectadas con *M. phaseolina* de las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (resistente) luego de A) 3 dpi y B) 6 dpi por *cut-stem*. La escala de color ubicada a la derecha representa la magnitud de la expresión génica a partir de valores normalizados (valor Z).

## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 Caracteres macroscópicos asociados a resistencia y susceptibilidad frente a *M. phaseolina* de las variedades de soja DT974290 y A4910 observados en ambos métodos de infección

En el presente trabajo se ha propuesto inicialmente un método de infección utilizando sustrato con inóculo de arroz en condiciones estériles, adaptado de la metodología descrita por Claudino (2013), por la cual se clasificaron otras variedades de soja de acuerdo al grado de afectación radicular. En este trabajo se ensayaron dos variedades de soja; DT974290 y A4910, resistente y susceptible a *M. phaseolina* respectivamente, a fin de evaluar las diferencias fenotípicas en el proceso de infección y asociar a los eventos moleculares que se desencadenan en respuesta a la infección por este fitopatógeno. No se verificaron diferencias significativas en estos parámetros estudiados entre condiciones y variedades a los 4 dpi por el método de infección en sustrato estéril, incluso fueron similares entre infectados y controles tanto en DT974290 (R) y A4910 (S) (**Figura 11A-C**). Aunque se observó una disminución en el número de raíces secundarias en los ejemplares infectados con respecto a los controles, esta disminución fue similar entre ambas variedades (**Figura 11C**). Si consideramos que la resistencia a este patógeno se observa como menor necrosis de los tejidos infectados (Reznikov et al. 2018; Twizeyimana et al. 2012) e inhibición del crecimiento de las plántulas (Reznikov et al. 2018), se esperaría que el crecimiento y desarrollo de A4910 se encontrase afectado en mayor grado por la infección que en DT974290 (resistente). Sin embargo, no se establecieron diferencias macroscópicas por este método de infección, lo cual pudo deberse a la influencia de

los siguientes factores: en primer lugar, la carga real del hongo presente en el inóculo de arroz podría no ser la misma en cada réplica. Aunque la masa de inóculo fue estandarizada no fue posible cuantificar al hongo.

Un segundo factor constituye el hecho de que el método de infección en sustrato estéril no permite observar el inicio de infección, por lo que en una misma réplica algunos ejemplares podrían no infectarse al mismo tiempo. Por último, la dispersión en los datos también puede atribuirse a la diferencia en el desarrollo de las plántulas. Idealmente se requiere que las plántulas presenten similitud en el crecimiento y desarrollo durante el experimento. Aunque se han seleccionados plántulas de tamaño similar, frecuentemente se observaron diferencias en la longitud de la raíz y número de raíces secundarios incluso dentro del grupo control de una misma variedad. Estos problemas contribuyen a que el método de infección en sustrato estéril no sea adecuado para observar las diferencias en la resistencia a *M. phaseolina*, al menos con las dos variedades analizadas.

Alternativamente se empleó el método de infección por corte al tallo o *cut-stem* propuesto por Twizeyimana (2012) para clasificar a cultivares de soja en resistente o susceptible a *M. phaseolina*. Con este método fue posible verificar una diferencia significativa en la extensión de la necrosis lineal a causa de la infección por *M. phaseolina* entre la variedad resistente y susceptible, siendo significativamente menor en DT974290 (R) (**Figura 19**). Además, aunque la formación de microesclerocios se observó a los 3 dpi en la variedad resistente (**Figura 20**) el detenimiento de avance de la infección fue más temprano (5 dpi) que en la susceptible (9 dpi) (**Figura 19**), lo cual también coincide con la observación del fenotipo resistente a *M. phaseolina* de la variedad DT974290 reportada por Paris et al., (2006).

Los problemas del método de infección en sustrato estéril fueron resueltos con el método de *cut-stem*. Aunque la cantidad exacta del hongo inoculado no se pudo determinar, es posible colocar un inóculo relativamente uniforme directamente sobre la zona a ser infectada. Además, como el inóculo se pone en contacto con todas las plantas al mismo tiempo, el inicio de la infección también es uniforme. Debido a

que en el método de *cut-stem* se utilizan plantas más desarrolladas (aproximadamente cuatro semanas de edad), tiene la facilidad de seleccionar aquellas con crecimiento más uniforme. Cabe mencionar que la parte aérea de la planta de soja presenta mayor homogeneidad en el crecimiento comparado con el crecimiento de las raíces. A esto se suma el mayor porcentaje de germinación de las semillas al ser sembradas directamente en el sustrato, lo que permite obtener mayor cantidad de réplicas biológicas en un solo ensayo. Por ello, este método permitió mejorar la precisión de la evaluación de la resistencia/susceptibilidad de las variedades frente a *M. phaseolina* sobre las medidas obtenidas por el método de infección en sustrato estéril.

## **5.2 La carga fúngica relativa determinada en muestras de ambos métodos de infección no refleja el fenotipo resistente y susceptible de cada variedad**

Como una medida del grado de colonización por *M. phaseolina*, se ha determinado la cantidad relativa de ADN fúngico acumulado a los cuatro días luego de la inoculación en muestras de raíces de las variedades A4910 (susceptible a *M. phaseolina*) y DT974290 (resistente a *M. phaseolina*) por el método de infección en sustrato estéril así como en muestras de tallos infectados de ambas variedades luego de tres días de inoculación por el método de *cut-stem*, utilizando un cebador específico de *M. phaseolina* diseñado para SCAR-qPCR (Babu et al., 2011).

La determinación de la biomasa fúngica relativa fue llevada a cabo en trabajos anteriores como parte de la evaluación del proceso de infección por *M. phaseolina*. En un trabajo realizado en sésamo, la cantidad relativa de ADN fúngico de *M. phaseolina* (determinada mediante la amplificación y cuantificación de una región ITS) fue menor en la variedad resistente comparado con la de la variedad susceptible a este patógeno en todos los tiempos post infección ensayados (Chowdhury et al., 2017). Similares resultados fueron obtenidos en un estudio con *A. thaliana*, donde mutantes con defectos en las vías de señalización de JA, ET o SA presentaron mayor retención de ADN de *M. phaseolina* (determinada mediante SCAR-qPCR) con respecto al silvestre (Schroeder et al., 2019). En el doble mutante *ein2/jar1* (con defectos en la señalización tanto de ET como JA), tanto el número de

microesclerocios en la raíz principal como la abundancia del ADN de *M. phaseolina* fueron elevados. Sin embargo, en los mutantes *ein2*, *jar1* y la línea transgénica NahG (incapaz de producir SA) no se observó una correlación entre el número de microesclerocios en la raíz y la abundancia de ADN fúngico.

Aunque en trabajos anteriores la biomasa fúngica relativa se correlacionó con el fenotipo resistente/susceptible en las variedades de sésamo y en el doble mutante de *A. thaliana*, los resultados obtenidos en el presente estudio con las dos metodologías de infección ensayadas no reflejaron dicha relación (**Figura 12** y **Figura 22**). En el presente trabajo se descartó los cebadores utilizados por Chowdhury et al. (2017) debido a la presencia de múltiples bandas luego de la amplificación por PCR y esto puede interferir en la cuantificación correcta del material genético del hongo.

La baja reproducibilidad entre réplicas, así como la falta de asociación entre la biomasa fúngica relativa con el fenotipo resistente y susceptible puede deberse a que en la variedad resistente podría ocurrir una mayor colonización en la superficie externa de la planta y menor colonización en el tejido vegetal interno. En tal caso, como las muestras utilizadas para la qPCR incluyeron tanto la corteza externa (de las raíces o los tallos) como el tejido interno, la biomasa fúngica cuantificada en estas condiciones no reflejaría el fenotipo resistente de la planta. Además, la amplificación por qPCR no discrimina el material genético del hongo vivo del muerto.

### **5.3 Perfil de expresión de genes implicados en vías de señalización de fitohormonas y metabolismo secundario en soja frente a la infección por *M. phaseolina***

Inicialmente, fueron determinados los niveles de expresión de los genes descritos en la **Tabla 4** para las muestras de raíces obtenidas por el método de infección en sustrato estéril a los 4 dpi. Sin embargo, debido a la alta dispersión de los valores obtenidos (**Figura 13-17**) y debido a que en este sistema no fue posible observar el fenotipo resistente/susceptible esperado, finalmente fue descartado. Por lo tanto, la discusión experimental se basa en los resultados obtenidos por la metodología de infección por *cut-stem*. Se analizó la expresión de diecinueve genes

implicados en la señalización de fitohormonas y biosíntesis de metabolitos secundarios en muestras de tallos infectados luego de tres y seis días de inoculación por *cut-stem* (**Tabla 6**).

### 5.3.1 Implicancia de la señalización de JA/ET en soja en defensa a la infección por *M. phaseolina*

Las fitohormonas JA y ET median la defensa vegetal frente al ataque de patógenos necrotrofos y herbívoros (Glazebrook, 2005). Estudios previos de interacción planta-*M. phaseolina*, utilizando diversos sistemas patogénicos con otras especies vegetales han demostrado la implicancia de la señalización por JA/ET en respuesta a la infección por este patógeno.

Se han reportado que la infección con *M. phaseolina* induce la expresión de genes implicados en la biosíntesis de JA y ET en los estadios tempranos de la infección. En las RILs (líneas consanguíneas recombinantes) de yute (*Corchorus capsularis*) con fenotipo resistente a *M. phaseolina* se observó la regulación a la alta de genes implicados en biosíntesis de JA y ET (Biswas et al., 2014), principalmente los genes de las enzimas lipoxigenasa (biosíntesis de JA) y ACCO. En *A. thaliana* silvestre, la expresión de genes como *LOX3* y *ACS2*; implicados en la biosíntesis de JA y ET respectivamente, se encontraron regulados positivamente entre las 24 y 48 horas luego de la inoculación con *M. phaseolina* (Schroeder et al., 2019). Así también, en raíces y partes aéreas de *Medicago truncatula*; una leguminosa al igual que soja, se indujo la expresión del gen *OPR-12* (que codifica a una enzima implicada en la biosíntesis de JA) luego de 48 horas de inoculación (Gaigne et al., 2010); aunque no fueron estudiados los genes implicados en la biosíntesis de ET. En el presente trabajo, se demostró un aumento no significativo de la expresión de *AOS* (biosíntesis de JA) durante la infección con *M. phaseolina*, sin observar una diferencia entre la variedad susceptible y resistente (**Figura 23**). Mientras que el gen *ACCO/ACO2* (biosíntesis de ET) fue ligeramente inducido en plantas infectadas de A4910 (S) a los 3 dpi (**Figura 26A**) pero a los 6 dpi, se observó una disminución de la expresión en ambas variedades siendo significativa en DT974290 (R) (**Figura 26B**). Aunque en estudios anteriores fueron demostrados que la biosíntesis de JA/ET

se encuentra regulada al alta en etapas iniciales de la infección (entre las 24 y 72 horas luego de la inoculación dependiendo de la metodología utilizada) (Biswas et al., 2014; Gaige et al., 2010; Schroeder et al., 2019) las observaciones no se llevaron a cabo a tiempos más tardíos de la infección. Es de esperar que la biosíntesis de las fitohormonas ocurra a inicio de la respuesta al estrés para luego activar la señalización y por ende a la respuesta. La inducción de AOS en fases tardías de la infección observada en ambas variedades de soja puede deberse al mecanismo de retroalimentación positiva que regula la biosíntesis de JA (Sasaki et al., 2001; Wasternack, 2007), por lo que no descartaría que la biosíntesis de JA se encontrase diferencialmente activada antes de los 3 dpi en respuesta a la infección.

Las proteínas de la familia JAZ regulan la transcripción de los genes de respuesta a JA, inhibiendo la unión de factores de transcripción al ADN en ausencia de JA (Wager & Browse, 2012). La expresión de los genes *JAZ* es inducida por JA, regulando la activación de esta vía mediante una retroalimentación negativa (Grunewald et al., 2009; Moreno et al., 2013). Por otro lado, el sinergismo de JA/ET en la defensa a necrotrofos requiere que ERF1 (componente de la señalización de ET) actúe como integrador de ambas vías (Lorenzo et al., 2003); lo que a su vez requiere activar la señalización de ET. Una vez que ET se una a su receptor, éste interactúa con la proteína de membrana EIN2 (Wen et al., 2012) para desencadenar la cascada de señalización. Durante la infección con *M. phaseolina*, la inducción de *JAZ1* se verificó en RILs de yute resistente a este hongo luego de tres días de inoculación (Biswas et al., 2014), sin embargo no se identificaron genes de factores de transcripción que responden a ET asociados a este fenotipo. Así mismo, en respuesta a la infección por *M. phaseolina* varios genes que codifican a factores de transcripción de la familia JAZ y ERF se encontraron regulados positivamente en *A. thaliana* silvestre, entre las 24 y 48 horas luego de la inoculación con *M. phaseolina* (Schroeder et al., 2019). En el presente trabajo, a los 3 dpi, se observó la inducción no significativa de la expresión de *JAZ1* en infectados de ambas variedades de soja en estudio con respecto a los controles, la cual fue mayor en DT974290 (R) (**Figura 24A**). Sin embargo, a los 6 dpi se observó similares niveles de expresión entre controles e infectados de ambas variedades de *JAZ1* (**Figura 24B**). A pesar de su función como represor transcripcional de la vía del JA, debido a que los genes *JAZ*

son inducibles con JA se podría pensar que a los 3 dpi esta vía se encuentra más activa que a los 6 dpi.

Un aumento en la expresión de *ERF1* se observó en infectados de A4910 (S) (**Figura 27A**), para lo cual también se encontró inducida la expresión ACCO/ACO2 (biosíntesis de ET) (**Figura 26A**). No obstante, a los 6 dpi inducción de *ERF1* se verificó solo en infectados de DT974290 (R) (**Figura 27C**). Estos resultados podrían sugerir que la inducción de *ERF1* a los 6 dpi es necesario para la resistencia a *M. phaseolina*.

Mutaciones en el gen *EIN2* en *A. thaliana* y su ortólogo en *M. truncatula* mostraron que éstas fueron más susceptibles a otros hongos necrotróficos como *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*, respectivamente (Thomma et al., 1999; Varma Penmetsa et al., 2008), demostrando el papel de la señalización de ET en la defensa contra patógenos necrotróficos. Al igual que ACCO/ACO y *ERF1*; la expresión de *EIN2* se encontró inducida en infectados de la variedad susceptible y disminuida en estos ejemplares de la variedad resistente a los 3 dpi (**Figura 27B**), lo cual podría contribuir a la hipótesis de una activación temprana de la señalización de ET en A4910 (S), comparado con la variedad DT974290 (R), frente a la infección por *M. phaseolina*. A los 6 dpi, no se observó la inducción de *EIN2* en respuesta a la infección en ambas variedades (**Figura 27D**), aunque la expresión de *ERF1* se encontró aumentada en la variedad resistente en este punto. Como EIN2 requiere de la unión de ET a su receptor para ser activado, esta disminución puede deberse a que en este punto de la infección por *M. phaseolina* reduce significativamente biosíntesis de ET (**Figura 26B**).

Existen dos ramas principales en la vía de señalización de JA, una mediada por factores de transcripción MYC y otra mediada por ERF, ambas antagónicas entre sí. La rama MYC está controlada por los factores de transcripción de la familia MYC e induce genes marcadores como *VSP2* en respuesta a heridas y ataques de herbívoros (Fernández-Calvo et al., 2011; Lorenzo et al., 2004). Mientras que la rama ERF está regulada por los factores de transcripción de la familia APETALA2 (AP2)/ERF y activa genes de defensinas como *PDF1.2* en respuesta a ataques de

patógenos necrotróficos (Lorenzo et al., 2003; Pré et al., 2008), donde se verifica el sinergismo de las vías de JA y ET. En el presente trabajo, la expresión de *VSP2* se indujo ligeramente en infectados de DT974290 (R) y disminuyó en infectados de A4910 (S) a los 3 dpi (**Figura 25A**). En este punto fue sugerida la activación de ERF1 en los infectados de la variedad susceptible; además de observarse un aumento de la biosíntesis de JA (**Figura 23A**), y menor represión por JAZ1 (**Figura 24A**) por lo que la rama ERF podría estar activa y antagonizar la activación de *VSP2*; sin embargo, se debería analizar otros genes de esta vía para la confirmación. La inducción de *VSP2* en infectados de la variedad resistente a los 3 dpi, podría asociarse a una activación mediada directamente por JA, el cual no requiere de ET para su expresión (Lorenzo & Solano, 2005; Zhang et al., 2018). A los 6 dpi, disminuye la expresión de *VSP2* en infectados de ambas variedades (**Figura 25C**); que podría deberse a la baja actividad de la vía de JA (sugerida por el nivel de expresión de JAZ1 similar entre control e infectado) en ambas variedades y la activación de la rama ERF en la variedad resistente (**Figura 27C**).

Se ha propuesto a PR3 como un marcador de la defensa mediada por JA/ET y a PR5 por SA (Ali et al., 2017; Chandrashekar et al., 2018; Dinolfo et al., 2017; Narusaka et al., 2015; Jung et al., 2007). Los transcritos de *PR3* se encontraron diferencialmente inducidos en ejemplares RILs de yute resistente a *M. phaseolina* durante la infección por este patógeno (Biswas et al., 2014). Se ha informado que tras la infección por *M. phaseolina* en dos variedades de sorgo (*S. bicolor*); resistente y susceptible, los niveles de expresión de *PR3* en el cultivar resistente fueron significativamente más altos y de expresión más temprana (Sharma et al., 2014) este hecho sentó las bases para el desarrollo de plantas de yute transgénico resistentes a *M. phaseolina* mediante la introducción del gen *PR3* (Datta et al., 2018); esta evidencia demuestra el potencial rol de estas PRs en la resistencia hacia *M. phaseolina*. Los resultados obtenidos en soja demostraron una inducción significativa de *PR3* frente a la infección en la variedad A4910 (S) a los 3 dpi, no se observó inducción en DT974290 (R) para la misma condición (**Figura 25B**), hecho que se invierte en fases tardías de la infección por *M. phaseolina* que provocó un aumento significativo en variedad resistente; y no así en la susceptible (**Figura 25D**). Esto

podría suponer una respuesta mediada por JA/ET en fases tardías de la infección se encuentra asociada a la resistencia.

### 5.3.2 Señalización de SA en la defensa de la soja frente *M. phaseolina*

En ciertas especies como *M. truncatula* no se ha esclarecido el rol del SA en la defensa frente a *M. phaseolina*, ya que no se observó desarrollo de resistencia en ejemplares infectados luego de la aplicación exógena de SA (Gaige et al., 2010) y no se identificaron genes activados o inducidos de esta vía de señalización en respuesta a la infección (Mah et al., 2012). Por otra parte, genes de respuesta a SA se encontraron regulados a la alta durante la infección por *M. phaseolina* en RILs de yute con fenotipo resistente (Biswas et al., 2014), y los genes involucrados en la señalización del SA fueron inducidos en una variedad de soja frente a la infección por este patógeno (Marquez et al., 2018).

NPR1 es el receptor de SA y un componente esencial para la regulación de la expresión génica durante RSA (Wu et al., 2012). La infección por *M. phaseolina* induce significativamente la expresión de *NPR1* en A4910 (S) a los 3 dpi y no así en DT974290 (R) donde se observó una leve disminución no significativa con respecto al control (**Figura 28A**). A los 6 dpi, la expresión de *NPR1* en los infectados fue similar a la de su respectivo control (**Figura 28B**). Además, en ambos tiempos de estudio DT974290 (R) sin inocular expresó más *NPR1* que A4910 (S) (**Figura 28**) y esto podría ser una característica de la variedad que contribuiría a una respuesta eficiente de SA (Ali et al., 2017).

EDS1 es un componente de regulación de la defensa basal que promueve la acumulación de SA y controla la producción de SA para la amplificación de las señales de defensa, además de mediar el antagonismo de JA/ET y SA en la defensa (Rustérucci et al., 2001; Wiermer et al., 2005). Estudios previos han demostrado que la variedad de soja DT974290 exhibe mayor expresión de *EDS1* en raíces antes de ser enfrentado a *M. phaseolina* en comparación a los niveles observados en una variedad de susceptibilidad no caracterizada a *M. phaseolina*, y que *EDS1* constituye un componente de la resistencia hacia este patógeno (Lawaju et al., 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo no demuestran una inducción de *EDS1* frente a la

infección por *M. phaseolina*. A los 3 dpi, se observó una leve disminución del nivel de expresión en DT974290 (R) frente a la infección, además de un similar nivel de expresión en ambas variedades sin inocular. (**Figura 29A**). A los 6 dpi, una leve inducción del nivel de expresión *EDSI* se verificó en DT974290 (R) infectados con respecto al control, mientras que en A4910 (S) la expresión de *EDSI* fue similar en ambas condiciones (**Figura 29B**). Además, la expresión entre ejemplares sin inocular de ambas variedades no demuestra la diferencia descrita anteriormente, cabe señalar que la comparación descrita anteriormente fue realizada con una variedad distinta a A4910 (S) y se analizaron raíces, no así tallos.

La RSA es un mecanismo de defensa inducida capaz de conferir una protección duradera contra un amplio espectro de patógenos, que requiere la señalización de SA y concluye con la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) que presentan diversas actividades efectoras y así podrían contribuir a la resistencia (Métraux 2013). La expresión de la proteína PR1 ha sido utilizado por muchos como un marcador de la resistencia mediada por SA (Breen et al., 2017). Los hallazgos del presente trabajo demuestran un aumento significativo de la expresión de *PR1* a los 3 dpi en la variedad susceptible y no en la resistente, aunque se observó la inducción de este gen durante la infección en ambas variedades (**Figura 30A**). En fases tardías de la infección induce significativamente la expresión de *PR1* en ambas variedades (**Figura 30B**), sin observar una diferencia entre las variedades.

Se ha propuesto que hongos necrotróficos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* manipulan la señalización de SA para promover el desarrollo de su enfermedad en el tomate a través de la activación de NPR1, que suprime respuestas importantes para la resistencia a este tipo de patógeno (Rahman et al., 2012). Por lo tanto, la activación temprana y muy elevada de SA a través de NPR1 observada en la variedad susceptible frente a la infección podría contribuir a la susceptibilidad. La expresión de PR1 en fases tardías de la infección puede deberse a la implicancia de RSA, aunque también se ha observado que JA también es capaz de inducir la acumulación sistémica de PR1 en un mecanismo denominado resistencia sistémica inducida (RSI) (Repka et al., 2004). En un estudio previo, la inducción de PR1 se

observó en soja infectada con *M. phaseolina* entre las 24 y 72 horas luego de la inoculación (Marquez et al., 2018). Sin embargo, debido a que este estudio utilizó una sola variedad de soja, no es posible asociar con resistencia o susceptibilidad.

PR5 ha sido caracterizado como un marcador de respuesta a SA (Ali et al., 2017; Jung et al., 2007). La expresión de *PR5* se encontró diferencialmente inducida en ejemplares RILs de yute resistente a *M. phaseolina* en respuesta a la infección por este patógeno (Biswas et al. 2014). Además, la sobreexpresión de *PR5* de la planta del té (*Camellia sinensis*) *CsTLP* en papa (*Solanum tuberosum*) demostró el papel potencial de inducción de resistencia a *M. phaseolina* (Acharya et al., 2013) y un aumento concomitante y significativo de genes involucrados en la ruta de la biosíntesis de fenilpropanoides, ROS y la vía de respuesta de defensa general después de la infección (Acharya et al., 2013), lo cual sugiere que las *PR5* también son capaces de activar otras vías de defensa. Sin embargo, pese a que estudios previos señalaron la implicancia de *PR5* en defensa contra este patógeno, no se detectó expresión en ambas variedades de soja en los puntos de estudios del presente trabajo. Por lo tanto, la expresión de *PR5* durante la infección por *M. phaseolina* podría aumentar la resistencia a este patógeno.

### 5.3.3 Metabolismo secundario en la defensa de la soja frente a *M. phaseolina*

*PAL1* constituye la primera enzima implicada en la ruta biosintética de los fenilpropanoides, más adelante *CHI* y *FS* determinan la síntesis de flavonoides e isoflavonoides en la vía (Falcone et al., 2012). En soja, frente a la infección a los 3 dpi indujo más la expresión de *PAL1* en la variedad A4910 (S) (**Figura 31A**); para luego verificarse que la infección aumentó de manera significativa la expresión en ambas variedades a los 6 dpi (**Figura 31C**). Esto indica que la ruta de fenilpropanoide se activa en tiempos tardíos de la infección en la variedad resistente. Por otra parte, la expresión de *CHI* se indujo frente a la infección en la variedad susceptible y no en la resistente a los 3 dpi (**Figura 31B**), que luego disminuyó en fases tardías de la infección en ambas variedades (**Figura 31D**). No se verificó la expresión de *FS* en los dos puntos de estudio. Esto es contrario a lo observado en *M. truncatula* donde se verificó la regulación a la alta de genes implicados en los

primeros pasos del metabolismo de fenilpropanoides entre las cuales se encontraron *PAL* y *CHI* (Gaige et al., 2010). No obstante, el estudio de una variedad de soja frente a la infección por *M. phaseolina*, reveló el aumento de expresión de genes implicados en la síntesis de lignina, otra rama de la ruta fenilpropanoide (Marquez et al., 2018). Además en soja, se ha demostrado que la supresión de la vía de síntesis de flavonoides en el vegetal aumentaba la susceptibilidad hacia este patógeno lo cual se encontraba asociado a la disminución de gliceolina; fitoalexina de soja implicada en la defensa a múltiples patógenos (Hill et al. 2010). Por lo tanto, la gliceolina podría actuar como un componente importante en la defensa contra *M. phaseolina* (Lygin et al. 2013). Para clarificar la importancia de la gliceolina en la resistencia o la susceptibilidad de las variedades estudiadas, se debe analizar la cantidad de gliceolina producida y otros genes implicados en la biosíntesis de fenilpropanoides y flavonoides.

#### **5.3.4 Otras fitohormonas: Auxinas y ABA en la defensa de la soja frente *M. phaseolina***

Se ha sugerido que la susceptibilidad a *M. phaseolina* puede deberse en parte a la supresión de la respuesta de AUX en el huésped (Mah et al., 2012). En el presente estudio se analizó la expresión de los genes de dos factores de transcripciones represores de la vía de AUX: *IAA10* e *IAA30*. Se observó mayor inducción de *IAA30* comparado con *IAA10* en ambas variedades (**Figura 32**). Si bien a etapas tempranas *IAA30* se encuentra aumentado en infectados de ambas variedades (**Figura 32C**), a los 6 dpi vemos una inducción significativa solo en la variedad susceptible (**Figura 32D**), lo cual podría contribuir a su fenotipo. Sin embargo, en la variedad resistente los valores de expresión fueron similares entre el control y el infectado. Además, se ha reportado que tanto la aplicación exógena como el efecto de AUX de rizobacterias fue capaz de impartir resistencia frente a *M. phaseolina* en las especies ensayadas (Khare & Arora, 2010; Mah et al., 2012), por un probable mecanismo de promoción de agua y nutrientes por parte del vegetal (Patten and Glick 2002). Estas observaciones sugieren el rol de la señalización de AUX en la resistencia frente a *M. phaseolina*.

Por otro lado, aunque en los estudios de interacción planta-*M. phaseolina* no se aplican la sequía en las plantas infectadas, los transcritos de genes relacionados con la respuesta al ABA fueron aumentados durante el enfrentamiento a *M. phaseolina* en RILs de yute con fenotipo resistente a este patógeno (Biswas et al. 2014) y en un modelo de infección en soja (Marquez et al., 2018). Sin embargo, el rol de la vía del ABA no es muy claro en el desarrollo de la resistencia a este patógeno. ABF2 constituye uno de los componentes esenciales en la activación de la señalización de ABA (Kim et al., 2004). El patrón de expresión de *ABF2* en A4910 (S) frente a la infección verificó una inducción a los 3 dpi y una disminución significativa en fases tardías (**Figura 33**). Mientras que en DT974290 (R) se observó una leve disminución en los infectados para ambos puntos (**Figura 33**). *ADH1* es inducido por ABA en estrés biótico y abiótico (Shi et al., 2017). La expresión de este gen se disminuyó en fases tempranas de la infección en ambas variedades comparadas con la de sus respectivos controles, mientras que a los 6 dpi la expresión fue similar en ambas condiciones (**Figura 34**). Con respecto al otro gen inducido por ABA, *DHDN*, a los 3 dpi se indujo en mayor grado en la variedad resistente, y a los 6 dpi se disminuyó en ambas variedades, siendo esta disminución significativa para la susceptible (**Figura 34**). Se debe considerar que ABA es sensible al estrés abiótico y la expresión de los genes estudiados pudieron estar afectados por dichos factores en el punto de inoculación debido al corte en el tallo; no obstante, la supresión de la respuesta a ABA por *M. phaseolina* en A4910 (S) podría contribuir a la susceptibilidad.

### 5.3.5 *M. phaseolina* como un patógeno hemibiotrofo

El análisis de la infección por *M. phaseolina* en dos variedades de sésamo (*S. indicum*); resistente y susceptible a este patógeno sugirió que el mismo, considerado necrotrófico, presenta un comportamiento hemibiotrófico, caracterizada por una fase inicial biotrófica y una tardía necrotrófica, esta transición se observa en hongos hemibiotróficos típicos como *Colletotrichum sp.* (Wei et al. 2013). Por lo que la resistencia hacia *M. phaseolina* fue sugerida que se debe en gran parte de la capacidad del huésped de adaptar las respuestas de defensa acorde el a las fases del

patógeno durante la infección (Chowdhury et al., 2017), una respuesta temprana mediada principalmente por SA y posteriormente JA/ET.

En el presente estudio la infección por *M. phaseolina* en soja provocó una mayor activación de la señalización mediada por SA a los 3 dpi en A4910 (S) que en DT974290 (R) (**Figura 28A y 30A**). En fases tardías de la infección indujo significativamente la expresión de *PR1* (marcador de SA) en ambas variedades (**Figura 30B**) lo que podría sugerir el establecimiento de RSA; sin embargo, este mecanismo se caracteriza por el aumento de expresión de PRs, incluyendo a PR5; cuya expresión no fue observada en el presente estudio. Además, se debe evaluar órganos o tejidos (e.g. hojas) alejados del sitio de infección para confirmar la activación de este mecanismo. Contrariamente, en sésamo se verificó que la expresión de genes implicados en la activación de la vía de SA (*SiNPRI* y *SiEDSI*) aumentaba entre la fase biotrófica y la transición biotrófica-necrotrofica para luego disminuir en la fase tardía de la infección (fase necrotrofa), y los genes PRs *Thaumatine like protein (SiTLP)* y *Chitinase*; el primero equivalente a *PR5* mientras que el segundo aunque codifica a una quitinasa ésta no se encuentra relacionada a la familia PR3 en soja, aumentaron su expresión a medida que transcurría las fases de la infección (Chowdhury et al., 2017), con lo cual se supone la inducción de RSA. En general, la expresión de estos genes fue mayor en la variedad resistente de sésamo. Previamente se ha reportado la inducción de *PR1* en una variedad de soja entre las 24 y 72 horas luego de la inoculación con *M. phaseolina* (Marquez et al., 2018), lo que podía sugerir la activación de defensa temprana mediada por SA. No obstante, la metodología de inoculación no fue la misma que la aplicada en este trabajo, además de utilizarse una sola variedad de soja y los resultados fueron obtenidos a partir de raíces.

La biosíntesis JA se encontró inducida frente a la infección en ambos tiempos, tanto para la variedad resistente y susceptible (**Figura 23**) y la de ET se indujo a los 3 dpi en A4910 (S) (**Figura 26A**). A pesar de ello, los resultados del presente trabajo sugieren que la respuesta mediada por JA/ET se encontró inducida frente a la infección en DT974290 (R) en fases tardías de la infección y no en A4910 (S), mediante la observación en conjunto de la inducción de *ERF1* y *PR3* (**Figura**

**27C** y **25D**). Sin embargo, deben analizarse otros genes componentes de la señalización de la rama ERF. En sésamo, la variedad resistente fue capaz de expresar los genes de la vía del JA/ET a modo de acompañar al cambio de estilo de vida del hongo (de biotrófica hacia necrotrófica) (Chowdhury, Basu, and Kundu 2017). Los picos iniciales de *SiAOS* (gen de biosíntesis de JA) en etapas iniciales de la infección (fase biotrófica) en la variedad resistente permitieron a la planta regular rápidamente los genes posteriores en la ruta de JA, en tanto que la regulación al alza de *SiSAM* (gen de biosíntesis de etileno) durante la transición del estilo de vida del hongo indicó la activación de la vía de biosíntesis de JA-ET. Una mayor acumulación de transcritos de genes marcadores para la señalización de la rama ERF de JA (*SiPDF1.2*, *SiAP2*, *SiERF*) ocurrió en la etapa tardía de la infección (fase necrotrófica), mientras el gen *SiJAZ* (represor de la vía de JA) se comportó de manera opuesta (Chowdhury et al., 2017).

Además, la implicancia del metabolismo secundario se verificó en sésamo en donde la variedad resistente, los genes de la biosíntesis de flavonoides y de lignina fue constantemente mayor en la misma durante el proceso de infección (Chowdhury et al., 2017). De hecho, la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides se encontró diferencialmente incrementada en la variedad resistente en estados tardíos de la infección (fase necrotrofa). Sin embargo, en soja el estudio realizado no ha esclarecido el papel de los flavonoides frente a la infección por *M. phaseolina*, aunque no debe ser descartado.

Debido a que a los 3 dpi ya se observaron microesclerocios en el tallo (**Figura 20**), se debe analizar estadíos más tempranos para conocer si en estas condiciones experimentales el hongo utilizado en el presente trabajo demuestra un comportamiento hemibiotrófico. Aunque a los 6 dpi se confirmó la inducción de *PR3* y *ERF1* (indicando una probable activación de la vía del JA/ET) en la variedad resistente de soja, sería interesante analizar si la vía del SA está activa en esta variedad en el caso de que el hongo presente un estilo de vida hemibiotrófico.

## 6 CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el proceso de infección con *M. phaseolina* en las variedades de soja DT974290 y A4910; resistente y susceptible a dicho patógeno, utilizando dos métodos de inoculación. El método de inoculación por *cut-stem* reflejó mejor el fenotipo observado en el campo: menor extensión de la necrosis y un detenimiento temprano del avance de la lesión a causa de la infección en la variedad resistente. Se verificaron los signos de la infección a partir de tres días luego de la inoculación.

No se observó una relación entre el fenotipo resistente/susceptible y la biomasa fúngica, estimada mediante la relación entre la cantidad del ADN fúngico y la del vegetal, en los tallos infectados con *M. phaseolina*.

Mediante el análisis de expresión de los genes, se encontró que en la variedad susceptible la señalización de SA se activa en fases tempranas de la infección, una regulación positiva de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios principalmente en la fase temprana, así como la inducción de represores de la vía de AUX tanto en la fase temprana como la tardía. Mientras tanto, en la variedad resistente se observó una probable activación de la respuesta mediada por JA/ET en fases tardías de la infección.

Por lo tanto, la alta de expresión del gen *IAA30* en la fase tardía de la infección puede contribuir a la susceptibilidad a *M. phaseolina*. Aunque *PR1* fue inducido en la fase temprana solamente en la variedad susceptible, se desconoce su implicancia en el desarrollo de la susceptibilidad. Por otro lado, la alta expresión del gen *PR3* podría contribuir a la resistencia al patógeno. Adicionalmente, la mayor expresión basal de *EIN2* y *ACO2* también podría contribuir a la resistencia del huésped. Si bien los genes analizados han sido descritos como componentes de una vía de o respuesta a fitohormonas, éstos han sido estudiados en plantas modelo como

*Arabidopsis*, por lo que en soja se requiere estudios que permitan verificar el comportamiento de éstos ante la activación de una vía, como por ejemplo el tratamiento con fitohormonas. Los resultados de este trabajo servirían para dilucidar el mecanismo de defensa frente a este patógeno y así aplicar en la mejora de la soja para aumentar su resistencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El Rahman, Taha, Mohamed El Oirdi, Rocio Gonzalez-Lamothe, and Kamal Bouarab. 2012. "Necrotrophic Pathogens Use the Salicylic Acid Signaling Pathway to Promote Disease Development in Tomato." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(12): 1584–93.
- Acharya, Karan et al. 2013. "Overexpression of *Camellia Sinensis* Thaumatin-like Protein, CsTLP in Potato Confers Enhanced Resistance to *Macrophomina Phaseolina* and *Phytophthora Infestans* Infection." *Molecular Biotechnology* 54(2): 609–22.
- Agarwal, Parinita et al. 2013. "Pathogenesis-Related Gene, JcPR-10a from *Jatropha Curcas* Exhibit RNase and Antifungal Activity." *Molecular Biotechnology* 54(2): 412–25.
- Ahuja, Ishita, Ralph Kissen, and Atle M. Bones. 2012. "Phytoalexins in Defense against Pathogens." *Trends in Plant Science* 17(2): 73–90.
- Ali, Sajad, Zahoor Ahmad Mir, Anshika Tyagi, Javaid A. Bhat, et al. 2017. "Identification and Comparative Analysis of Brassica Juncea Pathogenesis-Related Genes in Response to Hormonal, Biotic and Abiotic Stresses." *Acta Physiologiae Plantarum* 39(12).
- Ali, Sajad, Zahoor A. Mir, Anshika Tyagi, Hailay Mehari, et al. 2017. "Overexpression of NPR1 in Brassica Juncea Confers Broad Spectrum Resistance to Fungal Pathogens." *Frontiers in Plant Science* 8(October): 1–16.
- Babu, Bandamaravuri Kishore et al. 2011. "Quantitative Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Plant and Human Pathogenic *Macrophomina Phaseolina* from Field and Environmental Samples." *Mycologia* 103(3): 466–73.
- Biswas, Chinmay, Piyali Dey, P. G. Karmakar, and Subrata Satpathy. 2014. "Next-Generation Sequencing and Micro RNAs Analysis Reveal SA/MeJA1/ABA Pathway Genes Mediated Systemic Acquired Resistance (SAR) and Its Master Regulation via Production of Phased, Trans-Acting siRNAs against Stem Rot Pathogen *Macrophomina Phaseolina* in A." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 87: 76–85.
- Breen, Susan et al. 2017. "Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1." *Trends in Plant Science* 22(10): 871–79.
- Castagnaro, Pedro Atilio. 2010. "3° Informe Proyecto Biotec Soja Sur: Aproximación Genómica Integrada En El MERCOSUR Para La Prospección de Genes Útiles Al Mejoramiento de La Soja Frente a Estrés Biótico y Abiótico."

- Chandrashekar, N., Sajad Ali, and Anita Grover. 2018. "Exploring Expression Patterns of PR-1, PR-2, PR-3, and PR-12 like Genes in *Arabidopsis Thaliana* upon *Alternaria Brassicae* Inoculation." *3 Biotech* 8(5): 0.
- Chang, C, and R Stadler. 2001. "Ethylene Hormone Receptor Action." *in Arabidopsis. Bioessays* 23: 619–27.
- Chowdhury, Supriyo, Arpita Basu, and Surekha Kundu. 2017. "Biotrophy-Necrotrophy Switch in Pathogen Evoke Differential Response in Resistant and Susceptible Sesame Involving Multiple Signaling Pathways at Different Phases." *Scientific Reports* 7(1): 1–17.
- Chung, Gyuhwa, and Ram J Singh. 2008. "Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach." *Critical Reviews in Plant Sciences* 27(5): 295–341.
- Claudino, Monaliza Rodrigues. 2013. "MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Macrophomina Phaseolina* EM MAMONEIRA VISANDO À SELEÇÃO DE GENÓTIPOS RESISTENTES." Universidade Estadual da Paraíba.
- Coser, Sara M. et al. 2017. "Genetic Architecture of Charcoal Rot (*Macrophomina Phaseolina*) Resistance in Soybean Revealed Using a Diverse Panel." *Frontiers in Plant Science* 8(September): 1–12.
- Crous, Pedro W et al. 2011. "Phylogenetic Lineages in the Botryospha ... Phylogenetic Lineages in the Botryosphaeriaceae Phylogenetic Lineages in the Botryospha ..." (1915): 1–36.
- Dabi, Mitali et al. 2016. "Improved Shoot Regeneration, Salinity Tolerance and Reduced Fungal Susceptibility in Transgenic Tobacco Constitutively Expressing PR-10a Gene." *Frontiers in Plant Science* 7(February): 1–20.
- Datta, Karabi et al. 2018. "The Development of *Macrophomina Phaseolina* (Fungus) Resistant and Glufosinate (Herbicide) Tolerant Transgenic Jute." *Frontiers in Plant Science* 9(July): 1–19.
- Delaney, Terrence P. et al. 1994. "A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance." 266(November): 1247–50.
- Dinolfo, María Inés, Eliana Castañares, and Sebastián A. Stenglein. 2017. "Resistance of *Fusarium Poae* in *Arabidopsis* Leaves Requires Mainly Functional JA and ET Signaling Pathways." *Fungal Biology* 121(10): 841–48.
- Dirección de Censos y Estadísticas Agropecuarias. 2020. "Síntesis Estadísticas - Año Agrícola 2019/2020."
- Dixon, Richard A. et al. 2002. "The Phenylpropanoid Pathway and Plant Defence - A Genomics Perspective." *Molecular Plant Pathology* 3(5): 371–90.

- Falcone Ferreyra, María L., Sebastián P. Rius, and Paula Casati. 2012. "Flavonoids: Biosynthesis, Biological Functions, and Biotechnological Applications." *Frontiers in Plant Science* 3(SEP): 1–16.
- Fernández-Calvo, Patricia et al. 2011. "The Arabidopsis BHLH Transcription Factors MYC3 and MYC4 Are Targets of JAZ Repressors and Act Additively with MYC2 in the Activation of Jasmonate Responses." *Plant Cell* 23(2): 701–15.
- Ferrari, Simone, Julia M. Plotnikova, Giulia De Lorenzo, and Frederick M. Ausubel. 2003. "Arabidopsis Local Resistance to Botrytis Cinerea Involves Salicylic Acid and Camalexin and Requires EDS4 and PAD2, but Not SID2, EDS5 or PAD4." *The Plant Journal* 35(2): 193–205.
- Gaige, Andres Reyes, Allan Ayella, and Bin Shuai. 2010. "Methyl Jasmonate and Ethylene Induce Partial Resistance in Medicago Truncatula against the Charcoal Rot Pathogen Macrophomina Phaseolina." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74(5–6): 412–18.
- Glazebrook, Jane. 2005. "Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens." *Annual Review of Phytopathology* 43(1): 205–27.
- Grunewald, Wim et al. 2009. "Expression of the Arabidopsis Jasmonate Signalling Repressor JAZ1/TIFY10A Is Stimulated by Auxin." *EMBO Reports* 10(8): 923–28.
- Gupta, Girish K., Sushil K. Sharma, and Rajkumar Ramteke. 2012. "Biology, Epidemiology and Management of the Pathogenic Fungus Macrophomina Phaseolina (Tassi) Goid with Special Reference to Charcoal Rot of Soybean (Glycine Max (L.) Merrill)." *Journal of Phytopathology* 160(4): 167–80.
- Hill, Curtis B. et al. 2010. "Response of Soybean Pathogens to Glyceollin." *Phytopathology* 100(9): 897–903.
- Jones, Jonathan D.G., and Dangl. Jeffery L. 2006. "The Plant Immune System." *Nature* 444: 323–29.
- Jung, Choonkyun et al. 2007. "Microarray-Based Screening of Jasmonate-Responsive Genes in Arabidopsis Thaliana." *Plant Cell Reports* 26(7): 1053–63.
- Katsir, L. et al. 2008. "COI1 Is a Critical Component of a Receptor for Jasmonate and the Bacterial Virulence Factor Coronatine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(19): 7100–7105.
- Kaur, Surinder et al. 2012. "Emerging Phytopathogen Macrophomina Phaseolina: Biology, Economic Importance and Current Diagnostic Trends." *Critical Reviews in Microbiology* 38(2): 136–51.

- Kazan, Kemal, and Rebecca Lyons. 2014. "Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors." 26(June): 2285–2309.
- Kazan, Kemal, and John M. Manners. 2009. "Linking Development to Defense: Auxin in Plant-Pathogen Interactions." *Trends in Plant Science* 14(7): 373–82.
- Khare, Ekta, and Naveen Kumar Arora. 2010. "Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* in Suppression of Charcoal Rot Disease of Chickpea." *Current Microbiology* 61(1): 64–68.
- Kim, Sunmi et al. 2004. "ABF2, an ABRE-Binding BZIP Factor, Is an Essential Component of Glucose Signaling and Its Overexpression Affects Multiple Stress Tolerance." *Plant Journal* 40(1): 75–87.
- Koike, Steven T., Krishna V. Subbarao, R. Michael Davis, and Thomas A. Turini. 2003. *Vegetable Diseases Caused by Soilborne Pathogens - Google Libros*. California: University of California.
- Laluk, Kristin, and Tesfaye Mengiste. 2010. "Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion?" *The Arabidopsis Book* 8(8): e0136.
- Lawaju, Bisho R., Kathy S. Lawrence, Gary W. Lawrence, and Vincent P. Klink. 2018. "Harpin-Inducible Defense Signaling Components Impair Infection by the Ascomycete *Macrophomina Phaseolina*." *Plant Physiology and Biochemistry* 129(April): 331–48.
- Lewis, D. H. 1973. "Concepts in Fungal Nutrition and the Origin of Biotrophy." *Biological Reviews* 48(2): 261–78.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25(4): 402–8.
- Lorenzo, O, JM Chico, JJ Sánchez-Serran, and R Solano. 2004. "JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis Author ( s ): Oscar Lorenzo , Jose M . Chico , Jose J . Sánchez-Serrano and Roberto Solano Published." *Plant Cell* 16(July): 1938–50.
- Lorenzo, Oscar, Raquel Piqueras, Jose J. Sánchez-Serrano, and Roberto Solano. 2003. "ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense." *Plant Cell* 15(1): 165–78.
- Lorenzo, Oscar, and Roberto Solano. 2005. "Molecular Players Regulating the Jasmonate Signalling Network." *Current Opinion in Plant Biology* 8(5): 532–40.

- Lygin, Anatoliy V et al. 2013. “Glyceollin Is an Important Component of Soybean Plant Defense Against *Phytophthora Sojae* and *Macrophomina Phaseolina*.” *Phytopathology* 103: 984–94.
- Mah, Kar Men et al. 2012a. “Gene Expression pro Fi Ling of *Macrophomina Phaseolina* Infected *Medicago Truncatula* Roots Reveals a Role for Auxin in Plant Tolerance against the Charcoal Rot Pathogen.” *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 21–30.
- Manitoba Pulse & Soybean Growers. “Soybean Plant Development Guide.” [https://www.manitobapulse.ca/wp-content/uploads/2019/03/Soybean-Plant-Development\\_June-2018\\_WR\\_2.jpg](https://www.manitobapulse.ca/wp-content/uploads/2019/03/Soybean-Plant-Development_June-2018_WR_2.jpg) (December 9, 2020).
- Marquez, Nathalie et al. 2018a. “Transcriptional Changes in Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Soybean Plants upon Infection with the Fungal Pathogen *Macrophomina Phaseolina*.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31(8): 842–55.
- Mauch-Mani, Brigitte, and Felix Mauch. 2005. “The Role of Abscisic Acid in Plant-Pathogen Interactions.” *Current Opinion in Plant Biology* 8(4): 409–14.
- Mengistu, Alemu, Jeffery D. Ray, James R. Smith, and Robert L. Paris. 2007. “Charcoal Rot Disease Assessment of Soybean Genotypes Using a Colony-Forming Unit Index.” *Crop Science* 47(6): 2453–61.
- Métraux, J. P. 2013. “Systemic Acquired Resistance.” *Brenner’s Encyclopedia of Genetics: Second Edition*: 627–29.
- Mihail, J. D., and S. J. Taylor. 2008. “Interpreting Variability among Isolates of *Macrophomina Phaseolina* in Pathogenicity, Pycnidium Production, and Chlorate Utilization .” *Canadian Journal of Botany* 73(10): 1596–1603.
- Miyakawa, Takuya, and Masaru Tanokura. 2017. “Structural Basis for the Regulation of Phytohormone Receptors.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 81(7): 1261–73.
- Moreno, Javier E. et al. 2013. “Negative Feedback Control of Jasmonate Signaling by an Alternative Splice Variant of JAZ10.” *Plant Physiology* 162(2): 1006–17.
- Murray, M. G., and W. F. Thompson. 1980. “Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA.” *Nucleic Acids Research* 8(19): 4321–26.
- Narusaka, Mari et al. 2015. “Yeast Cell Wall Extract Induces Disease Resistance against Bacterial and Fungal Pathogens in *Arabidopsis Thaliana* and Brassica Crop.” *PLoS ONE* 10(1): 1–14.

- Naseem, Muhammad, Martin Kaltdorf, and Thomas Dandekar. 2015. "The Nexus between Growth and Defence Signalling: Auxin and Cytokinin Modulate Plant Immune Response Pathways." *Journal of Experimental Botany* 66(16): 4885–96.
- Orrego-Fuente, Aida. 2009. *Macrophomina Phaseolina Causante de La Pudrición Carbonosa Del Tallo: FCA-UNA/INBIO*. 1st ed. Alamo.
- Paris, R. L., Mengistu, A., Tyler, J., and Smith, J. 2006. "Registration of Soybean 483 Germplasm Line DT 97–4290 with Moderate Resistance to Charcoal Rot." : *Crop Sci.* 46:2324-2325.
- Patten, Cheryl L., and Bernard R. Glick. 2002. "Role of Pseudomonas Putida Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System." *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 3795–3801.
- Pawlowski, M. L., Hill C. B., and Hartman G. L. 2015. "Resistance to Charcoal Rot 486 Identified in Ancestral Soybean Germplasm." : *Crop Sci.* 55:1230-1235.
- Pré, Martial et al. 2008. "The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense." *Plant Physiology* 147(3): 1347–57.
- Repka, V., I. Fischerová, and K. Šilhárová. 2004. "Methyl Jasmonate Is a Potent Elicitor of Multiple Defense Responses in Grapevine Leaves and Cell-Suspension Cultures." *Biologia Plantarum* 48(2): 273–83.
- Reznikov, Sebastian et al. 2018. "Soybean - Macrophomina Phaseolina Specific Interactions and Identification of a Novel Source of Resistance." *Phytopathology* 109(1): PHYTO-08-17-0287-R.
- Rustérucci, C. et al. 2001. "The Disease Resistance Signaling Components EDS1 and PAD4 Are Essential Regulators of the Cell Death Pathway Controlled by LSD1 in Arabidopsis." *Plant Cell* 13(10): 2211–24.
- Sasaki, Yuko et al. 2001. "Monitoring of Methyl Jasmonate-Responsive Genes in Arabidopsis by CDNA Macroarray: Self-Activation of Jasmonic Acid Biosynthesis and Crosstalk with Other Phytohormone Signaling Pathways." *DNA Research* 8(4): 153–61.
- Schäfer, Holger, and Michael Wink. 2009. "Medicinally Important Secondary Metabolites in Recombinant Microorganisms or Plants: Progress in Alkaloid Biosynthesis." *Biotechnology Journal* 4(12): 1684–1703.
- Schenk, Peer M et al. 2000. "Coordinated Plant Defense Responses in Arabidopsis Revealed by Microarray Analysis." *Proc Natl Acad Sci USA* 97(21): 11655–60.
- Schroeder, Mercedes M. et al. 2019. "A Novel Arabidopsis Pathosystem Reveals

- Cooperation of Multiple Hormonal Response-Pathways in Host Resistance against the Global Crop Destroyer *Macrophomina Phaseolina*.” *Scientific Reports* 9(1): 1–14.
- Sharma, Isha, Nilima Kumari, and Vinay Sharma. 2014. “Defense Gene Expression in Sorghum Bicolor against *Macrophomina Phaseolina* in Leaves and Roots of Susceptible and Resistant Cultivars.” *Journal of Plant Interactions* 9(1): 315–23.
- Shi, Haitao et al. 2017. “Alcohol Dehydrogenase 1 (ADH1) Confers Both Abiotic and Biotic Stress Resistance in *Arabidopsis*.” *Plant Science* 262: 24–31.
- Shinozaki, Kazuo, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, and Motoaki Seki. 2003. “Regulatory Network of Gene Expression in the Drought and Cold Stress Responses.” *Current Opinion in Plant Biology* 6(5): 410–17.
- Thomma, Bart P.H.J., Kristel Eggermont, Koenraad F.M.J. Tierens, and Willem F. Broekaert. 1999. “Requirement of Functional Ethylene-Insensitive 2 Gene for Efficient Resistance of *Arabidopsis* to Infection by *Botrytis Cinerea*.” *Plant Physiology* 121(4): 1093–1101.
- Trakunsukharat, P, and P Songsang. 2011. “Charcoal Rot (*Macrophomina Phaseolina*).”
- Twizeyimana, M et al. 2012. “A Cut-Stem Inoculation Technique to Evaluate Soybean for Resistance to *Macrophomina Phaseolina*.” 96(8): 1210–15.
- United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. 2020a. “Oilseeds: World Markets and Trade.”
- United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. 2020b. “Soybeans & Oil Crops.” <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/> (April 25, 2020).
- VanEtten, H. D., J. W. Mansfield, J. A. Bailey, and E. E. Farmer. 1994. “Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus ‘Phytoanticipins.’” *The Plant Cell* (September): 1191–92.
- Varma Penmetsa, R. et al. 2008. “The *Medicago Truncatula* Ortholog of *Arabidopsis* EIN2, Sickle, Is a Negative Regulator of Symbiotic and Pathogenic Microbial Associations.” *Plant Journal* 55(4): 580–95.
- Wager, Amanda, and John Browse. 2012. “Social Network: JAZ Protein Interactions Expand Our Knowledge of Jasmonate Signaling.” *Frontiers in Plant Science* 3(MAR): 1–11.
- Wally, Owen, Jayaraman Jayaraj, and Zamir K. Punja. 2009. “Broad-Spectrum Disease Resistance to Necrotrophic and Biotrophic Pathogens in Transgenic

- Carrots (*Daucus Carota* L.) Expressing an Arabidopsis NPR1 Gene.” *Planta* 231(1): 131–41.
- Wasternack, C. 2007. “Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development.” *Annals of Botany* 100(4): 681–97.
- Wei, Yangdou et al. 2013. “Identification of Lens Culinaris Defense Genes Responsive to the Anthracnose Pathogen *Colletotrichum Truncatum*.” *BMC Genetics* 14(1): 31.
- Wen, Xing et al. 2012. “Activation of Ethylene Signaling Is Mediated by Nuclear Translocation of the Cleaved EIN2 Carboxyl Terminus.” *Cell Research* 22(11): 1613–16.
- Wiermer, Marcel, Bart J. Feys, and Jane E. Parker. 2005. “Plant Immunity: The EDS1 Regulatory Node.” *Current Opinion in Plant Biology* 8(4): 383–89.
- Wrather, A et al. 2010. “Effect of Diseases on Soybean Yield in the Top Eight Producing Countries in 2006. Online.”
- Wu, Yue et al. 2012. “The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid.” *Cell Reports* 1(6): 639–47.
- Zhang, Wei et al. 2018. “Different Pathogen Defense Strategies in Arabidopsis: More than Pathogen Recognition.” *Cells* 7(12): 252.