



TÍTULO

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES
DURANTE EL DESARROLLO
DEL SÍNDROME DE MUERTE SÚBITA.
INTERACCIÓN SOJA
(GLYCINE MAX (L.)MER) / FUSARIUM VIRGULIFORME**

AUTORA

María Lorena Giachero

Directora
Curso

©
©

Esta edición electrónica ha sido realizada en 2012

Daniel Ducasse

Programa Interuniversitario de Doctorado / Máster en Biotecnología

María Lorena Giachero

Para esta edición, la Universidad Internacional de Andalucía



Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciadore (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
 - **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
 - **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
-
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
 - *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
 - *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCÍA SEDE IBEROAMERICANA SANTA MARÍA DE LA RÁBIDA



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DURANTE EL
DESARROLLO DEL SÍNDROME DE MUERTE SÚBITA. INTERACCIÓN
SOJA (*GLYCINE MAX (L.) MERR*)/*FUSARIUM VIRGULIFORME*.**

Requisito para la obtención del título

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGIA

Autor:

Microbióloga María Lorena Giachero

Director:

Dr. Daniel Ducasse

Realizado en:

**INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA - INSTITUTO DE
FITOPATOLOGÍA Y FISIOLOGÍA (INTA-IFFIVE)
CÓRDOBA – ARGENTINA**

2010

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Gladys y Oscar, por estar siempre, escuchándome y apoyándome en todo.

A mis hermanos, Emi, Anto, Sole y Seba, por ser incondicionales.

A mi director, Daniel Ducasse, por su confianza y dedicación.

Al profesor Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo y a todo su grupo de laboratorio, por su colaboración y confianza.

A Marina por tantos momentos compartidos, y por sus valiosos aportes en la realización de esta tesis.

A Naty, Vero, Mariela, Gastón, Nathalie, Sandra, Vani, Analía, Fer, Cin, Tiki, Vale, Beti, Evi, por los buenos momentos compartidos.

A Evi y Tiki por ayudarme con “los detalles” que fueron surgiendo durante la escritura de esta tesis. Gracias chicos!!

A Vanesa Calleri, por escucharme y aconsejarme.

A mis compañeros y profesores del Master, por los días compartidos en La Rábida, no los voy a olvidar nunca.

A la gente linda de La Rábida, por tratarnos tan bien y hacernos sentir como en casa.

A Lolita

Por el tiempo compartido

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	15
CULTIVO DE SOJA.....	15
<i>Taxonomía.....</i>	<i>15</i>
<i>Distribución geográfica</i>	<i>16</i>
<i>Condiciones de cultivo.....</i>	<i>20</i>
LA MUERTE SÚBITA, UN SÍNDROME LIMITANTE EN EL CULTIVO DE SOJA.....	22
<i>Agente etiológico</i>	<i>22</i>
<i>Síntomas y signos de la enfermedad.....</i>	<i>23</i>
<i>Condiciones favorables para la ocurrencia de la enfermedad.....</i>	<i>26</i>
<i>Pérdidas.....</i>	<i>28</i>
MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS.....	29
<i>Resistencia mediada por genes R.....</i>	<i>33</i>
<i>Nutrición de los patógenos y su relación con el mecanismo de defensa vegetal.....</i>	<i>36</i>
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42
MATERIAL VEGETAL	42
MATERIAL FUNGICO	42
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
EXTRACCIÓN DE RNA.....	44
POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS A PARTIR DE ADNc (ADNc-AFLP)	45
<i>PCR reverso (RT-PCR) Síntesis de ADN copia usando ARN total</i>	<i>46</i>
<i>Digestión y Ligación de Adaptadores</i>	<i>47</i>

<i>Pre-amplificación y amplificación selectiva</i>	48
<i>Geles de poliacrilamida</i>	49
PCR EN TIEMPO REAL	50
RACE (RÁPIDA AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS DE ADNc).....	51
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA SECUENCIAR.....	52
CLONADO DE SECUENCIAS	52
ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	54
RESULTADOS	55
TOMA DE MUESTRA	55
EXTRACCIÓN DE RNA.....	57
POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS A PARTIR DE ADNc (ADNc-AFLP)	58
<i>PCR reverso (RT-PCR) Síntesis de ADN copia usando ARN total</i>	58
ANÁLISIS DE GELES DE POLIACRILAMIDA.....	59
DISEÑO DE LOS CEBADORES PARA VALIDACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL FRAGMENTO 67	60
NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DEL FRAGMENTO 67	61
RACE (RÁPIDA AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS DE ADNc).....	64
CLONADO DEL FRAGMENTO.....	65
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA SECUENCIA 67	66
DISCUSIÓN	71
BIBLIOGRAFÍA	78

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA: 1 PRINCIPALES PAÍSES EXPORTADORES DE SOJA. FUENTE: USDA AGRICULTURAL BASELINE PROJECTIONS TO 2012, FEBRUARY 2003. ECONOMIC RESEARCH SERVICE, USDA.....	17
---	----

FIGURA: 2 DISPERSIÓN GEOGRÁFICA DEL CULTIVO EN FUNCIÓN DEL ÁREA SEMBRADA PROMEDIO DE LAS ÚLTIMAS CAMPAÑAS. FUENTE: DIRECCIÓN DE COORDINACIÓN DE DELEGACIONES- ESTIMACIONES AGRÍCOLAS- SAGPYA/CNA 2002.....	18
FIGURA: 3 PORCENTAJE DE LA PRODUCCIÓN TOTAL POR PROVINCIA (DATOS PROMEDIO DEL ÚLTIMO QUINQUENIO). FUENTE: DIRECCIÓN DE COORDINACIÓN DE DELEGACIONES- ESTIMACIONES AGRÍCOLAS- SAGPYA/CNA 2002.....	19
FIGURA: 4 SÍNTOMAS FOLIARES DE CLOROSIS Y NECROSIS INTERNERVALES CAUSADOS POR EL SÍNDROME DE MUERTE SÚBITA DE LA SOJA.....	24
FIGURA: 5 CORTE LONGITUDINAL DE BASE DE TALLO Y RAÍZ QUE MUESTRA DECOLORACIÓN VASCULAR CAUSADA POR EL SMS DE LA SOJA.	25
FIGURA: 6 PRINCIPALES SIGNOS DEL AGENTE CAUSAL DEL SÍNDROME DE LA MUERTE SÚBITA DE LA SOJA SOBRE LA RAÍZ PRINCIPAL, ESPORULACIÓN COLOR AZUL FORMADA POR LA PRESENCIA DE MACROCONIDIOS.....	25
FIGURA: 7 CAMPO DE SOJA CON SÍNTOMAS CLAROS DEL SÍNDROME DE MUERTE SÚBITA. FUENTE: IMAGEN TOMADA DEL ARTÍCULO DE <i>PLANT HEALTH PROGRESS: FOLIAR SYMPTOM EXPRESSION IN ASSOCIATION WITH EARLY INFECTION AND XYLEM COLONIZATION BY FUSARIUM VIRGULIFORME (FORMERLY F. SOLANI F. SP. GLYCINES), THE CAUSAL AGENT OF SOYBEAN SUDDEN DEATH SYNDROME.</i>	27
FIGURA: 8 MECANISMOS DE DEFENSA ACTIVADOS POR EL PATÓGENO. EL ESQUEMA MUESTRA LAS REACCIONES DE DEFENSA QUE OCURREN EN LAS CÉLULAS INFECTADAS (REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD, HR), EN EL TEJIDO VECINO AL SITIO DE INFECCIÓN (RESISTENCIA LOCAL ADQUIRIDA, LAR) Y EN LOS TEJIDOS DISTANTES AL SITIO DE INFECCIÓN (RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA, SAR).....	33
FIGURA: 9 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ACTIVACIÓN DE RESPUESTAS A PATÓGENOS Y HERIDA EN <i>ARABIDOPSIS</i> DEPENDIENTES DE AtMYC2 Y ERF1. DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS, COMO LA HERIDA (MECÁNICA O BIÓTICA) O LA INFECCIÓN POR PATÓGENOS NECROTROFOS, INDUCEN LA SÍNTESIS Y POSTERIOR ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS DE ET Y JA. EL JA POR SÍ SOLO INDUCE LA EXPRESIÓN DE AtMYC2 QUE ES EL RESPONSABLE DE LA ACTIVACIÓN DE GENES DE RESPUESTA A HERIDA Y DE LA REPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA A PATÓGENOS. POR OTRA PARTE, LA COOPERACIÓN DE LAS SEÑALIZACIONES DE ET Y JA A TRAVÉS DE LA INDUCCIÓN	

TRANSCRIPCIONAL DE ERF1 DA LUGAR A LA ACTIVACIÓN DE GENES DE RESPUESTA A PATÓGENOS Y A LA REPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA A HERIDA (LORENZO, <i>ET AL.</i> , 2003, LORENZO, <i>ET AL.</i> , 2004)	38
FIGURA: 10 SISTEMA EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> . PLANTA DE SOJA CRECIENDO EN MEDIO HOAGLAND GELIFICADO CON PHYTAGEL™ (SIGMA). LA FIGURA MUESTRA EL SITIO DE INOCULACIÓN DEL HONGO PATÓGENO (<i>Fv</i>) Y LAS ZONAS DE MUESTREO ELEGIDAS. SE TOMARON MUESTRAS DE RAÍZ DE UNA ZONA ADYACENTE Y DE UNA ZONA LEJANA AL SITIO DE INFECCIÓN.	44
FIGURA: 11 EL MAPA MUESTRA LAS CARACTERÍSTICAS DE LA PCR® 4-TOPO® Y LA SECUENCIA QUE RODEA EL SITIO® TOPO CLONING. SE PUEDEN OBSERVAR LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN DE LA ENZIMA <i>ECORI</i>	54
FIGURA: 12 EL CIRCULO INDICA LA ZONA EN LA QUE EL HONGO PATÓGENO (<i>FUSARIUM VIRGULIFORME</i>) ENTRA EN CONTACTO CON LAS RAÍCES DE SOJA. A ESTE MOMENTO SE LO CONSIDERÓ COMO TIEMPO 1. SE TOMARON MUESTRAS DE RAÍCES ADYACENTES Y LEJANAS AL SITIO DE INFECCIÓN.	55
FIGURA: 13 LA FIGURA MUESTRA AL HONGO PATÓGENO (<i>FUSARIUM VIRGULIFORME</i>) LUEGO DE 48 HS DE HABER ENTRADO EN CONTACTO CON LAS RAÍCES DE SOJA. A ESTE MOMENTO SE LO CONSIDERÓ COMO TIEMPO 2. SE TOMARON MUESTRAS DE RAÍCES ADYACENTES Y LEJANAS AL SITIO DE INFECCIÓN.	56
FIGURA: 14 MUESTRAS DE ARN DE RAÍCES CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> EN UN GEL DESNATURALIZANTE DE AGAROSA 1.2%	57
FIGURA: 15 GEL DE AGAROSA 1% CONFIRMANDO LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>CAT</i> COMO COMPROBACIÓN DE LA REACCIÓN RT-PCR. (+): CONTROL POSITIVO, KN: KANAMICINA, POSITIVO RT, 1-10: MUESTRAS PROBLEMA, -RT: REACCIÓN NEGATIVA RT, -PCR: NEGATIVO. LA FLECHA SEÑALA LAS BANDAS GENERADAS, CUYO TAMAÑO ES DE 427PB.	58
FIGURA: 16 GEL DE POLIACRILAMIDA EN DONDE SE MUESTRAN 4 COMBINACIONES DE CEBADORES ESPECÍFICOS. LA FIGURA AMPLIADA MUESTRA EN DETALLE Y A MODO DE EJEMPLO, UN POLIMORFISMO DIFERENCIAL ENCONTRADO, DONDE (-): NEGATIVO; C: CONTROL 1A: RAÍZ ADYACENTE INOCULADA CON <i>Fv</i> TIEMPO UNO; 1L: RAÍZ LEJANA INOCULADA CON <i>Fv</i> TIEMPO UNO; 2A: RAÍZ ADYACENTE INOCULADA CON <i>Fv</i> TIEMPO DOS; 2 L: RAÍZ LEJANA INOCULADA CON <i>Fv</i> TIEMPO DOS.	59

FIGURA: 17 EL GRÁFICO REPRESENTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA PARA EL GEN 67, EN EL MOMENTO QUE EL HONGO ENTRA EN CONTACTO CON LA RAÍZ (TIEMPO 1). RA Fv T1: RAÍZ ADYACENTE, INOCULADO CON <i>FUSARIUM VIRGULIFORME</i> , TIEMPO 1. RL Fv T1: RAÍZ LEJANA AL SITIO DE INFECCIÓN, INOCULADA CON Fv, TIEMPO 1.	62
FIGURA: 18 EL GRÁFICO REPRESENTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA PARA EL GEN 67, A LAS 48 HORAS POST INFECCIÓN (TIEMPO 2). RA Fv T2: RAÍZ ADYACENTE, INOCULADO CON <i>FUSARIUM VIRGULIFORME</i> , TIEMPO 2. RL Fv T2: RAÍZ LEJANA AL SITIO DE INFECCIÓN, INOCULADA CON Fv, TIEMPO 2.	63
FIGURA: 19 GEL DE AGAROSA 2%. 1: RAÍZ ADYACENTE INOCULADA CON Fv TIEMPO 1 (RA Fv T1), 2: RAÍZ ADYACENTE INOCULADA CON Fv TIEMPO 2 (RA Fv T2), 3: RAÍZ LEJANA INOCULADA CON Fv TIEMPO 1 (RL Fv T1) Y 4: RAÍZ LEJANA INOCULADA CON Fv TIEMPO 2 (RL Fv T2). LA FLECHA INDICA EL TAMAÑO DEL AMPLICÓN.	64
FIGURA: 20 GEL DE AGAROSA 2%. LA FLECHA MUESTRA LA BANDA AMPLIFICADA A PARTIR DE LOS CEBADORES COLA 5' Y 67R, LA CUAL MUESTRA UN TAMAÑO APROXIMADO DE 1400PB. ..	65
FIGURA: 21 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LA SECUENCIA CONSENSO 67 Y LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN EL GENBANK.	68
FIGURA: 22 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CORRESPONDIENTES A LA SECUENCIA 67 Y LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA CORRESPONDIENTE AL ORF 1.	69
FIGURA: 23 GRÁFICA DE SIMILITUD CON LA SUPERFAMILIA UDPG_MGDP_DH [cl03053] Y AL MULTIDOMINIO UDP-GLUCOSE 6-DEHYDROGENASE (PLN02353), OBTENIDOS USANDO BLASTP.	70

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA: 1 CEBADORES ESPECÍFICOS PARA CAT.	47
TABLA: 2 JUEGOS DE ADAPTADORES ESPECÍFICOS UTILIZADOS PARA CADA ENZIMA DE RESTRICCIÓN.	48
TABLA: 3 SECUENCIAS DE CEBADORES ESPECÍFICOS DISEÑADOS PARA LLEVAR VALIDAR LOS RESULTADOS POR PCR EN TIEMPO REAL.	50

TABLA: 4 CEBADORES ESPECÍFICOS UTILIZADOS PARA LA TÉCNICA RACE.....	51
TABLA: 5 CEBADORES M13 ESPECÍFICOS PARA AMPLIFICAR TRANSFORMANTES POSITIVOS POR PCR.	53
TABLA: 6 SECUENCIA CONSENSO DEL FRAGMENTO 67. EN ROJO PUEDEN OBSERVARSE LOS SITIOS DE UNIÓN DE LOS CEBADORES ESPECÍFICOS DISEÑADOS PARA VALIDAR EL RESULTADO POR PCR EN TIEMPO REAL.	60
TABLA: 7 LA TABLA MUESTRA LAS CONCENTRACIONES RELATIVAS PARA CADA TRATAMIENTO Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVOS AL CONTROL (MEDIDOS COMO PORCENTAJE).....	62
TABLA: 8 SECUENCIA CONSENSO OBTENIDA PARA EL GEN 67.....	66
TABLA: 9 SECUENCIAS DEL GENBANK CON LAS CUALES EL CONSENSO 67 PRESENTÓ SIMILITUD, SEGÚN EL PROGRAMA BLASTN.	67
TABLA: 10 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA QUE CORRESPONDE AL MARCO DE LECTURA ABIERTO USADO PARA COMPARAR CON LA BASE DE DATOS DE PROTEÍNAS DEL NCBI.	70

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario.

ADNc-AFLP: del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism a partir de ADNc (Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados a partir de ADNc).

ARN: Ácido Ribonucleico.

Avr: gen de avirulencia.

BLAST: del inglés Basic Local Alignment Search Tool.

CNA: Censo Nacional Agropecuario.

EcoRI: Enzimas de restricción de corte raro.

ET: Etileno.

Fv: *Fusarium virguliforme*

GEA: Guía Estratégica para el Agro.

Gen R: gen de resistencia.

GPx: Glutation Peroxidasa.

GST: Glutation-S-Transferasa.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno.

HindIII: Enzimas de restricción de corte raro.

HR: respuesta de hipersensibilidad.

JA: Ácido Jasmónico.

LAR: Resistencia Local Adquirida.

LB: Medio Luria-Bertani.

MseI: Enzimas de restricción de corte frecuente.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NO: Óxido Nitroso.

ORF: del inglés open reading frame (marcos de lectura abiertos).

PAL: Fenilalanina Amonio Ligasa.

pb: Pares de Bases.

PCR: del inglés Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

PR: Proteínas relacionadas con la patogénesis.

RA Fv T1: Raíz Adyacente *Fusarium virguliforme* Tiempo 1.

RA Fv T2: Raíz Adyacente *Fusarium virguliforme* Tiempo 2.

RACE: del inglés Rapid Amplification of cDNA Ends (Rápida Amplificación de los Extremos de ADNc).

RL Fv T1: Raíz Lejana *Fusarium virguliforme* Tiempo 1.

RL Fv T2: Raíz Lejana *Fusarium virguliforme* Tiempo 2.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

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

SA: Ácido Salicílico.

SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación.

SAR: Resistencia Sistémica Adquirida.

SMS: Síndrome de Muerte Súbita.

SNA: Synthetic low Nutrient Agar.

USDA: United Status Department of Agriculture.

RESUMEN

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.), es en la actualidad el cultivo más importante de Argentina, no solo por la magnitud del área que ocupa, sino, fundamentalmente, porque la mayor parte de su producción se destina a la exportación. Argentina, además de ser el tercer país productor de soja en el mundo, ocupa el primer lugar en exportación de aceite y harina de esta oleaginosa.

Numerosas enfermedades pueden afectar al cultivo de soja, ocasionando pérdidas importantes de rendimiento. Se conocen más de 100 microorganismos patógenos de soja, de los cuales alrededor de 35 pueden causar pérdidas de importancia económica. La muerte súbita de la soja es una enfermedad fúngica, que en ataques severos puede producir disminuciones de rendimiento que varían entre el 20 y el 80%, dependiendo del cultivar y del momento de infección. En general, esta enfermedad está asociada a la ocurrencia de condiciones óptimas para el crecimiento del cultivo, además de altos contenidos de humedad edáfica también es importante la alta fertilidad. Recientes estudios morfológicos y moleculares han permitido determinar al menos 4 especies responsables de producir síntomas de la enfermedad. En Argentina se ha determinado la presencia de *F. tucumaniae* y *F. virguliforme*; siendo este último el más importante por ser el más patogénico.

El objetivo de este trabajo fue comprobar, mediante PCR en tiempo real, la expresión diferencial de aquellos genes que se activa o se reprimen durante la interacción soja/*F. virguliforme*. Para ello se diseñaron cebadores específicos y por PCR en tiempo real se comprobó que el gen Ugd se ve diferencialmente expresado durante la interacción con el patógeno. Se determinó, por comparaciones con la base de datos del NCBI, que la secuencia correspondiente a este gen presenta similitud con la proteína UDP-glucosa 6-deshidrogenasa y a la UDP-glucosa/GDP-manosa deshidrogenasa. Estas enzimas participan en la biosíntesis de pared celular, proceso que se ve claramente modificado durante los diferentes estadios de la infección fúngica.

INTRODUCCIÓN

CULTIVO DE SOJA

Taxonomía

La soja (*Glycine max* (L.) Merr) es una especie de la familia de las leguminosas (*Fabaceae*) cultivada por sus semillas, de alto contenido en aceite y proteína.

El nombre de género *Glycine* fue introducido originalmente por Linnaeus (1737) en la primera edición de *Genera Plantarum*. La palabra *glycine* deriva del griego - *glykys* (dulce) y se refiere, probablemente al dulzor de los tubérculos comestibles con forma de pera (apios en Griego) producidos por la enredadera leguminosa o herbácea trepadora, *Glycine apios*, que ahora se conoce como *Apios americana*.

La soja cultivada primero apareció bajo el nombre de *Phaseolus max* L. La combinación, *Glycine max* (L.) Merr., fue propuesta por Merrill en 1917, ha llegado a ser el nombre válido para esta planta.

El género *Glycine* se divide en dos subgéneros: *Glycine* y Soja. El subgénero Soja Moench incluye la soja cultivada, *G. max* (L.) Merr., y la soja silvestre: *G. soja*. (Giorda and Baigorri, 1997). Ambas especies son anuales. La soja crece sólo bajo cultivo mientras que *G. soja* crece en forma silvestre en China, Japón, Corea, Taiwán y Rusia. *Glycine soja* es el ancestro silvestre de la soja: el progenitor silvestre.

Distribución geográfica

Su centro de origen se sitúa en el Extremo Oriente (China, Japón, Indochina). En 1765 se introdujo en América (Georgia, EE.UU.). Sin embargo, no fue hasta la década del 40 donde se produce la gran expansión del cultivo en ese país, liderando la producción mundial de soja a partir de 1954 hasta la actualidad. Se comercializa en todo el mundo, debido a sus múltiples usos. En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión se inició a principios del siglo XX y la producción comercial comenzó también en la década del 40, constituyéndose en la actualidad en el segundo productor mundial de grano de soja.

Los tres mayores exportadores de soja, Estados Unidos, Brasil y Argentina son responsables del 90% de las exportaciones mundiales (Figura 1). Conducido por aumentos continuos del área, Brasil se consolidará como el mayor exportador mundial, la imposibilidad de extender el área sembrada en los Estados Unidos limita la ampliación de las exportaciones de este país (USDA, 2003).

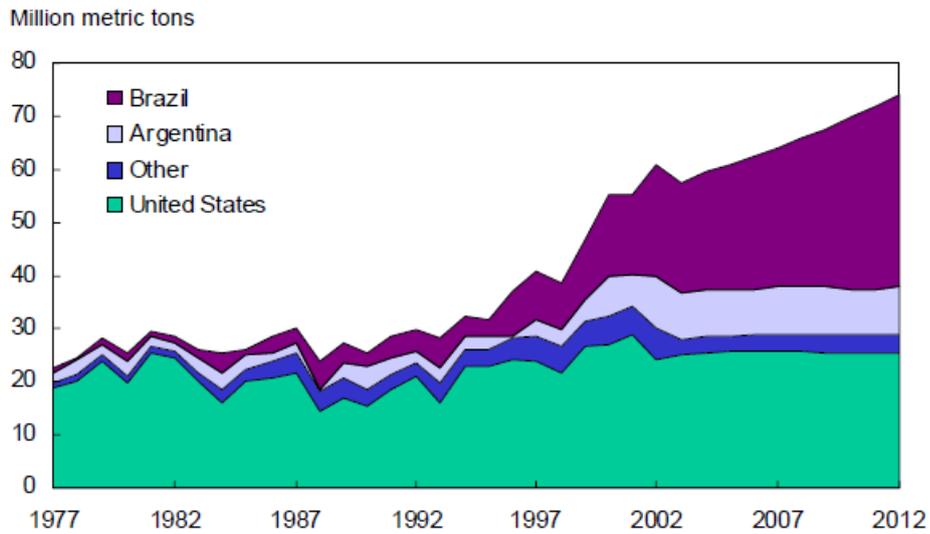


Figura: 1 Principales países exportadores de soja. Fuente: USDA Agricultural Baseline Projections to 2012, February 2003. Economic Research Service, USDA.

En Argentina, el 95% de los cultivos de soja se ubican en una amplia zona de la región pampeana norte (provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Buenos Aires, La Pampa y San Luís). El 5% restante se encuentra en la región Norte del país: provincias de Tucumán, Salta, Santiago del Estero, Catamarca, Jujuy, Chaco, Formosa, Misiones y norte de Santa Fe (Ploper, 1999) (Figura 2).

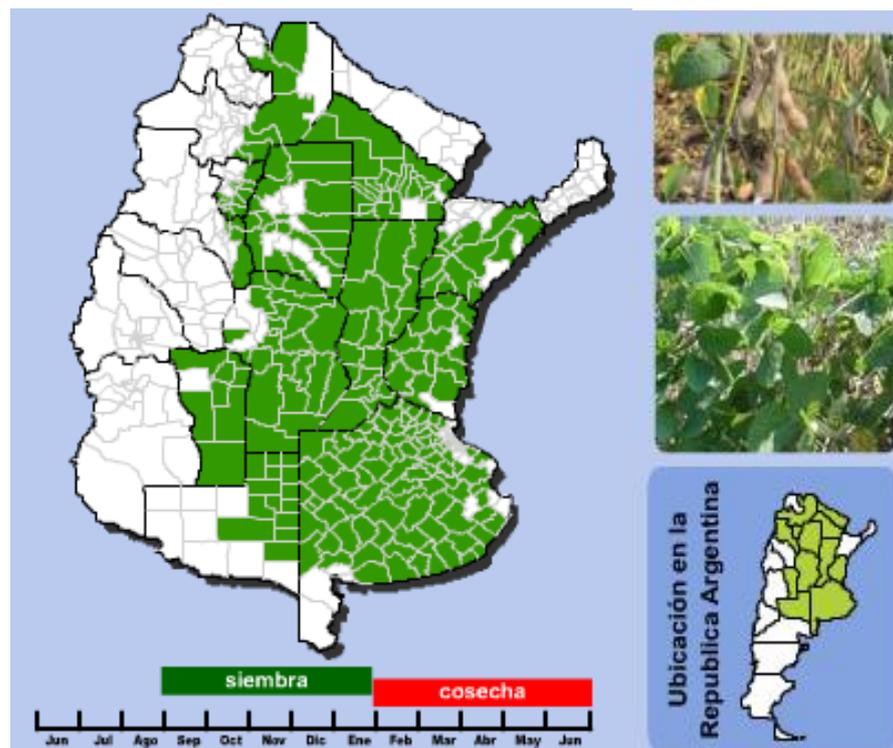


Figura: 2 Dispersión geográfica del cultivo en función del área sembrada promedio de las últimas campañas. Fuente: Dirección de Coordinación de Delegaciones- Estimaciones Agrícolas- SAGPyA/CNA 2002.

En los últimos 30 años se ha constituido en un fenómeno trascendente y fundamental para el país, tanto desde el punto de vista económico como social. Las condiciones agroecológicas son ideales para el desarrollo y expansión de la soja, convirtiéndola en el cultivo más importante en superficie y productividad (Cuniberti, *et al.*, 2007) (Figura 3). En la campaña 2009/10, el factor de mayor preponderancia en el incremento de la superficie sembrada con soja fue la reducción del área maicera en la zona núcleo -Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos- como también en áreas de Chaco y Santiago del Estero. Del mismo modo, se produjo un traspaso hacia el cultivo de soja, aunque de menor magnitud en valores absolutos, donde no pudo concretarse la

siembra de girasol o se perdieron lotes a causa de la sequía. Esto se dio en las regiones del norte de Santa Fe y sur del Chaco, y algunas áreas de la provincia de Buenos Aires, donde también fue menor la superficie implantada (Bolsa de Comercio de Rosario, 2009). La superficie sembrada con soja en Argentina en la campaña 2005/06 fue estimada en 15,2 millones de hectáreas, mientras que el valor estimado de superficie sembrada para la campaña 2009/10, es de 18,7 millones de hectáreas (GEA, 2002). Ante la posibilidad de completar un área récord y obtener un rinde algo mejor que el promedio cercano, la campaña 2009/10 podría exhibir como logro obtener 50,8 millones de toneladas de soja. (Bolsa de Comercio de Rosario, 2009).



Figura: 3 Porcentaje de la producción total por provincia (datos promedio del último quinquenio). Fuente: Dirección de Coordinación de Delegaciones- Estimaciones Agrícolas- SAGPyA/CNA 2002.

Condiciones de cultivo

Las temperaturas óptimas para el desarrollo de la soja están comprendidas entre los 20 y 30º C, siendo las temperaturas próximas a 30º C las ideales para su desarrollo. El crecimiento vegetativo de la soja es pequeño o casi nulo en presencia de temperaturas próximas o inferiores a 10º C, quedando frenado por debajo de los 4º C. Sin embargo, es capaz de resistir heladas de -2 a -4º C sin morir. Temperaturas superiores a los 40º C provocan un efecto no deseado sobre la velocidad de crecimiento, causando daños en la floración y disminuyendo la capacidad de retención de legumbres.

Las temperaturas óptimas oscilan entre los 15 y los 18º C para la siembra y los 25º C para la floración. Sin embargo, la floración de la soja puede comenzar con temperaturas próximas a los 13º C. Las diferencias de fechas de floración, entre años, que puede presentar una variedad, sembrada en la misma época, son debidas a variaciones de temperatura.

La soja es una planta sensible a la duración del día, es una planta de día corto. Es decir, que para la floración de una variedad determinada, se hacen indispensables unas determinadas horas de luz, mientras que para otra, no.

Respecto a la humedad, durante su cultivo, la soja necesita al menos 300 mm de agua, que pueden ser en forma de riego cuando se trata de regadío, o bien en forma de lluvia en aquellas zonas templadas húmedas donde las precipitaciones son suficientes.

La extensión del área cultivada, la uniformidad genética centrada particularmente en cultivares de ciclo corto, el monocultivo, el aumento de la densidad poblacional, la siembra directa, y la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para los patógenos son algunos de los factores que han contribuido al incremento de la presencia de enfermedades, haciendo de la soja un cultivo altamente vulnerable ((Carmona, 2004);(Carmona, *et al.*, 2003); (Formento, 2001); (Ploper, *et al.*, 2006)). Numerosas enfermedades pueden afectar al cultivo de soja, ocasionando pérdidas de rendimiento y/o disminución de la calidad comercial del grano, como así también problemas en la germinación, cuando los granos afectados son utilizados como semilla. Se conocen más de 100 microorganismos patógenos de soja, de los cuales alrededor de 35 pueden causar pérdidas de importancia económica. Se ha estimado que las pérdidas de rendimiento atribuidas a las enfermedades de soja en el país pueden alcanzar valores cercanos al 8% (Wrather, 2001).

Luego de la adopción de la siembra directa las enfermedades en el cultivo de soja comenzaron a manifestarse con mayor intensidad, aumentando las pérdidas especialmente en lotes con monocultivo (Ploper, *et al.*, 2006). Desde hace algunos años la probada contribución de las prácticas agrícolas al deterioro ambiental provocó el interés mundial por la investigación sobre métodos alternativos para el control de herbívoros, patógenos y malezas, utilizando metabolitos secundarios relacionados con las estrategias defensivas de las plantas.

LA MUERTE SÚBITA, UN SÍNDROME LIMITANTE EN EL CULTIVO DE SOJA

Agente etiológico

La muerte súbita de la soja (SMS) es una enfermedad fúngica que se encuentra en las regiones sojeras de Estados Unidos, Canadá (Anderson and Tenuta, 1998), Argentina, Brasil (Nakayima, 1996); (Yorinori, 2002) Paraguay (Yorinori, 1999), Bolivia (Yorinori 2002) y Uruguay (Ploper, *et al.*, 2003). Fue detectada en Argentina por primera vez en cultivos del área de Pergamino (Provincia de Buenos Aires) durante la campaña 1991/92 (Ivancovich, *et al.*, 1992).

Hasta el año 2003 el agente etiológico se conocía como *Fusarium solani f. sp. glycines* (Rupe, *et al.*, 1999). En 2003 se identificaron dos especies causales de la enfermedad: *Fusarium virguliforme* en USA y *F. tucumaniae* en Argentina (Aoki, *et al.*, 2003). Recientes estudios morfológicos y moleculares han permitido determinar al menos 4 especies responsables de producir síntomas de la enfermedad (Aoki, *et al.*, 2005). En Argentina se ha determinado la presencia de *F. tucumaniae* (Aoki, *et al.*, 2003); (Scandiani, 2004) y *F. virguliforme* (Scandiani, *et al.*, 2004). Las pruebas de patogenicidad realizadas sobre distintos genotipos de soja mostraron que los aislamientos de *F. virguliforme* resultaron más agresivos y patogénicos que los aislamientos de *F. tucumaniae* (Scandiani, 2004).

Síntomas y signos de la enfermedad

En el síndrome de la muerte súbita, plantas normales y vigorosas se tornan amarillentas y mueren rápidamente, 10 a 20 días luego de la aparición de los primeros síntomas. La infección de las plantas se produce a través de las raíces, cuando el hongo penetra en el tejido vascular de la misma (Roy, *et al.*, 1997) y causa podredumbre radicular. Allí el patógeno produce toxinas que son traslocadas a las hojas. Frecuentemente los síntomas aparecen luego de severas lluvias durante los estadios reproductivos; la alta humedad edáfica incrementa la severidad de la enfermedad.

Las toxinas son responsables de los síntomas foliares ya que el hongo *per se* no invade los tallos más allá de unos pocos centímetros por encima de la superficie del suelo (Roy, *et al.*, 1997). Los síntomas foliares aparecen generalmente después de floración y consisten en manchas cloróticas internervales que suelen tornarse necróticas. Cuando dichas manchas coalescen pueden abarcar una mayor área foliar. Las hojas quedan de color castaño, a excepción de las nervaduras que permanecen verdes y es frecuente observar la caída de los folíolos pero no de los pecíolos (Figura 4). Las plantas afectadas pueden aparecer aisladas o en grupos formando manchones distribuidos por todo el lote. La enfermedad debe su nombre a la rapidez con la cual los síntomas foliares pueden desarrollarse. Este nombre no es siempre descriptivo porque el progreso de la enfermedad puede ser más lento si las condiciones ambientales

no son completamente favorables o si el cultivar posee algún grado de resistencia.



Figura: 4 Síntomas foliares de clorosis y necrosis internerval causados por el Síndrome de Muerte Súbita de la soja.

Los síntomas en las raíces preceden a los síntomas foliares. Se produce una necrosis acentuada del tejido vascular en la raíz y en la base del tallo, se observan tonos grises internamente y, externamente, una coloración rojiza algo debajo del nivel del suelo, pero la médula permanece blanca (figura 5).



Figura: 5 Corte longitudinal de base de tallo y raíz que muestra decoloración vascular causada por el SMS de la soja.

Los principales signos del patógeno son: masas conidiales azules o verdosas sobre la corteza radicular y base del tallo, tanto en forma macro como microscópica (Roy, 1997a, Roy, 1997b, Roy, *et al.*, 1997, Rupe and Hartman, 1999) e hifas del hongo alrededor de los haces vasculares e incluso dentro del xilema (Goeke, *et al.*, 2000) (Figura 6).



Figura: 6 Principales signos del agente causal del Síndrome de la Muerte Súbita de la soja sobre la raíz principal, esporulación color azul formada por la presencia de macroconidios.

Condiciones favorables para la ocurrencia de la enfermedad

En general, esta enfermedad está asociada a la ocurrencia de condiciones óptimas para el crecimiento del cultivo, además de altos contenidos de humedad edáfica también es importante la alta fertilidad. Scherm y Yang (1996) determinaron a la temperatura como otro factor importante en el desarrollo del síndrome de la muerte súbita (Scherm, *et al.*, 1996). La temperatura óptima para producir podredumbre de raíz en cámara de cultivo es de 15°C, en cambio, la temperatura óptima para el desarrollo de síntomas foliares varía entre 22 y 24°C (Rupe, 1999) y se ha observado un agravamiento de la enfermedad con condiciones posteriores de sequía (Ivancovich, *et al.*, 1992). Los mayores daños se asocian a siembras tempranas en suelos fríos, saturados, y alta compactación, descensos bruscos de temperatura e importantes lluvias días antes o durante la floración (Figura 7).



Figura: 7 Campo de soja con síntomas claros del síndrome de muerte súbita. Fuente: imagen tomada del artículo de *Plant Health Progress: Foliar Symptom Expression in Association with Early Infection and Xylem Colonization by *Fusarium virguliforme* (formerly *F. solani* f. sp. *glycines*), the Causal Agent of Soybean Sudden Death Syndrome.*

Los cambios fisiológicos ocurridos en el hospedante durante el paso del estado vegetativo al reproductivo pueden tener algún efecto sobre la enfermedad, ya que el crecimiento neto de la raíz se reduce drásticamente, los fotosintatos son transportados a las vainas en desarrollo y a las semillas, y no a las hojas como en el estado vegetativo, pudiendo reducir las defensas (Rupe, 1995).

Pérdidas

El nivel de pérdidas depende del estado de desarrollo del cultivo al momento de infección, de la reacción del cultivar y, del ambiente (Lago, 2009). En ataques severos puede producir disminuciones de rendimiento que varían entre el 20 y el 80%, dependiendo del cultivar y del momento de infección (Rupe, 1992). Las mayores pérdidas se producen cuanto más temprano se presenta la enfermedad. La disminución de los rendimientos se debe a la disminución del área fotosintéticamente activa, defoliación, aborto de flores y vainas y reducción del tamaño y peso de 1000 semillas (Costamilan, 2000, Ploper, *et al.*, 1995, Rupe, 1989a, Rupe, 1989b, Rupe, 1991, Rupe and Hartman, 1999).

Las pérdidas promedio estimadas en la actualidad para las principales enfermedades en la Argentina son de aproximadamente el 8 al 10% de la producción (1,9 a 2,4 millones de t); estas estimaciones reflejan solamente las pérdidas directas sin considerar las indirectas, como la reducción de la vida útil de un lote por incremento de inóculo, mayores costos derivados del control cultural y de la obtención de nuevos cultivares con resistencia genética. Sin embargo, las pérdidas son similares a las informadas en otras regiones productoras del mundo donde el cultivo se realiza desde hace más de 50 años.

Este alarmante aumento de los problemas sanitarios se debe a la falta de rotaciones de cultivos, uno de los componentes básicos del manejo de enfermedades. En los lotes de producción, el monocultivo se practica de manera tal que las enfermedades se tornaron limitantes; además, los sistemas de

labranza conservacionista permiten detener procesos erosivos, optimizar el uso del agua del suelo y reducir costos, pero inducen cambios en la epidemiología de las enfermedades. Algunas aumentan o disminuyen su importancia y otras, permanecen invariables. También la uniformidad del germoplasma utilizado es otro problema siempre presente.

MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas poseen **mecanismos constitutivos** de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva se pueden dividir en mecanismos de defensa **estructurales constitutivos**, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa **químicos constitutivos**, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales.

Sin embargo, la defensa incluye también otros mecanismos más sofisticados, en los que, tras la percepción del factor de estrés, se activa de forma específica una cascada de señales que desencadenan una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, y que requieren a menudo la activación de un conjunto de genes cuyos productos proporcionan protección, no sólo a nivel local sino también, a menudo, sistémicamente en áreas distales (Shah, *et al.*, 1999). Esa corriente de información en forma de flujo de señales es lo que

constituye el proceso de transducción de las señales defensivas. Cada una de estas señales intermediarias es capaz de inducir la expresión de múltiples genes, por lo que muchas respuestas de defensa comparten intermediarios comunes que establecen interacciones reguladoras entre las diversas rutas de señalización.

Los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como **resistencia inducida**, se activan solamente como una respuesta al ataque de patógenos (Collinge, *et al.*, 1994). La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998).

La respuesta local ha sido llamada **respuesta de hipersensibilidad (HR)** puesto que puede llevar, a altas dosis del patógeno, a la necrosis de parte importante del tejido infectado (Figura 8). Esta necrosis se produce fundamentalmente por activación de herramientas químicas: las células infectadas producen altas concentraciones de potentes agentes oxidantes: especies activas de oxígeno (ROS) y ácido salicílico (SA). Además, estas células producen altas concentraciones de otras hormonas como etileno, óxido nítrico (NO), ácido jasmónico y sus derivados (JA), y otros antibióticos o fitoalexinas. Es interesante destacar que la reacción local inducida utiliza también herramientas

estructurales, fundamentalmente el reforzamiento de la pared celular, para impedir la proliferación y la diseminación del patógeno hacia el resto de la planta.

En los tejidos que rodean al sitio de entrada del patógeno ocurre una reacción denominada de **resistencia local adquirida (LAR)**. En estos tejidos se acumulan especies reactivas de oxígeno, SA y las otras hormonas, en concentraciones más bajas que en las células infectadas. Estos compuestos provocan la activación de un gran número de genes de defensa. Un grupo de estos genes codifica para enzimas de las rutas de síntesis de fitoalexinas, provocando un aumento sostenido en la producción de estos compuestos antibióticos y de fenoles precursores de la lignina. Un segundo grupo de genes de defensa codifica para proteínas estructurales de la pared, contribuyendo a su reforzamiento. Un tercer grupo codifica para enzimas encargadas de detoxificar y proteger al tejido vegetal del daño oxidativo. Un cuarto grupo de genes codifica para enzimas que degradan la pared de hongos y bacterias (β -1,3-glucanasas y quitinasas). En consecuencia, la reacción LAR permite proteger al tejido circundante al sitio de infección, potenciando las barreras químicas y estructurales.

En los tejidos distantes al sitio de infección se produce una reacción denominada de **resistencia sistémica adquirida (SAR)**. Esta reacción es similar a la reacción LAR, sólo que es más atenuada. La reacción SAR está fundamentalmente destinada a proteger o inmunizar al resto de la planta frente

a una potencial segunda infección por el mismo u otro agente patógeno, se caracteriza por ser de duración larga (desde días hasta semanas dependiendo del patógeno) y por la activación de la expresión selectiva y coordinada de un grupo característico de genes de defensa (genes SAR), que estarán directamente implicados en el establecimiento y mantenimiento de dicha resistencia (Dong, 1998, Durrant and Dong, 2004, Glazebrook, 1999, Glazebrook, 2001, Gozzo, 2003, Grant and Lamb, 2006, Pieterse and Van Loon, 2004, Ward, *et al.*, 1991). La familia de genes SAR ha sido caracterizada en tabaco (Ward, *et al.*, 1991) y en *Arabidopsis* (Uknes, *et al.*, 1992). Otros genes que también gobiernan las reacciones de defensa no son expresados sistémicamente (Sha and Klessig, 1996). El conjunto mayoritario de proteínas defensivas sintetizadas en las plantas durante dicha respuesta SAR pertenece a la familia de las proteínas *PR*.

Aunque la inducción de SAR no es dependiente del desarrollo de HR (Van Loon, 1997) la resistencia se expresa a su nivel más alto cuando el patógeno inductor causa necrosis (Cameron et al, 1994). La necrosis inducida puede ser el resultado de la muerte celular programada después del reconocimiento del patógeno en una interacción incompatible, donde se produjo una respuesta hipersensible, o de la muerte celular causada por la acción del patógeno en una interacción compatible.

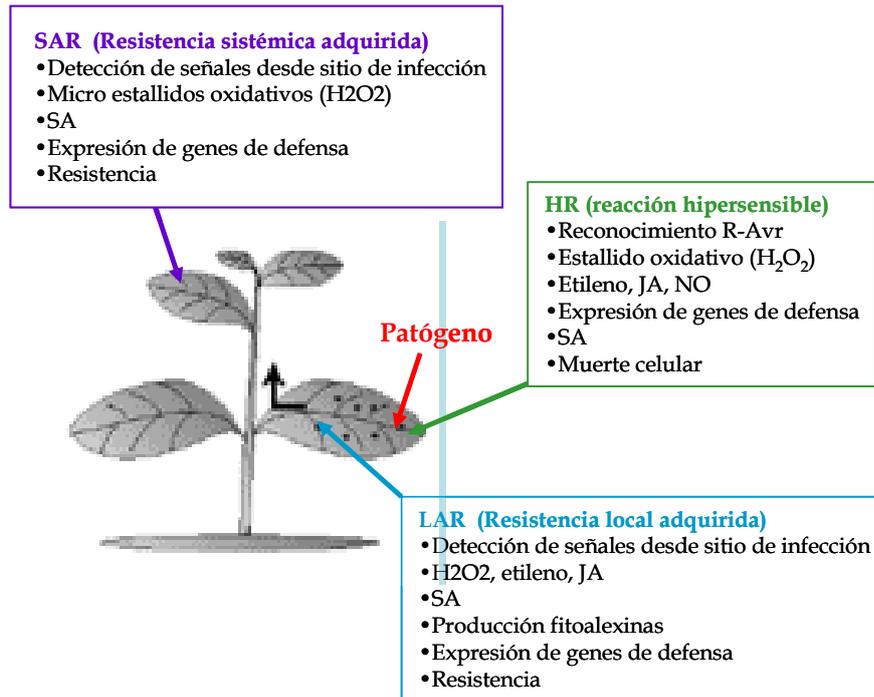


Figura: 8 Mecanismos de defensa activados por el patógeno. El esquema muestra las reacciones de defensa que ocurren en las células infectadas (reacción de hipersensibilidad, HR), en el tejido vecino al sitio de infección (resistencia local adquirida, LAR) y en los tejidos distantes al sitio de infección (resistencia sistémica adquirida, SAR).

Resistencia mediada por genes R

En la naturaleza, las plantas son generalmente resistentes a muchos patógenos. La capacidad de un patógeno para producir una enfermedad en una planta huésped suele ser una excepción, no una regla. Esto es porque las plantas han desarrollado una habilidad para detectar posibles patógenos invasores y establecer con éxito una defensa.

Un patógeno puede ser muy patogénico o poco patogénico para un hospedante dado. El grado de patogenicidad se define frecuentemente como virulencia (Abad and Khara, 2007, Collinge, *et al.*, 2001). De esta forma, y

dependiendo de su habilidad de causar enfermedad, un patógeno puede ser altamente virulento para un hospedante y levemente virulento para otro. Estos conceptos han sido discutidos por Vand der Plank quien propuso que el nivel de virulencia se determina con respecto a la resistencia del hospedante (Vand der Plank, 1968). En otras palabras, la virulencia es un concepto estrechamente ligado a la habilidad del patógeno de superar la resistencia de la planta. Sin embargo, en términos genéticos, virulencia se utiliza para definir si una variante o raza de un patógeno puede o no causar enfermedad en una variedad o cultivar del hospedante. Así, una especie de hospedante puede presentar cultivares que muestran *resistencia* y otros que muestran *susceptibilidad* a un patógeno dado, el cual a su vez puede presentar razas tanto virulentas como avirulentas para un cultivar determinado (Collinge, *et al.*, 1994).

Las reacciones a nivel molecular que inducen la resistencia en plantas al ataque del patógeno fue descrita inicialmente por H. H. Flor (Flor, 1971) bajo la hipótesis de reconocimiento “Gen a Gen”, la cual afirma que la respuesta de defensa existe como consecuencia de una directa interacción entre el producto de un gen de avirulencia (*Avr*) del patógeno denominado elicitor y la proteína codificada por un gen de resistencia (*R*) de la planta, manteniendo una relación antígeno – anticuerpo similar al sistema inmune en mamíferos. Este modelo ha sido descrito en numerosas especies de plantas incluyendo *Arabidopsis* y ha servido como metodología para clonar genes de resistencia. (Dangl and McDowell, 2006, Roger, 2004).

Recientes estudios indican una base de reconocimiento más compleja en la cual la acción de los productos de genes *Avr* es mediada por mecanismos indirectos y envuelve al menos un tercer componente en la célula huésped conformado por una “proteína blanco” de los factores de virulencia, la cual es reconocida por el elicitor tanto en plantas resistentes como susceptibles. En este caso las proteínas codificadas por los genes *R* actúan como un guardián monitoreando modificaciones en la “Proteína Blanco” y detectando las alteraciones de procesos celulares que son claves para el patógeno, con la consecuente inducción de la activación de mecanismos de defensa (Bent and Mackey, 2007, Jorunn, *et al.*, 2003).

En base a lo anterior se formuló la existencia de dos tipos de interacciones. La primera producida en plantas susceptibles en la cual se dice que hay una “interacción compatible”, es decir el patógeno reconoce el huésped, pero no hay reconocimiento por parte de la planta de los efectores del patógeno, por lo que no hay impedimento para el desarrollo de la enfermedad. En el caso contrario se produce una “interacción incompatible”, hay reconocimiento directo o indirecto del patógeno por parte de la planta y se desarrolla los mecanismos de defensa que detienen la infección (Panabieres, *et al.*, 1995).

Recientemente se reportó un nuevo modelo de interacción que integra el reconocimiento gen a gen y la hipótesis de la molécula guardián. Este modelo denominado “Dogma Central de la Fitopatología” describe el proceso

molecular de inducción de resistencia basado en una continua competencia evolutiva (Bent y Mackey, 2007; Dangl y McDowell, 2006).

Nutrición de los patógenos y su relación con el mecanismo de defensa vegetal

Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrientes de fuentes existentes y para ello necesitan invadir y adaptarse al tejido del hospedante para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta.

Los patógenos de plantas son a menudo divididos en biotrofos y necrotrofos, según su forma de vida. Los biotrofos se alimentan de tejido vivo, mientras que los necrotrofos lo hacen de tejido muerto (Parbery, 1996). En el caso de los biotrofos es fácil de imaginar que la resistencia mediada por genes R y la vía de señalización por SA resulten en resistencia, ya que la respuesta hipersensible no permite que el patógeno llegue a la fuente de alimento. Sin embargo, en el caso de los necrotrofos, la muerte celular programada de las células huésped simplemente facilita la vida del patógeno. Varios experimentos realizados con mutantes de *Arabidopsis* en algunos genes relacionados con las vías de defensa permitieron determinar la resistencia de muchos patógenos. La mutación en el gen *npr1* y el transgen *NahG*, que bloquea la señal de SA, resulta en la pérdida de resistencia para el patógeno biotrófico *Peronospora parasitica*, pero no tiene ningún efecto para el hongo necrotrofico *Alternaria brassicicola*. Por el contrario, una mutación en *coi1*, que bloquea la señal de JA, compromete

severamente la resistencia del hongo necrotrófico *A. brassicicola*, pero no tiene ningún efecto para *P. parasitica* (Thomma, *et al.*, 1998b). Estas observaciones sugieren que la defensa dependiente de SA se activa en presencia de patógenos biotrofos mientras que la respuesta dependiente de JA y ET se activan contra patógenos necrotrófos (McDowell and Dangl, 2000).

Los nuevos conocimientos confirman que la activación de defensa en las plantas tiene una base compleja que depende de la manifestación coordinada de un conjunto de mecanismos de defensa. Estos mecanismos responden a la expresión o represión de genes cuyos productos participan en las diferentes vías metabólicas que participan en la defensa. Pero, la respuesta de una planta a cualquier estímulo exógeno o endógeno nunca es el resultado de la activación de una única ruta de señalización hormonal, sino que es la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas rutas de señalización. Distintos estímulos provocan una activación asimétrica de esas redes señalizadoras complejas y el balance final de interacciones entre las mismas es el que determina las respuestas específicas al estímulo inicial. La célula es capaz de combinar de distintas formas las mismas rutas hormonales para determinar respuestas muy distintas a diferentes estímulos. Un ejemplo claro lo constituye la respuesta de las plantas a patógenos y heridas (Figura 9). Aunque en ambos casos la planta activa las rutas de señalización de ácido jasmónico (JA) y de etileno (ET), combina estas dos rutas de distintas formas para que las respuestas finales sean distintas y específicas para cada estímulo.

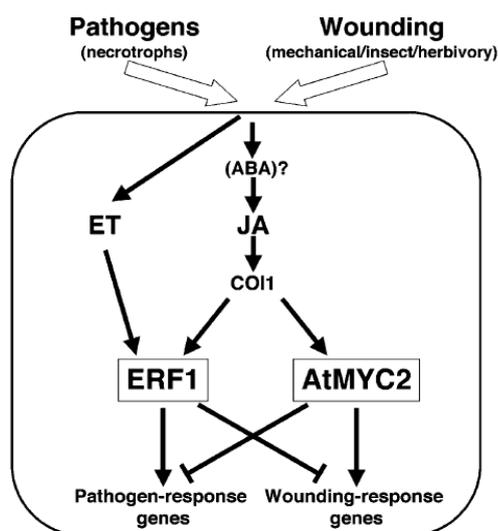


Figura: 9 Representación esquemática de la activación de respuestas a patógenos y herida en *Arabidopsis* dependientes de AtMYC2 y ERF1. Diferentes tipos de estrés, como la herida (mecánica o biótica) o la infección por patógenos necrotrofos, inducen la síntesis y posterior activación de las rutas de ET y JA. El JA por sí solo induce la expresión de AtMYC2 que es el responsable de la activación de genes de respuesta a herida y de la represión de genes de respuesta a patógenos. Por otra parte, la cooperación de las señalizaciones de ET y JA a través de la inducción transcripcional de ERF1 da lugar a la activación de genes de respuesta a patógenos y a la represión de genes de respuesta a herida (Lorenzo, *et al.*, 2003, Lorenzo, *et al.*, 2004)

Las vías de señalización del SA, JA y ET interactúan extensivamente. En el caso de patógenos necrotrofos, por ejemplo, ambas hormonas (ET y JA) actúan sinérgicamente en la activación de la expresión de genes de defensa (Penninckx, *et al.*, 1998, Xu, *et al.*, 1994), y los mutantes afectados en la síntesis o señalización de cualquiera de estas dos hormonas son incapaces de inducir estas respuestas de defensa y son más susceptibles al ataque de los patógenos (Knoester, *et al.*, 1998, Staswick, *et al.*, 1998, Thomma, *et al.*, 1998a, Thomma, *et al.*, 1999, Vijayan, *et al.*, 1998). La producción de estas señales varía

generalmente en cantidad, composición y en el momento de acción, dando como resultado la activación de un set de genes relacionados con la defensa que eventualmente determina la naturaleza de la respuesta. (Reymond and Farmer, 1998, Rojo, *et al.*, 2003, Van Oosten, *et al.*, 2004).

La resistencia mediada por genes R está asociada con la activación de vías de señalización del ácido salicílico (SA) que lleva a la expresión de fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) entre otros productos metabólicos cuya síntesis ocurre *de novo* en los tejidos afectados. Los genes R que median la resistencia están usualmente acompañados por una rápida producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). La producción de ROS es requerida para otros componentes de la respuesta, la muerte celular hipersensible (HR). Dado que las infecciones son eventos que ocurren por lo general, de manera local, se propuso la existencia de señales sistémicas. En un principio, se identificó al SA como una de estas moléculas señales (Klessig and Malamy, 1994), pero luego se demostró que no es una señal translocada de SAR (Vernooij, *et al.*, 1994), pero su acumulación es esencial para determinar la resistencia en plantas (Delaney, *et al.*, 1994). Se acumula intercelularmente en un receptor específico que se une a la enzima catalasa, por lo que se lo asocia directamente con la producción de ROS. Normalmente la catalasa protege a la planta contra el estrés oxidativo ejercido por especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, esta actividad de la catalasa es bloqueada por la unión del ácido salicílico (Chen, *et al.*, 1993). Por lo que, alterando la cantidad de ácido salicílico

dentro de la célula, se puede regular el nivel de especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno. Si solamente una pequeña cantidad de ácido salicílico está presente en la célula, y poco unido a la catalasa, su actividad permanece alta, manteniendo los niveles de especies reactivas del oxígeno bajo. Cuando los niveles de SA son altos y la actividad catalasa baja, los niveles de ROS permanecen altos liberando la síntesis de proteínas PR (Klessig and Malamy, 1994). Recientemente, se ha propuesto al H_2O_2 como un componente clave durante la respuesta hipersensible (Levine, *et al.*, 1994, Tenhaken, *et al.*, 1995), ya que actúa como una molécula señal, induciendo la expresión de genes. En soja, el H_2O_2 induce la expresión de genes de enzimas relacionadas con la defensa como la glutatión-S-transferasa (GST) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Levine *et al.*, 1994). También se ha demostrado en *Arabidopsis* que se induce la expresión de GST y PAL. GST comprende una familia de enzimas involucradas en procesos de detoxificación celular después del estrés, incluyendo el estrés oxidativo (Marrs, 1996), la glutatión peroxidasa destruye al H_2O_2 en el ciclo glutatión ascorbato (Foyer, *et al.*, 1997), y PAL o fenilalanina amonio ligasa es una enzima involucrada en la síntesis de compuestos relacionados a defensa.

HIPÓTESIS

- La infección de plantas de soja (*Glycine max*) por *Fusarium virguliforme* modifica la expresión de los genes involucrados en la respuesta de defensa y puede ser evaluado en infecciones *in vitro*

OBJETIVOS

- Ajustar un método de inoculación e infección de plantas de soja con *Fusarium virguliforme in vitro*.
- Mediante la técnica de ADNc-AFLP, detectar, seleccionar y caracterizar los polimorfismos encontrados en los distintos tratamientos.
- Determinar las secuencias nucleotídicas de los genes con expresión polimórfica frente al estrés biótico.
- Validar mediante la técnica de PCR en tiempo real la expresión génica diferencial encontrada mediante ADNc-AFLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de soja (*Glycine max*) cultivar Don Mario 4800, desinfectadas superficialmente. Bajo condiciones de esterilidad, las mismas fueron pre-germinadas y colocadas cuidadosamente, a través de un orificio, en cajas de *Petri* conteniendo medio Hoagland gelificado con Phytigel™ (SIGMA). Este medio de cultivo nos asegura el crecimiento autotrófico de las plantas de soja y la no provisión de fuentes de carbono al hongo patógeno. Se utilizó una dilución de Hoagland 1X, ya que fue la óptima para el desarrollo y crecimiento de las plántulas de soja, que llegaron a permanecer en el sistema por al menos 1 mes.

Material Fúngico

Se utilizó una cepa de *Fusarium virguliforme* (Fv), la cual se mantuvo en medio de cultivo sintético (SNA: Synthetic low nutrient agar, Nirenberg, 1976), para ser utilizado como inóculo.

Diseño experimental

Se diseñó un sistema experimental *in vitro* (Bressano, *et al.*, 2009) (Figura 10) que incluyó los siguientes tratamientos:

- **Control:** plantas sanas.
- **Fv:** plantas inoculadas con *Fusarium virguliforme*.

El sistema se mantuvo en condiciones controladas de luz y temperatura, y una vez que la planta desarrolló las primeras hojas trifoliadas, se procedió a la infección con *F. virguliforme*. Para ello, un taco de agar (de aprox. 1 cm x 1 cm) con micelio fúngico fue asépticamente transferido próximo a la raíz.

Se realizaron dos muestreos a diferentes tiempos postinfección. Para ello, las placas se observaron bajo lupa, considerando como tiempo uno, el momento en el que el patógeno entra en contacto con la raíz. El segundo muestreo se llevó a cabo 48 hs después.

Se tomaron muestras de raíces, las cuales fueron conservadas a -80°C. Se eligieron dos zonas de muestreo, una zona adyacente y una zona lejana al lugar de infección. En la figura 1 se pueden observar las distintas zonas de muestreo y el sitio de infección con *F. virguliforme*.

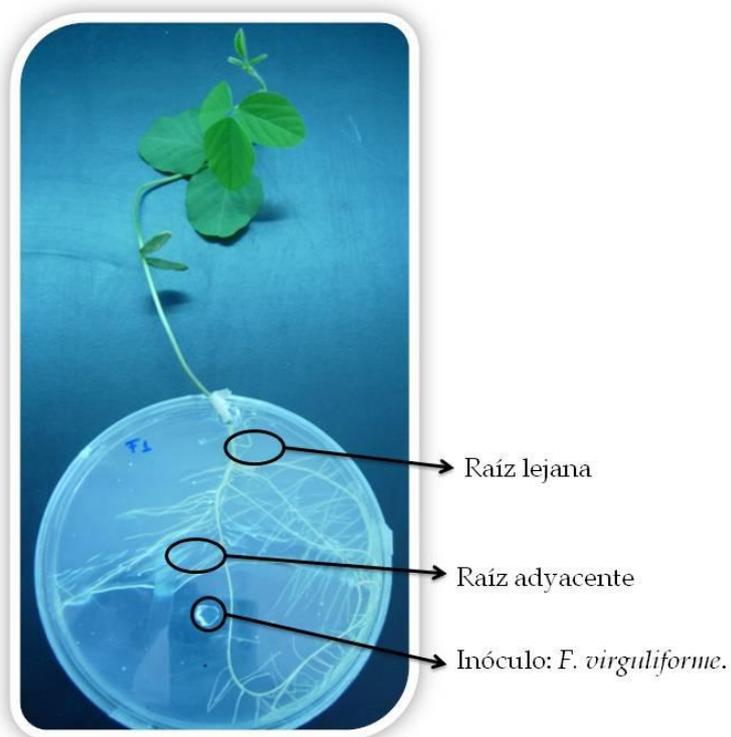


Figura: 10 Sistema experimental *in Vitro*. Planta de soja creciendo en medio Hoagland gelificado con Phytigel™ (SIGMA). La figura muestra el sitio de inoculación del hongo patógeno (*Fv*) y las zonas de muestreo elegidas. Se tomaron muestras de raíz de una zona adyacente y de una zona lejana al sitio de infección.

Extracción de RNA

A partir de las muestras de raíces se extrajo ARN total mediante el método de TRIZOL, utilizando materiales libres de RNAasas. Para ello, se pulverizó 0,1 g de muestra en mortero con aire líquido y se agregó 1 ml de Trizol. Se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf nuevo de 1,5 ml e incubados durante 5 minutos entre 15 a 30°C para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se agregó 0,2 ml de cloroformo cada 1 ml de TRIZOL, se agitó

vigorosamente por 15 segundos y se incubó 2 a 3 minutos entre 15 a 30°C. Pasado ese tiempo, se centrifugó nuevamente a 12.000g a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo al cual se le agregó 0,5 ml de alcohol isopropílico (2-propanol). Se incubó 10 minutos entre 15 a 30°C y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000g a 4°C. Al pellet se le agregó 1,5 ml de etanol 75% y se centrifugó a 7.500g durante 5 minutos. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 µl de agua tratada con DEPC y se incubó durante 10 minutos a 55°C. El RNA extraído se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

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

Se realizó un tratamiento con DNAasas con el fin de eliminar restos de ADN de las muestras de ARN mediante columnas del kit RNAeasy, según protocolo del producto. La eliminación de ADN contaminante se comprobó mediante reacciones de PCR del ARN extraído.

Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados a partir de ADNc (ADNc-AFLP)

Con el objetivo de estudiar los genes cuya transcripción se activa o se reprime frente a la infección de *Fv*, se realizó la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos a partir de ADN copia (ADNc-AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism a partir de ADNc). Dicho estudio fue llevado a cabo en Brasil, en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de

Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola-Escuela Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, bajo la dirección del Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo.

La Técnica de ADNc-AFLP consiste en la combinación de los métodos de RT-PCR, PCR y análisis de fragmentos de restricción, con el fin de detectar polimorfismos debidos a modificaciones en la expresión de genes. Este cambio se percibe como un patrón diferente en número de bandas generadas.

Este análisis consiste en 4 pasos:

1. Síntesis de ADN copia usando ARN total y un oligonucleótido poliT.
2. Producción de un molde inicial mediante digestión con dos enzimas de restricción y posterior ligamiento de adaptadores.
3. Pre-amplificación utilizando cebadores correspondientes a los adaptadores
4. Amplificación selectiva de los fragmentos de restricción con cebadores extendidos en 1 o más bases específicas. El resultado final se observa con tinción con plata en geles de poliacrilamida.

PCR reverso (RT-PCR) Síntesis de ADN copia usando ARN total

Para generar la primera hebra de ADN copia a partir del ARN extraído se utilizó el RT PCR KIT IMPROM –PROMEGA. Se utilizó 1 µg de ARN de cada muestra problema.

Para verificar la reacción de la reverso transcriptasa se procedió a generar un juego de cebadores a partir de un exón de la secuencia de la enzima antioxidante Catalasa, el cual genera un amplicón de 427 pb (Tabla 1).

Nombre	Secuencia (5'-3')
CAT exón 3 up-5'	GTC CGC GAT GGC CTC AAG TT
CAT exón 3 low-3'	GGG GGT CAA AGT CAA GCC TGT C

Tabla: 1 Cebadores específicos para CAT.

Digestión y Ligación de Adaptadores

Para generar la segunda hebra de ADN copia se utilizaron 10 µl de ADNc hebra simple de cada muestra problema, posteriormente se llevó a cabo una digestión con enzimas de restricción y se ligaron los adaptadores.

Se utilizaron enzimas de restricción de corte frecuente (MseI) y de corte raro (HindIII y EcoRI) combinadas de la siguiente manera:

- MseI y HindIII
- MseI y EcoRI

Para la Ligación se utilizaron los siguientes adaptadores (Tabla 2):

Nombre	Secuencia (5'-3')
Mse I	
Adaptador 1	GAC GAT GAG TCC TGA G
Adaptador 2	TAC TCA GGA CTC AT
EcoR I	
Adaptador 1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
Adaptador 2	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
Hind III	
Adaptador 1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
Adaptador 2	AGC TGG TAC GCA GTC TAC

Tabla: 2 Juegos de adaptadores específicos utilizados para cada enzima de restricción.

Pre-amplificación y amplificación selectiva

Inicialmente se amplificó el ADNc utilizando cebadores correspondientes a los adaptadores ligados con anterioridad. Luego se realizó una amplificación selectiva colocando cebadores con 1, 2 y 3 bases extras en el extremo 3', lo que permite restringir ampliamente el número de amplicones generados. Los programas utilizados fueron los siguientes:

Programa de pre-amplificación:

- 94°C 2 minutos
 - 94°C 1 minuto
 - 56°C 1 minuto
 - 72°C 1 minuto
 - 72°C 5 minutos
- } 26 ciclos

Programa de amplificación selectiva:

- 94°C 2 minutos
 - 94°C 30 seg.
 - 65°C 30 seg.
 - 72°C 1 minuto
- } 13 ciclos

- 94°C 30 seg.
 - 56°C 30 seg.
 - 72°C 1 minuto
 - 72°C 5 minutos
- } 23 ciclos

Geles de poliacrilamida

Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida, y fueron reveladas con nitrato de plata 0,2%. Allí se reconocieron los fragmentos de los genes cuya expresión aparentemente se modifica (induce o reprime) frente al patógeno.

De estos posibles genes con modificaciones en su expresión se seleccionó el fragmento 67, cuyo comportamiento fue claramente diferencial. Una vez seleccionadas las bandas polimórficas, las mismas fueron secuenciadas en el Laboratorio a cargo del Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo¹. A partir de la secuencia 67 obtenida, se diseñó un juego de cebadores específicos (tabla 3) para validar los resultados mediante PCR en tiempo real. Las propiedades de los cebadores se calcularon con la herramienta de Internet *Oligo Calc*:

Oligonucleotide

Properties

Calculador

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

¹ Lab. del Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo, Departamento de Biología, Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) de la Universidad de São Paulo (USP)

Nombre	Orientación	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)
Primer 67	Left Primer	AGAGTTGAAGGGATTTGAAC	127
	Right Primer	GCTGATGTATCCAAGAGTG	
Factor de Elong. 1 α	Left Primer	CTGTAACAAAATGGATGCTA	106
	Right Primer	GTCAGGGTTGTATCCTACTT	

Tabla: 3 Secuencias de cebadores específicos diseñados para llevar a validar los resultados por PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real

Para realizar los ensayos de PCR en tiempo real se siguió el protocolo del Kit de Invitrogen “EXPRESS One-Step SYBR GreenER™”, usando EXPRESS SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal, EXPRESS SuperScriptR Mix for One-Step SYBR GreenER, 0.1 μ g de molde de RNA y 0.2 μ M de Cebadores específicos. Además, para cada muestra se corrieron reacciones con el cebador específico para el Factor de Elongación 1 α , el cual fue usado como gen calibrador, para asegurar que la expresión diferencial no fue debida a diferente cantidad de molde inicial de RNA.

El experimento fue llevado a cabo en un termociclador Rotor Gene 6000.

El programa utilizado fue el siguiente:

- 53°C 5 min
 - 95°C 2 min
 - 95°C 15 seg
 - 53°C 60 seg
 - 74°C 10 seg 
 - Curva de melting
- } 45 ciclos

RACE (Rápida Amplificación de los Extremos de ADNc)

Dada la corta extensión de la frecuencia de fragmento 67, no fue posible determinar su identidad por comparación de secuencias en los bancos de datos. Por esta razón se decidió generar un fragmento mayor del transcrito mediante la técnica de 5' RACE (Nature Methods, 2005, Schramm, *et al.*, 2000). Esta técnica utiliza la enzima reverso transcriptasa, el RNA extraído y un cebador universal poli T que contiene en el extremo 5' una secuencia al azar. Este cebador hibrida en la secuencia poli A de los RNA mensajeros y a partir de allí, mediante la enzima reverso transcriptasa, se genera una hebra de ADN copia, que será amplificada mediante el uso de los cebadores específicos de cada gen buscado y un cebador que reconoce la secuencia agregada a la cola poli T (Tabla 4).

Nombre	Secuencia (5'-3')
Poli T + cola 5'	TATAGGCCATCGAGGCC(T) ₂₀
Cola 5'	TATAGGCCATCGAGGCC

Tabla: 4 Cebadores específicos utilizados para la técnica RACE.

Inicialmente, la reacción se llevo a cabo en un volumen de 50 µl conteniendo Buffer colorless con Cl₂Mg 1X y 1.5 mM respectivamente, dNTPs

(0.25 mM), Cebadores (0.2 uM), ADN (1µl) y 1 U. de la Enzima Polimerasa. El programa empleado fue:

- 94°C 5 min
 - 94°C 30 seg
 - 53°C 30 seg
 - 72°C 2 min
 - 72°C 15 min
 - 4°C 48 hs
- } 35 ciclos

Preparación de Muestras para Secuenciar

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

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

Clonado de secuencias

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

El análisis de los transformantes positivos, se realizó mediante una reacción PCR a partir de colonia, usando los cebadores M13 Forward y M13 Reverse (tabla 5).

Nombre	Secuencia
M13 Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tabla: 5 Cebadores M13 específicos para amplificar transformantes positivos por PCR.

Se seleccionaron los clones que presentaron un inserto superior al esperado en el vector autoligado. Las colonias seleccionadas fueron repicadas en medio líquido LB + Ampicilina. A los cultivos con 16 hs de crecimiento a 37°C se los centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos. El plásmido fue purificado siguiendo el protocolo de Fermentas (“GeneJET™ Plasmid Miniprep”); se midió la concentración en NanoDrop ND-1000® y se llevó a cabo una digestión con la enzima *EcoRI* (1U de enzima/1 µg de DNA) para verificar los clones positivos. Las digestiones fueron corridas en geles de agarosa al 1%. En la Figura 11 se pueden observar los sitios de corte de la enzima *EcoRI*.

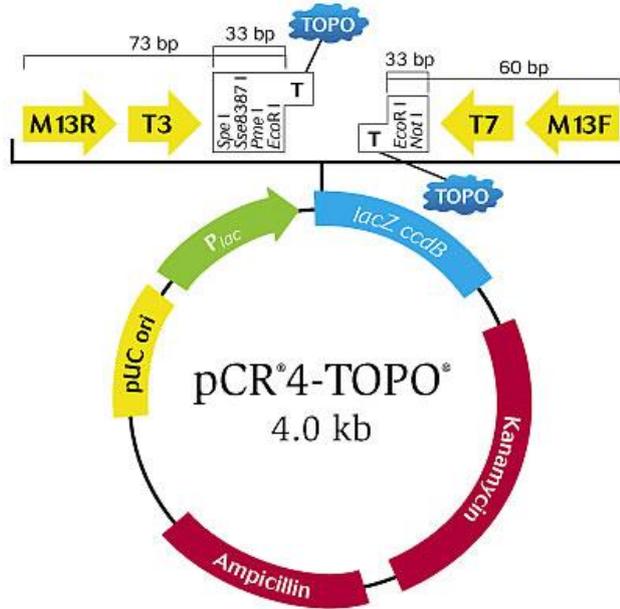


Figura: 11 El mapa muestra las características de la PCR[®] 4-TOPO[®] y la secuencia que rodea el sitio[®] TOPO Cloning. Se pueden observar los sitios de restricción de la enzima *EcoRI*.

Análisis de secuencias

Las secuencias nucleotídicas de los clones generados fue determinada usando los servicios de la empresa MacroGene. Todas las secuencias nucleotídicas obtenidas se procesaron con los programas Chromas lite 2.01 y SeqMan Pro (*DNASTAR lasergene* versión 8.0.2). La identificación molecular de la secuencia consenso se realizó usando el programa MegaBlastn de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

RESULTADOS

Toma de muestra

Las muestras de raíces fueron tomadas luego de la observación de las placas bajo lupa. La figura 12 muestra el tiempo 1 en el cual, el hongo (*Fv*), entra en contacto con la raíz de las plantas de soja. En este tiempo, se tomaron muestras tanto de raíces adyacentes como lejanas al sitio de infección (denominados como RA Fv T1 y RL Fv T2 respectivamente).

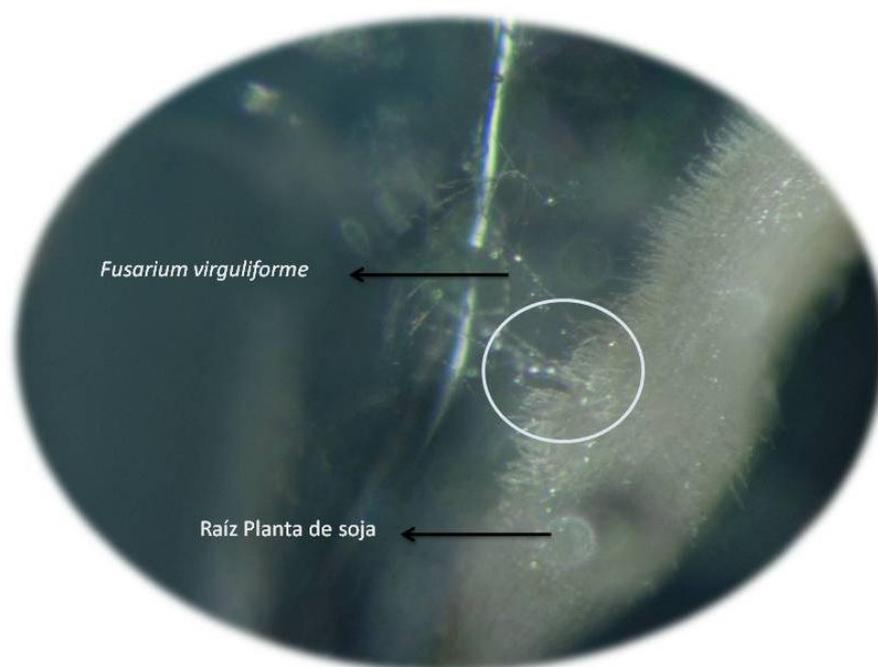


Figura: 12 El círculo indica la zona en la que el hongo patógeno (*Fusarium virguliforme*) entra en contacto con las raíces de soja. A este momento se lo consideró como tiempo 1. Se tomaron muestras de raíces adyacentes y lejanas al sitio de infección.

En la figura 13 se puede observar a *Fv* luego de 48hs de entrar en contacto con las raíces de soja. Se consideró a este muestreo como el tiempo 2, y se identificó a las muestras como RA Fv T2 y RL Fv T2 según la zona muestreada.

También se tomaron muestras de plantas controles sin inocular con *Fv*. Se hizo extracción de RNA a todas las muestras.

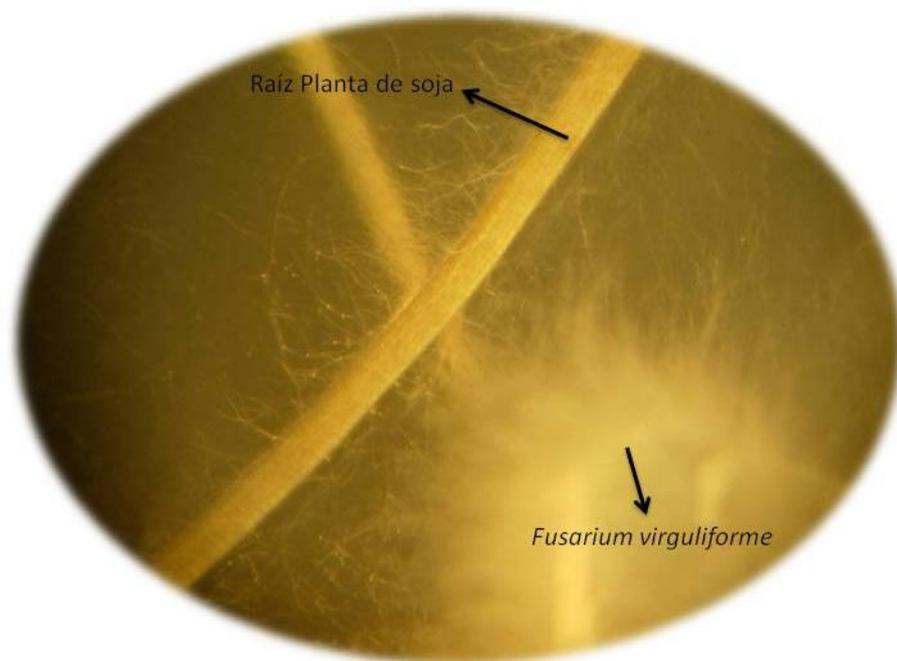


Figura: 13 La figura muestra al hongo patógeno (*Fusarium virguliforme*) luego de 48 hs de haber entrado en contacto con las raíces de soja. A este momento se lo consideró como tiempo 2. Se tomaron muestras de raíces adyacentes y lejanas al sitio de infección.

Extracción de RNA

Mediante el método del Trizol y luego de la eliminación del ADN contaminante pudo obtenerse de a 0.04-0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN total. La integridad del material extraído fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa desnaturalizante (Figura 14). Además, se hizo una estimación visual y se comprobó que la relación de RNA ribosómico 25s/18s fue de aproximadamente 1 para todas las muestras. La pureza se evaluó en base a la relación $A_{260/280}$ que en todos los casos se mantuvo entre 1.8-2.0.

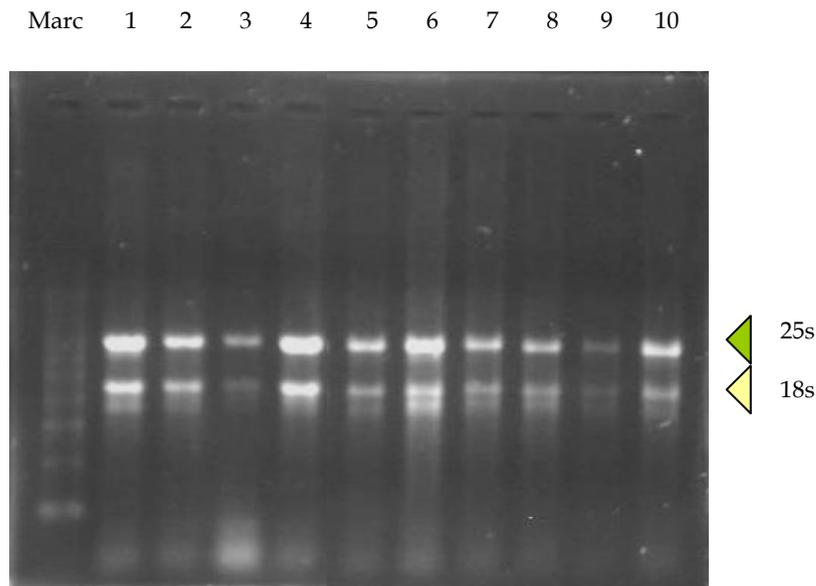


Figura: 14 Muestras de ARN de raíces cultivadas *in vitro* en un gel desnaturalizante de agarosa 1.2%

Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados a partir de ADNc (ADNc-AFLP)

PCR reverso (RT-PCR) Síntesis de ADN copia usando ARN total

Se comprobó la generación de cDNA mediante una reacción de PCR, para amplificar un fragmento de 427 pb, correspondiente a un exón de la enzima antioxidante Catalasa (Figura 15).

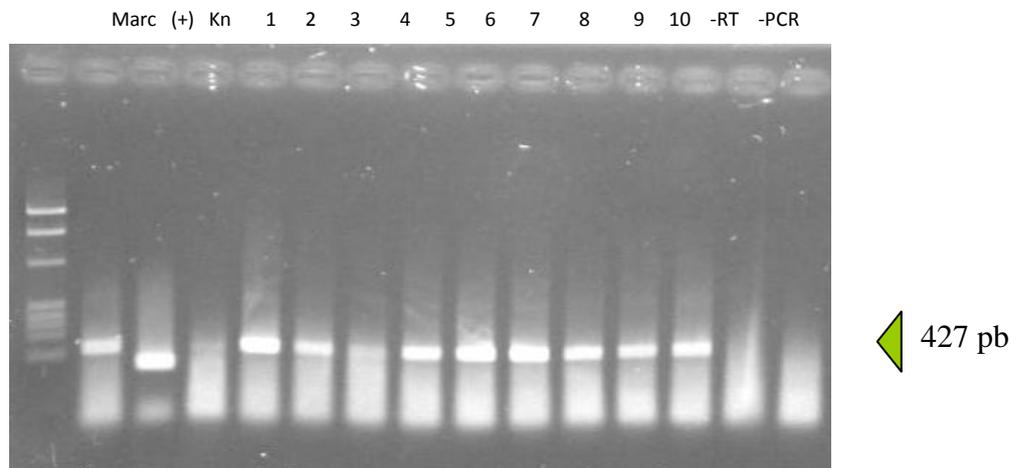


Figura: 15 Gel de agarosa 1% confirmando la amplificación del gen CAT como comprobación de la reacción RT-PCR. (+): Control positivo, Kn: kanamicina, positivo RT, 1-10: muestras problema, -RT: reacción negativa RT, -PCR: negativo. La flecha señala las bandas generadas, cuyo tamaño es de 427pb.

Análisis de geles de poliacrilamida

Los productos de la amplificación selectiva obtenidos mediante la técnica de ADNc-AFLP que fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% (Figura 16), fueron analizadas cuidadosamente, con la ayuda de un transiluminador de luz blanca. Allí se reconocieron los fragmentos polimórficos, eventualmente pertenecientes a genes con expresión diferencial, ya sea por activación o supresión, para los tratamientos control e inoculado con Fv, a las 24 y 48hs post-inoculación con el patógeno.

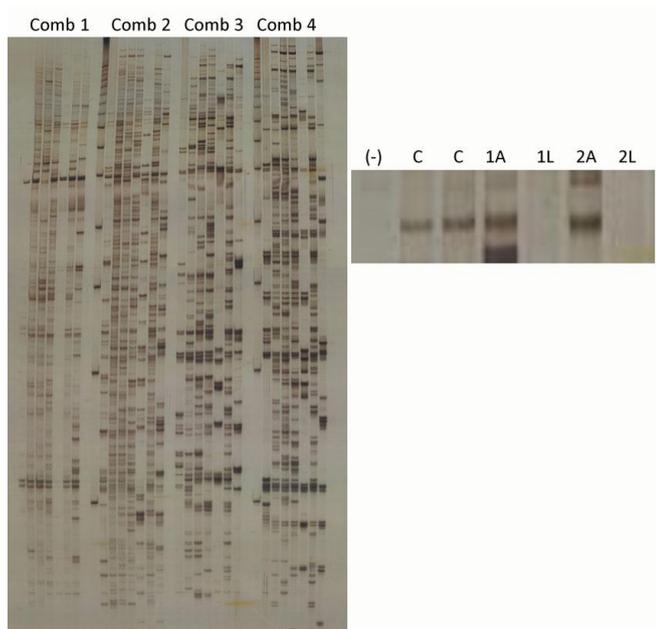


Figura: 16 Gel de poliacrilamida en donde se muestran 4 combinaciones de cebadores específicos. La figura ampliada muestra en detalle y a modo de ejemplo, un polimorfismo diferencial encontrado, donde (-): negativo; C: control 1A: raíz adyacente inoculada con Fv tiempo uno; 1L: raíz lejana inoculada con Fv tiempo uno; 2A: raíz adyacente inoculada con Fv tiempo dos; 2 L: raíz lejana inoculada con Fv tiempo dos.

De los 75 polimorfismos encontrados según las distintas combinaciones de cebadores utilizados durante la técnica cDNA-AFLP, se seleccionó uno, el

denominado fragmento 67, cuya expresión se vio claramente modificada durante la interacción con el patógeno.

El fragmento 67 fue eluido del gel como se indica en materiales y métodos y la secuencia nucleotídica de ambas cadenas fue determinada. Los datos obtenidos fueron procesados con los programas Chromas lite 2.01 y SeqMan Pro (DNASTAR lasergene versión 8.0.2), para determinar el consenso de las cadenas sentido y antisentido.

Diseño de los cebadores para validación por PCR en tiempo real de la expresión diferencial del fragmento 67

En base a parámetros estándares para PCR, se definieron dos cebadores internos a la secuencia determinada para el fragmento 67. La tabla 6 muestra la secuencia de 127pb del fragmento 67 y en rojo, las secuencias de los cebadores diseñados para su amplificación en experimentos de PCR en tiempo real.

Consenso	AAGAGTTGAAGGGATTTGAAC
67	TTGATTCCCTAGGCATTGCGAGTCAAATTTTC TCTATGGCCTCAGCAGTTTTACAGGGACAGTGGATTTCTCCACCACAATCTTGT CACTCTTGGATACATCAGCAATCATGCGTGCTGCACTCTCCCAGTACGT

Tabla: 6 Secuencia consenso del fragmento 67. En rojo pueden observarse los sitios de unión de los cebadores específicos diseñados para validar el resultado por PCR en tiempo real.

Niveles de expresión relativa del fragmento 67

Para calcular los cambios en la expresión de los genes encontrados, se usó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, que supone una eficiencia de reacción de PCR óptima e idéntica (del 100%) tanto para el gen de interés como para el gen de referencia. En este trabajo, se calculó la eficiencia de reacción para los diferentes cebadores, y se comprobó que, tanto el cebador 67 como el Factor de Elongación 1α , mostraron la misma eficiencia.

En los ensayos de PCR en tiempo real, cuando se evaluó el nivel de expresión relativa (Figura 17 y 18), se pudo observar que, cuando *Fv* entraba en contacto con la raíz (tiempo 1), el gen representado por el fragmento 67 incrementaba 161% su expresión en la zona adyacente al sitio de infección en relación al control sin inocular. También se observó un incremento en la expresión del mismo gen para la zona de raíz lejana a este punto (RL *Fv* T1) aunque en menor medida (41%) (Figura 17).

Sin embargo, a las 48 hs post-infección (tiempo 2), la expresión del mismo gen se vio disminuida un 64% para las zonas adyacentes (RA *Fv* T2), mientras que para las zonas lejanas al punto de infección (RL *Fv* T2) esta disminución fue menor, disminuyendo solo un 15% en relación al control (Figura 18). La siguiente tabla muestra la expresión relativa para cada tratamiento medida en porcentajes respecto al control (tabla 7).

Tratamientos	Concentración Relativa	Expresión Relativa al control (%)
Control 67	1	0
RA Fv T1	2,61	161
RL Fv T1	1,41	41
RA Fv T2	0,36	-64
RL Fv T2	0,85	-15

Tabla: 7 La tabla muestra las concentraciones relativas para cada tratamiento y los niveles de expresión relativos al control (medidos como porcentaje).

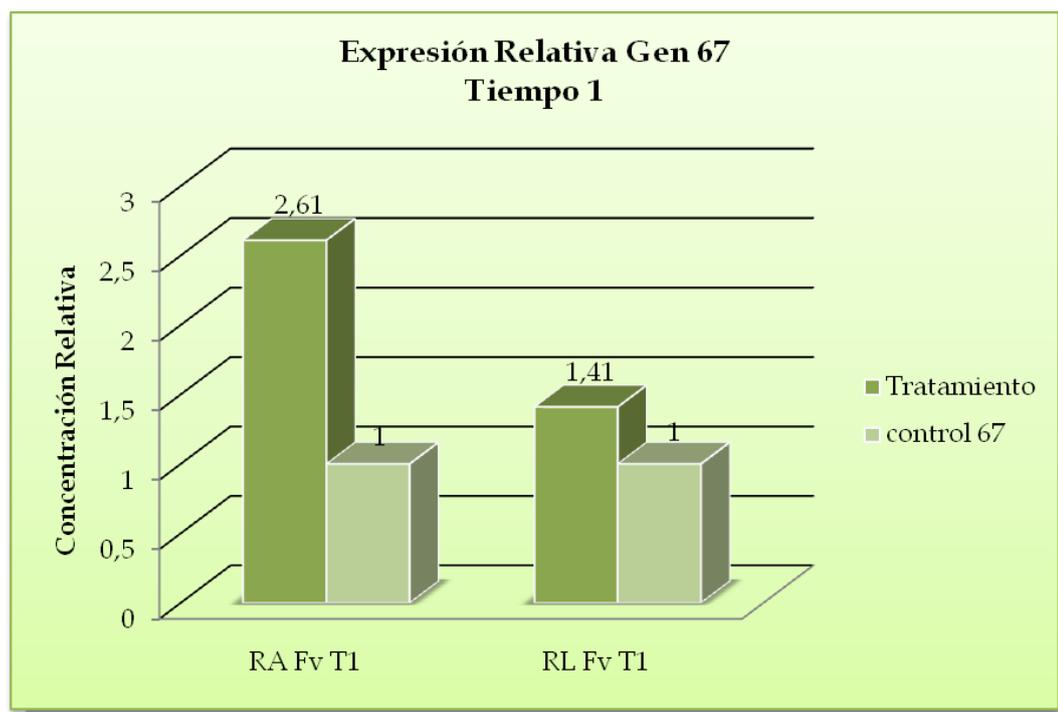


Figura: 17 El gráfico representa los niveles de expresión relativa para el gen 67, en el momento que el hongo entra en contacto con la raíz (tiempo 1). RA Fv T1: Raíz Adyacente, inoculado con *Fusarium virguliforme*, Tiempo 1. RL Fv T1: Raíz Lejana al sitio de infección, inoculada con *Fv*, Tiempo 1.

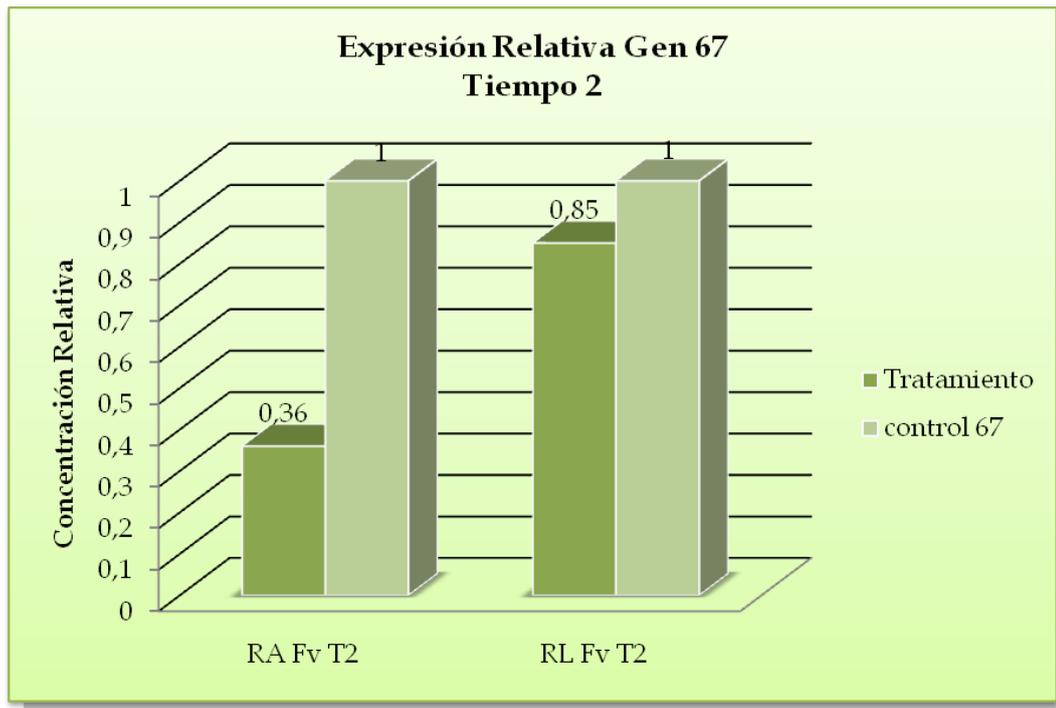


Figura: 18 El gráfico representa los niveles de expresión relativa para el gen 67, a las 48 horas post infección (tiempo 2). RA Fv T2: Raíz Adyacente, inoculado con *Fusarium virguliforme*, Tiempo 2. RL Fv T2: Raíz Lejana al sitio de infección, inoculada con Fv, Tiempo 2.

Luego de realizada la reacción de PCR en tiempo real, las muestras fueron corridas en gel de agarosa, donde se comprobó el tamaño de fragmento amplificado (127 pb). El orden de siembra fue el siguiente: C: Control (sin inocular), 1: Raíz adyacente inoculada con Fv tiempo 1 (RA Fv T1), 2: Raíz adyacente inoculada con Fv tiempo 2 (RA Fv T2), 3: Raíz lejana inoculada con Fv tiempo 1 (RL Fv T1) y 4: Raíz lejana inoculada con Fv tiempo 2 (RL Fv T2) (Figura 19).

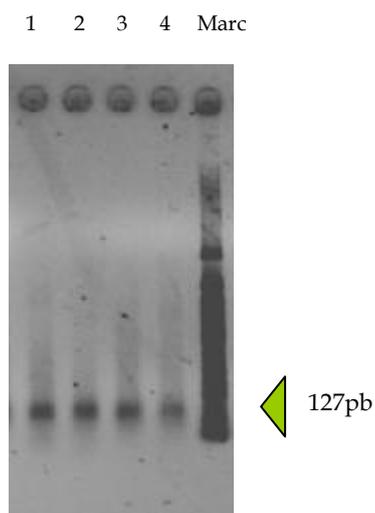


Figura: 19 Gel de agarosa 2%. 1: Raíz adyacente inoculada con Fv tiempo 1 (RA Fv T1), 2: Raíz adyacente inoculada con Fv tiempo 2 (RA Fv T2), 3: Raíz lejana inoculada con Fv tiempo 1 (RL Fv T1) y 4: Raíz lejana inoculada con Fv tiempo 2 (RL Fv T2). La flecha indica el tamaño del amplicón.

RACE (Rápida Amplificación de los Extremos de ADNc)

La primera cadena de cDNA fue sintetizada usando el cebador poliT + cola 5', como se describió previamente. Luego, la segunda reacción de PCR, fue llevada a cabo con el cebador específico que hibrida con la región de la cola 5' y el cebador 67R (ver tabla 4 y 3 respectivamente) diseñado para las reacciones de PCR en tiempo real. De esta manera se obtuvo un fragmento de 1400pb, un tamaño mayor al obtenido por PCR en tiempo real (Figura 20).

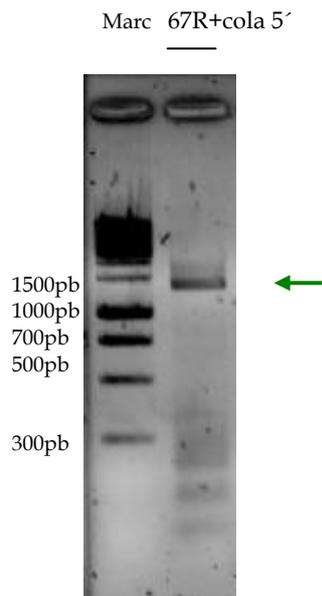


Figura: 20 Gel de agarosa 2%. La flecha muestra la banda amplificada a partir de los cebadores cola 5' y 67R, la cual muestra un tamaño aproximado de 1400pb.

Clonado del Fragmento

La secuencia 67 amplificada fue clonada en el plásmido vector pCR[®] 4-TOPO[®]. Se analizaron los transformantes positivos mediante PCR a partir de colonia y se seleccionaron los clones 67.1, 67.5, 67.8 y 67.10 para su posterior análisis.

Los clones seleccionados, se digirieron con la enzima *EcoRI*. Después de realizado el gel de agarosa, se observaron bandas cuyo tamaño fue próximo a 1400 pb. Se tomaron como positivos los clones 67.1 y 67.8. Los mismos fueron mantenidos en glicerol a -80°C.

Identificación molecular de la secuencia 67

Los clones con el fragmento adecuado fueron enviados a secuenciar a la empresa Coreana Macrogen. Una vez obtenida la secuencia 67, se analizó la misma mediante la herramienta Chromas lite 2.01 y SeqMan Pro (DNASTAR lasergene versión 8.0.2) y se obtuvo la siguiente secuencia consenso:

	ACATGATTACGCCAGCTCAGAATTAACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTA
	AACGAATTCGCCCTTGCTGATGTATCCAAGAGTGACAAGATTGTGGTGGAGAAATCC
	ACTGTCCCTGTGAAAAGTCTGAGGCCATAGAGAAGATTTTGACTCACAATGGAAAAG
	GGAATCAAGTTCAAATCCTTTCAAACCCTGAATTCCTTGCTGAGGGAAGTCAATCC
	AAGATCTTTTCAACCCGGATCGAGTCCTAATTGGAGGCAGGGAGACCCAGAAGGCC
	AAAAAGCAATTCAAACATTGAAAAATGTGTATGCTCATTGGGTTCTGAGAAGAAAA
	TTCTAACCACAAACCTCTGGTCTGCTGAGCTATCCAAGCTTGCTGCTAATGCCTTTTTG
Secuencia	GCACAGAGAATTTTCATCTGTGAATGCTATGTCAGCACTTTGTGAGGCCACTGGGGCA
consenso	AATGTCACACAAGTTTCCTATGCTGTTGGCACAGACACAAGGATTGGACCGAAATTC
del gen 67	TCAATGCTAGTGTGGTTTTGGTGGATCCTGCTTCCAGAAGGATATCTTGAACCTTGTC
	TACATCTGTGAATGTAATGGCCTTCCAGAGGTGGCTGAGTACTGGAAACAAGTGATC
	AAGGTCAATGATTACCAGAAGAGCCGTTTCGTGAACCGCGTGGTTTCGTCATGTTTA
	ACACTGTTGCAACCAAAAAGATAGCAATTCTTGGGTTTGCATTCAAGAAGGACACTG
	GTGACACAAAGGGAGACACCAGCCATTGATGTGTGCAAGGGACTACTCGGCGACAA
	GGCGCGCCTAAGCATATATGATCCACAGTCACTGAGGACCAATTCAGAGGGATTTA
	TGGATGAACAGTTTGATTGGGACACCCTATTCACTTGCAGCCACTAGTCCTACACTGA
	GAAGAAAGTTAGTGTGTTGG

Tabla: 8 Secuencia consenso obtenida para el gen 67.

Se analizó la secuencia en el programa MegaBlastn de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), en la tabla 9 se resumen las

principales secuencias con las que presentó similitud la secuencia consenso 67. En la figura 21 se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas obtenidas en el Genbank y la secuencia 67.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AK286096.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-21-N19	1552	1552	92%	0.0	98%
BT099482.1	Soybean clone JCVI-FLGm-26P24 unknown mRNA	1546	1546	92%	0.0	98%
AK287356.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-51-D20	1280	1280	89%	0.0	94%
U53418.1	Glycine max UDP-glucose dehydrogenase mRNA, complete cds	929	929	92%	0.0	86%
BT095417.1	Soybean clone JCVI-FLGm-25K19 unknown mRNA	913	913	92%	0.0	85%
AK285878.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-17-N18	863	863	50%	0.0	99%

Tabla: 9 Secuencias del Genbank con las cuales el consenso 67 presentó similitud, según el programa blastn.

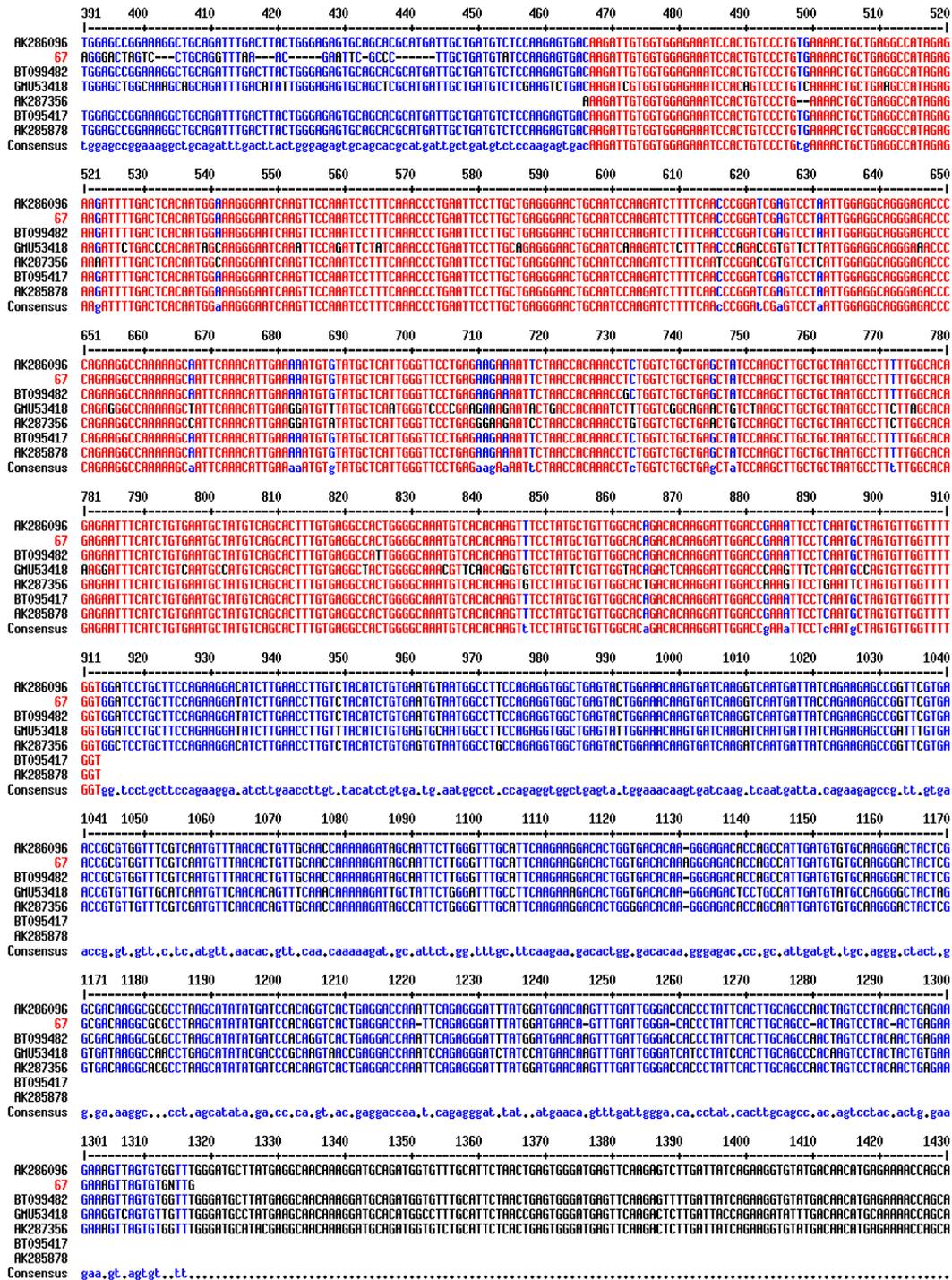


Figura: 21 Alineamiento múltiple de la secuencia consenso 67 y las secuencias obtenidas en el Genbank.

Usando la herramienta SeqBuilder (*DNASTAR lasergene* versión 8.0.2) se obtuvieron los marcos de lectura abiertos (ORF) correspondientes a la secuencia 67. En la figura 22 se muestra el ORF a partir del cual se hizo el análisis en el NCBI. En la tabla 10 se muestra la secuencia de aminoácidos que corresponde al ORF con el cual, después de buscar en la base de datos de proteínas (Blastp) en el NCBI, se encontró que la misma, muestra similitud con la proteína UDP-glucosa 6 dehidrogenasa.

```

5  CATGATTACGCCAGCTCAGAATTAACCCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTGCTGATGTATCCAAGAGT 91
2  H D Y A S S E L T L T K G T S P A G L N E F A L A D V S K S
2  |
5  GACAAGATTGTGGTGGAGAAATCCACTGTCCTGTGAAAACCTGCTGAGGCCATAGAGAAGATTTTGACTCACAAATGGAAGGGAATCAAG 181
2  D K I V V E K S T V P V K T A E A I E K I L T H N G K G I K
2  |
5  TTCCAAATCCTTTCAAACCCCTGAATTCCTTGCTGAGGGAACTGCAATCCAAGATCTTTTCAACCCGGATCGAGTCCTAATTGGAGGCAGG 271
2  F Q I L S N P E F L A E G T A I Q D L F N P D R V L I G G R
2  |
5  GAGACCCAGAGGCCAAAAAGCAATTCAAACATTGAAAAATGTGTATGCTCATTGGGTTCTGAGAAGAAAATTCAAACCACAAACCTC 361
2  E T P E G Q K A I Q T L K N V Y A H W V P E K K I L T T N L
2  |
5  TGGTCTGCTGAGCTATCCAAGCTTGCTGCTAATGCCTTTTTGGCACAGAGAATTCATCTGTGAATGCTATGTCAGCACTTTGTGAGGCC 451
2  W S A E L S K L A A N A F L A Q R I S S V N A M S A L C E A
2  |
5  ACTGGGGCAAATGTCACACAAGTTTCCTATGCTGTTGGCACAGACACAAGGATTGGACCGAAATTCCTCAATGCTAGTGTGGTTTTGGT 541
2  T G A N V T Q V S Y A V G T D T R I G P K F L N A S V G F G
2  |
5  GGATCCTGCTTCCAGAAGGATATCTTGAACCTTGCTACATCTGTGAATGTAATGGCCTTCCAGAGGTGGCTGAGTACTGGAACAAGTG 631
2  G S C F Q K D I L N L V Y I C E C N G L P E V A E Y W K Q V
2  |
5  ATCAAGGTCAATGATTACCAGAAGAGCCGGTTCGTGAACCGTGGTTTCGTCAATGTTTAACTGTTGCAACCAAAAAGATAGCAATT 721
2  I K V N D Y Q K S R F V N R V V S S M F N T V A T K K I A I
2  |
5  CTGGGTTTGCATTCAAGAAGGACACTGGTGACACAAAGGGAGACACCAGCCATTGA
2  L G F A F K K D T G D T K G D T S H .
2  |

```

Figura: 22 Secuencia de nucleótidos correspondientes a la secuencia 67 y la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente al ORF 1.

HDYASSELTLTKGTSPAGLNEFALADVSKDKIVVEKSTVPVKTAEAIEKILTHNGKGIKQILSNPEFL
ORF 1 AEGTAIQDLFNPDRVLIGGRETPEGQKAIQTLKNVYAHVWVPEKKILTTLNLSAELSKLAANAFLAQR
 ISSVNAMSALCEATGANVTQVSYAVGTDTRIGPKFLNASVGFGGSCFQKDILNLVYICECNGLPEVA
 EYWKQVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVATKKIAILGFAFKKDTGDTKGDTSH

Tabla: 10 Secuencia de aminoácidos deducida que corresponde al marco de lectura abierto usado para comparar con la base de datos de proteínas del NCBI.

El análisis de los resultados obtenidos en el Blastp mostró además que la secuencia 67 presenta un dominio conservado correspondiente a la superfamilia de la UDP-glucosa/GDP-manosa deshidrogenadas (UDPG_MGDP_dh (cl03053)) y un multidominio correspondiente a la UDP-glucosa 6-dehidrogenasa (PLN02353) (Figura 23).

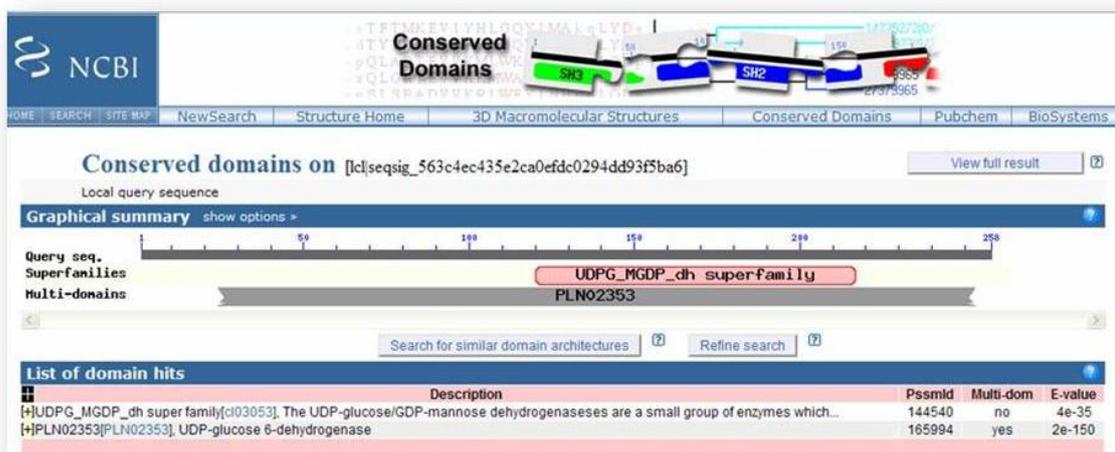


Figura: 23 Gráfica de similitud con la superfamilia UDPG_MGDP_dh [cl03053] y al multidominio UDP-glucose 6-dehidrogenase (PLN02353), obtenidos usando Blastp.

DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis describe la variación en la expresión génica en plantas de soja (*Glycine max*) en respuesta al estrés biótico generado durante la interacción con el hongo patógeno *Fusarium virguliforme*.

De los resultados obtenidos en la base de datos del GenBank se observó que el fragmento 67, seleccionado a partir de la técnica cDNA-AFLP, mostró una altísima similitud con la proteína UDP-glucosa 6 dehidrogenasa, comprobándose de esta manera la identidad del fragmento seleccionado por su expresión diferencial la cual se vio claramente modificada durante la interacción con el patógeno. Estos resultados también revelaron que dicha proteína presenta dominios conservados correspondientes a UDP-Glucosa 6 dehidrogenasa (UDP-GlcDH, EC 1.1.1.22) y a la UDP-glucosa/GDP-manosa deshidrogenadas (UDPG-MGDDP-dh).

La UDPG-MGDDP-dh es un pequeño grupo de enzimas que poseen la capacidad de catalizar la oxidación, dependiente de NAD, de un alcohol a un ácido sin la liberación de un aldehído como intermediario (Campbell, *et al.*, 1997, Roychoudhury, *et al.*, 1989a, Roychoudhury, *et al.*, 1989b, Roychoudhury S, 1989) La UDP-glucosa dehidrogenasa (UDP-GlcDH, EC 1.1.1.22) cataliza la oxidación de la UDP-glucosa (UDP-Glc) y la convierte en UDP-acido glucuronico (UDP-GlcA). El UDP-GlcA es precursor de muchos nucleótidos de azucares, incluyendo UDP-ácido galacturonico (UDP-GalA), UDP-xilosa (UDP-Xyl), UDP-

arabinosa (UDP-Ara) y UDP-apiosa, que son sustratos para la síntesis de los polímeros de pectina y hemicelulosa (Gibeaut and Carpita, 1994).

Este grupo de enzimas tienen un amplio rango de funciones. En las plantas, la enzima UDP-GlcDH (EC: 1.1.1.22), participa en la síntesis de hemicelulosa y pectina (Johansson, *et al.*, 2002), que son los principales componentes de la pared celular. En organismos como el pez cebra, la misma enzima es utilizada para la formación de la válvula cardiaca (Walsh and Stainier, 2001), mientras que, en la bacteria fitopatogénica *Xanthomonas campestris*, la UDP-glucosa deshidrogenasa es requerida para la virulencia (Chang, *et al.*, 2001).

El análisis de los componentes de la pared celular de *Arabidopsis thaliana* ha revelado que, aproximadamente el 50% de la biomasa de la pared celular deriva de UDP-GlcA mientras que el 30% deriva de UDP-Glc como precursor de celulosa y xiloglucanos (Zabackis, *et al.*, 1995). Se ha demostrado que la UDP-GlcDH es la enzima limitante en la biosíntesis de los polisacáridos no celulósicos de la pared celular, sugiriendo que es un paso regulatorio clave (Amino, *et al.*, 1985, Dalessandro and Northcote, 1977a, Dalessandro and Northcote, 1977b). A pesar de la importancia de la pared celular vegetal, poco se conoce sobre esta enzima en plantas. La UDP-GlcDH es codificada por el gen Ugd, que fue clonado (Tenhaken and Thulke, 1996) y secuenciado en soja y que el mismo tiene una alta homología con la única otra secuencia conocida en eucariotas (caracterizada a partir de hígado bovino). También se vio que es altamente conservado entre diferentes especies vegetales (Hempel, *et al.*, 1994). Es evidente que los genes

de la Ugd están presentes en casi todos los organismos, con excepción de algunos pocos microorganismos con un genoma secundariamente reducido como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A menudo varias isoformas de Ugd están presentes en plantas, un hallazgo que, hasta el momento, sólo ha sido estudiado en maíz (Karkonen, *et al.*, 2005).

Seitz y col. (2000) demostraron que la expresión del gene Ugd en *Arabidopsis* está controlada a nivel de la transcripción y que es expresado en tejido en crecimiento, especialmente en el sistema vascular (Seitz, *et al.*, 2000).

Durante el desarrollo de esta tesis se pudo observar que, para esta interacción planta-patógeno, la expresión del gen Ugd se vio diferencialmente expresada tanto temporal como espacialmente. Los resultados de validación mediante PCR en tiempo real demostraron que, durante una fase temprana de la infección, el gen Ugd incrementa notablemente su expresión, en relación al control sin inocular. Esta variación estuvo relacionada con el sitio de infección, ya que el aumento de dicha expresión fue menor para aquellas raíces que fueron cosechadas en zonas distantes al punto inoculación (RL Fv T1) (Figura 17). Esto podría estar relacionado con la reacción de defensa inducida, ya que es sabido que cuando la célula detecta la presencia de un organismo patógeno, se activan una serie de mecanismos de defensa, y que esta reacción es más severa a nivel local, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno, y más débil a nivel sistémico, en los tejidos no infectados de la planta (Benezer-Benezer, *et al.*, 2008).

En el año 2004, Moy y colaboradores reportaron que, luego de haber inoculado plantas de soja con el patógeno fúngico *Phytophthora sojae*, un total de 7.7% genes del huésped fueron regulados de manera positiva durante un período de 3-48 h después de la inoculación; y que dichos genes incluían proteína relacionadas con la defensa y la patogénesis (Moy, *et al.*, 2004).

Un estudio previo llevado a cabo por Iqbal y colaboradores (2002) demostró que, raíces de soja infectadas con *Fv* provocaron un aumento en la cantidad de transcritos luego de 14 días de inoculación, y que estos aumentos estaban relacionados con la síntesis de pared celular (Iqbal, *et al.*, 2002).

Rodríguez-Gálvez y Mendgen (1995) han reportado que *F. oxysporum* en un primer momento solo colonizan la superficie de la raíz, produciendo una masa densa de micelio. Este micelio no altera la morfología de la raíz, ni tiene efectos perjudiciales en el desarrollo radicular. En este momento, las hifas no penetran las células vegetales, pero inducen la síntesis de pared celular (Rodríguez-Gálvez and Mendgen, 1995). Observaciones similares fueron hechas para otras especies de *F. oxysporum* (Brammall and Higgins, 1988, Parry and Pegg, 1985, Smith and Peterson, 1983) y para otros patógenos de suelo como *Rhizotonia* y *Pythium* (Huisman and Gerick, 1989).

Los autores observaron también que, luego de 24 h de la inoculación, *F. oxysporum* invade los órganos vegetales y comienza a penetrar la raíz de manera inter o intracelular, dando lugar a la inducción y la expresión sostenida de

algunos genes relacionados con la defensa (Rodríguez-Gálvez and Mendgen, 1995). Xu y Mendgen (1997) han demostrado que la cutícula que rodea el sitio de penetración, sufre cambios en su estructura, probablemente como resultado de la actividad enzimática. Los autores indican que, en esta zona, tanto la pectina como los xyloglucanos son degradados.

La deposición adicional de pared celular que se produce durante el crecimiento del hongo dentro de la célula vegetal, incluye una gran cantidad de epitopes de ácido poligalacturónico. Mientras que la capa externa de la epidermis se mantiene sin cambios después de la infección, la capa interna muestra un aumento dramático en el número de estos epitopes (Xu and Mendgen, 1997). Sin embargo, al evaluar la expresión del gen *Ugd* luego de 48 h de haber inoculado las plantas con *Fv* (tiempo 2), se observó que la misma disminuyó notablemente, en relación a los controles sin inocular; y que esta disminución fue más acentuada para aquellas muestras tomadas en las zonas adyacentes al sitio de infección (RA *Fv* T2), que para las zonas lejanas a este punto (RL *Fv* T2) (Figura 18). Algunos reportes indican que, una vez que el hongo penetra las células del huésped, se genera una zona de interfaz entre el patógeno y el hospedante. Estas zonas muestran similitud con los organismos biotróficos (Harder D.E., 1990, Harder and Chong, 1990, Knauf G.M., 1989), hemibiotróficos (O'Connell, 1987) y con hongos micorrizicos (P. Bonfante-Fasolo; R. Peretto and Perotto, 1992). En este punto, la pared fúngica es rodeada por una gran matriz con propiedades de tinción similar a la pared normal de la

planta. La membrana plasmática que rodea esta estructura no muestra evidencias de degradación, mostrando similitud a las modificaciones de la membrana extra-haustorial en interacciones biotróficas (Knauf, *et al.*, 1989). Es común que los patógenos fúngicos desarrollen una fase latente dentro del huésped antes de causar algún tipo de daño (Fisher and Petrini, 1992).

Algunos estudios sugieren que *Fusarium* presenta una corta “fase endófito o biotrófica”, en la cual, puede infectar los tejidos vegetales sin causar daños importantes (Rodríguez-Gálvez and Mendgen, 1995, Yuan, *et al.*, 2008).

Los resultados de este trabajo de tesis permiten concluir que, cuando *F. virguliforme* entra en contacto con la raíz de plantas de soja, las células vegetales responden tanto de manera espacial como temporal al ataque del hongo patógeno. Esta respuesta mostró, en un primer momento, un incremento importante en la cantidad de transcriptos correspondientes al gen *Ugd*, el cual sintetiza una proteína con actividad enzimática, la UDP-glucosa 6 dehidrogenasa. Esta proteína participa en la biosíntesis de pared celular, proceso que se ve claramente modificado durante los diferentes estadios de la infección fúngica. El contacto inicial entre las raíces y el micelio fúngico provocan un marcado aumento en la producción de componentes de la pared celular. Esta variación puede estar relacionada con la producción de enzimas fúngicas, las cuales degradan la pared celular vegetal para poder penetrar e infectar el interior celular. Esta degradación es localizada, justo en la zona de penetración de la hifa. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que, luego de dos días de

haber inoculado, el mismo gen mostró una regulación negativa comparada con el control sin inocular. Esto tiene una clara relación con la capacidad de *Fusarium* de crecer de manera semi-biotrófica; es capaz de utilizar haustorios para alimentarse de células vivas, o puede utilizar la degradación enzimática y alimentarse de células muertas (Roy et al. 1998). Esta “doble vida” permite al hongo crecer de manera endófito, sin producir daño alguno en las células.

Es importante destacar que, si bien estos resultados nos permiten observar modificaciones en la expresión de un gen particular, el cual está relacionado con la entrada del patógeno en las células vegetales, quedan por analizar 74 polimorfismos (encontrados inicialmente con la técnica de cDNA-AFLP). Estos futuros estudios nos permitirán tener una idea más clara de qué genes están involucrados en la respuesta de defensa durante un período corto de interacción con el patógeno.

BIBLIOGRAFÍA

Abad, A. K. J. and Khara, J. 2007. Effect of Cadmium Toxicity on the Level of Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzymes Activity in Wheat Plants Colonized by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10: (14) 2413-2417.

Amino, S.; Takeuchi, Y. and Komamine, A. 1985. Changes in the enzyme activities involved in formation and interconversion of UDP-sugars during cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus* *Physiol. Plant* 64 111-117.

Anderson, T. and Tenuta, A. 1998. First report of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* causing sudden death syndrome of soybean in Canada *Plant Dis.* 82: 448.

Aoki, T.; O'Donnell, K.; Homma, Y.; Lattanzi, A. and 2003. Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex, *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* 95: 660-684).

Aoki, T.; O'Donnell, K.; Scandiani, M. and 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *Fusarium cuneirostrum* sp. nov., *Fusarium tucumaniae* and *Fusarium virguliforme*. *Mycoscience* 46: (3) 162-183.

Benezer-Benezer, M.; Castro-Mercado, E. and García-Pineda, E. 2008. La producción de Especies Reactivas de Oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: (1) 56-61.

Bent, A. and Mackey, D. 2007. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology*. 45 399-436.

Bolsa de Comercio de Rosario. 2009. Con área récord y buen clima se superarían los 50 M de Tn de soja. *Informes Especiales* 22/12/2009. <http://www.bcr.com.ar/gea/>

Brammall, R. and Higgins, V. 1988. A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible and resistant to *Fusarium* crown root rot disease. *Can J Plant Pathol*. 66: 915-925.

Bressano, M.; Giachero, M.; Luna, C.; Ducasse, D. and 2009. An In Vitro Method For Examining Infection Of Soybean Roots By *Macrophomina Phaseolina*, *Physiological and Molecular Plant. Pathology*, doi: 10.1016/j.pmpp.2009.12.003

Campbell, R.; Sala, R.; van de Rijn, I. and Tanner, M. 1997. Properties and kinetic analysis of UDP-glucose dehydrogenase from group A streptococci. Irreversible inhibition by UDP-chloroacetol. *J Biol Chem.* 272: (6) 3416-3422.

Carmona, M.; Ploper, L.; Grijalba, P.; Gally, M. and Barreto, D. 2003. Enfermedades de fin de ciclo del cultivo de soja. Guía para su reconocimiento y manejo. Editado por Syngenta. 20 pp.

Carmona, M., Gally, M., Grijalba, P., Sugia, V., & Jaeggi, E. . 2004. Frequency and chemical control of causal pathogens of soybean late season diseases in the Pampeana Region. VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congreso Mundial de Soja. Foz de Iguazú. Brasil.

Collinge, D.; Gregersen, P. and Thordal-Christensen, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In *Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches.* Basra,AS. ed. New York, Marcel Dekker. 391-433.

Collinge, D.; Borch, J.; Madriz-Ordeñana, K. and Newman, M. 2001. The responses of plants to pathogens. In *Hawkesford,MJ; Buchner, P. Molecular analysis of plant adaptation to the environment.* Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers.

Costamilan, L. M. 2000. Estresses ocasionados por doenças e por nematóides. Estresses em soja. E. Rizzo Bonato, ed. EMBRAPA Trigo. 145-200

Cuniberti, M.; Herrero, R.; Macagno, S. and Berra, O. 2007. Calidad industrial y sanitaria de la soja en la región núcleo sojera. Cosecha 2006-07. Boletín Informativo del INTA Marcos Juárez. Agosto/07

Chang, K.; Weng, S. and Tseng, Y. 2001. UDP-glucose dehydrogenase gene of *Xanthomonas campestris* is required for virulence. *Biochem Biophys Res Commun.* 287: (2) 550-555.

Chen, Z.; Silva, H. and Klessig, D. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science.* 262: 1883-1886.

Dalessandro, G. and Northcote, D. 1977a. Possible control sites of polysaccharide synthesis during cell growth and wall expansion of pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta.* 134 39-44.

Dalessandro, G. and Northcote, D. 1977b. Changes in enzymatic activities of nucleoside diphosphate sugar interconversions during differentiation of cambium to xylem in sycamore and poplar *Biochem. J.* 162 267-279.

Dangl, J. and McDowell, J. 2006. Two modes of pathogen recognition by plants. *PNAS.* 103 (23) 8575-8576.

Delaney, T.; Uknes, S.; Vernooij, B.; Friedrich, L.; Weymann, K.; D, N.; Gaffney, T.; Gut-Rella, M.; Kessmann, H.; Ward, E. and Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*. 266: 1247-1250.

Dong, X. N. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 1: 316-323.

Durrant, W. and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 42: 185-209.

Fisher, P. and Petrini, O. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist*. 120: (1) 137-143.

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9: 275-296.

Formento, N. 2001. Labranzas, secuencias de cultivos y enfermedades en el cultivo de soja. www.inta.gov.ar

Foyer, C.; López-Delgado, H.; Dat, J. and Scott, I. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*.

GEA. 2002. Para la Bolsa de Rosario la cosecha de soja superaría los 50 millones de toneladas. <http://www.bcr.com.ar/gea/>. 22/12/09.

Gibeaut, D. and Carpita, N. 1994. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.* 8: 904-915.

Giorda, L. M. and Baigorri, H. E. J. 1997. El cultivo de la soja en Argentina. 448.

Glazebrook, J. 1999. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology.* 2: 280-286.

Glazebrook, J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* -2001 status. *Current Opinion in Plant Biology.* 4: 301-308.

Goeke, S.; Kim, K.; Rupe, J. and Cho, J. 2000. Cellular responses of soybean to root infection by *Fusarium solani* f. sp. *Glycines*. *Phytopathology.* 90: S28.

Gozzo, F. 2003. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 51: (16) 4487-4503.

Grant, M. and Lamb, C. 2006. Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology.* 9: (4) 414-420.

Harder D.E., C. J. 1990. Rust haustoria. Mendgen K, Leseman DE (eds) Electron microscopy of plant pathogens. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo. 235-250.

Harder, D. E. and Chong, J. 1990. Rust haustoria. Mendgen K, Leseman DE (eds) Electron microscopy of plant pathogens. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo. 235-250.

Hempel, J.; Perozich, J.; Romovacek, H.; Hinich, A.; Kuo, I. and Feingold, D. 1994. UDP-glucose dehydrogenase from bovine liver: primary structure and relationship to other dehydrogenases. Protein Sci. 3: 1074-1080.

Huisman, O. and Gerick, J. 1989. Dynamics of colonization of plant roots by *Verticillium dahliae* and other fungi. In: Tjamos EC, Beckman CH (eds) Vascular wilt disease of plants. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo. 1-17.

Hutcheson, S. 1998. Current concepts of active defense in plants. Annual Review of Phytopathology. 36: 59-90.

Iqbal, M.; Yaegashi, S.; Njiti, V.; Ahsan, R.; Cryder, K. and Lightfoot, D. 2002. Resistance locus pyramids alter transcript abundance in soybean roots inoculated by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Mol Genet and Genom. 268: 407-417.

Ivancovich, A.; Botta, G. and Annone, J. 1992. Síndrome de la muerte repentina en cultivos de soja en el área de la EEA INTA Pergamino. Carpeta de producción Producción Vegetal. Tomo XI Información N° 94.

Johansson, H.; Sterky, F.; Amini, B.; Lundeberg, J. and Kleczkowski, L. 2002. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDP-glucose dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation. *Biochim Biophys Acta*. 1576: (1-2) 53-58.

Jorunn; Bos; Miles Armstrong; Stephen; Whisson; Trudy; Torto; Mildred Ochwo; Paul R.J. Birch and Sophien Kamoun. 2003. Intraspecific comparative genomics to identify avirulence genes from *Phytophthora*. *New Phytologist*. 159: 63-72.

Karkonen, A.; Murigneux, A.; Martinant, J.; Pepey, E.; Tatout, C.; Dudley, B. and Fry, S. 2005. UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentose biosynthesis. *Biochem J* 391: 409-415.

Klessig, D. and Malamy, J. 1994 The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26: 1439-1458.

Knauf, G.; Welter, K.; Mtiler, M. and Mendgen, K. 1989. The haustorial host-parasite interface in rust-infected bean leaves after highpressure freezing. *Physiol Mol Plant Pathol*. 34: 519-530.

Knauf G.M., W. K., Mtiller M., Mendgen K. . 1989. The haustorial host-parasite interface in rust-infected bean leaves after highpressure freezing. . *Physiol Mol Plant Pathol* 34:: 519-530.

Knoester, M.; Van Loon, L.; Van den Heuvel, J.; Henning, J.; Bol, J. and Linthorst, H. 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 1933-1937.

Lago, M. E. 2009. Enfermedades de tallo y raíz en soja. *Fitopatología EEA Oliveros INTA*.

Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R. and Lamb, C. 1994. H₂O₂ from oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 79: 583-593.

Lorenzo, O.; Piqueras, R.; Sanchez-Serrano, J. and Solano, R. 2003. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. . *Plant Cell.* 15: 165-178.

Lorenzo, O.; Chico, J.; Sanchez-Serrano, J. and Solano, R. 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonateregulated defence responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* , en prensa.

Marrs, K. 1996. The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant and Molecular Biology*. 47: 127-158.

McDowell, J. and Dangl, J. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25: 79-82.

Moy, P.; Qutob, D.; Chapman, B.; Atkinson, I. and Gijsen, M. 2004. Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. *Mol Plant Microbe Interact* (17) 10.

Nakayima, T. M., T., and Charchar, M.J.D. 1996. First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. . *Japan Agric. Research Quarterly (JARG)* 30: 31-34.

Nature Methods. 2005. Rapid amplification of 5[prime] complementary DNA ends (5[prime] RACE). *Nat Meth* 2: (8) 629-630.

O'Connell, R. J. 1987. Absence of a specialized interface between intracellular hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and cells of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol* 107:: 725-734.

P. Bonfante-Fasolo; R. Peretto and Perotto, S. 1992. Cell surface interactions in endomycorrhizal symbiosis. In: Callow JA, Green JA (eds) Perspectives in plant cell recognition. Cambridge University Press, Cambridge 239-255.

Panabieres, F.; Marais, A.; Le Berre, J.; Penot, I.; Fournier, D. and Ricci, P. 1995. Characterization of a Gene Cluster of *Phytophthora cryptogea* which codes for Elicitins, proteins inducing a Hypersensitive-Like Response in Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8 (6) 996-1003.

Parbery, D. 1996. Trophism and the ecology of fungi associated with plants. *Biol Rev Cambridge Philosophic Soc*. 71: (473-527)

Parry, D. and Pegg, C. 1985. Surface colonization, penetration and growth of three *Fusarium* species in lucerne *Medicago sativa*. *Trans Br Mycol Soc*. 85: 495-500.

Penninckx, I.; Thomma, B.; Buchala, A.; Mettraux, J. and Broekaert, W. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin. *Plant Cell*. 10: 2103-2113.

Pieterse, C. and Van Loon, L. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 7: (4) 456-64.

Ploper, L.; Chavarría, A.; Zarzosa, I.; Díaz, C. and Ramallo, J. 1995. Efectos del sistema de labranza, la rotación de cultivos, y la fertilización fosforada sobre las principales enfermedades de la soja en Tucumán, Argentina. RIAT 72: (1-2) 87-98.

Ploper, L.; Yoriniri, J. and Morel Paiva, W. 2003. Importancia de las enfermedades de la soja en el Mercosur. Pag. 163-174 en: Actas Simposio Internacional sobre Soja XI Congreso de AAPRESID. Rosario, Argentina.

Ploper, L.; González, V.; Gálvez, M.; Zamorano, M. and Díaz, C. 2006. Enfermedades del cultivo de soja en el Noroeste Argentino y su manejo. Producción de Soja en el Noroeste Argentino. EEAOC-Aceitera General Deheza. Tucumán, Argentina. p. 129-161.

Ploper, L. D. 1999. Management of economically important diseases of soybean in Argentina. Proceedings of the World Soybean Research Conference VI. Chicago, II-USA. Pág. 269-280

Reymond, P. and Farmer, E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol.* 1: 404-411.

Rodríguez-Gálvez, E. and Mendgen, K. 1995. The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma.* 189: (1) 61-72.

Roger, W. I. 2004. Guarding the Goods. New Insights into the Central Alarm System of Plants. *Plant Physiology* 135 : 695-7.

Rojo, E.; Solano, R. and Sanchez-Serrano, J. 2003. Interactions between signaling compounds involved in plant defense *Journal of Plant Growth Regulation*. 22: 82-98.

Roy, K. 1997a. *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* from B. . *Plant Dis.* 81: 259-266.

Roy, K. 1997b. Sporulation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, the causal agent of sudden death syndrome, on soybean plants symptomatic for the disease in the Midwestern and southern United States. *Plant Dis* 81: 566-569.

Roy, K.; Hershman, D.; Rupe, J. and Abney, T. 1997. Sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease* 81: 1100-1111

Roychoudhury, S.; May, T.; Gill, J.; Singh, S.; Feingold, D. and Chakrabarty, A. 1989a. Purification and characterization of guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase. A key enzyme in the biosynthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 264: (16) 9380-9385.

Roychoudhury, S.; May, T. B.; Gill, J. F.; Singh, S. K.; Feingold, D. S. and Chakrabarty, A. M. 1989b. Purification and characterization of guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase. A key enzyme in the biosynthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* 264: (16) 9380-9385.

Roychoudhury S, M. T., Gill JF, Singh SK, Feingold DS, Chakrabarty AM. 1989. Purification and characterization of guanosine diphospho-D-mannose dehydrogenase. A key enzyme in the biosynthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 264(16):: 9380-5.

Rupe, J. 1989a. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. *Plant Dis* 73: (7) 581-584.

Rupe, J. 1989b. Epidemiology of sudden death syndrome of soybeans. in: *Proc. World Soybean Conference IV*. Buenos Aires, Argentina. A.J. Pascale, ed. Westview Press, Boulder, CO. 2085-2090.

Rupe, J. 1991. Cultivar response to sudden death syndrome of soybean. *Plant Dis* 75: 47-50.

Rupe, J. 1992. Nature and management of soilborne fungal diseases of soybean. in: *Pest management in soybean*. L. G. Copping, Green, M. B and Rees, R. T, eds. Elsevier Applied Science. London. England. 369 pp. 196-205.

Rupe, J. 1995. Effect of plant age, maturity group, and the environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. *Plant Dis* 79: 139-143.

Rupe, J. 1999. Epidemiology of sudden death syndrome of soybean. . *Anais do Congresso Brasileiro de Soja*. Londrina, Brasil. 533: 139-148.

Rupe, J. and Hartman, G. 1999. Sudden Death Syndrome. *Compendium of Soybean Diseases*. 4^o Ed. APS Press. St. Paul, (MN), USA. 37-39. en: Scandiani, M.M., Wright, R., Luque, A., Leiva, M., Bottai, H., Ivancovich, J.J., Ruberti, D. T83 - Inoculación de *Fusarium virguliforme*, uno de los patógenos causante del síndrome de la muerte repentina de la soja, en condiciones de campo.

Rupe, J.; Hartman, G. and 1999. Sudden Death Syndrome. *Compendium of Soybean Diseases*. 4^o Ed. APS Press. St. Paul, (MN), USA. 37-39. en: Scandiani, M.M., Wright, R., Luque, A., Leiva, M., Bottai, H., Ivancovich, J.J., Ruberti, D. T83 - Inoculación de *Fusarium virguliforme*, uno de los patógenos causante del síndrome de la muerte repentina de la soja, en condiciones de campo.

Scandiani, M. 2004. Caracterización de la interacción *Glycine max* (L.) Merr. - *Fusarium solani* f. sp. *Glycines sensu lato*, causante del síndrome de la muerte repentina de la soja (SMR), en la zona núcleo de producción en Argentina. . Tesis Doctoral: Fac. de Cs. Agrarias. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Scandiani, M.; Ruberti, D.; O'Donnell, K.; Aoki, T.; Pioli, R.; Giorda, L.; Luque, A. and Biasoli, M. 2004. Recent outbreak of Soybean Sudden Death Syndrome in Argentina. *Plant Disease* 88: (9) 1044

Scherm, H.; Yang, X. and 1996. Development of sudden death syndrome of soybean in relation to soil temperature and soil water matric potential. *Phytopathology* 86: 642-649.

Schramm, G.; Bruchhaus, I. and Roeder, T. 2000. A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucl. Acids Res.* 28: (22) e96-.

Seitz, B.; Klos, C.; Wurm, M. and Tenhaken, R. 2000. Matrix polysaccharide precursors in Arabidopsis cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. *The Plant Journal* 21: (6) 537-546.

Sha, J. and Klessig, D. 1996. Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related β 1,3-glucanase gene, PR-2d. *Plant Journal*. 10: 1089-1101.

Shah, J.; Kachroo, P. and Klessig, D. 1999. The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11: 191-206.

Smith, A. and Peterson, R. 1983. Examination of primary roots of *Asparagus* infected by *Fusarium*. *Scann Electron Microsc.* 3: 1475-1480.

Staswick, P.; Yuen, G. and Lehman, C. 1998. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* 15 () 747-754.

Tenhaken, R.; Levine, A.; Brisson, L.; Dixon, R. and Lamb, C. 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 4158-4163.

Tenhaken, R. and Thulke, O. 1996. Cloning of an Enzyme That Synthesizes a Key Nucleotide-Sugar Precursor of Hemicellulose Biosynthesis from Soybean:UDP-Glucose Dehydrogenase. *Plant Physiol.* 112: (3) 1127-1134.

Thomma, B.; Eggermont, K.; Penninckx, I.; Match-Mani, B.; Vogelsang, R. and et al. 1998a. Separate jasmonate-dependent and salicylat-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 15107-11.

Thomma, B.; Eggermont, K.; Penninckx, I.; Match-Mani, B.; Vogelsang, R. and et al. 1998b. Separate jasmonate-dependent and salicylat-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 15107-11.

Thomma, B.; Eggermont, K.; Tierens, K. and Broekaert, W. 1999. Requirement of functional Ethylene-Insensitive2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by Botrytis cinerea. Plant Physiol. 121: 1093-1101.

Uknes, S.; Mauch-Mani, B.; Moyer, M.; Potter, S.; Williams, S.; Dincher, S.; Chandler, D.; Slusarenko, A.; Ward, E. and Ryals, J. 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. Plant Cell. 4: 645-656.

USDA. 2003. USDA Agricultural Baseline Projections to 2012. Office of the Chief Economist, U.S. Department of Agriculture. Prepared by the Interagency Agricultural Projections Committee. Staff Report WAOB 1-132

Van Loon, L. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal Plant Pathol. 103: 753-65.

Van Oosten, V.; De Vos, M.; Van Pelt, J.; Van Poecke, R.; Van Loon, L.; Dicke, M. and Pieterse, C. 2004. Signal signature in induced defense of Arabidopsis upon pathogen and insect attack. Biology of plant-microbe interactions. . The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions (in press).

Vand der Plank, J. 1968. Disease resistance in plants. New York, Academic Press. 206 p.

Vernooij, B.; Friedrich, L.; Morse, A.; Reist, R.; Kolditz-Jawhar, R.; Ward, E.; Uknes, S.; Kessmann, H. and Ryals, J. 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*. 6: 959-965.

Vijayan, P.; Shockey, J.; Levesque, C.; Cook, R. and Browse, J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7209-7214.

Walsh, E. and Stainier, D. 2001. UDP-glucose dehydrogenase required for cardiac valve formation in zebrafish. *Science* 293: (5535) 1670-1673.

Ward, E.; Uknes, S.; Williams, S.; Dincher, S.; Wiederhold, D.; DC, A.; Ahl-Goy, P.; Metraux, J. and Ryals, J. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*. 3: 1085-1094.

Wrather, J. A., Anderson, T.R., Arsyad, D.M., Tan, Y., Ploper, L.D., Porta-Puglia, A., Ram, H.H., y Yorinori, J.T. . 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. . *Can. J. Plant Path.* 23:115-121.

Xu, H. and Mendgen, K. 1997. Targeted Cell Wall Degradation at the Penetration Site of Cowpea Rust Basidiosporelings. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: (1) 87-94.

Xu, Y.; Chang, P.; Liu, D.; Narasimhan, M.; Raghothama, K.; Hasegawa, P. and Bressan, R. 1994. Plant defense genes are synergically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*. 6: 1077-1085.

Yorinori, J. T. 1999. Situação atual das enfermidades de soja na Bolívia, Brasil e Paraguai. *Resúmenes Mercosoja 99*. Rosario. 40-43

Yorinori, J. T. 2002. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. II Congreso Brasileiro de soja-Mercosoja 2002. Foz de Iguassu. Brasil. Embrapa soja. 171-183.

Yuan, J.; Zhu, M.; Lightfoot, A. D.; Iqbal, M. J.; Yang, J. Y. and Meksem, K. 2008. In silico comparison of transcript abundances during *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max* resistance to *Fusarium virguliforme*. *BMC Genomics* 9 (Suppl 2) :S6

Zabackis, E.; Huang, J.; Muller, B.; Darvill, A. and Albersheim, P. 1995. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol*. 107: 1129-1138.