

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

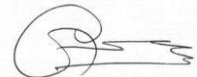
**CONOCIMIENTO DE LAS BASES FISIOLÓGICAS,
BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LA
COLONIZACIÓN EN LA SIMBIOSIS HONGOS
MICORRÍMICOS ARBUSCULARES-SOJA DOMESTICADA
VS NO DOMESTICADA**

Por

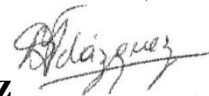
Ing. Agrónoma María Soraya Salloum



Directora: Dra. Celina Mercedes Luna



Co-Directora: Dra. Silvana Velázquez



**Lugar de Trabajo
CIAP-INTA**



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

**Córdoba, Argentina
2018**

COMISIÓN ASESORA

Dra. Celina Mercedes Luna, IFRGV-CIAP-INTA

Dra. Ileana Vanesa García (MACN - CONICET, Buenos Aires)

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

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

DEDICATORIA

Al culminar una importante etapa de mi vida dedico el fruto de mi esfuerzo y dedicación, reflejado en esta tesis...

A mis queridos padres Omar e Inés, quienes me inculcaron el esfuerzo y constancia.

A mis hermanos Evangelina, Gabriel, Ale, Dalila, Diego y Carlos quienes juntos crecimos y compartimos muchas vivencias y alegrías.

A mi compañero de vida Ivo por ser una persona muy especial en mi vida y acompañarme en todas mis decisiones.

A mis amigos por brindarme momentos de entretenimiento y alegrías y por acompañarme y aconsejarme.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas que de una u otra manera facilitaron el camino para alcanzar la meta:

A mi directora, Dra. Celina Mercedes Luna, por su absoluta dedicación y apoyo, sus enseñanzas, sus consejos y su excelente disposición.

A mi codirectora, Dra. María Silvana Velázquez quien estuvo siempre cerca a pesar de la distancia, respondiendo inmediatamente a todas mis consultas y haciendo que todo sea más simple. Estaré siempre agradecida por su generosidad y predisposición.

A mi codirectora de beca, Dra. Sonia Silvente, por compartir sus invaluable conocimientos conmigo.

Agradezco a mis Asesores de Tesis, Dra. Ileana García y Dr. Carlos Urcelay, por compartir sus ideas y sugerencias que contribuyeron ampliamente con la escritura de esta tesis.

A la Dra. Mónica Lugo, asesora externa, por brindar su tiempo para realizar correcciones y aportes a mi tesis doctoral.

A la Dra. Betiana Grümberg por compartir sus experiencias y brindar aportes en esta tesis doctoral.

A la Dra. Patricia Benavidez, Dra. Marina Insani y Dra. Mariana Larrauri por compartir recursos, laboratorio y conocimientos.

Al Centro de investigaciones Agropecuarias (CIAP) por haber permitido el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Mi agradecimiento especial a una persona con una hermosa calidad humana, mi gran compañera de trabajo y mi gran amiga Florencia Menduni por acompañarme todos los días en la jornada laboral, por sus constantes palabras de aliento y motivación y por sus contribuciones para llevar adelante esta tesis doctoral.

A todo el personal de apoyo del CIAP por su colaboración en las actividades de ensayos.

A mis compañeros del CIAP, quienes me acompañaron durante toda esta etapa, por su excelente calidad humana y por brindarme su amistad.

A todos aquellos quienes de una u otra forma colaboraron y brindaron su apoyo para la elaboración de esta tesis.

Publicaciones derivadas de la tesis

Salloum MS, Guzzo MC, Velazquez MS, Sagadin MB, Luna CM (2016) Variability in colonization of arbuscular mycorrhizal fungi and its effect on mycorrhizal dependency of improved and unimproved soybean cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(12): 1034-1040

Salloum MS, Menduni MF, Luna CM (2017) A differential capacity of arbuscular mycorrhizal fungal colonization under well-watered conditions and its relationship with drought stress mitigation in unimproved vs. improved soybean genotypes. *Botany*, DOI: 10.1139/cjb-2017-0137

Salloum MS, Menduni MF, Benavides MP, Larrauri M, Luna CM, Silvente S (2018) Polyamines and Flavonoids: key compounds in mycorrhizal colonization of improved and unimproved soybean genotypes. ID: SYMB-D-17-00163 (aceptado, en proceso de publicación)

Índice

Listado de abreviaturas	1
Resumen	3
Summary	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
La soja: importancia en la economía Argentina.....	7
Micorrizas: generalidades	10
Beneficios de las micorrizas a las plantas	12
Domesticación de los genotipos y su efecto en la asociación micorrícica.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
HIPÓTESIS	19
CAPÍTULO 1	20
Caracterización morfotaxonomica de un inóculo mixto de hongos micorrícicos arbusculares aislado de raíces de soja	20
Introducción	21
Materiales y Métodos.....	23
Resultados	25
Discusión	27
Conclusiones	30
CAPÍTULO 2	31
Búsqueda de variabilidad en la capacidad de colonización micorrícica y dependencia micorrícica en genotipos de soja domesticados vs no domesticados	31
Introducción	32
Materiales y Métodos.....	35
Resultados	39
Discusión	54
Conclusiones	58
CAPÍTULO 3	59

Participación de poliaminas claves y flavonoides como metabolitos implicados en la colonización micorrícica en genotipo de soja domesticado vs genotipo de soja no domesticado.....	59
Introducción	60
Materiales y Métodos.....	63
Resultados	70
Discusión	78
Conclusiones	82
CAPÍTULO 4.....	83
Análisis de metabolitos implicados en la colonización micorrícica en genotipo de soja comercial vs genotipo de soja no domesticado.....	83
Introducción	84
Materiales y Métodos.....	87
Resultados	91
Discusión	99
Conclusiones	107
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	108
Discusión general.....	109
Conclusiones generales.....	113
BIBLIOGRAFÍA	114
ANEXO DE TÉCNICAS	140

Listado de abreviaturas

°C: grados centígrados
ACP: análisis de componentes principales
ADC: arginina descarboxilasa
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA: análisis de la varianza
ARN: ácido ribonucleico
ARNi: ácido ribonucleico interferente
C: carbono
CC: capacidad de campo
CIT: clorofila total
CM: inoculado con HMA
CP: componente principal
D: domesticado
DAO: diamina oxidasa
DM: dependencia micorrícica
EROs: especies reactivas del oxígeno
FRAP: ferric-reducing antioxidant power
g: gramos
GC-MS: del inglés Gas chromatography-mass spectrometry (Cromatografía gaseosa-espectrometría de masa)
Gm: *Glycine max*
HMA: hongos micorrícicos arbusculares
hs: horas
M: marcador
MDA: malondialdehído
mg: miligramos
ml: mililitros
mM: milimolar
mmoles: milimoles
NO₃: nitrato
N₂: nitrógeno gaseoso
ND: no domesticado
SM: sin inocular con HMA
P: fósforo
PAs: poliaminas
pb: pares de bases
PCR: del inglés Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PR: primer
PO₄: fosfato
PR: primer

Pf: peso fresco

Ps: peso seco

put: putrescina

RT-PCR: del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa)

SM: sin inocular con HMA

Spd: espermidina

Spm: espermina

SO₄: sulfato

Resumen

La soja (*Glycine max*) es uno de los cultivos más desarrollados en Argentina. En las últimas décadas la siembra directa y el empleo de variedades genéticamente modificadas favorecieron una masiva expansión del cultivo, acompañado por una mayor aplicación de agroquímicos. Tal problemática impacta negativamente sobre el ambiente y la salud del consumidor, promoviendo la búsqueda de soluciones hacia una agricultura sustentable. El uso de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) constituye una alternativa frente a los fertilizantes minerales. Sin embargo, el proceso de domesticación podría haber afectado la capacidad de las plantas para establecer asociaciones beneficiosas con microorganismos de la rizósfera.

El objetivo de esta tesis doctoral fue estudiar la simbiosis de HMA-soja domesticada (D) y no domesticada (ND) con el fin de elucidar si la domesticación, ha influenciado en la selección de genotipos menos micorrizables y cuales serían algunos de los mecanismos fisiológicos implicados. Se trabajó con genotipos de soja D y ND bajo condiciones de riego normal, se utilizó un inóculo mixto de HMA aislado de raíces de soja, en el que se registró la presencia de *Funneliformis mosseae* como especie mayoritaria. El sistema experimental bajo condiciones controladas nos permitió evaluar la colonización micorrícica y la dependencia micorrícica (DM) después de períodos cortos (20 días) y largos (40 días) de tratamiento. En general, los genotipos ND mostraron valores significativamente mayores en la formación de estructuras fúngicas, especialmente arbusculos, y en la DM evaluada como parámetros de crecimiento, absorción de nutrientes, contenido en clorofila y regulación del estrés oxidativo. Además se evidenció un aumento en la concentración endógena de flavonoides, fenoles totales y poliaminas (PAs) en las raíces de plantas micorrizadas ND. Tanto la aplicación de flavonoides exógenos, como el silenciamiento de genes claves para la síntesis/degradación de PAs, estimularon la formación de arbusculos en el genotipo D. El análisis de metabolitos por metabolómica, mostró mayores niveles en el genotipo ND, con la presencia aumentada de isoflavonas claves y de precursores de PAs. En genotipos de soja D de interés comercial se pudo confirmar la existencia de variabilidad en la respuesta a la micorrización. Algunos mostraron baja capacidad de colonización y formación de arbusculos y otros un comportamiento similar a los genotipos ND. La variabilidad observada en estas respuestas entre los genotipos D, sugiere que la selección de genotipos de soja con una buena y temprana colonización micorrícica, particularmente alta relación arbusculos / hifas y una

mayor concentración en flavonoides y PAs, podría ser una estrategia útil para el desarrollo de genotipos que optimicen la contribución de los HMA en los sistemas agrícolas.

Summary

Soybean (*Glycine max*) is one of the most developed crops in Argentina. In the last decades direct seeding and the use of genetically modified varieties favored a massive expansion of the crop, accompanied by a greater application of agrochemicals. Such a problem has a negative impact on the environment and consumer health, promoting the search for solutions towards sustainable agriculture. The use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is an alternative to mineral fertilizers. However, the process of domestication may have affected the ability of plants to establish beneficial associations with rhizosphere microorganisms.

The objective of this PhD thesis was to study the symbiosis of improved (I) and unimproved (UI) AMF-soybean, in order to elucidate whether domestication has influenced the selection of less mycorrhizal genotypes and which would be some of the physiological mechanisms involved. I and UI soybean genotypes were used under normal irrigation conditions. A mixed AMF inoculum isolated from soybean roots was used, in which the presence of *Funneliformis mosseae* as majority species. The experimental system under controlled conditions allowed us to evaluate mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependence (MD) after short periods (20 days) and long periods (40 days) treatment. In general, the UI genotypes showed significantly higher values in the formation of fungal structures, especially arbuscules, and in MD evaluated as growth parameters, nutrient absorption, chlorophyll content and regulation of oxidative stress. In addition, there was an increase in the endogenous content of flavonoids, total phenols and polyamines (PAs) in roots of UI mycorrhizal plants. Both, the application of exogenous flavonoids and the silencing of key genes for the synthesis / degradation of PAs stimulated the arbuscule formation in I genotype. Metabolic analysis showed higher levels of metabolites in UI genotype, with the increased presence of isoflavones keys and precursors of PAs. In I soybean genotypes of commercial interest it was possible to confirm the existence of variability in the response to mycorrhization. Some of I genotypes, showed low ability of colonization and arbuscule formation and others a behavior similar to UI soybean genotypes. The variability observed in these responses among I genotypes, suggests that the selection of soybean genotypes with good and early mycorrhizal colonization, particularly high arbuscule / hyphae ratio and higher concentration of flavonoids and PAs, could be a useful strategy for development of genotypes that optimize AMF contribution to cropping systems.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La soja: importancia en la economía Argentina

La soja cultivada (*Glycine max* (L.) Merr) es una especie de la familia de las leguminosas, fabácea, originaria del este de Asia, especialmente China. El género *Glycine* Willd está dividido en los subgéneros *Glycine* y *Soja* (Hymowitz y Newell 1980), siendo ésta última la especie cultivada. Su mayor particularidad radica en que los granos de esta leguminosa presentan altos contenidos de proteína y aceite, por ello también pertenece al grupo de las oleaginosas. En Argentina esta especie es conocida desde 1862, pero recién en 1909 se iniciaron los primeros cultivos en la Estación Experimental. El cultivo de soja se incrementó a partir del año 1970. Si comparamos su evolución desde sus primeras 37.700 has a las 19.000.000 has sembradas en la campaña 2016/2017 (Bolsa de Rosario), observamos que la superficie cultivada aumentó unas 500 veces en 40 años convirtiéndose en el mayor protagonista de la economía Argentina.

A nivel mundial el denominado mercado de la soja es operado por una gran cantidad de países, sin embargo solo algunos tienen un rol protagónico y determinante para establecer la oferta y la demanda. Los principales demandantes son países pertenecientes a la Unión Europea y el sudeste asiático (en particular China y Japón). Por el lado de la oferta, Argentina se encuentra, junto a Brasil y Estados Unidos, como una de las tres potencias exportadoras del cultivo, que en conjunto aportan más del 80% de la producción mundial (Schvarzer y Tavošanska 2007). Esto implica que estos tres países tienen el poder de determinar el precio de los granos de este cultivo. Si tenemos en cuenta que en el 2003 el 45 % de la exportación agrícola se correspondía a la cosecha de soja, es entendible que se califique a la Argentina como un país sojero.

Diversos factores han intervenido para que la soja se incorpore en nuestros campos y se posicione como el mayor producto agropecuario de exportación (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca). Específicamente, la expansión del cultivo de soja respondió a múltiples factores de carácter climático, económico y de manejo. El aumento de las lluvias desde 1950 mejoró la productividad de áreas tradicionalmente agrícolas y permitió la expansión hacia áreas climáticamente marginales (Magrin et al. 2005; Berbery et al. 2006). Los cambios en el contexto económico global y nacional mejoraron la rentabilidad de la agricultura (Schnepf et al. 2001). Sumado a ello, la incorporación de dos innovaciones tecnológicas a mediados de los 90, como la siembra directa y variedades de soja tolerantes al herbicida glifosato, fueron también factores críticos en la expansión de la soja (Bert et al. 2011). Estas tecnologías mejoraron la productividad, redujeron los costos y

simplificaron el manejo (Qaim y Traxler 2005; Trigo et al. 2009). Así, la rápida expansión territorial y el aumento de la productividad son los dos factores claves que explican el crecimiento exponencial de la producción de soja en nuestro país. De esta forma, Argentina logró convertirse en el tercer productor mundial de grano de soja, el primer exportador mundial de aceite de soja y el segundo de harina de soja, generando una gran incidencia en el producto bruto agropecuario y por ende impactando significativamente en la generación de divisas. Actualmente el cultivo de soja se centra en la región pampeana, sobre todo en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, y luego se expande con una menor producción a las regiones del NOA y NEA, en donde las provincias que más aportan son Entre Ríos, Santiago del Estero, Chaco, Salta y Tucumán (Figura 1). (Bolsa de cereales 2017).

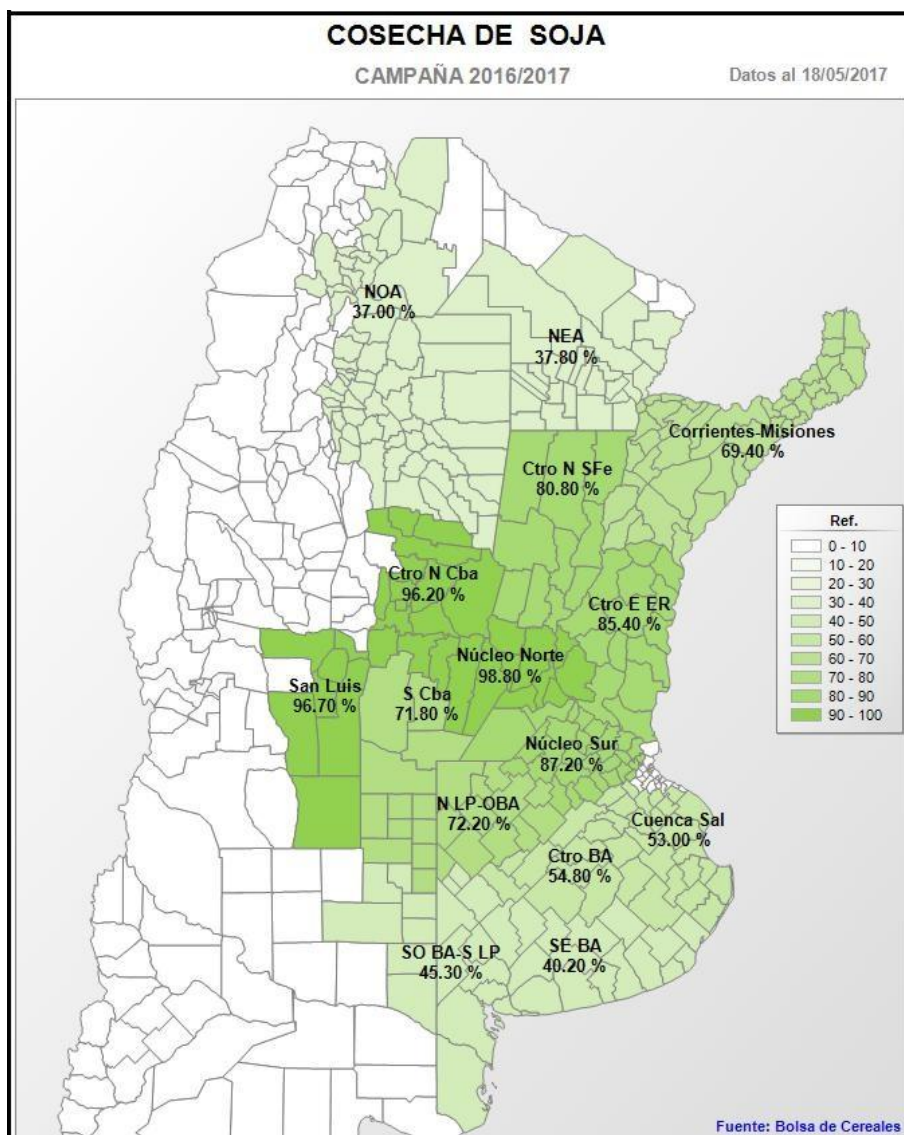


Figura 1. Mapa de las principales provincias donde se siembra soja (2016-2017) Fuente: (bolsa de cereales 2017).

La agricultura argentina ha sobrellevado grandes procesos de transformación. El cambio más importante en los últimos 20 años ha consistido en el predominio de la soja como el principal cultivo de la región pampeana (Solbrig 2005). El área sembrada con soja ha crecido junto con un paquete tecnológico que incluye la siembra directa o labranza cero y material genéticamente modificado que facilita el control de malezas con herbicidas totales. Sin embargo este paquete tecnológico fue acompañado por la aplicación de fertilizantes químicos, fungicidas y plaguicidas en dosis elevadas que conllevan a problemas de contaminación y deterioro de los suelos.

La creciente preocupación por el impacto negativo de la agricultura convencional, por la aplicación generalizada de agroquímicos, sobre el medio ambiente y la salud del consumidor, están llevando a los agricultores y consumidores hacia una agricultura sustentable. Por lo tanto la búsqueda de estrategias sustentables que favorezcan el crecimiento y rendimiento de los cultivos preservando el medio ambiente, es un desafío de creciente interés.

El uso de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la agricultura constituye una alternativa promisoría frente a los fertilizantes minerales, ya que es conocido que los HMA, pueden actuar como biofertilizantes, bioprotectores, mediadores intermediarios y biodegradadores (Muleta 2017) y podría considerarse un valor agregado, basado en los beneficios económicos de una mayor y más uniforme producción, una mayor rapidez de crecimiento y entrada en producción de las plantas, una mejor calidad de la cosecha y un ahorro en fertilizantes, riego y productos fitosanitarios. Entre otros beneficios de estas asociaciones micorrícicas se pueden mencionar: la promoción del crecimiento vegetativo (Huang et al. 2010; Khabou et al. 2014), contenido secundario de metabolitos (Sarkar et al. 2015; Urcoviche et al. 2015) y adquisición de nutrientes (Weisany et al. 2016). Otros estudios han demostrado que además de adquirir nutrientes, los HMA contribuyen en la reducción de pérdidas de los mismos, ya sea por lixiviación o denitrificación. En efecto, se ha registrado que los HMA disminuyeron significativamente las pérdidas de N y de P por lixiviación (Asghari y Cavagnaro 2012; Bender et al. 2015). Estudios más recientes también hallaron que los HMA, producen una reducción en la emisión de óxido nitroso (N₂O) un gas con un poder de producir el efecto invernadero 300 veces superior al del dióxido de carbono (CO₂) (Bender et al. 2015). También es conocido que los HMA, actúan en la tolerancia a la sequía (Augé 2001; Ruiz-Lozano 2003; Smith y Read 2008; Ruiz-Lozano y Aroca 2010) y las reducciones del impacto de estreses ambientales como por ejemplo la salinidad (Borde et al. 2017). Los HMA, también tienen una función importante

en el mantenimiento de la fertilidad física del suelo, al contribuir directamente e indirectamente en la estabilidad de los agregados. Directamente por un efecto físico de una red de hifas que forman los HMA alrededor de las partículas del suelo, e indirectamente por la exudación producida por las hifas de una glicoproteína estable al calor (extraída a 121 ° C) llamada glomalina como un agente aglutinante de los agregados (Rillig 2004; Violi et al. 2008; Wu et al. 2017). Cuando estas hifas mueren, la glomalina se deposita en el suelo donde comienza a acumularse llegando a alcanzar el 5% del C edáfico (Rillig et al. 2003). La glomalina, es un compuesto muy abundante en los suelos que secuestra considerables cantidades de C y N a escala global (Lovelock et al. 2004). Los stocks de glomalina se encontraron en mayor cantidad en presencia de plantas de alta dependencia micorrícica ya que destinan más C al hongo (Treseder y Turner 2007).

Por lo tanto, el manejo adecuado de los HMA, teniendo en cuenta los beneficios que promueven en los cultivos, como la soja, y en el suelo, debe ser considerado para mejorar la eficiencia, productividad y sostenibilidad de los sistemas agrícolas.

A continuación brindaremos con más detalles, las generalidades e importancia de los HMA.

Micorrizas: generalidades

El suelo es un sistema vivo, dinámico, que constituye un recurso esencial para la producción de alimento para el balance global y el funcionamiento de los ecosistemas. Un vasto número de microorganismos residen en el suelo y llevan a cabo un amplio rango de funciones (Bandyopadhyay et al. 2017). Entre estos microorganismos se encuentran los HMA, los cuales forman simbiosis mutualistas con las raíces de la mayoría de las especies vegetales (Smith y Read 2010). En estas asociaciones simbióticas se genera un movimiento bidireccional de nutrientes donde el carbono fluye hacia el hongo y los nutrientes inorgánicos se mueven hacia la planta.

Las micorrizas generalmente se clasifican en dos grandes grupos: las ectomicorrizas y las endomicorrizas. En ésta tesis doctoral nos enfocaremos en las endomicorrizas, las cuales constituyen la asociación de mayor distribución entre las plantas, encontrándose en angiospermas, gimnospermas, helechos y briófitos. Tradicionalmente esta simbiosis se conoce como micorrizas-arbusculares por la capacidad de estos hongos de formar arbusculos en el interior de la raíz (Pawłowska y Taylor 2004).

Los hongos que forman estas asociaciones son biótrofos obligados. Recientemente, Spatafora et al. (2016) los han incluido en el phylum Mucoromycota Doweld, subphylum Glomeromycotina (Walker & Schüßler) Spatafora & Stajich.

Las micorrizas son las asociaciones más frecuentes en la naturaleza debido a su rango de hospedantes y su distribución cosmopolita y son usualmente considerados generalistas dada su baja especificidad (Smith y Read 2008).

Los HMA colonizan los tejidos radicales a través de las fuentes de propágulos existentes en el suelo, entre los que se encuentran: esporas maduras, fragmentos de raíz micorrizadas, o plantas micorrizadas que crecen en vecindad. Las estructuras que forman estos hongos dentro de las raíces son los arbuscúlos y las hifas (Figura 2) y en algunas especies se presentan también vesículas y circunvoluciones. Las hifas de los HMA generalmente no poseen septos y pueden crecer tanto fuera (extra-radical) como dentro de la raíz (intra-radical). Esta estructura cenocítica permite que los núcleos puedan moverse a lo largo de las hifas (Bago et al. 1999). El micelio intra-radical produce típicamente estructuras ramificadas dentro de las células corticales denominadas arbuscúlos. Los mismos son considerados estructuras diagnósticas de la simbiosis micorrícica arbuscular. Se reconocen además enrollamientos intracelulares de hifas (circunvoluciones o coils) los cuales a veces se presentan sin la presencia de arbuscúlos (Smith y Read 2008). Muchas especies de HMA también forman grandes células intra-radicales globosas llamadas vesículas que cumplen una función de reserva (Biermann y Linderman 1983). Se ha observado que algunas especies de HMA incrementan la formación de vesículas cuando la simbiosis ocurre en situaciones de alta oferta nutricional (Nijjer et al. 2010). Las esporas de los HMA son estructuras que contienen lípidos, citoplasma y hasta 2000-3000 núcleos y se forman asexualmente por diferenciación de hifas en el suelo o las raíces. Las esporas pueden estar agregadas en grupos denominados esporocarpos que funcionan como estructuras de reserva y propágulos (Smith y Read 2008).

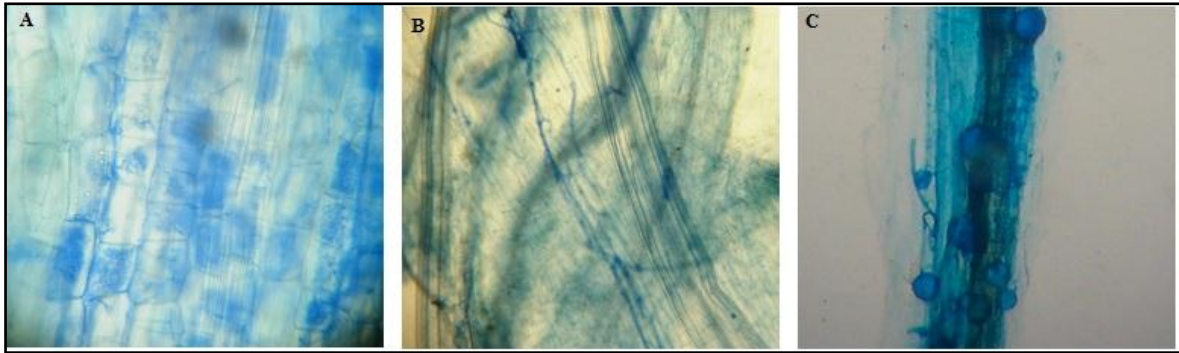


Figura 2. Estructuras características de micorrizas arbusculares: **A)** arbusculos en el interior de la célula radicular; **B)** hifas intra-radicales; **C)** vesículas de endomicorrizas en el interior da la raíz. (x 20). (Raíces micorrizadas de genotipos de soja luego de 20 días de inoculación con HMA).

Beneficios de las micorrizas a las plantas

El efecto positivo más significativo de los HMA consiste en el mejoramiento de la nutrición de las plantas, ya que las hifas de estos hongos se extienden en el suelo y pueden absorber y transferir macro y micronutrientes hacia las raíces. En ese sentido, la mayor captación de nutrientes, particularmente, de los poco móviles como el P, se logra ampliando el volumen de suelo explorado y alcanzando zonas donde los nutrientes se encuentran disponibles, siendo esta la característica más conocida de estas asociaciones (Augé 2001; Adesemoye y Kloeppe 2009). Desde el punto de vista nutricional es pertinente aclarar que, teniendo en cuenta que los HMA consumen C de los hospedantes, el efecto de la micorrización sobre las plantas depende de la relación costo-beneficio de la simbiosis (Grimoldi et al. 2005). Por lo tanto, si bien se asume que las micorrizas arbusculares constituyen asociaciones mutualistas, el rango de respuesta es afectado por numerosos factores, entre ellos: el estado y especie de planta hospedante, la especie de hongo arbuscular y las condiciones del ambiente rizosférico.

Domesticación de los genotipos y su efecto en la asociación micorrícica

Las plantas silvestres han sido domesticadas durante miles de años desde el comienzo de la civilización humana, como un medio para garantizar un suministro estable de alimentos. A través de las actividades de fitomejoramiento a lo largo de los siglos, las plantas de cultivo han sido manipuladas para desarrollar rasgos nuevos y deseables (Acquaah 2009). Los procesos de selección artificial basados en fenotipos impulsaron el

desarrollo de nuevas variedades con características deseables y se consideran la forma más antigua de mejoramiento de plantas. Con el tiempo, estas nuevas especies o variedades se han vuelto genéticamente divergentes de sus progenitores originales. Desafiados por la demanda de la creciente población mundial (FAO 2017), los efectos negativos del monocultivo y el cambio climático (Lobell et al. 2011), existe una constante necesidad de mejorar los cultivos.

Los parientes silvestres son recursos genéticos potenciales para la mejora de los cultivos (Dwivedi et al. 2008), así como para explorar sistemas de producción nuevos o alternativos. La lógica es simple: las poblaciones silvestres deben contener una mayor variabilidad genética, ya que se propagaron en una amplia gama de hábitats sin selección humana (Huang y Han 2014). Solo para demostrar este punto, los rasgos deseables, como las resistencias al estrés biótico y abiótico y los valores nutricionales especiales importantes para el mejoramiento de los cultivos, se pueden encontrar en algunos de los parientes silvestres (Asif et al. 2013; Li et al. 2016). Por otra parte, dado que la modificación genética de los cultivos alimentarios sigue siendo controvertida entre el público, es más aceptable introducir materiales genéticos de parientes silvestres (de la misma especie o especies estrechamente relacionadas) en variedades de cultivos mediante el mejoramiento, la hibridación u otras técnicas (Singh y Nelson 2014) para generar cultivos mejorados. Aunque el uso de parientes silvestres como fuentes de nuevos alelos es desafiante, debido principalmente a la resistencia del vínculo, los avances en las investigaciones genéticas y genómicas de las plantas de cultivo y sus parientes silvestres han ampliado nuestra comprensión de rasgos complejos y al descubrimiento de nuevos genes.

La domesticación de las plantas se asoció generalmente con centros de diversidad cultural junto con relaciones fascinantes entre antiguos asentamientos humanos y características fitogeográficas particulares. Es difícil rastrear la historia de la domesticación, pero hoy se ha puesto a disposición una gran cantidad de información generada por agrónomos, biólogos, antropólogos e historiadores para apoyar la hipótesis de la comunidad sobre los centros de origen y domesticación. Entre los primeros cambios asociados con la domesticación de plantas, encontramos: un mayor tamaño de semilla, la pérdida de los mecanismos de dispersión de semillas, el crecimiento determinado y la dominancia apical (Gross y Olsen 2010). La domesticación también condujo a una diversidad genética de los cultivares de plantas, tales como frijol (Bitocchi et al. 2013) arroz (Ram et al. 2007) y trigo (Haudry et al. 2007).

Particularmente, la Soja (*Glycine max* L.) uno de los cultivos más antiguos (Hymowitz 1970) fue domesticada a partir de una especie endémica silvestre en China, (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) probablemente hace 6000-9000 años (Hirst 2016). Theodore Hymowitz, un eminente investigador en la historia de la soja, ha sugerido que es poco probable que sepamos la hora exacta en que comenzó el cultivo de la soja y, según las primeras inscripciones en bronce, la domesticación pudo haber ocurrido durante la dinastía Shang (1500-1100 BC) (Smith 2003). Existe evidencia de que la soja parecía estar domesticada durante la dinastía Zhou en el noreste de China (Smith 2003). La evidencia documentada más temprana del uso por humanos de *Glycine* spp. provino de un sitio neolítico hace 7800-9000 años en Jiahu, provincia de Henan, donde se recuperaron los restos carbonizados de soja (Hirst 2016).

Se ha demostrado que la soja salvaje tiene mayor diversidad genética que la soja cultivada (Lam et al. 2010). Además de la diversidad genética general, los investigadores también han descubierto secuencias genéticas específicas únicas de la soja silvestre que confieren una mayor resistencia a las enfermedades y funciones metabólicas (Lam et al. 2010), que sirven como buenos candidatos para la mejora de la soja. Por el contrario, un estudio que utilizó soja silvestre en Corea también identificó posibles eventos de pérdida de genes en especies silvestres (Chung et al. 2013). La discrepancia en estos dos estudios puede implicar que el resultado de cualquier estudio genómico comparativo sobre germoplasma silvestre realmente depende de la diversidad de las colecciones silvestres. Qi et al. (2014) llevaron a cabo la secuenciación de novo de una soja silvestre, *Glycine soja* (G. soja) W05, ayudando a construir una comprensión más profunda del genoma de soja salvaje y demostrando el potencial de su uso para la mejora de cultivos. Li et al. (2014) también publicaron el ensamblaje de novo de 7 semillas de soja silvestres y cultivadas y proporcionaron un análisis pangénomico que identifica genes específicos del linaje, variaciones en el número de copias y mutaciones que eventualmente se asocian con la selección humana positiva para ciertos caracteres agronómicos. Usando un enfoque completo de re-secuenciamiento, se analizaron las diversidades genómicas de 302 líneas de soja silvestre, variedades nativas y variedades mejoradas (Zhou et al. 2015). Si bien existe mucha información sobre la diversidad genética entre la soja domesticada y sus parentales silvestres, poco se sabe sobre el efecto de la domesticación de los genotipos de soja en interacción con HMA. Se ha informado que la domesticación pudo haber afectado la capacidad de las plantas para establecer asociaciones beneficiosas con microorganismos de la rizósfera (Pérez Jaramillo et al. 2016). También se informó que la dependencia

micorrícica (DM) varió entre los cultivares, observando que los genotipos ancestrales o no domesticados de trigo tuvieron un mayor beneficio de la simbiosis micorrícica que los cultivares modernos, sugiriendo una DM más fuerte en las poblaciones más antiguas de soja (Hetrick et al. 1992). Por otro lado, muchos de los cambios en los rasgos de las plantas durante la domesticación fueron acompañados por cambios progresivos en el medio ambiente. Para mantener altos rendimientos de los cultivos seleccionados, se requirió de sistemas con una mayor necesidad de insumos externos. Un mayor uso de fertilizantes químicos en la agricultura causa frecuentes consecuencias ambientales perjudiciales, que son una preocupación global (Ashoka et al. 2017). El uso generalizado de fertilizantes químicos para suministrar nitrógeno (N) y fósforo (P) en la producción de cultivos aumentó fuertemente desde 1960, lo que resultó en mayores rendimientos y productividad agronómica, aunque causando impactos ambientales perjudiciales (Tilman et al. 2002, Meena et al. 2017). Particularmente, la intensificación de la producción de soja en siembra directa podría haber impactado negativamente sobre los HMA nativos a través de las prácticas de monocultivo, fertilización y el uso del herbicida glifosato. Se ha observado, que aumentos adicionales en la aplicación de N y P fueron menos efectivos para aumentar el rendimiento, especialmente de la soja (*Glycine max* L.). Actualmente, solo el 30-35% del fertilizante de N aplicado y el 8-10% del fertilizante de P son absorbidos por los cultivos debido a las malas prácticas de manejo del suelo y al uso inapropiado de fertilizantes (Adesemoye y Kloeppel 2009, Garnett et al. 2009).

Comunidades de microbiomas de suelo juegan un papel crucial en el mantenimiento del equilibrio ecológico del suelo (Kennedy y Smith 1995). Las interacciones rizosféricas beneficiosas tienen una fuerte influencia en la salud de las plantas, la calidad del suelo y en el rendimiento de la soja (Meena et al. 2015). En general, la soja se cultiva en suelos que generalmente tienen poblaciones diversas de *Bradyrhizobium* y HMA. Los estudios sobre la planta-suelo-ambiente demuestran la naturaleza dependiente del contexto de la simbiosis del microorganismo, como la interacción entre HMA y *Bradyrhizobium* (Vogelsang et al. 2006). Sin embargo, el potencial del ambiente del suelo (es decir, especies adicionales dentro de una comunidad) en influir en el resultado de las interacciones simbióticas es a menudo pasado por alto. La transición de los sistemas naturales a los agrícolas pueden haber obstaculizado las interacciones beneficiosas entre las plantas y los microbios debido a la pérdida de la diversidad microbiana del suelo. Por ejemplo, se demostró que la fertilización nitrogenada a largo plazo resultó en la evolución de rizobios menos mutualistas, proporcionando menos

beneficios al huésped (Weese et al. 2015). Además otro aspecto inherente al cultivo de soja es el uso de variedades genéticamente modificadas con resistencia al glifosato y/o insectos. Uno de los efectos de los cultivos genéticamente modificados, sobre los HMA, radica en la variación de la composición de los exudados radicales, los cuales pueden inhibir el proceso de infección radical por el hongo (Liu 2010). Sumado al efecto del cultivar modificado, se debe añadir el impacto de la adición de glifosato, un herbicida sistémico no selectivo, ampliamente empleado en la producción de soja. Se ha demostrado que este producto puede impactar sobre los HMA de manera directa, afectando a las esporas con las que toma contacto, e indirecta debido a los cambios que induce en la planta. Druille et al. (2013 ab, 2015) observaron una reducción en la formación de arbusculos luego de la aplicación foliar de glifosato, y disminución de la viabilidad de esporas al aplicarlo en el suelo. En definitiva, prácticas usuales en la producción de soja, tales como el monocultivo, fertilización, el uso de variedades modificadas y la aplicación de herbicidas actúan negativamente a lo largo de tiempo sobre las comunidades nativas de HMA.

En relación con la colonización micorrícica, se ha destacado que la aplicación de fertilizantes en genotipos comerciales, ha influenciado hacia la selección de genotipos menos micorrizables que los silvestres (Eason et al. 2001). Los HMA son simbioses obligados que necesitan colonizar la raíz de una planta para completar su ciclo de vida (Gutjahr y Parniske 2013). El establecimiento de las asociaciones entre las plantas y los HMA implica un complejo intercambio de señales entre los dos simbioses (Gadkar et al. 2001; Vierheilig y Piche 2002). Entre las moléculas que han estado implicadas en las señales entre las plantas y los HMA, algunas investigaciones han mencionado los flavonoides (Weston y Mathesius 2013) y poliaminas (PAs) (Requena et al. 2007; Kusano et al. 2008).

Los flavonoides son moléculas que pueden participar en la colonización de la raíz de la planta por HMA. Desempeñan un papel importante en la fase presimbótica (germinación de esporas, longitud de hifa, ramificación de hifas y formación de un grupo de células auxiliares o esporas secundarias) y en etapas simbióticas (formación de puntos de entrada y colonización de raíces) del desarrollo de los hongos arbusculares (Scervino et al. 2009). Ponce et al. (2004) han observado cambios cuantitativos y cualitativos en el patrón de flavonoides en trébol cuando se inocularon estas plantas con *Glomus intraradices*. Las PAs, principalmente putrescina (put) espermina (spm) y espermidina (spd) son compuestos nitrogenados ubicuos presentes en todas las células vivas. Las PAs, tienen un papel importante en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo, tales como

expresión génica, síntesis de proteínas y de ADN, homeostasis celular, división y diferenciación celular, crecimiento y procesos de desarrollo tales como embriogénesis, rizogénesis, organogénesis, desarrollo de las flores, maduración de los frutos, senescencia, y también en las respuestas a estreses bióticos y abióticos (Groppa y Benavides 2008; Alcázar et al. 2010, Talaat y Shawky 2013).

El cambio en el equilibrio de PAs es una respuesta frecuente en el metabolismo de las plantas a la colonización micorrícica, que influye en varios aspectos fisiológicos (Smith y Read 2008). Sin embargo, la información con respecto a las PAs en las interacciones simbióticas planta-hongos es muy limitada. En tal sentido, las PAs pueden formar parte en los eventos de señalización molecular entre los simbioses (El Ghachtouli et al. 1995) y vías de síntesis de put similares a los descritos para plantas y bacterias se han encontrado para los hongos arbusculares (Sannazzaro et al. 2004). Wu et al. (2010 a) detectaron que la aplicación exógena de spm, spd y put aumentaron significativamente el número de arbusculos y vesículas.

Por lo expuesto, la identificación de las moléculas involucradas en el proceso de intercambio de señales entre los simbioses es un requisito previo para una mejor comprensión de esta interacción. En esta tesis doctoral se abordará el estudio de PAs y flavonoides, por su posible participación en la colonización micorrícica, en un sistema experimental original como es la comparación del comportamiento entre genotipos de soja domesticados vs no domesticados.

Fundamentado con estos antecedentes se realizó esta investigación tomando en cuenta los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de estrategias sustentables mediante la generación de conocimiento básico y aplicado sobre la capacidad de colonización micorrícica de genotipos de soja domesticados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la composición morfotaxonomica del inóculo mixto de HMA autóctono aislado de raíces de soja, proveniente de suelos con tradición sojera.

Identificar la variabilidad en el porcentaje de colonización micorrícica arbuscular y su efecto sobre el crecimiento, en genotipos de soja no domesticados vs domesticados.

Caracterizar la participación e interacción de las poliaminas y los flavonoides como metabolitos implicados en la colonización y su efecto en la dependencia de la simbiosis HMA-genotipo de soja no domesticado vs domesticado.

Comparar cuali y cuantitativamente el contenido de metabolitos en raíces de genotipos de soja domesticados vs no domesticados con diferente capacidad de micorrización.

HIPÓTESIS

Hipótesis 1: el proceso de domesticación de los cultivares modernos afecta la capacidad de las plantas para asociarse simbióticamente con hongos micorrícicos arbusculares. Predicción: los genotipos de soja no domesticados exhibirán una mayor colonización y dependencia micorrícica en comparación con los genotipos domesticados.

Hipótesis 2: los genotipos de soja domesticados y no domesticados presentan diferencias en la concentración de flavonoides y PAs lo que está influenciado por diferencias en la capacidad de colonización micorrícica, particularmente en la formación de arbusculos. Predicción: las raíces de soja de los genotipos no domesticadas presentarán una mayor concentración de flavonoides y PAs con respecto a las raíces de los genotipos domesticados.

Hipótesis 3: la respuesta diferencial en el perfil metabólico entre los genotipos domesticados vs no domesticados se relaciona con su capacidad contrastante de micorrización. Se predice que los genotipos no domesticados mostraran un aumento significativo de metabolitos asociados a PAs y flavonoides en sus raíces.

CAPÍTULO 1

Caracterización morfotaxonomica de un inóculo mixto de hongos micorrícicos arbusculares aislado de raíces de soja

Los resultados de este capítulo han sido publicados:

Salloum MS, Guzzo MC, Velázquez MS, Sagadin MB, Luna CM (2016) Variability in colonization of arbuscular mycorrhizal fungi and its effect on mycorrhizal dependency of improved and unimproved soybean cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(12): 1034-1040

Introducción

Los HMA constituyen una simbiosis mutualista entre raíces de plantas y hongos, basados en estudios de filogenia molecular, Spatafora et al. (2016) reubicaron al phylum Glomeromycota dentro del phylum Mucoromycota Doweld (2001); subphylum Glomeromycotina (C. Walker & A. Schüßler) Spatafora & Stajich stat. nov. El mismo cuenta con la clase Glomeromycetes (Cavalier-Smith 1998) la cual incluye cuatro órdenes: Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales y Paraglomerales. Redecker et al. (2013) reconocen nueve familias: Acaulosporaceae, Ambisporaceae, Archaeosporaceae, Claroideoglomeraceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae, Glomeraceae, Pacisporaceae y Paraglomeraceae. Las cuales incluyen los siguientes géneros: *Acaulospora*, *Ambispora*, *Archaeospora*, *Bulbospora*, *Cetraspora*, *Claroideoglosum*, *Dentiscutata*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Entrophospora*, *Funneliformis*, *Geosiphon*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Kamienskia*, *Pacispora*, *Paraglosum*, *Racocetra*, *Redeckera*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Scutellospora* y *Septoglosum* (<http://invam.caf.wvu.edu/>).

La taxonomía de los hongos arbusculares tradicionalmente se ha basado en la caracterización morfológica de las esporas y es usada para diferenciar comunidades de HMA a través de un amplio gradiente de hospedantes (Eom et al. 2000; Lovelock et al. 2003) y de condiciones ambientales (Egerton-Warburton y Allen 2000). En años recientes los métodos moleculares se han convertido en una herramienta indispensable para dilucidar patrones filogenéticos, sin embargo han sido menos eficaces para la taxonomía o como carácter diagnóstico en la descripción de nuevas especies (Hibbett y Donoghue 1998). También resultan controversiales a causa de los altos niveles de polimorfismo en el rDNA de los hongos arbusculares (Sanders 2004) y debido a que resultan estar fuertemente influenciados por la elección del método empleado (Landis et al. 2004).

La mayoría de los estudios que abordan la diversidad de HMA se basan en la identificación morfológica de las esporas obtenidas directamente de muestras de campo (Douds y Millner 1999; Landis et al. 2004; Gai et al. 2006) o procedentes de los denominados “cultivos trampa” (Bever et al. 1996). La propagación de los HMA en cultivos trampa requiere, debido a la naturaleza biotrófica de estos microorganismos, la asociación con plantas hospedadoras. Estos cultivos son necesarios para proporcionar una mayor cantidad de esporas viables en buen estado para fines de investigación y para aplicaciones prácticas (Walker 1992; Morton 1993).

Es ampliamente reconocido que la composición de la comunidad de HMA puede influenciar favorablemente en el desarrollo de la planta (Van der Heijden et al. 2003; Jansa et al. 2008). Los hongos que constituyen este tipo de simbiosis poseen gran importancia económica potencial, y su estudio resulta relevante para posibilitar el manejo de HMA indígenas como para el logro de inoculaciones exitosas.

Algunos trabajos pioneros indicaron que los mayores beneficios para las plantas se obtenían cuando se las inoculaba con la selección de una única especie eficiente de HMA (Edathil et al. 1996). Más recientemente, se ha sugerido que los beneficios de un consorcio de especies de HMA sobre las plantas pueden ser mayores que los proporcionados por los aislamientos individuales (Hoeksema et al. 2010; Verbruggen y Kiers 2010). Estos beneficios pueden ser el resultado de la diferenciación de nichos y la colaboración entre las distintas especies fúngicas (efecto de complementariedad) (Maherali y Klironomos 2007) o de un efecto dominante de alguna especie particularmente productiva (efecto de selección) (Vogelsang et al. 2006). Más recientemente, nuestro grupo de trabajo examinó el rol de tres aislamientos de HMA y su mezcla sobre un genotipo de soja bajo condiciones de riego y sequía. Los resultados no mostraron efecto de complementariedad entre aislamientos, sugiriendo que la elección de un inóculo particular provee iguales o mayores beneficios que el incremento de la riqueza en HMA, sobre el alivio de la sequía en soja (Grümberg et al. 2015).

Dado que no hay datos sobre la existencia de inóculos micorrícicos aislados de soja, nos pareció de interés aislar un inóculo mixto nativo de raíces de soja y en este primer capítulo se planteó como objetivo específico: determinar la composición morfotaxonomica del inóculo mixto de HMA autóctono aislado de raíces de soja, proveniente de suelos con tradición sojera.

Materiales y Métodos

Se utilizó un inóculo mixto de HMA aislado de raíces de soja de un ensayo establecido en la EEA INTA Manfredi (Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de la localidad de Manfredi) en un suelo Argiudol típico serie Oncativo con rotación soja-soja. Todas sus parcelas fueron igualmente tratadas con los agroquímicos de uso rutinario en la zona, y según las diferentes necesidades de cada cultivo (fertilizantes, herbicidas y plaguicidas). En enero de 2008 se seleccionaron al azar 10 puntos de muestreos, de los cuales se tomaron diez plantas de soja, cuyas raíces luego fueron utilizadas como inóculo en el armado de las plantas trampas. Posteriormente el inóculo fue llevado a invernáculo en planta trampa de soja durante 2 años, en macetas con un sustrato suelo: arena (1:1) esterilizado mediante dos autoclaves de 1 hora separadas por un período de 24 hs. Desde el año 2012 ha seguido en multiplicación en soja, y se mantiene así hasta la actualidad, con el agregado de semillas de alfalfa. Las semillas de soja y alfalfa utilizadas fueron previamente esterilizadas en superficie con una solución de hipoclorito de sodio al 18%.

Se tomaron 10 muestras de suelo de las macetas trampas con un sacabocados de 30 mm. Las mismas fueron trasladadas al Instituto Spegazzini, perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP para su posterior aislamiento e identificación. El aislamiento de las especies de HMA se realizó mediante la técnica de tamizado húmedo y decantado de suelo con tamices de distinta apertura de malla (450-105-75-30 μm) (Gerdemann y Nicolson 1963) y centrifugación en gradiente de sacarosa (Walker et al. 1982). Las esporas obtenidas se colocaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro y se observaron en un microscopio estereoscópico Wild M3 a 40 x de aumento.

Para la identificación morfológica, las esporas aisladas fueron montadas en Polivinil-ácido láctico-glicerina (PVLG) (Koske y Tessier 1983) o en una mezcla de PVLG con reactivo de Melzer en relación 1:1 (v/v) (Brundrett et al. 1994). Posteriormente se observaron con un microscopio óptico (Leitzdialux 20EB) a 40x, 250x, 400x y 1000x. Las esporas fueron identificadas siguiendo criterios taxonómicamente aceptados (International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi, <http://invam.caf.wvu.edu>; Blaszkowski AMF www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital (Olympus modelo

SP-350) en un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61) y con un microscopio óptico (Leitzdialux 20EB).

Resultados

Se identificaron 6 especies de HMA pertenecientes a 5 familias de Glomeromycotina (Figura 3). Las especies de hongos arbusculares reportadas fueron las siguientes: *Acaulospora scrobiculata* Trappe (Acaulosporaceae), *Gigaspora* sp.1 (Gigasporaceae), *Funneliformis mosseae* (Nicolson & Gerd.) Walker & Schüßler y *Glomus* sp (Glomeraceae), *Diversispora spurca* (Walker & Bloss), Walker & Schüßler (Diversisporaceae), *Paraglomus occultum* (Walker) Morton & Redecker (Paraglomeraceae). Se registraron 739 esporas en total en 100 gramos de suelo seco. La especie con mayor abundancia de esporas fue *F. Mosseae* con un total de 427 esporas, valores intermedios de abundancia fueron registrados para *P. Occultum* y *D. spurca* (175 y 122 esporas respectivamente) seguido por *Glomus* sp con un registro de 22 esporas y los menores valores correspondieron a *A. Scrobiculata* y *Gigaspora* sp.1 (7 y 3 esporas respectivamente). Consecuentemente, el número de esporas por gramo de suelo presentes en el inóculo, fue de 8 esporas, en el cual, *F. mosseae* contribuyó con el 57,78 %; *P. occultum* con el 23,68 %; *D. spurca* con el 15,15 %; *A. scrobiculata* con el 2,98 % y *Gigaspora* sp.1 contribuyó con el 0,41 %.

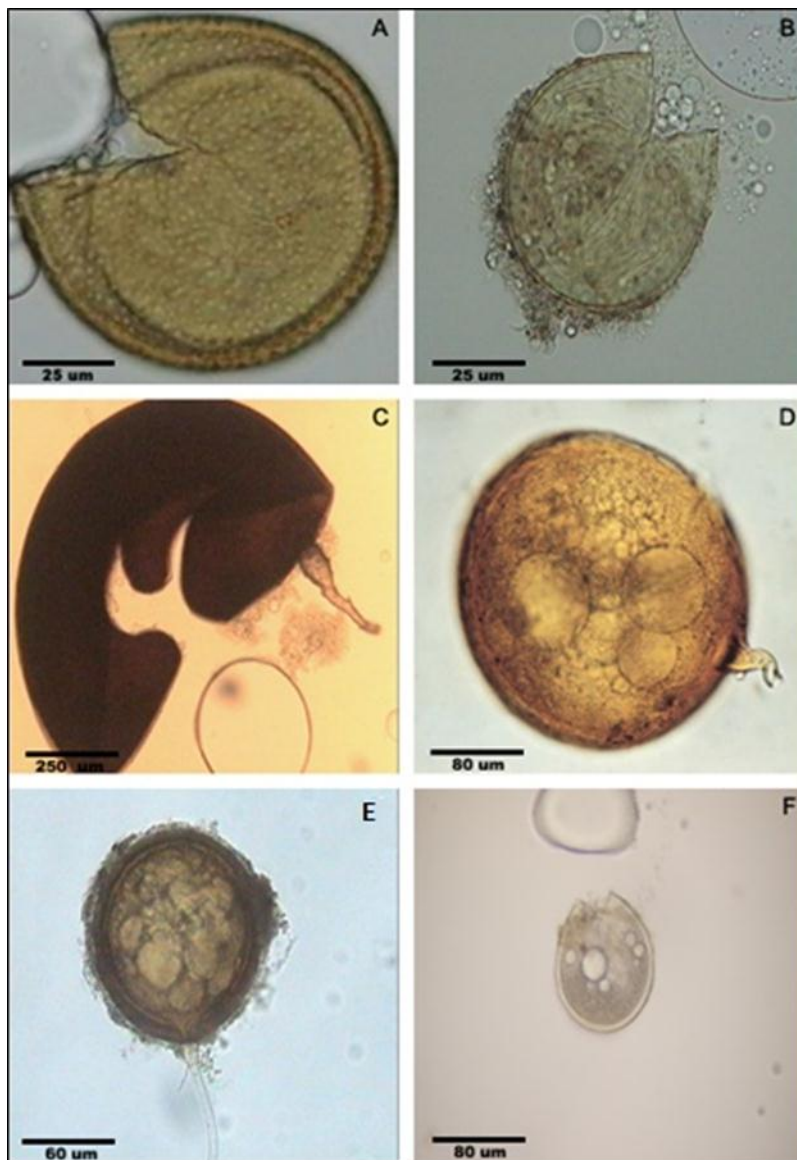


Figura 3. Microfotografías de las esporas pertenecientes al inóculo mixto de HMA, aislado de raíces de soja, en simbiosis con plantas trampa de soja y trébol. **A)** *Acaulospora scrobiculata* (x25) **B)** *Diversispora spurca* (x25). **C)** *Gigaspora* sp.1 (x6) **D)** *Funneliformis mosseae* (x25) **E)** *Glomus* sp (x6) **F)** *Paraglomus occultum* (x25). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital (Olympus modelo SP-350) en un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61) y con un microscopio óptico (Leitzdialux 20EB), en el Instituto Spegazzini, La Plata.

Discusión

El aprovechamiento del amplio espectro de servicios ecosistémicos en los que intervienen los HMA depende de la conservación de los integrantes de la biota del suelo. Las redes miceliales, los fragmentos de raíces colonizadas y las esporas constituyen la reserva de inóculo micorrícico del suelo (Smith y Read 2010). Hart y Reader (2005) observaron que la etapa inicial de colonización era más rápida en presencia de mayor número y tamaño de estructuras y puntos de contacto con las raíces. Por otro lado, Barea et al. (2002) indicaron que los fragmentos de raíz micorrizados son el inóculo más efectivo en la colonización. Sin embargo las esporas aisladas, por su capacidad de supervivencia y mayor tolerancia a las situaciones adversas, son las principales responsables de perpetuar los HMA. En este trabajo se caracterizaron y contabilizaron las esporas presentes en la planta trampa pero no se evaluaron las otras estructuras de colonización, es decir fragmentos radicales colonizados y micelio de HMA, que también constituyen fuentes de propágulos activos. La literatura existente hace referencia generalmente a la densidad de esporas para proveer un indicativo de la densidad de inóculo (Orozco et al. 1986; Friese y Allen 1991). Verbruggen et al. (2012) mediante la abundancia relativa y la riqueza de las especies de hongos arbusculares caracterizan los inóculos donde se emplean todos los propágulos del suelo como fuente de inóculo. El sistema de planta trampa seleccionado en nuestro trabajo para la multiplicación de esporas resultó apropiado, ya que en los tratamientos de inoculación propiamente dicha (ver capítulo 2), los niveles de colonización radical alcanzaron porcentajes de 22-39 % a los 20 días y de 38-72 % a los 40 días. Sin embargo, el número de esporas presentes en el inóculo resultó bajo (8 esporas por gramo) si lo comparamos con los ensayos efectuados por (Hernández 2008) en donde se utilizó como inoculante de *G. max*, el hongo formador de micorrizas *Glomus hoi* que contenía 40 esporas por gramo. A partir de lo cual se puede inferir que las esporas no habrían constituido una fuente de inóculo exitosa, sino que más bien, la colonización podría deberse fundamentalmente a las redes de micelio y fragmentos de raíces micorrizadas.

En nuestras observaciones, del total de las especies recuperadas *F. mosseae* contribuyó con el 57,78 %; *P. occultum* con el 23,68 %; *D. spurca* con el 15,15 %; *A. scrobiculata* con el 2,87 % y *Gigaspora* sp.1 con el 0,41 %. De acuerdo con nuestros resultados (Faggioli 2016) en un experimento con plantas trampa usando suelos provenientes de sitios con tradición sojera de la provincia de Córdoba, también registró con

mayor abundancia, esporas pertenecientes a *F. mosseae* y además esporas de *D spurca* y *A. scrobiculata* mientras que a diferencia de nuestros resultados, no registró esporas de *P. occultum*.

De acuerdo a la observación taxonómica *F. mosseae* fue la especie que mostró mayor abundancia en el inóculo mixto de HMA. En tal sentido, *F. mosseae*, ha sido frecuentemente citadas en una amplia gama de ecosistemas terrestres y se caracterizan por su ubicuidad (Oehl et al. 2010; Davison et al. 2015). Esta especie ha logrado sobreponerse exitosamente a las prácticas agrícolas relacionadas con la producción de soja, tales como el uso de pesticidas y la fertilización, las cuales afectan negativamente a ciertas especies de Glomeromycotina (Schalamuk et al. 2006; Druille et al. 2015). Esta especie puede aprovechar las tres fuentes de inóculos (esporas, hifas y raíces colonizadas) (i) poseen elevada producción de esporas (ii) las hifas son altamente eficientes en la colonización incluso en situaciones de déficit hídrico (Jasper et al. 1989) y (iii) forman vesículas intraradicales que les permite iniciar nuevas colonizaciones (Biermann y Linderman 1983). Otra especie mencionada como abundante ha sido *Acaulospora scrobiculata* (Oehl et al. 2010; Davison et al. 2015), sin embargo en nuestro estudio esta espóra sólo representó un 2,87 % del total de esporas.

Paraglomus occultum y *D. spurca*, en cambio, no constituyen especies habitualmente citadas en los relevamientos realizados en suelos agrícolas por la comunidad científica, y esto fue igualmente observado en nuestra caracterización morfotaxonómica, con ambas especies mostrando porcentajes intermedios de 23,68 % y 15,15 % respectivamente. Liu et al (2015) observaron que *Diversispora* sp predomina en ambientes ricos en humus, esto puede evidenciar que este género sería común de encontrar en suelos de bajo historial de uso antrópico. Saks et al. (2013) y Camenzind et al. (2014) hallaron una gran abundancia de Diversisporales en suelos de una reserva natural tropical.

Gigaspora sp.1, es la especie reportada con menor frecuencia en nuestro relevamiento. Miembros de la familia Gigasporaceae se han citado como más susceptibles a diversos factores de perturbación como cambio de uso de suelo, prácticas agrícolas y uso de agroquímicos (Turrini y Giovannetti 2012). Poseen gran importancia desde el punto de vista funcional debido a que la producción de hifas extraradicales es mayor que en las otras familias y en consecuencia es mayor su aporte a la adquisición de nutrientes (Hart y Reader 2002; Maheralli y Klironomis 2007).

Es importante considerar que las diferentes familias de hongos arbusculares presentan distintas estrategias de colonización. Las Gigasporaceae dependen fuertemente

de las esporas para iniciar una colonización ya que su micelio tiene una capacidad de colonización relativamente nula en comparación con la alta capacidad de las hifas de miembros de Acaulosporaceae y Glomeraceae (Biermann y Linderman 1983; Hart y Reader 2002, 2005). Es probable que las especies pertenecientes a estas dos familias sean las responsables de los altos porcentajes de colonización registrados en este trabajo.

El utilizar inóculos mixtos se justifica plenamente, debido a que en condiciones naturales las plantas están expuestas a una mezcla de especies de HMA, de este modo se incrementan las posibilidades de que más de uno de los hongos colonice a la planta y eventualmente promueva su crecimiento (Van der Heijden et al. 1998; Cuenca et al. 2003). Adicionalmente, los inóculos mixtos, aumentan las posibilidades de que los hongos más apropiados se hagan dominantes en la eventualidad de que las condiciones del suelo cambien con las diferentes prácticas agrícolas, forestales y en etapas sucesivas (Abbott y Gazey 1994). Hoeksema et al. (2010) y Verbruggen y Kiers (2010) han sugerido que los beneficios de las mezclas de especies de HMA en plantas pueden ser mayores que las de especies individuales. Estos beneficios pueden ser el resultado de la diferenciación de nichos y facilitación entre las especies fúngicas (efecto de complementariedad; por ejemplo, Maherali y Klironomos 2007) o el efecto dominante de una especie en particular (efecto de selección; por ejemplo, Vogelsang et al. 2006).

El sistema de planta trampa seleccionado resulto eficiente para la multiplicación del inóculo nativo asociado a *G. max*, proporcionando una densidad y diversidad de esporas de HMA capaces de colonizar efectivamente al cultivo.

Conclusiones

El relevamiento morfotaxonómico realizado de un inóculo de HMA nativo de suelos con tradición sojera permitió identificar 6 especies de HMA pertenecientes a las familias: Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae, Glomeraceae y Paraglomeraceae. El inóculo está constituido en mayor porcentaje por una especie numerosa y común de suelos agrícolas como es *Funneliformis mosseae*, y en menor cantidad por especies como *Acaulospora scrobiculata* y *Gigaspora* sp.1, las cuales, al igual que *F.mosseae* han sido también mencionadas como resistentes al uso de pesticidas y fertilizantes. Este inóculo fue utilizado para realizar todos los ensayos de esta tesis doctoral.

CAPÍTULO 2

Búsqueda de variabilidad en la capacidad de colonización micorrícica y dependencia micorrícica en genotipos de soja domesticados vs no domesticados

Los resultados de este capítulo han sido publicados:

Salloum MS, Guzzo MC, Velázquez MS, Sagadin MB, Luna CM (2016) Variability in colonization of arbuscular mycorrhizal fungi and its effect on mycorrhizal dependency of improved and unimproved soybean cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(12): 1034-1040

Salloum MS, Menduni MF, Luna CM (2017) A differential capacity of arbuscular mycorrhizal fungal colonization under well-watered conditions and its relationship with drought stress mitigation in unimproved vs. improved soybean genotypes. *Botany*, DOI: 10.1139/cjb-2017-0137

Introducción

La domesticación es un proceso evolutivo complejo que implica cambios morfológicos y fisiológicos que conducen a la diferenciación de taxones domesticados de sus antepasados silvestres (Acquaah 2009; Gross y Olsen 2010; Bitocchi et al. 2013). La domesticación de las especies vegetales se ha relacionado con una disminución en la diversidad genética de los cultivares modernos, lo que puede haber afectado la capacidad de las plantas para establecer asociaciones beneficiosas con microorganismos de la rizósfera (Pérez-Jaramillo et al. 2016).

Particularmente en la simbiosis de las plantas con HMA (organismos biotrófos obligados que requieren una planta huésped para completar su ciclo de vida) (Smith y Read 2008); se ha observado que la eficacia de los HMA es altamente dependiente del genotipo de la planta huésped. Estudios sobre diferentes cultivos indicaron que existe variabilidad genética en la capacidad de colonización entre los genotipos de las especies huéspedes (Rengel 2002). Así, la colonización por HMA de 13 cultivares de trigo varió de no colonizarse a un alto grado de colonización (Azcon y Ocampo 1981). Recientemente (Singh et al. 2012) demostraron variabilidad genética en la colonización con HMA en el germoplasma de trigo moderno (*Triticum turgidum* L. var. *Durum* Desf.).

En relación con la domesticación de genotipos y la colonización micorrícica, se ha destacado que la aplicación de fertilizantes en genotipos comerciales, ha influenciado hacia la selección de genotipos menos micorrizables que los silvestres (Eason et al. 2001).

El concepto de dependencia micorrícica (DM) ha sido definido como el grado de cambio en el crecimiento de la planta asociado con HMA (Plenchette et al. 1983). En tal sentido, se reportaron diferencias en la DM entre líneas cultivadas y salvajes, observándose variabilidad en la DM en trigo de diferentes edades (Kapulnik y Kushnir 1991). La comparación de DM entre cultivares modernos de *T. aestivum* y sus antepasados mostró una DM superior en cultivares liberados antes de 1950, que en los liberados más tarde (Hetrick et al. 1993), lo que indica que los programas de mejoramiento modernos podrían haber reducido la capacidad de respuesta de los HMA.

Zhu et al. (2001) también encontraron una reducción en la capacidad de respuesta micorrícica en los cultivares de trigo modernos de Australia en comparación con los cultivares antiguos. Tawaraya (2003) informó que las especies de plantas cultivadas mostraron una DM más baja que las silvestres. En estos estudios se propuso a las

condiciones de suelo altamente fértiles utilizadas durante el proceso de selección de plantas como una posible explicación de la menor DM de los genotipos modernos. Por el contrario (Bryla y Koide 1990) informaron que las plantas de tipo salvaje resultaron ser menos dependientes de las micorrizas. Además, en plantas de maíz encontraron que los híbridos modernos mostraron valores significativamente mayores que las líneas consanguíneas y las variedades más antiguas (An et al. 2010). En un análisis metagenómico (Lehmann et al. 2012) no encontraron evidencia de que los nuevos genotipos de plantas hubiesen perdido su capacidad de responder a las micorrizas debido a las prácticas agrícolas y de mejoramiento genético y observaron que aunque los nuevos cultivares estaban menos intensamente colonizados, eran más sensibles a las micorrizas (y posiblemente dependientes) que los genotipos ancestrales.

Por otro lado, en la influencia de la domesticación en la colonización micorrícica, algunos autores sugirieron que variedades modernas de alto rendimiento, seleccionadas para un rendimiento óptimo en suelos de alta fertilidad, pueden haber reducido la capacidad de responder a HMA en comparación con los antiguos (Hetrick et al. 1992; Zhu et al. 2001). Sin embargo, otros datos no mostraron pérdida de capacidad de colonización con HMA en líneas más nuevas (An et al. 2010; Leiser et al. 2015). En general, un meta análisis de 410 ensayos encontraron que en cultivares liberados después de 1900, la colonización micorrícica fue del 30%, en comparación con 40% en cultivares y variedades locales más antiguas (Lehmann et al. 2012). Diferencias en la colonización por HMA fueron encontradas entre los genotipos de trigo que difieren en nivel de ploidía, origen geográfico, eficiencia del uso de nutrientes y año de lanzamiento de variedad (Hetrick et al. 1992; Graham y Abbott 2000; Yao et al. 2001; Zhu et al. 2001; Yucel et al. 2009). En un estudio reciente, se informó variación significativa en la colonización de micorrizas entre un pequeño número de cultivares modernos de trigo duro (Singh et al. 2012).

Particularmente en soja, existen poco datos sobre la colonización micorrícica a lo largo de la domesticación. Heckman y Angle (1987) reportaron variabilidad en la colonización de raíces de soja por poblaciones de suelo indígenas de HMA. Khalil et al. (1994; 1999) encontraron que tanto la colonización por HMA como la DM aumentaron en genotipos de soja no mejorados, mostrando mayores beneficios de la simbiosis micorrícica que los cultivares mejorados. Estos autores destacaron que el crecimiento relativo de dos cultivares de soja no mejorados fue significativamente mayor con HMA. Mientras que en los cultivares mejorados, el crecimiento relativo fue menos potenciado con la colonización por HMA. Las diferencias encontradas en la DM de los cultivares de soja con y sin HMA,

sugieren que los fitomejoradores deben considerar este rasgo en sus programas de mejoramiento. Khalil et al. (1994) sugirieron que la soja no mejorada, *Glycine soja*, podría ser una fuente importante en el mejoramiento para optimizar las asociaciones de HMA.

Por lo tanto, la evaluación de la variación del establecimiento de la simbiosis entre cultivares es importante para la mejora de nuevos genotipos, ya que el nivel de colonización puede modular el equilibrio costo / beneficio de la simbiosis HMA (Sawers et al. 2008). A pesar de la gran importancia económica del cultivo de soja en Argentina, es escasa la información sobre su variabilidad genotípica en la capacidad de micorrización.

Para este estudio, el desarrollo de un sistema experimental bajo condiciones controladas nos permitió evaluar DM después de períodos cortos (20 días) y largos (40 días). La DM de plantas de soja se determinó midiendo parámetros de crecimiento y parámetros bioquímicos relacionados con la regulación del estrés oxidativo.

Se proponen los siguientes objetivos

1) *Determinar la variabilidad genética en la capacidad de colonización micorrícica de las plantas de soja en simbiosis con HMA.*

2) *Contrastar las diferencias en la formación de arbusculos y DM en genotipos de soja de interés comercial y genotipos de soja no domesticados.*

Hipótesis 1: el proceso de domesticación de los cultivares modernos afecta la capacidad de las plantas para asociarse simbióticamente con hongos arbusculares. Predicción: los genotipos de soja no domesticados exhibirán una mayor colonización y dependencia micorrícica en comparación con los genotipos domesticados.

Materiales y Métodos

1) Determinar la variabilidad genética en la capacidad de colonización micorrícica de las plantas de soja en simbiosis con HMA.

Se utilizaron cuatro genotipos de soja para este estudio. Dos genotipos de soja domesticados (DM50048 y NA5009), caracterizado previamente como susceptibles y tolerantes a la sequía (Grümberg et al. 2015); en lo sucesivo, serán nombrados como genotipos D-1 y D-2, respectivamente. También se utilizaron dos genotipos de soja no domesticados, PI57440 (en lo sucesivo genotipo ND-3) y PI90768 (en lo sucesivo genotipo ND-4), perteneciente a la Estación Experimental de Agricultura del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA-INTA) colección de germoplasma -Marcos Juárez.

El inóculo mixto de HMA se obtuvo a partir de raíces de soja, aislado de un sistema de monocultivo de soja, que pertenece a EEA INTA Manfredi. El inóculo mixto de HMA se aisló y se multiplicó en macetas con mezcla estéril de arena/suelo (1: 1 v/v), utilizando soja y *Medicago sativa* como plantas trampa, en condiciones de invernadero, a 25 °C, y regadas diariamente con agua destilada, durante dos años.

Los cuatro genotipos de soja se cultivaron en presencia o ausencia del inóculo mixto en una cámara con condiciones controladas de iluminación (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y de temperatura (media de 25° C). El experimento de inoculación se estableció en un diseño completamente aleatorizado factorial 4 x 2 x 1, con cuatro genotipos (D-1, D-2, ND-3 y ND-4), dos tratamientos de inoculación, inoculadas con HMA (CM) y sin inocular con HMA (SM) y una condición hídrica: riego normal a 80 % de capacidad de campo (CC), 25% de humedad del suelo, correspondiente con la máxima cantidad de agua que puede retener el suelo después de haber drenado el agua gravitacional. Las semillas de los genotipos de soja se esterilizaron usando 18% de hipoclorito de sodio durante 30 segundos. A continuación, se introdujeron dos semillas pregerminadas en macetas de 450 gramos de capacidad, a las cuales se las llenó con 400 gramos de sustrato de suelo/arena (1:1 v/v), previamente tratado en autoclave dos veces durante 1 hora, con 24 horas de diferencia. El suelo usado en el experimento contenía 4,8 ppm N-NO₃; 2,5 ppm S-SO₄²⁻; 5.9 ppm P; 3,09% de materia orgánica; 1,79% de carbono orgánico; 0,162% N total; 11.1 C: N y pH de 6,7.

El inóculo de micorrizas consistió en 8 g de suelo conteniendo fragmentos de raíz de soja, esporas y micelio con un 60% aproximadamente de colonización y fue agregado en el centro de la maceta, cerca de las raíces de las plántulas de soja en el momento del trasplante. Las plantas fueron divididas en: CM, las cuales se inocularon en el centro de la maceta; y plantas SM, las que recibieron la misma cantidad de inóculo (8 gramos) pero autoclavado (el inóculo se sometió a autoclave dos veces a 121 ° C durante 25 min, con 24 horas de separación). Antes de la esterilización en autoclave, el inóculo se filtró con 8 ml de agua desionizada a través de un tamiz de 37 mm (Schleicher y Schuell, Alemania). El filtrado se añadió a las macetas con plantas SM (8 ml por maceta) para proporcionarles las poblaciones microbianas que acompañan a los HMA (Porcel y Ruiz Lozano 2004).

Cada maceta recibió al inicio del ensayo 5 ml de solución nutritiva de Hoagland reducida en fosfatos (0,25 mM, que es 1/4 del fosfato de potasio recomendado en el protocolo general), a continuación, las macetas se regaron con agua destilada tres veces a la semana para mantener el suelo a un 80 % de CC. Las muestras de raíces y de parte aérea se tomaron a los 20 y 40 días después del tratamiento. Se utilizaron 10 macetas (10 plántulas) por genotipo (D-1, D-2, ND-3 y ND-4) y por tratamiento (CM y SM).

La DM se calculó como $[(CM-SM) / CM] \times 100$, utilizando diferentes parámetros de crecimiento de las plantas CM y la media de los diferentes parámetros correspondientes a las plantas SM (Plenchette et al. 1983). La biomasa de la planta fue medida como peso seco de la parte aérea, luego de ser secada en estufa a 70°C hasta peso constante. El área foliar se estimó a partir de las primeras hojas trifoliadas, para lo cual se calcularon en papel los contornos de los tres folíolos, se recortaron y sus pesos se relacionaron con el peso de áreas conocidas (1 cm²) del mismo papel.

Además, la DM se calculó utilizando diferentes caracteres bioquímicos de estrés oxidativo que se evaluaron en 100 mg de la segunda hoja de soja trifoliada. El daño oxidativo se midió como la peroxidación de lípidos, que se estima que es el contenido de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico y se expresó como equivalentes de malondialdehído (MDA) (Hodges et al. 1999). Clorofila total (CIT) se estimó mediante la extracción del material de la hoja en 80% de etanol después de la incubación a 80 °C durante 15 min. La absorbancia se registró a 665, 645 y 470 nm, y se calculó de acuerdo a Arnon (1949). La defensa antioxidante se evaluó a través del contenido en FRAP (Benzie y Strain 1996).

Las estructuras de HMA en las raíces se tiñeron según Phillips y Hayman (1970) y la colonización se midió según McGonigle et al. (1990).

2) Contrastar las diferencias en la formación de arbusculos y DM en genotipos de soja de interés comercial y genotipos de soja no domesticados.

Para validar los resultados correspondientes al primer objetivo planteado, se realizaron estudios ampliando el número de genotipos de soja domesticados y no domesticados. Se evaluó el porcentaje de colonización micorrícica y sus estructuras en 2 genotipos de interés comercial: INTACTA y SYNGENTA 4X99: los que fueron comparados con los dos genotipos domesticados ya estudiados NA 5009 y DM 50048. Además se incluyeron 2 genotipos no domesticados provenientes del Banco de Germoplasma del INTA Marcos Juárez: (PI89772, PI548510) los que fueron comparados con los dos genotipos no domesticados ya estudiados (PI57440, PI90768).

El experimento de inoculación se estableció en un diseño factorial completamente aleatorizado 8 x 2 x 1, con ocho genotipos (cuatro domesticados D-1 a D-4 y cuatro no domesticados ND-1 a ND-4), dos tratamientos de inoculación (CM y SM) y una condición hídrica: riego normal (80 % CC). El experimento se realizó en invernadero bajo condiciones de luz controlada con un fotoperiodo de 8 h de oscuridad y 16 h de luz y temperatura de 25 °C. Para el tratamiento de las semillas, inoculación y trasplante se siguió la misma metodología que en los ensayos mencionados en materiales y métodos 1. Las muestras de raíz y hojas se tomaron luego de 20 días de tratamiento. Las variables medidas fueron porcentaje de micorrización total, formación de estructuras micorrícicas; peso seco aéreo, peso seco radicular y contenido de nutrientes. El contenido de nutrientes minerales en los extractos de hoja se determinó por cromatografía con detección de conductividad, según Cataldi et al. (2003). Para la evaluación de la arquitectura de las raíces, se extrajo la raíz con toda la planta y después de un lavado cuidadoso se realizó la medición de la longitud de raíz principal y se cuantificó el número de raíces laterales desarrolladas para evaluar la densidad de ramificación. El número de las raíces laterales se determinó contando las raíces ramificadas emergentes de raíces laterales y la raíz principal.

Análisis Estadístico

Los datos de DM calculados como $[(CM-SM) / CM] \times 100$ se expresaron como % con relación a los tratamientos CM. Tanto los datos absolutos como los datos de DM se analizaron estadísticamente usando un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre las medias se compararon mediante pruebas DGC ($P \leq 0,05$). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el empleo del programa InfoStat Profesional (Di Rienzo et al. 2013).

Resultados

Variabilidad de la colonización micorrícica en genotipos de soja domesticados vs no domesticados

A tiempos tempranos (20 días de ensayo) (Tabla 1), no se observó una marcada variabilidad en la colonización total con HMA entre genotipos de soja domesticados y no domesticados. Sin embargo, a los 40 días de tratamiento (Tabla 2), los genotipos de soja no domesticados mostraron una colonización micorrícica total significativamente mayor (64-72%), seguido por el genotipo D-2. Nuestro sistema experimental desarrollado bajo condiciones controladas, permitió identificar además de la colonización total, las estructuras micorrícicas características de los HMA, en las dos fechas analizadas. A los 20 días los genotipos no domesticados mostraron un mayor porcentaje de arbusculos, seguido por el genotipo D-2, mientras que no se detectó formación de arbusculos en el genotipo D-1, durante todo el experimento (Tabla 1).

Además, se observó variabilidad en la relación arbusculo /hifas entre genotipos de soja. A los 20 días, los genotipos no domesticados tuvieron una proporción arbusculos/hifas estadísticamente mayor (58/24 ND-3 y 46/51 ND-4), comparados a los genotipos domesticados (0/88 D-1 y 36/60 D-2), (Tabla 1). A los 40 días de tratamiento, los genotipos no domesticados mantuvieron la proporción arbusculos/hifas estadísticamente mayor (63/21 ND-3 y 57/40 ND-4), comparados a los genotipos domesticados (0/73 D-1 y 40/ 56 D-2) (Tabla 2). No se observó colonización micorrícica en las raíces de las plántulas SM expuestas a condiciones de riego normal.

Por otro lado, a los 40 días de tratamiento, se observó la presencia de nódulos activos en las plantas CM comparado a las SM (Tabla 3). Es interesante destacar que, se observó un mayor número y peso de los nódulos en los genotipos de soja no domesticados que en los domesticados (Tabla 3).

En general, nuestros resultados mostraron una mayor colonización micorrícica total y formación de arbusculos y nódulos, en ambos genotipos no domesticados. Por el contrario, los genotipos de soja domesticados mostraron variabilidad micorrícica entre ellos, donde el genotipo D-2 mostró un comportamiento similar a los genotipos no domesticados.

Tabla 1. Colonización de raíces por hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en genotipos de soja domesticados (D-1 y D-2) y no domesticados (ND-3 y ND-4). Los resultados se obtuvieron a los 20 días bajo condiciones riego normal (80 % de capacidad de campo).

Genotipos	Tiempo (días)	Colonización micorrícica total (%)	Colonización por hifas (%)	Colonización por vesículas (%)	Colonización por arbusculos (%)
D-1	20	36 b	88 a	12 b	-
D-2	20	22 c	60 b	4 c	36 c
ND-3	20	39 a	24 d	18 a	58 a
ND-4	20	22 c	51 c	3 d	46 b

Los datos son medias ($n = 10$ plantas). Los valores con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes entre tratamientos según la prueba de DGC ($p < 0,05$).

Tabla 2. Colonización de raíces por hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en genotipos de soja domesticados (D-1 y D-2) y no domesticados (ND-3 y ND-4). Los resultados se obtuvieron a los 40 días bajo condiciones riego normal (80 % de capacidad de campo).

Genotipos	Tiempo (días)	Colonización micorrícica total (%)	Colonización por hifas (%)	Colonización por vesículas (%)	Colonización por arbusculos (%)
D-1	40	38 d	73 a	27 a	-
D-2	40	42 c	56 b	4 c	40 c
ND-3	40	64 b	21 d	16 b	63 a
ND-4	40	72 a	40 c	3 d	57 b

Los datos son medias ($n = 10$ plantas). Los valores con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes entre tratamientos según la prueba de DGC ($p < 0,05$).

Tabla 3. Número y peso total de nódulos en genotipos de soja domesticados (D-1 y D-2) y no domesticados (ND-3 y ND-4). SM: (plantas sin inocular con hongos micorrícicos arbusculares), CM: (plantas inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares). Los resultados se obtuvieron a los 40 días en condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo).

Genotipos	N° de nódulos/planta	Peso seco total (G)
D-1 SM	12 d	0,6 c
D-1 CM	12 d	1,00 b
D-2 SM	13 d	0,6 c
D-2 CM	23 b	1,3 b
ND-3 SM	17 c	0,8 c
ND-3 CM	28 a	2,1 a
ND-4 SM	18 c	0,8 c
ND-4 CM	30 a	2,3 a

Los datos son medias ($n = 10$ plantas). Los valores con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes entre tratamientos según la prueba de DGC ($p < 0,05$).

Dependencia micorrícica en genotipos de soja domesticados vs. no domesticados

La DM fue evaluada en los 4 genotipos de soja en simbiosis con HMA en dos tiempos, lo que nos permitió detectar la variabilidad de los parámetros de crecimiento. De este modo, en el primer tiempo, 20 días, en las plantas CM, se observó que los genotipos ND-3 y ND-4, seguidos por el genotipo D-2 mostraron un aumento significativo de la biomasa vegetal, expresada como DM en altura, área foliar y peso seco aéreo. Por el contrario, el genotipo D-1 mostró una DM negativa en altura y área foliar (Figura 4). Este comportamiento cambió en el segundo tiempo evaluado, 40 días donde el genotipo D-1 CM mostró un incremento positivo en altura y peso seco, sin superar los valores de DM, de los demás genotipos (Figura 4).

A los 20 días de tratamiento, la DM medida como MDA en los genotipos no domesticados y en el genotipo D-2 mostraron valores negativos, en comparación con el genotipo D-1 cuyo nivel de MDA se mantuvo cercano a cero (Figura 5, 20 días). A los 40 días, el genotipo D-1 mostró un porcentaje negativo del nivel de MDA, similar a los demás genotipos de soja (Figura 5, 40 días). Nuevamente, después del período corto de tratamiento, fueron los genotipos no domesticados, y el genotipo D-2 quienes mostraron una mayor DM, medida como CIT y FRAP, con respecto al genotipo D-1 (Figura 6 y 7, 20 días). Sin embargo, a los 40 días de tratamiento, la DM aumentó significativamente en el genotipo D-1, alcanzando valores similares en CIT y FRAP, a los mostrados por los otros genotipos (Figura 6 y 7, 40 días).

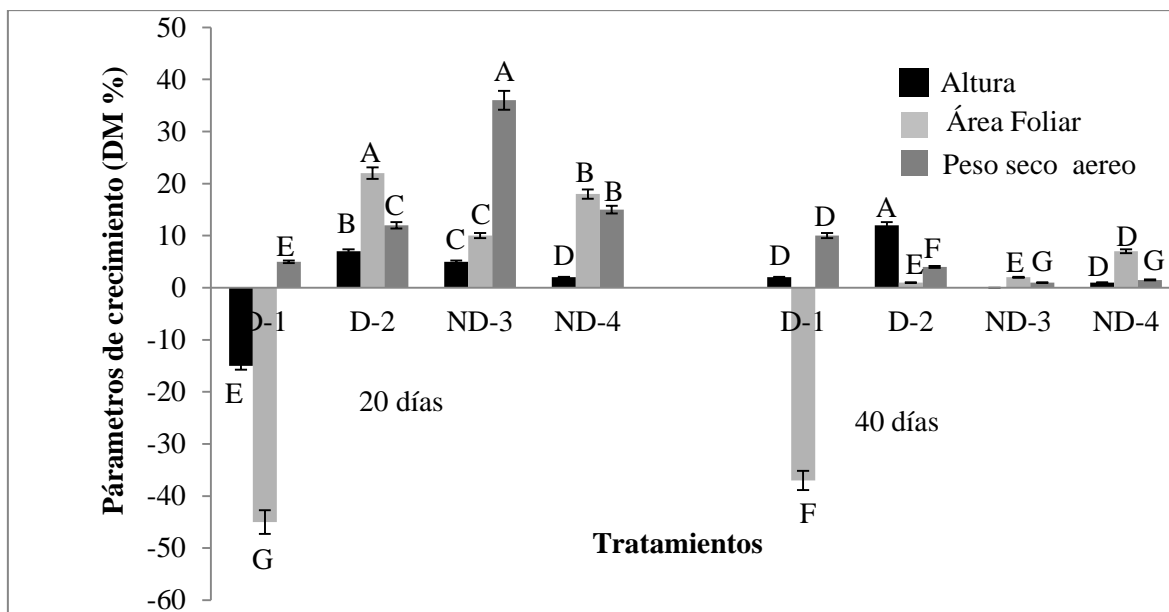


Figura 4. Parámetros de crecimiento (altura, área foliar y peso seco aéreo) en respuesta al efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares, evaluados como dependencia micorrícica (DM) en genotipos domesticados (D-1 y D-2) y no domesticados (ND-3 y ND-4). Los datos son medias \pm SE ($n=10$ plantas). Los resultados se obtuvieron a los 20 y 40 días de tratamiento, en condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo). Las barras con las mismas letras en cada variable (altura, área foliar, peso seco) no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de DGC ($p \leq 0,05$).

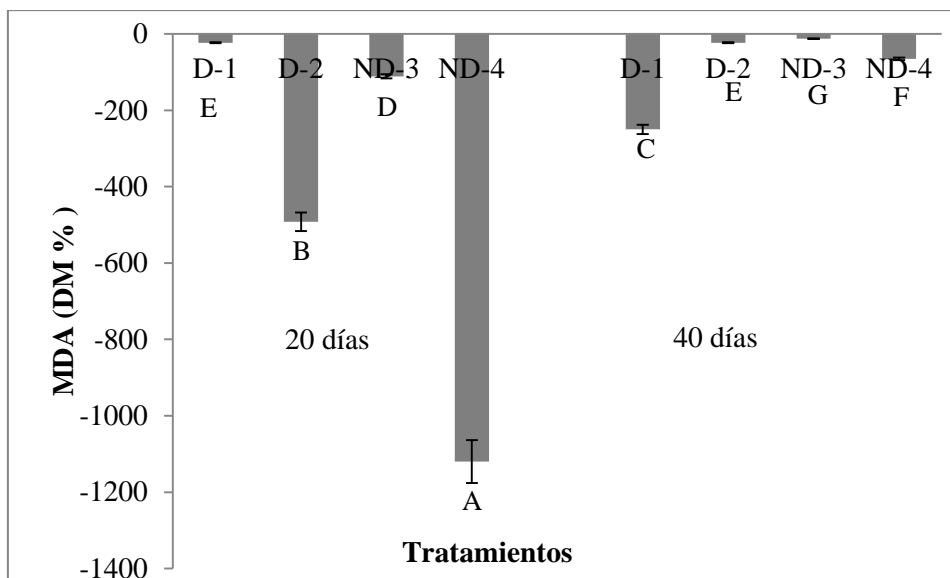


Figura 5. Efectos de la inoculación de hongos micorrícicos arbusculares en la concentración de malondialdehído (MDA) en genotipos de soja, evaluados como dependencia micorrícica (DM) en genotipos domesticados (D-1 y D-2) y no domesticados (ND-3 y ND-4). Los resultados se obtuvieron a los 20 y 40 días bajo condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo). Los datos son medias \pm SE ($n=10$ plantas). Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, de acuerdo al test de DGC ($p \leq 0,05$).

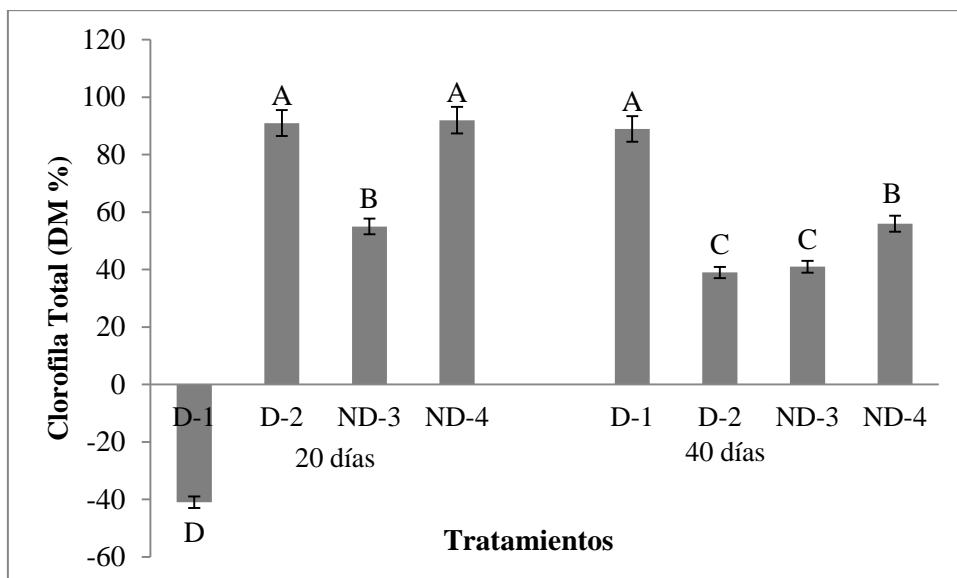


Figura 6. Efectos de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares sobre el contenido total de clorofila en plantas de soja, evaluados como dependencia micorrícica (DM) en genotipos domesticados (D-1 y D-2) y no domesticados (ND-3 y ND-4). Los resultados se obtuvieron a los 20 y 40 días bajo condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo). Los datos son medias \pm SE ($n=10$ plantas). Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, de acuerdo al test de DGC ($p \leq 0,05$).

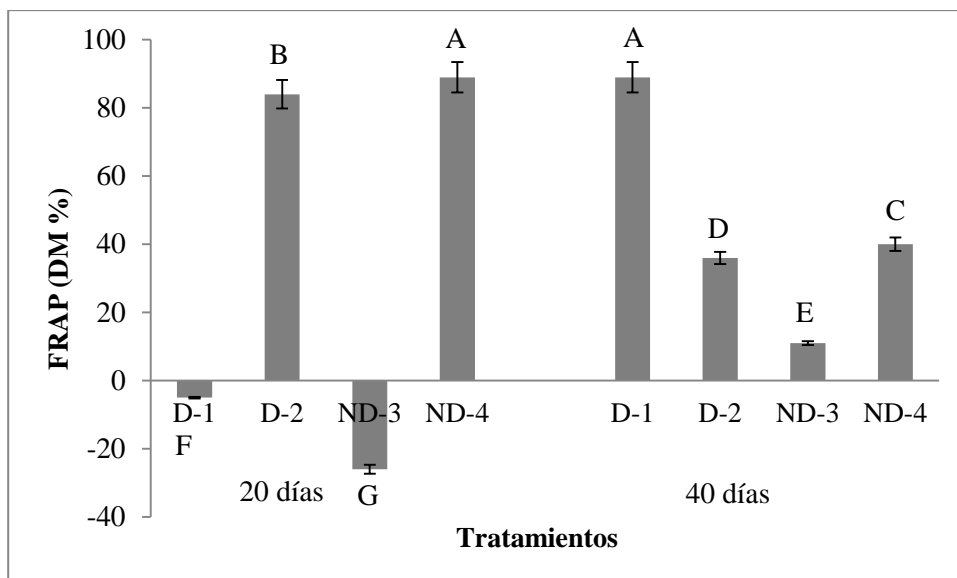


Figura 7. Efectos de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares sobre la actividad antioxidante (FRAP) en plantas de soja, evaluados como dependencia micorrícica (DM) en genotipos domesticados (D-1 y D-2) y no domesticados (ND-3 y ND-4). Los resultados se obtuvieron a los 20 y 40 días bajo condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo). Los datos son medias \pm SE ($n = 10$ plantas). Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, de acuerdo al test de DGC ($p \leq 0,05$).

Validación de la existencia de variabilidad en la formación de arbusculos y DM en genotipos de soja de interés comercial vs genotipos de soja no domesticados

Con el objetivo de validar las observaciones realizadas sobre variabilidad micorrícica en genotipos de soja domesticados vs no domesticados, se agregaron INTACTA y SYNGENTA 4X99 (D-3 y D-4), los que fueron comparados con los dos genotipos domesticados ya estudiados D-1 y D-2. Además se incluyeron 2 genotipos no domesticados provenientes del Banco de Germoplasma del INTA Marcos Juárez: (PI89772, PI548510: ND-1 y ND-2) los que fueron comparados con los dos genotipos no domesticados ya estudiados (ND-3 y ND-4). Después de 20 días de tratamiento en condiciones de riego normal (80 % CC), se observó que los mayores porcentajes de micorrización y formación de arbusculos correspondieron nuevamente, a los genotipos no domesticados (Tabla 4). Además, todos los genotipos de soja no domesticados mostraron un porcentaje similar de colonización micorrícica total y formación de arbusculos, mientras que entre los genotipos domesticados se observó variabilidad. En particular, el genotipo D-1 micorrizado, presentó el porcentaje de arbusculos más bajo entre los genotipos domesticados. Los porcentajes de hifas y vesículas variaron entre los tratamientos y en general no se observaron diferencias de estas estructuras entre los genotipos de soja domesticados y no domesticados. La colonización micorrícica no se observó en las raíces de las plántulas SM expuestas a condiciones de riego normal.

El análisis comparativo de la arquitectura de las raíces laterales de las plantas de soja CM, mostró que las mismas fueron más grandes y más densas que las raíces de soja SM tanto en genotipos domesticados como no domesticados (Tabla 5 y Figura 8 A y 8 B). Además, no se observaron diferencias en la arquitectura de las raíces entre genotipos de soja domesticados y no domesticados micorrizados y no micorrizados.

Tabla 4. Caracterización de la variabilidad en el porcentaje y estructuras de colonización micorrícica arbuscular en genotipos de soja no domesticados (ND-1, ND-4) vs domesticados (D-1, D-4), después de 20 días de tratamiento con hongos micorrícicos arbusculares en condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo).

Genotipos	Colonización total (%)	Colonización por hifas (%)	Colonización por vesículas (%)	Colonización por arbusculos (%)
ND-1	40 a	8 a	2 b	30 a
ND-2	42 a	9 a	1 b	32 a
ND-3	38 a	10 a	3 b	25 b
ND-4	41 a	5 b	1 b	34 a
D-1	25 c	8 a	5 a	12 d
D-2	32 b	8 a	2 b	22 b
D-3	28 b	4 b	4 a	20 c
D-4	30 b	6 b	7 a	18 c

Los datos son medias ($n=10$ plantas). Los valores con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes entre tratamientos según la prueba de DGC ($p<0,05$).

Tabla 5. Longitud de raíz principal y número de raíces laterales en genotipos de soja no domesticados (ND-1 a ND-4) y domesticados (D-1 a D-2). SM: (plantas sin inocular con hongos micorrícicos arbusculares), CM: (plantas inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares). Los resultados se obtuvieron a los 20 días en condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo).

Genotipos	Longitud de raíz principal (cm)		Número de raíces laterales	
	SM	CM	SM	CM
ND-1	14,9 b	20,6 a	52,5 b	120,3 a
ND-2	15,3 b	21,3 a	53,3 b	122,5 a
ND-3	16,1 b	20,8 a	53,4 b	119,8 a
ND-4	15,5 b	21,2 a	51,4 b	119,5 a
D-1	15,9 b	20,1 a	51,9 b	119,2 a
D-2	16,1 b	20 a	53,1 b	119,1 a
D-3	16,5 b	19,7 a	50,7 b	118,9 a
D-4	16,3 b	19,5 a	52,6 b	118,5 a

Los datos son medias ($n=10$ plantas). Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre genotipos y los tratamientos con y sin micorrizas según la prueba de DGC ($p<0,05$).



Figura 8. Imágenes del efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la arquitectura de las raíces aisladas y limpias de genotipos de soja **A)** no domesticados (ND-1 a ND-4) **B)** domesticados (D-1 a D-4); sin inocular con HMA (SM), inoculados con HMA (CM) en condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo), luego de 20 días de tratamiento.

El crecimiento de la biomasa de genotipos de soja domesticados y no domesticados fue incrementado por la inoculación de HMA, con un índice de DM positivo en área foliar y en masa seca de hojas y raíces (Figura 9). Aunque, el índice de DM fue mayor en genotipos de soja no domesticados micorrizados que en los domesticados micorrizados. Además, el contenido foliar de P04, N03 y S04 mostró un índice de DM positivo en genotipos de soja no domesticados y domesticados micorrizados (Figura 10), siendo el índice de DM significativamente mayor en todos los genotipos de soja no domesticados micorrizados. Por otra parte, mientras que en los genotipos de soja no domesticados se observó poca variabilidad en el nivel de DM relacionada con la biomasa y el contenido de nutrientes minerales foliares, los genotipos domesticados fueron variables, mostrando D-1 la respuesta de DM significativamente más baja tanto en biomasa como en el contenido de nutrientes foliares (Figuras 9 y 10).

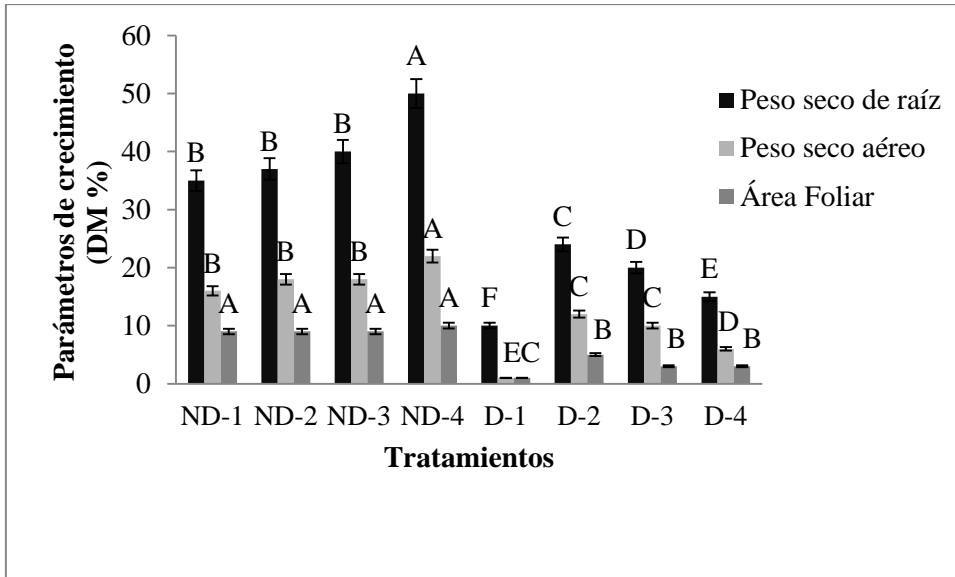


Figura 9. Peso seco de raíz, peso seco aéreo y área foliar evaluados como dependencia micorrícica (DM) en genotipos de soja no domesticados (ND-1 a ND-4) vs domesticados (D-1 a D-4) bajo condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo), luego de 20 días de tratamiento. Los datos son medias \pm SE ($n=10$ plantas). Las barras con las mismas letras en cada variable (altura, área foliar, peso seco) no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de DGC ($p \leq 0,05$).

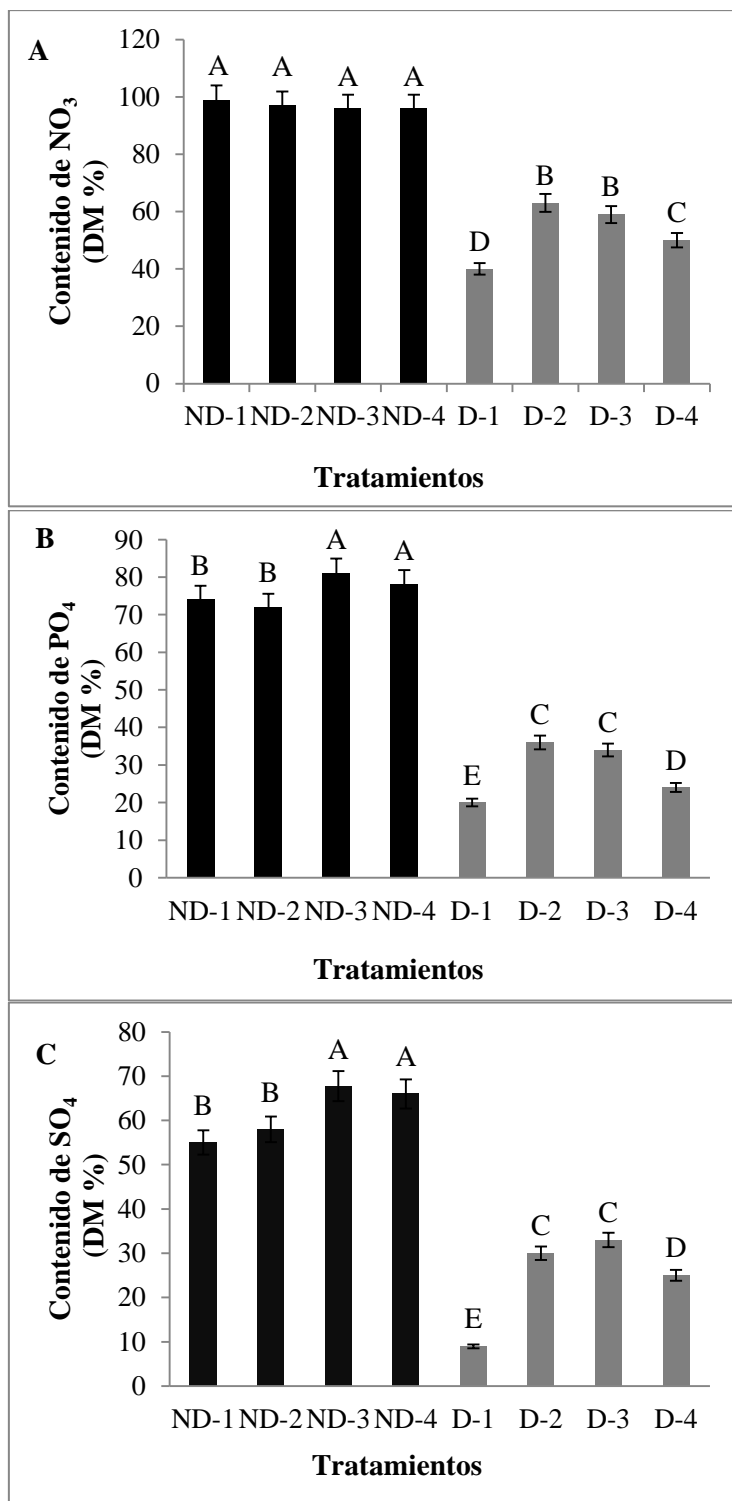


Figura 10. Contenido de nutrientes en raíces de genotipos de soja no domesticados (ND-1 a ND-4) y domesticados (D-1 a D-4) evaluados como dependencia micorrícica (DM) bajo condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo), luego de 20 días de tratamiento. **A)** Contenido de nitrato (NO₃); **B)** Contenido de fosfato (P₀₄), **C)** Contenido de sulfato (SO₄). Los datos son medias \pm SE ($n=10$ plantas). Tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo al test de DGC ($p \leq 0.05$).

Discusión

Algunas investigaciones realizadas en el cultivo de soja (Khalil et al. 1994; 1999) encontraron que tanto el aumento en la colonización de HMA como la DM fue mayor en genotipos de soja no mejorados que en cultivares modernos.

Nuestro sistema experimental bajo condiciones controladas nos permitió evaluar la colonización micorrícica y DM después de períodos cortos (20 días) y largos (40 días). Los resultados mostraron variabilidad en la colonización en los distintos genotipos de soja, dependiendo de la domesticación y del tiempo transcurrido desde la inoculación. En tal sentido se informaron porcentajes de colonización en las raíces de genotipos de soja no mejorados y mejorados que fueron desde 62 hasta 87 %, con la mayor colonización en *G. soja* (promedio 84 %) (Khalil et al. 1994). Además, a tiempos tempranos los genotipos no domesticados mostraron un mayor número de arbusculos comparados a los genotipos domesticados. Es conocido que los arbusculos pueden facilitar el intercambio bidireccional de nutrientes entre las plantas y los hongos (Smith y Smith 2011), la presencia de los mismos es crítica para la función simbiótica y se ha asociado con un aumento de la actividad metabólica en las plantas micorrizadas. Park et al. (2015) demostraron que la formación de arbusculos se relaciona con diferentes niveles de colonización y de simbiosis productiva. El genotipo comercial D-1, no tuvo presencia de arbusculos, aunque se observó la presencia de hifas en espiral, que se ha relacionado con el control de la transferencia de nutrientes entre simbioses (Smith y Smith 2011).

A tiempos más tardíos, 40 días, los genotipos no domesticados micorrizados presentaron un mayor número y peso de nódulos activos (color rojizo en su interior por presencia de leghemoglobina) (Morón et al. 2006), comparados a los genotipos domesticados micorrizados. Estos resultados coinciden con trabajos previos que muestran que el número y peso de los nódulos aumentó significativamente en plantas colonizadas de *Trifolium alexandrinum* L. y *Trifolium resupinatum* L. (Zarea et al. 2011) y *Glycine max* L. Merrill (Bulgarelli et al. 2017).

El hecho de que los genotipos no domesticados exhiben el mayor número y tamaño de los nódulos sugiere su mayor capacidad de fijación biológica de N₂ a la de genotipos domesticados, una hipótesis que se abordará en el futuro. Algunos estudios han demostrado que la presencia de HMA puede tener un impacto positivo en la fijación biológica del nitrógeno (FBN). Ruiz-Lozano et al. (2001) encontraron que bajo condiciones de sequía,

las plantas de soja inoculadas con *Glomus mosseae* y con *Bradyrhizobium japonicum* incrementaron la actividad de acetileno reductasa (una medida de FBN) en un 112 por ciento y un aumento en el contenido de leghemoglobina en un 25 por ciento, en comparación con plantas que solo habían sido inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum*. Las plantas inoculadas con micorrizas y *Bradyrhizobium* también presentaban un aumento en el peso de nódulos.

Por otro lado en éste capítulo se evaluó la DM, la cual se mide generalmente como cambios en el peso seco, expresado como un porcentaje y representa la relación entre el peso seco de la planta micorrizada, menos el alcanzado por la no micorrizada, relativo a la planta micorrizada (Plenchette et al. 1983; Janos 2007). Así a tiempos tempranos (20 días), los dos genotipos no domesticados y el genotipo D-2 inoculados con HMA, mostraron un aumento significativo en la biomasa vegetal, expresada como DM en peso seco de raíz, peso seco aéreo y área foliar. Por el contrario, el genotipo D-1 mostró una DM negativa en parámetros de biomasa (altura y área foliar) en comparación con los otros genotipos (Figura 4). Este comportamiento cambió a los 40 días de tratamiento, mostrando el genotipo D-1 un incremento positivo en la DM (altura y peso seco aéreo), alcanzando, pero no excediendo, valores de DM similares a los mostrados por los otros genotipos a tiempos tempranos (20 días) (Figura 4).

En el presente estudio, la DM también se evaluó mediante parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo y defensas antioxidantes. El estrés oxidativo se define como el aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROs). En condiciones normales, EROs se produce principalmente en un nivel bajo en orgánulos como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. En situaciones de estrés biótico y abiótico, la tasa de producción de EROs aumenta considerablemente; produciendo fenómenos de toxicidad en las plantas, con la consiguiente reducción en el rendimiento del cultivo (Miller et al. 2010). El daño oxidativo se evaluó como MDA, que a menudo se considera como el producto y un indicador del grado de peroxidación de los lípidos de membrana. El hecho que el MDA mostrara valores negativos en todos los genotipos de soja micorrizadas podría interpretarse como una disminución del daño oxidativo. Zhu et al. (2011) también reportaron que las plantas micorrizadas pueden reducir el daño oxidativo. Experimentos previos realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que luego del tratamiento con paraquat (herbicida cuaternario de amonio) (Bressano et al. 2010), o después de estrés por sequía (Grümbert et al. 2015), las plantas de soja micorrizadas mostraban un menor daño oxidativo que las plantas no micorrizadas.

La defensa antioxidante se evaluó como FRAP; el cual es una medida indirecta del contenido de antioxidantes no enzimáticos, tales como ácido ascórbico y glutatión, que han sido relacionados con la defensa antioxidante en plantas micorrizadas (Ruiz Lozano 2003). Además, se evaluó el contenido de clorofila total (CIT), ya que se sabe que la simbiosis con HMA estimula la síntesis del pigmento (Auge et al. 2001), relacionándose este efecto con un aumento en el metabolismo fotosintético en plantas micorrizadas (Gong et al. 2013). Nuestros resultados mostraron que a tiempos tempranos (20 días de ensayo), los genotipos ND, seguidos por el genotipo D-2 evidenciaron un valor de DM más alto, en CIT y FRAP, comparado con el genotipo D-1. Sin embargo, a los 40 días de tratamiento, la DM aumentó significativamente en el genotipo D-1, alcanzando valores similares a los mostrados por los otros genotipos. Tomado en conjunto, estos resultados sugieren que los genotipos ND y el genotipo D-2 pudieron regular el daño oxidativo en un corto período de tiempo (20 días de tratamiento), mientras que el genotipo D-1 necesitó más tiempo (40 días) para alcanzar la regulación del daño oxidativo.

En el segundo ensayo realizado también a tiempos tempranos pero incorporando más genotipos se observó una mayor colonización de HMA en los genotipos de soja no domesticados que en los domesticados, apoyando las observaciones del ensayo 1. En este ensayo al igual que en el ensayo 1, todos los genotipos de soja no domesticados mostraron una formación arbuscular mayor que los genotipos domesticados. Un resultado similar fue informado en el árbol de pan o frutipan (*Artocarpus sp.*) donde tanto las tasas de colonización vesicular como arbuscular disminuyeron significativamente en los cultivares comerciales o domesticados (Xing et al. 2012). El índice de DM positivo expresado como crecimiento de biomasa y contenido de nutrientes minerales fue mayor en genotipos de soja no domesticados que en domesticados. Estos resultados están de acuerdo con los de Khalil et al. (1994; 1999), quienes observaron que *Glycine soja* inoculada con HMA, tenía 7,8 veces mayor contenido en P total que *Glycine soja* sin inocular, mientras que los valores para sojas mejoradas fueron de 2,4 para Mandarin y 1,5 para Swift. También observaron que las raíces de *Glycine soja* inoculadas con HMA mostraron mayor actividad fosfatasa que los cultivares sin inocular. Además, Zhu et al. (2001) reportaron una menor capacidad de respuesta micorrícica en la concentración de P en raíces, en cultivares de trigo modernos que en cultivares antiguos.

En nuestro estudio bajo condiciones bien regadas, se observó que la arquitectura de las raíces laterales con micorrizas fue más grande y más densa que las raíces de soja sin micorrizas, lo que podría sugerir una mayor capacidad de absorción de nutrientes

minerales en las plantas de soja micorrizadas. En tal sentido, se ha informado que los HMA, tienen la capacidad de regular la arquitectura del sistema de raíz permitiendo una mayor absorción de nutrientes minerales (Smith y Read 2008). Wu et al. (2011, 2015) demostraron que la inoculación con HMA estimulaba la modificación morfológica de ciertas características de la raíz, como la longitud de la raíz, el área superficial y su volumen en *Poncirus trifoliata* L. Por otro lado, Isobe et al. (2002) informaron un efecto negativo de la inoculación de HMA sobre la longitud y el número de raíces principales y raíces laterales en *Phaseolus vulgaris*. Además, algunos estudios han descrito las diferencias en la arquitectura de las raíces entre los cultivares modernos y sus parientes silvestres. Por ejemplo, se desarrolló un sistema de raíces poco profundo en lechuga cultivada, *Lactuca sativa*, comparado con *Lactuca serriola silvestre* (Jackson 1995). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios en la arquitectura de la raíz micorrícica entre los genotipos de soja domesticados y no domesticados, lo que sugiere que la selección genética no afectó la arquitectura de las raíces en plantas de soja micorrizadas bajo condiciones de riego, al menos en una etapa temprana de colonización.

Conclusiones

Nuestros hallazgos muestran variabilidad genética en la capacidad de colonización micorrícica entre los genotipos de soja no domesticados y domesticados y el inóculo nativo mixto de HMA. Los genotipos de soja no domesticados presentan un mayor porcentaje de micorrización comparado con los domesticados.

La domesticación de los genotipos influye en la colonización micorrícica y tal efecto fue acompañado por una disminución en la formación de estructuras; especialmente arbusculos, una disminución del peso seco aéreo y radicular y en la absorción de nutrientes. Por el contrario, la arquitectura de las raíces micorrizadas de soja domesticada es similar a la no domesticada, sugiriendo que la domesticación no alteró la capacidad de exploración del suelo en la simbiosis HMA-soja domesticada.

La medición de parámetros claves del estrés oxidativo como contenido en clorofila, daño oxidativo como MDA y la defensa antioxidante como contenido en FRAP, mostró una respuesta temprana en los genotipos de soja ND y variable en los genotipos D.

La selección de genotipos de soja con buena y temprana colonización micorrícica y con una alta relación arbusculos/hifa surge como una estrategia útil para el desarrollo de variedades que optimicen la contribución de HMA en los sistemas de cultivo.

Las diferencias en la colonización micorrícica entre genotipos de soja no domesticados y domesticados pueden ayudar a dilucidar los diferentes mecanismos responsables de esta asociación.

Consecuentemente, se acepta la Hipótesis 1 que establece: el proceso de domesticación de los cultivares modernos afecta la capacidad de las plantas para asociarse simbióticamente con hongos micorrícicos arbusculares. Predicción: los genotipos de soja no domesticados exhibirán una mayor colonización y dependencia micorrícica en comparación con los genotipos domesticados.

CAPÍTULO 3

Participación de poliaminas claves y flavonoides como metabolitos implicados en la colonización micorrícica en genotipo de soja domesticado vs genotipo de soja no domesticado

Los resultados presentes en este capítulo han sido aceptados y están en proceso de publicación:

Salloum MS, Menduni MF, Benavides MP, Larrauri M, Luna CM, Silvente S (2018) Polyamines and Flavonoids: key compounds in mycorrhizal colonization of improved and unimproved soybean genotypes. *Symbiosis*, ID: SYMB-D-17-00163 (aceptado, en proceso de publicación)

Introducción

Poliaminas y flavonoides: metabolitos claves en la colonización micorrícica de genotipos de soja domesticados y no domesticados

La asociación entre las plantas vasculares y los HMA, se encuentra dentro del mutualismo más antiguo y generalizado de los ecosistemas terrestres, por lo que tiene una alta importancia ecológica (Strack et al. 2003; Parniske 2008). El establecimiento de esta asociación implica un complejo intercambio de señales entre los dos simbioses (Gadkar et al. 2001, Vierheilig y Piche 2002). Después del primer contacto físico entre las hifas y las raíces de las plantas, el hongo forma apresorios y posteriormente penetra en la superficie de la raíz colonizando el espacio intercelular de la corteza radicular que conduce a la formación del arbusculo (García Garrido y Ocampo 2002, Pozo et al. 2002). El aumento del crecimiento de las hifas cerca de la raíz de la planta se atribuye al hecho de que probablemente existan moléculas específicas presentes en los exudados radiculares del huésped, lo que indica que de algún modo se produce un fenómeno de reconocimiento en las primeras etapas de formación de la micorrización (Gadkar et al. 2001; Vierheilig y Piche 2002). Entre las moléculas que han estado implicadas en las señales entre las plantas y los HMA, algunas investigaciones han mencionado los flavonoides (Weston y Ulrike Mathesius 2013) y poliaminas (PAs) (Requena et al. 2007; Kusano et al. 2008).

Los flavonoides son metabolitos secundarios presentes en la mayoría de las plantas, y también constituyen una gran parte de los exudados radiculares y juegan un papel importante en muchas interacciones microbianas de las plantas (Akiyama et al. 2002). Por ejemplo, se ha mencionado su participación en etapas presimbióticas: germinación de esporas, longitud de hifa, ramificación de hifas y formación de un grupo de células auxiliares o esporas secundarias y en etapas simbióticas: formación de puntos de entrada y colonización de raíces, del desarrollo de los hongos arbusculares (Scervino et al. 2009; Mandal et al. 2010).

Larose et al. 2002, observaron en la etapa temprana de la colonización con HMA, niveles intermedios de flavonoides durante la penetración de la raíz, mientras que, altos niveles de flavonoides (como fitoalexina y medicarpin) se registraron, en una etapa posterior de la colonización de la raíz. Badri et al. (2009) establecieron que, una vez que

las plantas están bien colonizadas por HMA, el patrón de flavonoides cambia drásticamente, sugiriendo un papel regulador de los flavonoides en la interacción planta-HMA. Además, Scervino et al. (2005) reportaron que los efectos estimulantes de los flavonoides sobre el crecimiento de HMA podrían verse comprometidos, ya que cada flavonoide puede ejercer un efecto negativo o neutral sobre diferentes hongos debido a su especificidad involucrada en la formación de simbiosis micorrícica. Sin embargo, los flavonoides podrían no ser esenciales para el reconocimiento fúngico-vegetal ya que Becard et al. (1995) mostraron que las plantas mutantes de maíz dañadas en la producción de flavonoides fueron capaces de formar micorrizas de forma similar a las plantas de tipo silvestre. Hasta ahora, el papel de los flavonoides y otros ácidos fenólicos durante el crecimiento pre-simbiótico en la asociación de HMA no está claro.

Las PAs son pequeños compuestos policatiónicos que son omnipresentes en todos los organismos vivos (Kusano et al. 2008). Las principales especies de PAs en las plantas son putrescina (put), espermidina (spd) y espermina (spm). En las plantas, las PAs están involucradas en el crecimiento y el desarrollo, así como en las respuestas al estrés (Groppa y Benavides 2008; Alcázar et al. 2010; Mattoo et al. 2010; Takahashi y Kakehi 2010; Alet et al. 2012; Talaat y Shawky 2013). La homeostasis de las PAs se rige por un equilibrio dinámico entre la biosíntesis de las PAs y el catabolismo. La vía biosintética de las plantas PAs ha sido bien documentada (Bagni y Tassoni 2001, Kusano et al. 2008, Fuell et al. 2010). La biosíntesis de la put comienza con la descarboxilación de la ornitina, catalizada por la ornitina descarboxilasa (ODC), o indirectamente por la descarboxilación de la arginina por la arginina descarboxilasa (ADC), vía agmatina (Fuell et al. 2010). La put sirve entonces de sustrato para la biosíntesis de spd y spm a través de las actividades de S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) y espermidina (SPDS) y espermina sintasa (SPMS), (Walters 2000). El catabolismo de las poliaminas es crucial en la regulación de los niveles de las PAs en las células. Se catabolizan oxidativamente por aminas oxidasas que incluyen diamina oxidasas con unión al cobre (CuAO) / diaminas oxidasas (DAO) y FAD-unión de las poliaminas oxidasas (PAO) que están extendidas en todos los organismos vivos (Cona et al. 2006). Como resultado de la actividad de DAO, put puede oxidarse a Δ '-pirrolina con la liberación de amoníaco y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La oxidación de spm por PAO produce 1,3-aminopropilpirrolina, junto con diaminopropano y H_2O_2 (Bagni y Tassoni 2001). En las plantas se han reportado papeles diversificados de DAO y PAO en el crecimiento de las células (Delis et al. 2006, Tisi et al. 2011), en la

tolerancia al estrés por sequía (Yamaguchi et al. 2007, Shukla et al. 2015), al estrés salino (Cona et al. 2006, Liu et al. 2011) y respuestas de defensa (Rea et al. 2002).

Numerosas investigaciones implican que las PAs están involucradas en la colonización micorrícica (El Ghachtouli et al. 1996, Wu et al. 2010 a, b). En general, las PAs afectan a la colonización micorrícica arbuscular de las raíces de guisantes actuando directamente sobre el hongo, aumentando así los puntos de contacto con las raíces del huésped (El Ghachtouli et al. 1996). Específicamente, El Ghachtouli et al. (1996) reportaron que las PAs alteran la fisiología de la planta huésped, por interacción con pectinasas, afectando así la adhesión y / o penetración de la pared celular de la planta por el HMA. En plántulas de *Citrus tangerine* inoculadas con *Glomus mosseae* (Wu et al. 2010 a), el uso de difluorometilornitina, un inhibidor irreversible de la formación de put, mostró una inhibición significativa en el crecimiento de las plantas, la colonización micorrícica y el desarrollo radicular. Además, Wu et al. (2010 b), observó que las aplicaciones exógenas de put, pero no spm o spd, mejoraron el desarrollo micorrícico de las raíces de las plántulas de cítricos. Todos estos efectos se relacionaron con una inhibición de la asignación de glucosa a la raíz, lo que indica que las PAs endógenas regulan el desarrollo micorrícico de las plántulas de cítricos a través de la alteración de la asignación de carbohidratos a la raíz.

Los resultados desarrollados en el capítulo 2 de esta tesis doctoral mostraron diferencias significativas en la capacidad de colonización micorrícica entre genotipos de soja no domesticados y domesticados (Salloum et al. 2016).

En función de estas observaciones para el capítulo 3, se seleccionaron dos genotipos: un genotipo de soja no domesticado (ND-4) que mostró más capacidad de colonización micorrícica y formación de arbusculos desde tiempos tempranos, comparado con el genotipo domesticado seleccionado (D-1). En este sistema experimental consideramos de interés evaluar PAs y flavonoides como posibles metabolitos involucrados en el proceso de colonización, bajo la siguiente **Hipótesis 2**: los genotipos de soja domesticados y no domesticados presentan diferencias en la concentración de flavonoides y PAs lo que está influenciado por diferencias en la capacidad de colonización micorrícica, particularmente en la formación de arbusculos. Predicción: las raíces de soja de los genotipos no domesticadas presentarán una mayor concentración de flavonoides y PAs con respecto a las raíces de los genotipos domesticados.

Para probar esta hipótesis seguimos dos enfoques: en la simbiosis HMA-soja 1) se desarrolló un sistema experimental con la adición exógena de concentraciones crecientes

de flavonoides y 2) se obtuvieron raíces transgénicas con el silenciamiento de la vía PAs a nivel ADC y DAO, utilizando ARN interferente (ARNi).

Materiales y Métodos

Material vegetal y fúngico

Se utilizaron dos genotipos de soja: genotipo de soja domesticado (en adelante denominado genotipos D-1) y genotipos de soja no domesticado (en lo sucesivo denominados genotipos ND-4); seleccionados por el porcentaje de micorrización (Salloum et al. 2016).

El inóculo de HMA mixto se aisló según Salloum et al. (2016), a partir de raíces de soja recogidas de un sistema de monocultivo de soja desarrollado en EEA INTA Manfredi.

Sistema Experimental

El experimento de inoculación de HMA se realizó en un diseño factorial completamente al azar 2 x 2 x 1, con dos genotipos (D-1 y ND-4), dos tratamientos de inoculación, inoculadas con HMA (CM) y sin inocular con HMA (SM) y un régimen hídrico: riego normal (80 % de CC). Para el tratamiento de las semillas, inoculación y trasplante se siguió la misma metodología que en los ensayos mencionados en materiales y métodos 1 (ver capítulo 2).

Se tomaron muestras de raíces a los 20 días de tratamiento. Se utilizaron 10 macetas (10 plántulas) por genotipo (D-1 y ND-4) y por tratamiento (CM y SM).

Determinación de micorrización total

Las estructuras de HMA en las raíces se tiñeron según Phillips y Hayman (1970) y la colonización se midió siguiendo McGonigle et al. (1990).

Extracción y preparación de muestras para determinación de flavonoides y fenoles totales.

Después de 20 días de inoculación se recogieron las raíces y se almacenaron en bolsa de plástico sellada a 4 °C para la extracción. Se molieron las muestras (10 mg) y

luego se las remojo en 7 ml de metanol-agua (70:30 v / v) durante 24 h en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó para la determinación de flavonoides y fenoles totales. Los extractos se realizaron por triplicado.

Determinación de compuestos fenólicos totales

La concentración de fenoles totales en extractos de raíz se determinó usando el método de Folin-Ciocalteu (Waterman y Mole 1994, Nepote et al. 2005). La absorbancia de las muestras se registró a 760 nm por espectrometría (Spectrum SP-2100, Zhejiang, China). Se utilizó como estándar, ácido gálico (GAE, Sigma-Aldrich, St. Luois, EE.UU.). La concentración de fenoles totales de las raíces se calculó como equivalente de ácido gálico (mg GAE / g Ps).

Determinación de flavonoides totales

Para determinar la concentración total de flavonoides de los extractos se utilizó el ensayo de formación de complejos de cloruro de aluminio (Luximon-Ramma et al. 2005). Se utilizó quercetina (QE, Sigma Aldrich, St. Luois, EE.UU.) y se determinó la concentración de flavonoides como equivalentes de quercetina. Se dibujó una curva de calibración para la quercetina para este propósito, y se leyó la absorbancia a 367 nm. Las concentraciones de flavonoides se expresaron en (mg de QE / g Ps).

Aplicación de flavonoides exógenos

Se realizaron cuatro tratamientos, con diez repeticiones cada uno para un total de 40 macetas (una semilla / maceta). Los tratamientos realizados fueron: 1) HMA sin flavonoides (HMA + no F), 2) 50 mg / l de flavonoides exógenos más HMA (HMA+ F / 50), 3) 100 mg / l de flavonoides exógenos más HMA (HMA + F / 100), y 4) 150 mg / l de flavonoides exógenos más HMA (HMA + F / 150). Los flavonoides (Sigma, EE.UUG0897, formula: C₂₁H₂₀O₁₀, peso de fórmula: 432.4 AMU) se aplicaron exógenamente (100 ml) al medio de suelo en el inicio y después de 10 y 20 días de inoculación. Los otros tratamientos recibieron 100 ml de agua destilada.

Las plántulas se cosecharon 20 días después de los tratamientos con flavonoides exógenos, y se separaron las raíces. Se limpiaron trozos de raíces con hidróxido de potasio

al 10% y se tiñeron con azul de tripán al 0,05% en lactofenol según Phillips y Hayman (1970). La colonización y estructuras micorrícicas, tales como hifas, vesículas y arbusculos se examinaron y calcularon microscópicamente (Wu et al. 2008).

Determinación de poliaminas

El material vegetal (70 mg PS de raíces de soja) luego de 20 días de tratamiento con HMA se homogeneizó con 5% de ácido perclórico, se mantuvo 30 min en hielo y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se obtuvieron usando el método de dansilación descrito por Smith y Meeuse (1966) y se utilizó 1,6 hexanodiamina como patrón interno. La dansilación de los estándares de put, spd y spm fueron realizados simultáneamente. Los derivados de dansilo se extrajeron con 1 ml de acetato de etilo. Las PAs se separaron e identificaron por TLC, realizadas en placas de gel de sílice de alta resolución (JT Baker, placas de gel de sílice IB 2-F) usando n-hexano: acetato de etilo (1:1). Las PAs se identificaron mediante la comparación de los valores referencias. Las placas de sílice se observaron bajo luz UV y las bandas correspondientes a las PAs en las muestras y patrones se rasparon de las placas y se eluyeron con 1 ml de acetato de etilo. Su fluorescencia se midió a 365 nm de excitación y 510 emisiones en un espectro fluorómetro (Aminco Bowman).

Aislamiento del ARN y análisis semicuantitativo de RT-PCR.

Se extrajo el ARN total de las raíces de soja utilizando un kit de extracción de ARN (Sigma). El ADN genómico se degradó con DNasa I libre de RNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) por incubación en el tampón suministrado durante 15 minutos a temperatura ambiente. La pureza y la integridad del ARN se determinaron por electroforesis en gel de agarosa y las relaciones A260 / A230 y A260 / A280. Para los experimentos de RT-PCR, 3 µg de ARN total tratado con DNasa se transcribió inversamente en ADNc con oligo (dT) (12-18 -mer) utilizando la Transcriptasa Inversa M-MLV [H-] (Promega). Se utilizó una fracción (aproximadamente 1/20) de los ADNc de la primera hebra como molde para la PCR con cebadores específicos del gen en un volumen de 25 µl con 1 U de polimerasa Taq (Promega), 20 µM cada dNTP y 0,25 µM de cada cebador. La amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial de 1 min a 95 ° C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 ° C, 30 s a 60 ° C y 1 min a 72 ° C, y un único ciclo final de 7 min a 72 ° C. Los productos de RT-PCR se resolvieron en gel de agarosa al 1,2% (p / v) en tampón TRIS-acetato-EDTA. Como control interno, se utilizaron cebadores: FE1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') y FE1R (5'-AACAGTTTGACGCATGTCCCTAAC-3') para amplificar 358 pb dentro del gen de mantenimiento de la soja, *tefS1* (factor de elongación FE-1α; X56856).

Construcción de plásmidos

Para generar el vector silenciador, se crearon repeticiones invertidas en pARNi mediante dos etapas secuenciales de clonación. Las regiones diana correspondientes a la secuencia codificante de GmADC (320bp) o GmDAO (337bp) se amplificaron por PCR y posteriormente se enlazaron en el plásmido ARNi en los sitios de restricción AscI - SmaI en la orientación con sentido, o en los sitios de restricción BamHI - SpeI en la dirección antisentido. La construcción de repetición invertida resultante se insertó KpnI-PacI en el vector binario pRedRoot. Las regiones diana se amplificaron usando los siguientes cebadores:

GmADC-F: 5'ATATAACTAGTGGCGCGCCGAATGTTTTTGGGTGGGGCTTAC 3';

GmADC-R:

5'CGCGGGATCCATTTAAATCAGCAGATAAGGCATTCTGTCAAAGG3',

GmDAO-F: 5'ACTAGTGGCGCGCCCAGGATGGAAARATAGAAGC 3';

GmDAO-R: 5' GGATCCATTTAAATGCATAACWGGCCAGTCTTCC 3'.

Los sitios de restricción SpeI-AscI y BamHI-SwaI que están incluidos en el cebador han sido subrayados.

Las construcciones resultantes se utilizaron para la transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* K-599, lo que permitió la generación de plantas compuestas, principalmente según lo descrito por Estrada -Navarrete et al. (2007).

Silenciamiento de poliaminas

Con el objetivo de demostrar que las PAs están relacionadas con la colonización micorrícica se obtuvieron construcciones silenciadas en arginina decarboxilasa (ADC) y en diamino oxidasa (DAO), enzimas que intervienen en la síntesis y en el catabolismo de las PAs, respectivamente. En la figura 11 se observa el procedimiento para la obtención de raíces de soja con silenciamiento génico.

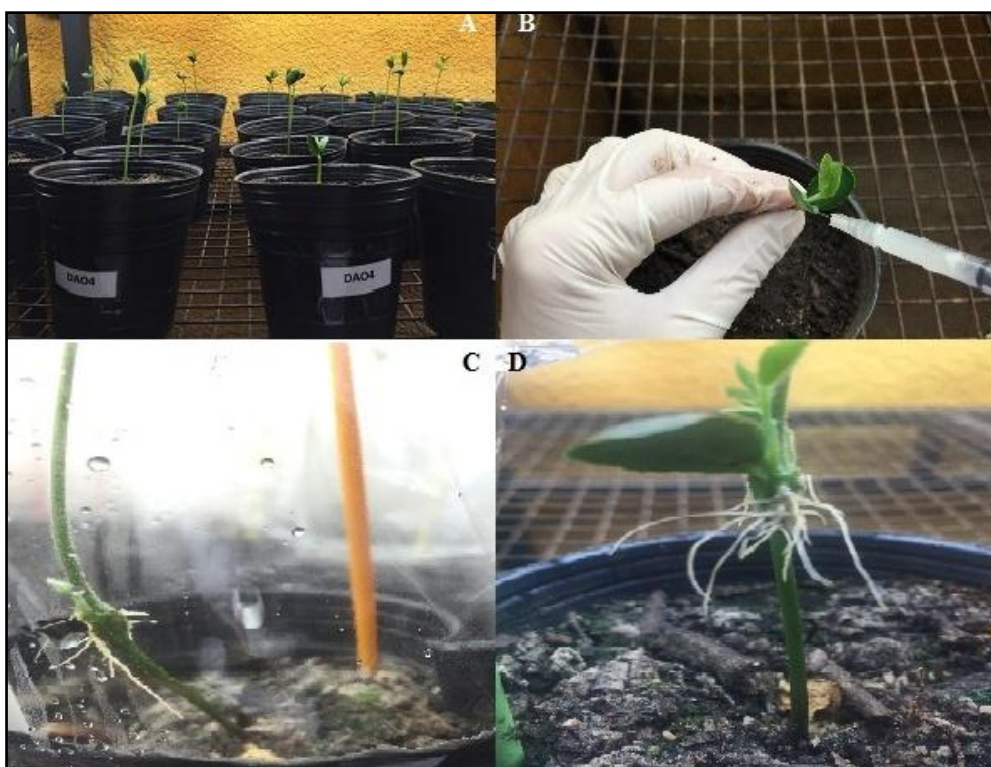


Figura 11. Transformación de raíz de soja. **A)** 7 días de crecimiento de los plantines; **B)** Inoculación de los plantines con *A. rhizogenes* y con *A. rhizogenes* + vector de red root resistente a la Kanamicina con segmento de ADN que silencia a las enzima DAO y ADC alrededor del área de los cotiledones utilizando una jeringa de insulina; **C)** 15 días después de la inoculación; **D)** raíz transformadas cultivadas en la cámara durante un mes.

De diez a doce días después de la infección, se seleccionaron las plántulas que presentaban profusa formación de raíz peluda en el sitio de infección, se eliminó la raíz primaria cortando aproximadamente 1 cm por debajo del nudo cotiledonario y se replantaron en macetas nuevas que contenían suelo: arena estéril. Inmediatamente después de transferir a nuevas macetas, cada una de las plantas transformadas con *A. rhizogenes* se inocularon con HMA, y se irrigaron con una solución nutritiva de Hoagland. Posteriormente, las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno para mantener las condiciones húmedas y se devolvieron a la cámara de crecimiento mantenida a un ciclo luz / oscuridad de 16/8 h y a una temperatura de 25°C. Después de 4-5 días de incubación, las bolsas de plástico se perforaron para facilitar la aclimatación gradual de las plantas transformadas al medio ambiente durante unos días. Las plantas se cosecharon 3-4 semanas después de la inoculación y las raíces se analizaron para observar la formación de micorrizas.

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el empleo del programa InfoStat Profesional (Di Rienzo et al. 2013). Los datos se analizaron estadísticamente usando un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre las medias se compararon mediante pruebas Duncan ($p \leq 0,05$).

Resultados

Después de 20 días de tratamiento con HMA, en condiciones de riego normal, las raíces del genotipo ND-4 CM mostraron un aumento significativo en la concentración de flavonoides y fenoles totales comparado con su control SM (Figura 12 A y 12 B). Por el contrario, en el genotipo D-1 CM, no se observaron diferencias en comparación con su control SM (Figura 12 A y 12 B).

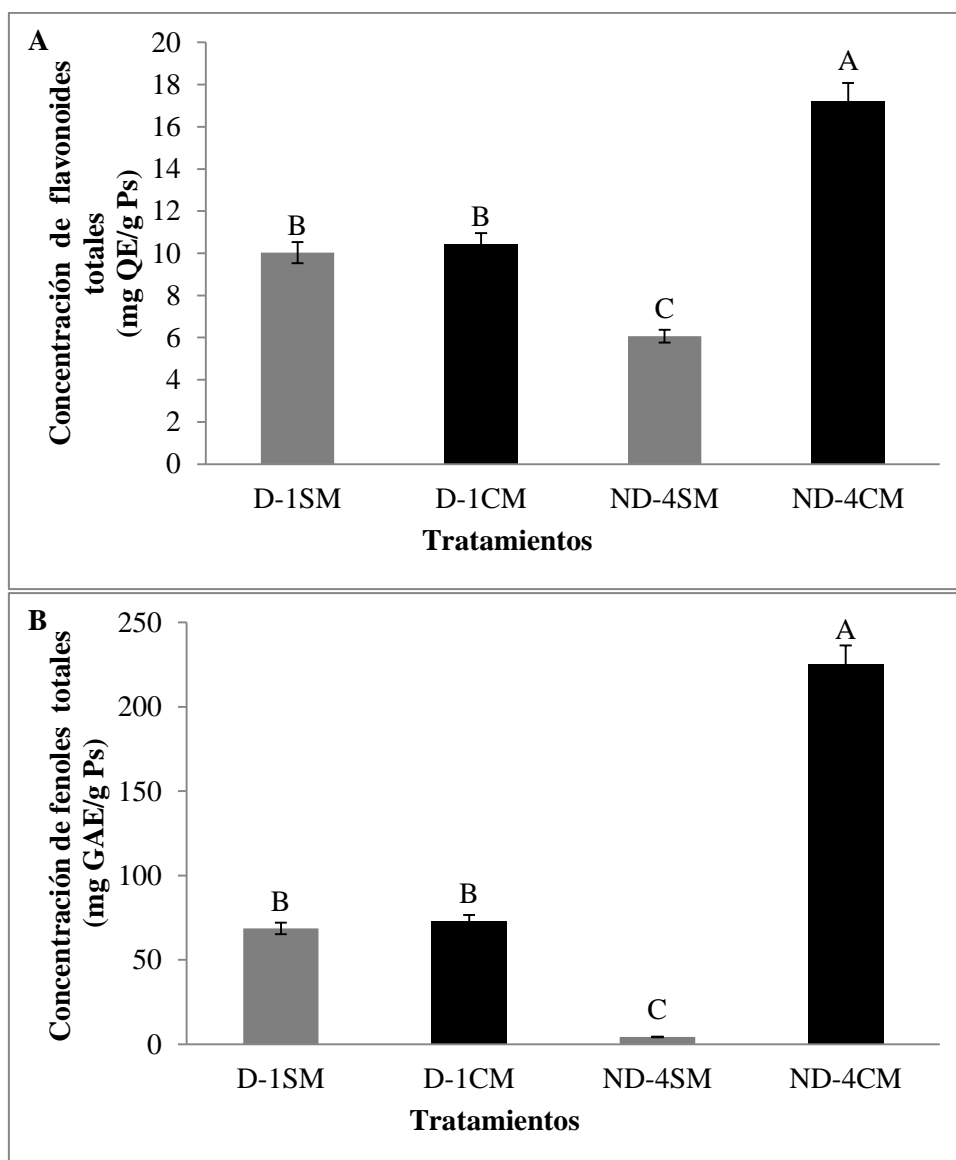


Figura 12. A) Concentración de flavonoides totales y B) Concentración de fenoles totales en raíces de genotipo de soja domesticado (D-1) y no domesticado (ND-4) a 20 días de edad foliar, en condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo); con y sin hongos micorrícicos arbusculares (CM y SM) . Los datos son medias \pm SE ($n=10$ plantas). Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo a la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$)

Efecto del tratamiento exógeno de flavonoides totales en la colonización micorrícica de genotipos de soja domesticados vs no domesticados

La aplicación exógena de flavonoides totales condujo a un aumento en la colonización micorrícica en las raíces de ambos genotipos de soja, particularmente, en el número de arbusculos y vesículas (Tabla 6). El efecto positivo se relacionó con la concentración, siendo la concentración de flavonoides más alta, F / 150 mg, la más efectiva, sobre todo en el incremento del porcentaje de arbusculos en ambos genotipos. Además, esta concentración más alta también favoreció el incremento en la colonización micorrícica y formación de arbusculos en el genotipo D-1.

Tabla 6. Efecto de la aplicación exógena de flavonoides totales en la colonización micorrícica de genotipo de soja domesticado (D-1) y no domesticado (ND-4). Las plantas fueron irrigadas con agua o con diferentes concentraciones de flavonoides (50-100 o 150 mg / l). Los resultados se expresan como porcentaje.

Tratamientos	Colonización total (%)	Colonización por hifas (%)	Colonización por vesículas (%)	Colonización por arbusculos (%)
D-1 HMA+F/0	20,9 d	19,9 e	1 c	0 e
D-1 HMA+F/50	34,4 c	29,5 b	3,3 b	3,4 d
D-1 HMA+F/100	34,5 c	26,6 c	3,3 b	4,4 d
D-1 HMA+F/150	39,5 b	27,2 c	1,7 c	12,2 b
ND-4 HMA+ F/0	35,5 c	30,8 b	2,6 b	2,9 d
ND4 HMA+F/50	38,6 b	30,3 b	3,3 b	3,6 d
ND4 HMA+F/100	43,3 a	36,6 a	3,3 b	6,6 c
ND4 HMA+F/150	44,5 a	24,7 d	3,7 a	16,1 a

Los datos son medias ($n=10$ plantas). Los valores con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes entre tratamientos según la prueba de Duncan ($p<0,05$).

Concentración de poliaminas

En general, las tres PAs que se presentan con frecuencia en las plantas, se detectaron en las raíces de ambos genotipos con y sin micorrizas. Put fue la más abundante, seguida por spm y spd, respectivamente (Figura 13 A, B y C).

En la Figura 13 A se observa un aumento significativo en la concentración de put en las raíces micorrizadas del genotipo D-1 CM, comparado con su control SM; no observándose diferencias significativas en los niveles de spd y spm. Por el contrario, se registraron aumentos significativos en las tres PAs en las raíces micorrizadas del genotipo ND-4 CM, comparado con su control SM (Figura 13 B).

En la figura 13 C donde se compara la concentración de PAs en ambos genotipos CM, fue evidente una mayor concentración de las tres PAs, put, spd y spm en el genotipo ND-4, comparado al genotipo D-1.

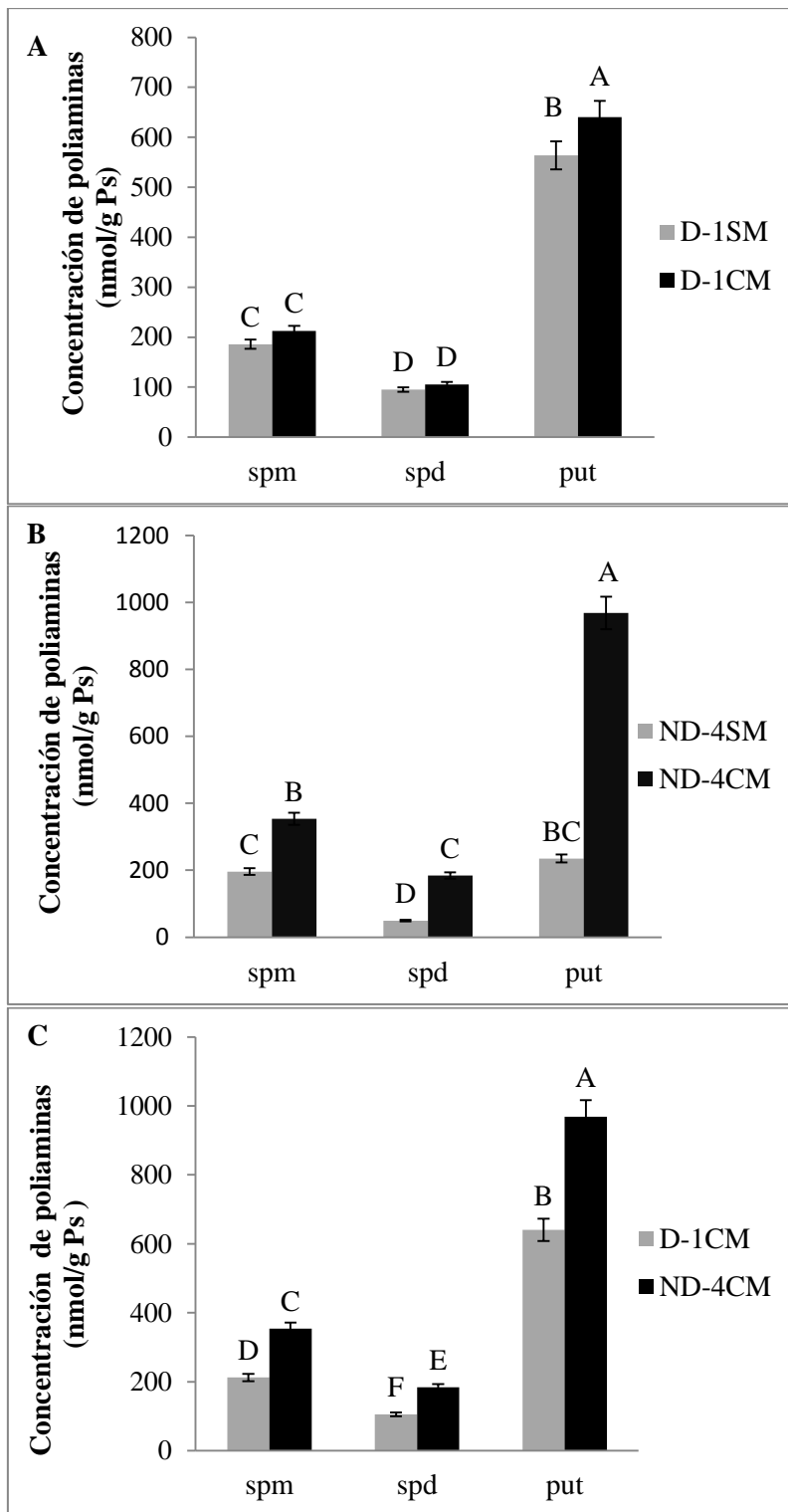


Figura 13. Concentración de poliaminas (PAs) en condiciones de riego normal (80 % de capacidad de campo). A) raíces de genotipo de soja domesticados (D-1): sin micorrizas (D-1SM) y con micorrizas (D-1CM); B) raíces de genotipo de soja no domesticados (ND): sin micorrizas (ND-4SM) y con micorrizas (ND-4CM); C) raíces de genotipo de soja domesticado y no domesticados micorrizados (D-1 CM; ND-4 CM), spm: espermina, spd: espermidina, put: putrescina. Los datos son medias \pm SE ($n=10$ plantas). Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes, de acuerdo a la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

Comprobación del Silenciamiento en ADC y DAO y su acumulación diferencial en raíces de soja micorrizadas domesticada vs no domesticada

Los genotipos D-1 y ND-4 con sus raíces transformadas por el *A. rhizogenes* se inocularon con el inóculo mixto de HMA, y sus raíces fueron evaluadas para confirmar el silenciamiento génico de las PAs claves, como así también su colonización micorrícica. De este modo, en las raíces control (no silenciadas) K599, al probar los primers (PR) DAO y ADC, se observó, según lo esperado, acumulación de transcritos de los genes respectivos (Figura 14 A y B; D1-K599 y ND4-K599). Por el contrario, cuando se evaluaron las raíces de plantas silenciadas, no se observó acumulación de transcritos según el PR evaluado. Así, cuando se probó el PR.DAO en plantas silenciadas en DAO, no se registró presencia de transcritos DAO en ambos genotipos (Figura 14 A y B; D1-DAO y ND4-DAO). Un resultado similar se observó con el PR.ADC en plantas silenciadas en ADC, de este modo, se confirmó el silenciamiento de dichos genes en las raíces de ambos genotipos con micorrizas (Figura 14 A y 14 B).

Por otro lado, y con el objetivo de avanzar en la comprensión de la participación de las PAs en la colonización micorrícica, se evaluó su acumulación diferencial en las raíces transgénicas silenciadas. Así, cuando se probó el PR.ADC en raíces de soja micorrizada silenciadas en DAO, se comprobó acumulación de transcritos ADC. Dicho comportamiento se registró en ambos genotipos (Figura 14 A y B, primer ADC; tratamiento D1-DAO y ND4-DAO). Por el contrario, cuando en las raíces silenciadas en ADC, se evaluó el efecto de la incubación con el PR-DAO, en las raíces de soja micorrizada de ambos genotipos, no se registró presencia de transcritos DAO (Figura 14 A y B; PR.DAO tratamiento D1-ADC y ND4-ADC).

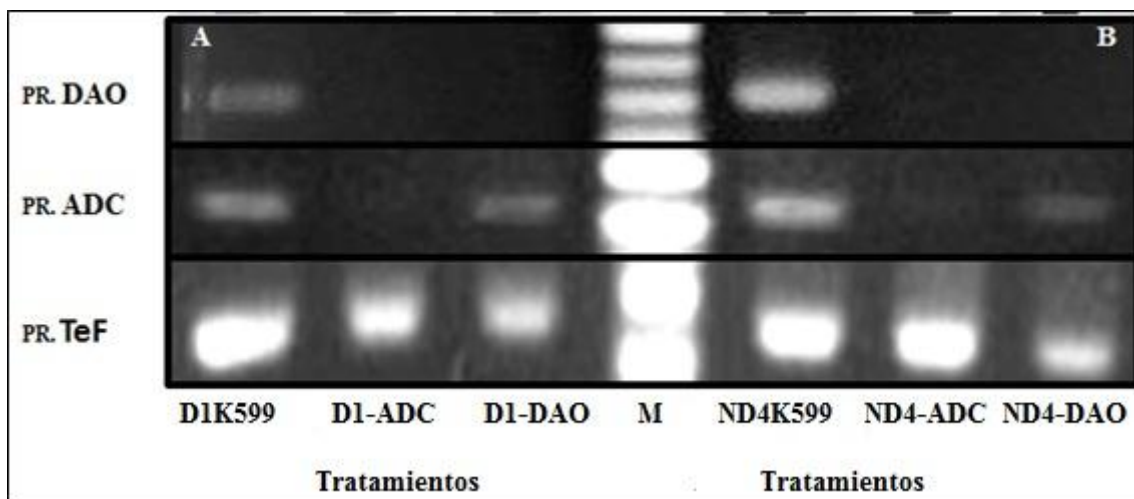


Figura 14. Acumulación de transcritos de enzimas del metabolismo de las poliaminas, en raíces transgénicas de soja micorrizadas de genotipo domesticado (D-1) vs no domesticado (ND-4). TEF: Factor de elongación (usado como control interno). Tratamientos: K599: planta micorrizada no transformada; -ADC: raíces micorrizadas silenciadas en arginina descarboxilasa; -DAO: raíces micorrizadas silenciadas en diamina oxidasa. M. Marcador molecular. PR: primer.

Al evaluar el efecto de PAs claves sobre la colonización micorrícica, en raíces transgénicas silenciadas (Tabla 7) se observó que el porcentaje de micorrización y formación de arbusculos fue similar en las plantas control D1-K599 y ND-4K5999. Con respecto a las plantas silenciadas en ADC, un gen clave para la síntesis general de las PAs, se observó en ambos genotipos (D-1 y ND-4), una disminución en la colonización micorrícica total y ausencia de arbusculos (Tabla 7).

Por el contrario, el silenciamiento del gen clave en la degradación de las PAs, como DAO, en las plantas D-1 promovió la formación de arbusculos ausentes en D1-k599. En las plantas ND-4 con raíces silenciadas en DAO, el porcentaje de micorrización total y formación de arbusculos fue similar a su control.

En la figura 15 A y 15 B se observa el efecto de la raíces micorrizadas transgénicas silenciadas en DAO y ADC, sobre la DM evaluada como altura, número y tamaño de hojas. Las plantas micorrizadas con raíces silenciadas D1-DAO y ND4-DAO se desarrollaron de forma normal como las plantas control no transformadas, D1-K599 y ND-4K599. Sin embargo, fue evidente un efecto sobre el crecimiento aéreo en ambos genotipos, cuando las raíces fueron silenciadas en ADC (Figura 15 A y B, D1-ADC y ND4-ADC), observándose una disminución en altura, número y tamaño de las hojas de las plantas, comparada con las plantas control (D1-K599 y ND4-K5999) y las plantas silenciadas en DAO (D1-DAO y ND4-DAO).

Tabla 7. Colonización micorrícica luego de 30 días de tratamiento con hongos micorrícicos arbusculares, en raíces silenciadas en arginina decarboxilasa (ADC) y en diamino oxidasa (DAO) y no silenciadas (control K599) en genotipo de soja domesticado (D-1) vs no domesticado (ND-4). Los resultados se expresan como porcentajes.

Tratamientos	Colonización total (%)	Colonización por hifas (%)	Colonización por vesículas(%)	Colonización por arbusculos(%)
D1-K599	28 a	22,5 b	-	-
D1-DAO	26 a	26 a	-	5,5 a
D1-ADC	8 b	8 c	-	-
ND4-K599	30 a	23,3 b	-	6,6 a
ND4-DAO	26,6 a	20 b	-	6,6 a
ND4-ADC	10 b	10 c	-	-

Los datos son medias ($n=10$ plantas). Los valores con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes entre tratamientos según la prueba de Duncan ($p<0,05$).



Figura 15. Dependencia micorrícica en parte aérea A) D-1: genotipo domesticado; B) ND-4: genotipo no domesticado; K599: *Agrobacterium Rhizogenes*; -DAO: *Agrobacterium Rhizogenes* +vector de red root resistente a la Kanamicina con segmento de ADN que silencia a la enzima DAO; -ADC: *Agrobacterium Rhizogenes* + vector de red root resistente a la Kanamicina con segmento de ADN que silencia a la enzima ADC.

Discusión

Conocer el diálogo entre las plantas y los HMA es crucial para entender la diferente capacidad micorrícica entre los distintos genotipos. En este capítulo se analizó la importancia y participación de dos metabolitos, flavonoides y PAs, implicados en la colonización micorrícica. De acuerdo a nuestro conocimiento, la comparación de la cantidad de estos metabolitos entre las raíces micorrizadas de genotipos de soja no domesticados o domesticados es original, y permitirá mejorar la comprensión de la colonización micorrícica en la simbiosis HMA-soja.

Es conocido que los flavonoides son metabolitos implicados en el desarrollo presimbiótico de los HMA en el suelo y en el proceso de reconocimiento de la interacción planta-HMA (Scervino et al. 2009.; Mandal et al. 2010). En ese sentido, en nuestros resultados, observamos una concentración endógena mayor de flavonoides y fenoles totales en plantas CM en comparación a plantas SM. También observamos un incremento en el porcentaje de micorrización total y porcentaje de estructuras fúngicas a mayor concentración de flavonoides y fenoles. Estos resultados apoyan la idea de participación de los flavonoides y fenoles en la regulación de la colonización micorrícica.

La concentración endógena de flavonoides y fenoles totales en raíces fueron mayores en el genotipo ND-4 CM que en las raíces del genotipo D-1 CM. Estos datos sugieren que la domesticación alteró negativamente los niveles de flavonoides en genotipos de soja domesticados y micorrizados y tal efecto podría haber influido en la variabilidad observada en la respuesta de soja domesticada a la colonización micorrícica (Salloum et al. 2016).

En apoyo de esta idea, en función de la aplicación exógena de flavonoides totales, el genotipo ND-4 CM, presentó mayores porcentajes de micorrización que los observados en el genotipo D-1 CM, en todas las concentraciones de flavonoides totales estudiadas. Sin embargo, se observó que la aplicación de flavonoides exógenos mejoró la colonización micorrícica, en el genotipo de soja D-1, lo que le permitió alcanzar un nivel similar al genotipo ND-4. También, las diferencias de colonización observadas entre las concentraciones fueron más evidentes en el genotipo D-1, lo que podría indicar que los niveles endógenos de flavonoides en ND-4 están muy cerca del óptimo requerido para alcanzar buenos niveles de micorrización. Además, en el presente estudio, se observó que la adición exógena de flavonoides estuvo acompañada por un aumento en la formación de

arbúsculos tanto en el genotipo ND-4 como en el D-1, lo que sugiere una relación entre los flavonoides y la formación de arbúsculos. Más aún, la aplicación exógena de flavonoides estimuló la formación de arbúsculos en el genotipo D-1, reforzando la idea que la domesticación alteró negativamente los niveles de flavonoides en soja domesticada y micorrizada, con un efecto específico en la formación de arbúsculos.

La interacción de las plantas con microorganismos beneficiosos también induce cambios en el metabolismo de las PAs. La colonización de HMA parece depender de los niveles de PAs (Yao et al. 2010). Sannazzaro et al. (2004) han sugerido que las PAs desempeñan un papel importante en las etapas iniciales de la colonización micorrízica debido a que se encontraron varias PAs en esporas de HMA. En el presente estudio el porcentaje de colonización micorrízica y la concentración de PAs, fueron mayores en el genotipo ND-4. Tales resultados muestran cambios la concentración endógena de PAs en función de la domesticación de soja con raíces micorrizadas y sugieren una posible participación de las PAs en la regulación de la colonización micorrízica. En este contexto, Wu et al. (2010 b) observó que put, pero no spd o spm, mejoró el desarrollo micorrízico de la raíz y el crecimiento de la planta de *Citrus trifoliada*. Más aún, Wu et al. (2012 a) reportaron que las plántulas de mandarina inoculadas con HMA aumentaron tanto la actividad foliar como de raíz, de arginina y de ornitina descarboxilasa (ADC y ODC), estimulando así la síntesis de put. De forma similar, se observó que la aplicación exógena de PAs, especialmente put, permitió un mayor desarrollo en el crecimiento y una mayor colonización micorrízica en *Citrus mandarina* (Wu et al. 2010 a y c), *Citrus limonia* (Yao et al. 2010), *Poncirus trifoliata* (Wu et al. 2010 b) y *Freesia híbrida* (Rezvanypour et al. 2015). Además, se ha investigado la posible participación de put en el desarrollo de micorrizas mediante aplicaciones exógenas de DL- α -difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor competitivo de los pasos catalizados por ODC de la formación de put (Hummel et al. 2002). DFMO inhibió fuertemente la infección micorrízica de *Pisum sativum* y la inhibición se invirtió cuando se incluyeron exógenos de put en el tratamiento DFMO (El Ghachtouli et al. 1996). Sin embargo, la evidencia para apoyar el rol directo de estos procesos sigue siendo difícil de alcanzar. Según nuestro conocimiento, nuestros resultados son los primeros en mostrar que la concentración endógena de PAs de raíces de soja micorrizada fue alterado en función de la domesticación.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de la participación de PAs endógenas de raíces de soja micorrizadas en la regulación de la colonización micorrízica,

en esta tesis, informamos sobre el uso de técnicas moleculares que han facilitado la modulación de las PAs por sobreexpresión o regulación negativa de los genes de las enzimas biosintéticas de las PAs en plantas transgénicas o mutantes, revelando así el papel preciso de las mismas. Específicamente, se utilizó un enfoque de silenciamiento de RNAi para reducir la actividad de ADC en las raíces de soja con el objetivo de evaluar la capacidad de las plantas transgénicas para formar micorrización. Razonamos que si la ruta mediada por la ADC está implicada en la estimulación de la formación micorrícica y el crecimiento de las hifas en: *Pisum sativum* (El Gachtouli et al. 1996), *Citrus tangerine* (Wu et al. 2010 c) y *Poncirus trifoliata* (Wu et al. 2010 b, Wu et al. 2012 b), podríamos esperar que la regulación negativa por silenciamiento de la transcripción de ADC presente un efecto marcadamente depresivo sobre la formación de micorrizas en las raíces de soja. Concordando con lo mencionado, nuestros resultados mostraron que la regulación de la transcripción de GmADC tuvo un profundo efecto negativo sobre la colonización micorrícica y también afectó el desarrollo normal de la planta, las cuales presentaron crecimiento atrofiado; sin ramificación del tallo y con hojas pequeñas. Sánchez- Rengel et al. (2016) observaron resultados similares en una línea amiR: ADC de *A. thaliana*, lo que sugiere que el ADC desempeña un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas durante su vida útil. Nuestros resultados muestran un efecto similar del silenciamiento en ADC a nivel fenotípico, en un genotipo de soja micorrizada. Más aun, estos resultados sugieren una posible participación del metabolismo de las PAs, particularmente la vía de ADC, tanto en la colonización micorrícica como en su efecto sobre la DM.

Puesto que la degradación de la put es a través de la vía de DAO (Smith y Barker 1988), para obtener más información sobre la participación de la misma en el proceso de colonización micorrícica se disminuyó la expresión de DAO. Es interesante destacar que, en las plantas silenciadas GmDAO, domesticadas y no domesticadas se observó expresión de los transcritos en ADC, demostrando que la vía de síntesis de PAs continuó normalmente, cuando se suprimió la vía DAO de degradación.

En ese sistema experimental, con presencia de transcritos ADC, la colonización micorrícica y la DM no mostraron cambios, siendo similares a su control sin silenciar (K599). En consecuencia, estos resultados apoyan la importancia y posible participación de la vía ADC, no solo en la colonización micorrícica sino además en la DM.

Finalmente, es interesante destacar que el silenciamiento en DAO, promovió la formación de arbusculos en el genotipo D-1. Estos resultados resaltan la importancia de la

expresión de los transcritos ADC tanto para la colonización micorrícica como para la DM tanto en genotipos domesticados como no domesticados.

Conclusiones

Los resultados muestran que la colonización micorrícica y la formación de arbusculos, se ven afectadas por la domesticación. Este efecto parece estar mediado por los niveles endógenos de metabolitos como los flavonoides y PAs (especialmente de put), ya que el genotipo ND-4 CM con mayor contenido endógeno de estos metabolitos, mostró mayor colonización micorrícica y mayor formación de arbusculos. Consecuentemente, se acepta la hipótesis 2 que establece: los genotipos de soja domesticados y no domesticados presentan diferencias en la concentración de flavonoides y PAs lo que está influenciado por diferencias en la capacidad de colonización micorrícica, particularmente en la formación de arbusculos. Predicción: las raíces de soja de los genotipos no domesticadas presentarán una mayor concentración de flavonoides y PAs con respecto a las raíces de los genotipos domesticados.

El silenciamiento del gen ADC en las raíces de soja, alteró negativamente la colonización micorrícica, particularmente la formación de arbusculos, y el fenotipo de ambos genotipos evaluados, sugiriendo su participación en el proceso de colonización.

Proponemos, la selección de genotipos domesticados micorrizados que presenten una alta concentración endógeno de PAs y flavonoides totales como una estrategia para mejorar la micorrización en el cultivo de soja.

En este sentido estamos realizando estudios que incluyen un mayor número de genotipos mejorados de soja para probar estos metabolitos como criterios de selección de genotipos de soja con mayor capacidad de colonización de HMA. Particularmente, a futuro proponemos evaluar la acumulación de transcritos del gen ADC en raíces de soja y establecer su relación con la variabilidad en la capacidad de colonización y la DM.

CAPÍTULO 4

Análisis de metabolitos implicados en la colonización micorrícica en genotipo de soja comercial vs genotipo de soja no domesticado

Introducción

El análisis metabólico como una herramienta para identificar los mecanismos fisiológicos relacionados con la colonización micorrícica arbuscular de raíces de genotipos de soja domesticados vs no domesticados

Para abordar cuestiones globales relacionadas con la agricultura, producción de biocombustibles y sostenibilidad ambiental, se están desarrollando nuevas tecnologías y enfoques que analizan exhaustivamente las complejas redes bioquímicas dentro de los sistemas de las plantas (Gemperline et al. 2016).

Específicamente, el enfoque de "cascada ómica" de los sistemas en la biología investiga los cambios globales dentro de los genes, proteínas y metabolitos de un organismo (Dettmer et al. 2007; Pu y Brady 2010). Avances significativos se han establecido en genómica, transcriptómica y proteómica, mientras que las tecnologías para monitorear los efectos posteriores (por ejemplo, metabolómica) emergen lentamente (Weckwerth 2003; Gemperline et al. 2016). La metabolómica es una herramienta poderosa por medio de la cual es posible obtener una perspectiva integral de cómo están reguladas las redes metabólicas. El término "metabolómica" es definido como el análisis cualitativo y cuantitativo de todas las moléculas pequeñas en un sistema biológico (Fiehn 2001). Hasta la fecha, se han desarrollado tecnologías para analizar los perfiles de metabolitos de una gran variedad de plantas que incluyen a tomate (Schauer et al. 2006; Oms-Oliu et al. 2011), *Arabidopsis* (Fiehn 2006; Schmidt et al. 2014), *Medicago truncatula* (Schliemann et al. 2008; Zhang et al. 2014) y *Glycine max* (Benkeblia et al. 2007).

Una de las técnicas más usadas hasta el momento para el estudio metabólico en plantas es la cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS), la cual permite la identificación y cuantificación de cientos de metabolitos en muestras vegetales que incluyen azúcares, alcoholes de azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y poliaminas, resultando en la comprensión del metabolismo primario de las vías centrales (Obata y Fernie 2012).

Dado que la interacción entre plantas y HMA genera cambios marcados en el metabolismo de las raíces, el análisis metabolómico podría ser útil para obtener una visión clara del proceso de simbiosis HMA-planta. En tal sentido, la interacción mutualista

requiere un ajustado control para que los beneficios sean mutuos (Kiers et al. 2011), y del lado de la planta implica cambios importantes en el metabolismo primario y secundario, y en la regulación de los mecanismos de defensa (Hause y Fester 2005). Particularmente, el análisis de metabolitos en función de la variabilidad genética entre los cultivares de soja podría proporcionar una oportunidad para entender el mecanismo subyacente a la colonización de soja micorrícica. Más aún, la identificación de metabolitos relacionados con la colonización podría permitir seleccionar cultivares de soja domesticados con mayor capacidad de colonización lo cual puede ser una estrategia útil para manejar los recursos de HMA del suelo. Los estudios metabolómicos en las asociaciones con HMA son poco frecuentes de encontrar, y la mayor parte del conocimiento actual sobre HMA y metabolismo se basa en estudios detallados que emplean isótopos marcados y espectroscopia de RMN (Bago et al. 2000, 2001; Pfeffer et al. 2001). Una de las investigaciones relacionadas con el tema, fue el estudio del perfil metabólico de *M. truncatula* (una leguminosa modelo estrechamente relacionada a *M. sativa*) inoculada con *Glomus intraradices*; donde los resultados revelaron niveles elevados de ciertos aminoácidos (glutamina y asparagina) acompañados por aumentos en las cantidades de algunos ácidos grasos (ácidos palmítico y oleico), indicando una activación específica del metabolismo de las micorrizas. Además, se observaron algunos ácidos grasos específicos de hongos (ácidos palmitvacénico y vacénico) los cuales fueron sugeridos como marcadores de colonización de raíces micorrizadas (Schliemann et al. 2008). Más recientemente, en nuestro grupo, se realizaron estudios de metabolómica comparando la respuesta al estrés por sequía de plantas de soja, micorrizadas y no micorrizadas (Grümberg 2015). En este estudio se utilizó el genotipo D-1 al igual que en esta tesis doctoral, y los resultados mostraron que bajo condiciones de sequía el genotipo D-1 micorrizado, comparado con su control indujo metabolitos diferentes, algunos relacionados con la defensa antioxidante.

No se ha reportado evidencia acerca del comportamiento metabolómico en raíces micorrizadas de genotipos de soja domesticados vs no domesticados, durante los primeros momentos (20 días) de la colonización micorrícica. Por lo que se propone su estudio, bajo la siguiente **hipótesis**: la respuesta diferencial en el perfil metabólico entre los genotipos domesticados vs no domesticados se relaciona con su capacidad contrastante de micorrización. Se predice que los genotipos no domesticados mostraran un aumento significativo de metabolitos asociados a PAs y flavonoides en sus raíces.

Para comprobar esta hipótesis se desarrolló un estudio metabolómico utilizando las raíces de los dos genotipos de soja con características contrastantes en su capacidad de colonización micorrícica: el genotipo D-1 que mostró una menor capacidad de colonización en comparación con el genotipo ND-4, el cual además presentó mayor formación de arbusculos desde tiempos tempranos (20 días de edad foliar) (Salloum et al. 2016).

Para este estudio se aplicaron dos técnicas complementarias: el análisis no dirigido o no focalizado que permitió la detección de los metabolitos de estructura conocida y desconocida, presentes en las raíces de soja de los distintos tratamientos. Por otro lado, la existencia de columnas específicas para flavonoides favoreció un análisis dirigido (Hong et al. 2016, Tian et al. 2016).

Materiales y Métodos

Material vegetal y fúngico

Se utilizaron los genotipos de soja domesticado DM50048 (en lo sucesivo D-1) y el no domesticado PI90768 (en adelante ND-4), pertenecientes a la colección de germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA-INTA) -Marcos Juárez. Se utilizó el inóculo mixto de HMA descrito en Salloum et al. (2016).

Diseño experimental y crecimiento de plantas

El experimento de inoculación de HMA se realizó en un diseño factorial completamente al azar 2 x 2 x 1, con los dos genotipos (D-1 y ND-4), dos tratamientos de inoculación, inoculadas con HMA (CM) y sin inocular con HMA (SM) y un régimen hídrico: riego normal (80 % de CC). Las semillas de soja se esterilizaron e inocularon siguiendo la metodología utilizada en materiales y métodos 1 (ver capítulo 2).

Se consideraron seis repeticiones biológicas por tratamiento (24 muestras en total). Las repeticiones biológicas hacen referencia a las raíces de 6 plantas para cada tratamiento (CM y SM) y para cada genotipo (D-1 y ND-4). Se tomaron raíces de plantas CM y SM a los 20 días de edad foliar y las muestras se almacenaron a -80° C hasta su análisis. Todas las muestras se extrajeron y procesaron en el laboratorio del Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas - Inta-Castelar, bajo la dirección de la Dra. Marina Insani y el Dr. Fernando Carrari.

Las muestras de las raíces de soja se molieron con nitrógeno líquido hasta alcanzar el estado de polvo con un peso registrado de (~ 80 mg). El polvo extraído se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml con 990 µl de metanol enfriado al 100% con el fin de detener la actividad enzimática, incluyendo 20 µl de stock ribitol (solución madre 0,2 mg / ml en metanol como patrón interno ES). Después del vórtex, las muestras se incubaron a 70° C durante 15 minutos mientras se agitaban a 1000 rpm. Luego se añadió agua fría ultra pura (480 µl), se mezcló bien y se centrifugaron durante 15 min a 13500 rpm. Una alícuota de 20 µl del sobrenadante metanol/agua se redujo a sequedad bajo vacío (concentrador Eppendorf plus). El extracto seco se trató para su posterior análisis en el sistema GC. En resumen, todas las muestras se re disolvieron en 20 µl de clorhidrato de metoxiamina 30 mg/ml en piridina y se trataron a 37 °C durante 120 minutos mientras se mezclaba a 500

rpm. Seguido de un tratamiento de 30 minutos con una mezcla de 20 μ l de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y 1 μ l de mezcla estándar de tiempo de retención compuesta por n-alcanos (C12, 15, 18, 22, 28, 32, 36) se mezclaron a 500 rpm (Lisec et al. 2006 con ligeras modificaciones).

Análisis del perfil metabólico no focalizado

Los perfiles completos de metabolitos se obtuvieron mediante GC/MS cuadrupolar único 5977B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Los análisis de metabolitos de los genotipos D-1 y ND-4 de plantas CM y SM, se extrajeron y trataron según Roessner-Tunnali et al. (2003), Lisec et al. (2006) y Dias et al. (2015).

Después se inyectaron volúmenes de muestra de 1 µl en el GC/MS usando la técnica de modo splitless. Los cromatogramas y los espectros de masas se evaluaron utilizando AMDIS Software, Versión 2.71 (2012). La identificación y la cuantificación relativa de los metabolitos detectados se realizaron con el software Tag Finder 4.0 (Luedemann et al. 2008) y en comparación con los datos espectrales de masa de la biblioteca pública GMD@CSB.DB (The Golm Metabolome Database, Kopka et al. 2005).

La estandarización del conjunto de datos completo se realizó teniendo en cuenta el valor de intensidad del ribitol (IS) en cada muestra y el peso fresco exacto. La cuantificación relativa, en términos de intensidad, se expresó como cambios de pliegue en comparación con los medios del grupo de tratamiento con los del grupo diseñado como control. Se realizó un análisis adicional sobre los datos de metabolitos normalizados, log-transformados y auto-escalados. Por último, la visualización de los metabolitos en las vías metabólicas para la interpretación biológica se realizó a través de las bases de datos Kegg – Encyclopedia of Genes and Genomes de Kyoto (Ogata et al. 1999), mapas de rutas de Kegg y la integración de datos de red y visualización gráfica con el software Cytoscape (Shannon et al. 2003).

Análisis del perfil metabólico selectivo

Para la determinación de isoflavonas, las raíces previamente congeladas a -80° C de los genotipos de soja se mortearon con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo de peso (~200 mg) y se extrajeron con 2,5 ml de metanol: agua fría de 90:10 v / v. Después de la centrifugación, se filtró una alícuota del sobrenadante transparente a través de membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) (diámetro de poro de 0,45 µm, AgilentTech., Santa Clara, EE.UU.) y se analizó mediante HPLC. La cromatografía se llevó a cabo con el mismo equipo de HPLC descrito anteriormente. La columna analítica era una columna ODS-Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm). La detección de compuestos se realizó con un detector UV-Vis de longitud de onda múltiple (MWV G1365B) a 250 nm. La fase móvil utilizada para la separación fue un gradiente lineal de ácido

trifluoroacético al 0,1% (disolvente A) y acetonitrilo: ácido trifluoroacético al 0,1% 80:20 (disolvente B). El gradiente fue de 68% a 30% de A en 16 minutos. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g/g}$ Pf.

Las curvas de calibración con compuestos puros de genisteína y daidzeína se usaron como patrones (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). La daidzeína total y la genisteína se evaluaron después de liberar la molécula de azúcar de los glicosídicos por hidrólisis química. Luego, un volumen igual de HCl 0,25 M y extracto de isoflavonas se puso en viales sellados y se incubó durante 2 h a 100°C. Cuando las muestras alcanzaron la temperatura ambiente, se filtraron a través de membranas de poli-tetrafluoroetileno (PTFE) (diámetro de poro de 0,45 μm) y se analizaron por HPLC usando las mismas condiciones cromatográficas descritas.

Análisis estadístico

Se aplicó análisis univariado y multivariado (software Infostat, Di Rienzo 2011). Primero, se probó el conjunto de datos para los valores atípicos. Después de verificar la homogeneidad y la normalidad, se compararon las diferencias estadísticas de las abundancias medias de cada uno de los compuestos mediante la prueba de Duncan, considerando: los dos genotipos (D-1 y ND-4), el tratamiento (CM y SM) y los genotipos de interacción por tratamiento. La significación se estableció en $p < 0,05$. Además se utilizó el análisis de conglomerados jerárquico y el Análisis de Componentes Principales (ACP) para la visualización de la relación entre las variantes relevantes (metabolitos) y genotipos / tratamientos e identificar los patrones dominantes en los datos (Figura 16 y 17).

Resultados

A los 20 días del tratamiento de inoculación con HMA, en condiciones de riego normal (80 % de CC), se detectaron 68 metabolitos en total, de los cuales 31 fueron de identidad desconocida. Entre los identificados se encontraron aminoácidos, polioles, ácidos orgánicos, azúcares, entre otros. De ellos, 32 mostraron diferencias significativas entre los genotipos micorrizados D-1 y ND-4.

Con el objetivo de obtener una información general del comportamiento de los distintos metabolitos en los diferentes tratamientos, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Figura 16). En dicho análisis los primeros 2 ejes, basados en el biplot, explicaron el 92% de la variación total entre tratamientos para las variables medidas (Figura 16). El componente principal 1 (CP1) explicó el 76% de la variabilidad de los datos, mientras que el componente principal 2 (CP2) explicó el 16%.

A lo largo del CP1 se separó el tratamiento del genotipo D-1 CM de los tratamientos del genotipo ND-4 CM y SM. Mientras que a lo largo del CP2 se separó el tratamiento del genotipo D-1 SM, del tratamiento del genotipo D-1 CM. La mayor cantidad de metabolitos (representados como puntos en la figura 16) se asociaron al genotipo ND-4 tanto CM como SM.

En el análisis de conglomerado jerárquico (Figura 17), nuevamente, se observó que el tratamiento del genotipo D-1 presentó una clara separación entre las plantas CM y SM. Es interesante destacar que el tratamiento del genotipo D-1 SM se encontró conglomerado con el grupo del genotipo ND-4 CM y SM, mientras el genotipo D-1CM se separó de todos los tratamientos.

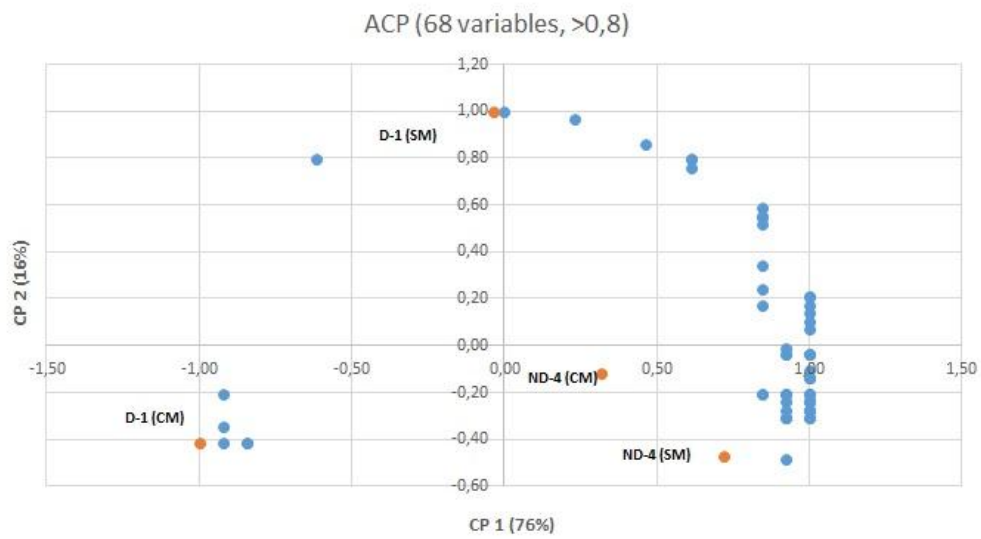


Figura 16. Análisis de componentes principales por (GC-MS) de metabolitos secundarios (puntos) en las raíces de genotipos de soja con y sin micorrizas, bajo condiciones de riego normal (80 % de CC) y luego de 20 días de tratamiento. D-1 CM: genotipo de soja domesticado inoculado con hongos micorrícicos arbusculares (HMA); D-1 SM: genotipo de soja domesticado sin inocular con HMA; ND-4 CM: genotipo de soja no domesticado inoculado con HMA; ND-4SM: genotipo de soja no domesticado sin inocular con HMA.

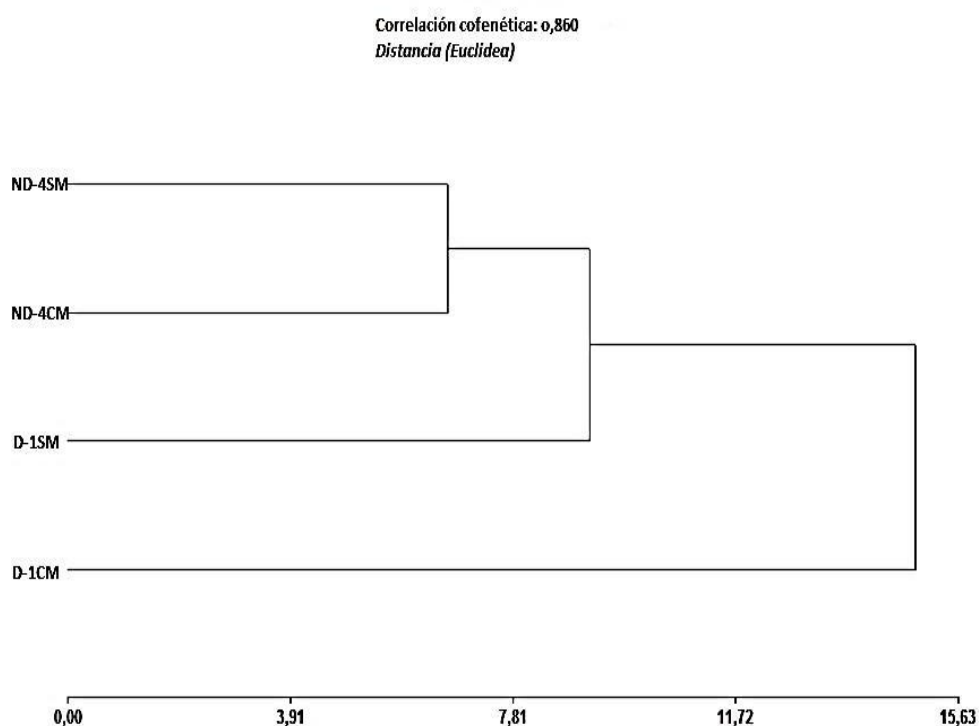


Figura 17. Análisis jerárquico de los metabolitos secundarios (GC-MS) en las raíces de genotipos de soja con y sin micorrizas, bajo condiciones de riego normal (80 % de CC) y luego de 20 días de tratamiento. D-1CM: genotipo de soja domesticado inoculado con HMA; D-1 SM: genotipo de soja domesticado sin inocular con HMA; ND-4 CM: genotipo de soja no domesticado inoculado con HMA; ND-4 SM: genotipo de soja no domesticado sin inocular con HMA.

En el genotipo ND-4, independientemente de si estaba o no inoculado con HMA, comparado al genotipo D-1 CM y SM, aumentó el nivel de los ácidos quínico, mirístico, galacturónico, glucónico, galactopironosido, cinámico y glucurónico (Tabla 8). Además, se observaron en el mismo genotipo mayores niveles de polioles como sorbitol, manitol, pinitol, inositol y viburnitol (Tabla 9). También, presentó mayores niveles de azúcares como glucosa, fructuosa, galactosa y calystegine B1 (Tabla 10) y mayores niveles de los aminoácidos metionina, lisina y asparagina (Tabla 11).

Por otro lado, la inoculación con HMA, provocó diferentes efectos sobre el contenido de metabolitos evaluados según el genotipo. En ambos genotipos en presencia de HMA se registró la presencia de ácidos, los que aumentaron diferencialmente según el genotipo. Así en el genotipo D-1, la presencia de HMA, comparado con su control SM, solo mostró el incremento de los ácidos cítrico e isocítrico, mientras que en el ND-4 CM comparado con su control SM se observó un incremento significativo de otros ácidos tales

como málico, butírico y aspártico (Tabla 8). Además, el genotipo ND-4 CM mantuvo los niveles de los restantes metabolitos ácidos, tales como malónico, fosfórico, piroglutámico, glutámico, glutárico, isocítrico, cítrico, galactopiranosido, quínico, mirístico, galacturónico, glucónico, cinámico, glucurónico y shikímico (Tabla 8), polioles tales como, treitol, pinitol, viburnitol, sorbitol y manitol (Tabla 9), azúcares, tales como fructuosa, galactosa y glucosa, alcaloide tal como calystegine B1 (Tabla 10) y aminoácidos tales como, metionina, espermina, lisina, asparagina y serina (Tabla 11), similares a su control SM. Mientras que el aminoácido cadaverina (Tabla 11) y el poliol inositol (Tabla 9) se encontraron disminuidos en el genotipo ND-4 CM comparado con su control SM.

Por el contrario en el genotipo D-1 CM la inoculación afectó negativamente, numerosos metabolitos comparados con su control SM. Así, en el genotipo D-1 CM se encontraron disminuidos los niveles de metabolitos ácidos tales como, malónico, fosfórico, piroglutámico, butírico, málico, glutárico, mirístico, galacturónico, glucónico, cinámico, glucurónico y shikímico (Tabla 8); polioles, tales como, treitol, pinitol, inositol, sorbitol y manitol (Tabla 9); azúcares y alcaloide como glucosa y calystegine B1 (Tabla 10), y aminoácidos como spermina (Tabla 11). Además, en el genotipo D-1 CM los restantes metabolitos, ácidos, tales como: glutámico, quínico y galacturónico (Tabla 8), polioles, tales como viburnitol (Tabla 9), azúcares, tales como fructuosa y galactosa (Tabla 10) y aminoácidos como cadaverina, metionina, lisina, asparagina y serina (Tabla 11), se mantuvieron en niveles similares a su control SM.

Por otro lado a través de la técnica de HPLC, con análisis dirigido o específico, se midió el contenido de isoflavonas en las raíces de soja de ambos genotipos. En el genotipo D-1 CM, se destacó la disminución de las tres isoflavonas medidas (daidzeína, genisteína y daidzeína total), mientras que en el genotipo ND-4 CM, se observó incremento de genisteína y mantuvo valores similares de daidzeína y daidzeína total con respecto a su control SM (Tabla 12).

Tabla 8. Análisis de varianza: efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA), sobre la cuantificación relativa de ácidos grasos, en raíces de genotipo de soja domesticado (D-1) y no domesticado (ND-4) a tiempos tempranos (20 días) de la colonización micorrícica, bajo condiciones de riego normal (80 % CC). CM: inoculado con HMA; SM: sin inocular con HMA.

Tratamientos Metabolitos	D-1 (SM)	D-1(CM)	ND-4 (SM)	ND-4 (CM)
Ácido malónico	66,86 a	9,12 c	35,12 b	34,01 b
Ácido fosfórico	119,56 a	37,09 b	53,16 b	66,56 b
Ácido málico	95,86 a	51,25 b	86,59 ab	90,65 a
Ácido aspártico	1,02 b	0,61 c	1,75 ab	2,23 a
Ácido piroglutámico	18,56 a	14,94 ab	8,78 b	10,86 b
Ácido butírico	7,39 b	4,40 c	12,37 ab	15,78 a
Ácido glutámico	5,34 a	7,53 a	5,32 a	4,87 a
Ácido glutárico	2,43 a	0,39 c	1,52 bc	1,74 b
Ácido isocítrico	1,31 b	3,74 a	1,54 b	0,98 b
Ácido cítrico	45,46 b	142,01 a	51,33 b	45,46 b
Ácido galactopiranosido	17,28 ab	7,73 b	28,62 a	22,39 a
Ácido quínico	1,32 b	0,2 b	4,17 a	3,05 a
Ácido mirístico	14,18 b	1,59 c	35,23 a	26,7 a
Ácido galacturónico	1,19 b	0,35 b	3,5 a	2,67 a
Ácido glucónico	1,74 b	0,24 c	4,9 a	3,74 a
Ácido cinámico	4,0 b	0,62 c	11,43 a	9,33 a
Ácido glucurónico	0,72 b	0,13 c	1,47 a	1,37 a
Ácido shikímico	1,52 a	0,76 b	1,75 a	1,7 a

Los datos son medias ($n=6$ plantas). Los valores de las medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla 9. Análisis de la varianza: efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA), sobre la cuantificación relativa de polioles, en raíces de genotipo de soja domesticado (D-1) y no domesticado (ND-4) a tiempos tempranos (20 días) de la colonización micorrícica, bajo condiciones de riego normal (80 % CC). CM: inoculado con HMA; SM: sin inocular con HMA.

Tratamientos Metabolitos	D-1 (SM)	D-1 (CM)	ND-4 (SM)	ND-4 (CM)
Treitol	1,56 a	0,79 b	1,45 a	1,49 a
Pinitol	31,05 ab	13,86 b	54,2 a	42,12 a
Viburnitol	1,29 b	0,23 b	3,8 a	2,79 a
Inositol	6,09 c	0,82 d	18,05 a	13,18 b
Sorbitol	1,75 b	0,38 c	4,02 a	3,95 a
Manitol				

Los datos son medias ($n=6$ plantas). Los valores de las medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan ($p\leq 0,05$).

Tabla 10. Análisis de la varianza: efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA), sobre la cuantificación relativa de azúcares, en raíces de genotipo de soja domesticado (D-1) y no domesticado (ND-4) a tiempos tempranos (20 días) de la colonización micorrícica, bajo condiciones de riego normal (80 % CC). CM: inoculado con HMA; SM: sin inocular con HMA.

Tratamientos Metabolitos	D-1 (SM)	D-1 (CM)	ND-4 (SM)	ND-4 (CM)
Fructuosa	65,21 b	9,10 b	215,23 a	214,14 a
Galactosa	1,11 b	0,17 b	2,92 a	2,28 a
Glucosa	63,63 b	15,87 c	140,32 a	126,11 a
Calystegine B1	3,77 b	1,01 c	8,71 a	7,72 a

Los datos son medias ($n=6$ plantas). Los valores de las medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan ($p\leq 0,05$).

Tabla 11. Análisis de la varianza: efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) sobre la cuantificación relativa de aminoácidos, en raíces de genotipo de soja domesticado (D-1) y no domesticado (ND-4) a tiempos tempranos (20 días) de la colonización micorrícica, bajo condiciones de riego normal. CM: inoculado con HMA; SM: sin inocular con HMA.

Tratamientos Metabolitos	D-1 (SM)	D-1 (CM)	ND-4 (SM)	ND-4 (CM)
Cadaverina	1,33 b	1,21 b	4,86 a	2,15 b
Metionina	2,36 b	1,39 b	4,32 a	4,65 a
Espermina	3,04 a	0,73 b	3,73 a	3,23 a
Lisina	0,49 b	0,22 b	1,25 a	0,96 a
Asparagina	2,67 b	0,38 b	7,4 a	5,64 a
Serina	3,83 a	3,69 a	5,32 a	4,70 a

Los datos son medias ($n=6$ plantas). Los valores de las medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tabla 12. Análisis de la varianza: efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares (HMA), sobre la concentración de isoflavonas en raíces de genotipos de soja domesticado (D-1) y no domesticado (ND-4), crecidos bajo condiciones de riego normal. CM: inoculado con HMA; SM: sin inocular con HMA. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g/g}$ PF.

Tratamientos	D-1 (SM)	D-1 (CM)	ND-4 (SM)	ND-4 (CM)
Isoflavonas				
Daidzeína	158,93 b	71,05 c	348,53 a	307,94 a
Genisteína	18,66 b	6,38 c	23,70 b	35,76 a
Daidzeína total	158,93 b	71,05 c	348,53 a	307,94 a

Los datos son medias ($n=6$ plantas). Los valores de las medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

Discusión

El análisis de conglomerado jerárquico y el ACP son algunos de los métodos exploratorios más populares usados para reducir la complejidad de los datos multivariados, son métodos de elección para identificar patrones, y destacar similitudes y diferencias entre las muestras. Su utilización permitió identificar diferencias entre los genotipos de soja y tratamientos con y sin micorrizas, en donde los resultados obtenidos serían la primera evidencia del contenido de metabolitos en raíces de la simbiosis HMA-soja de genotipos domesticados y no domesticados. En general, hemos podido identificar metabolitos cuyos niveles variaron significativamente según la inoculación con HMA y otros que fueron afectados negativamente en función de la domesticación del genotipo de soja.

Metabolitos en raíces de genotipos de soja en función de la domesticación

Dentro de los metabolitos que se encontraron con niveles más altos en las raíces del genotipo ND-4 en comparación con el genotipo D-1, independientemente de si estaba o no inoculado con HMA, destacamos los siguientes ácidos, como quínico, mirístico, galacturónico, glucónico, galactopironosido, cinámico y glucurónico; polioles como sorbitol, manitol, pinitol, inositol, azúcares como glucosa, fructosa, galactosa y el aminoácido metionina.

La acumulación de ácidos grasos y o carboxílicos han sido relacionados con la tolerancia de las plantas tanto en el estrés biótico como en el abiótico (Upchurch 2008). Estos metabolitos se encontraron en mayor cantidad en el genotipo ND-4 comparado al genotipo D-1, sugiriendo que la domesticación en soja alteró la acumulación de ácidos grasos o carboxílicos en las raíces de soja. La simbiosis con HMA no alteró este comportamiento. Dado que la acumulación de estos metabolitos se relaciona con el estrés ambiental, sería de interés observar tal comportamiento bajo condiciones de estrés abiótico (Upchurch 2008), por ejemplo, en raíces de soja con y sin micorrizas.

La acumulación de polioles como sorbitol, pinitol y manitol, ha sido relacionada con dos funciones: facilitar el ajuste osmótico y controlar el poder redox (Streeter et al. 2001). Nuestros resultados muestran que el genotipo ND-4 induce la acumulación de estos polioles sugiriendo tal comportamiento, que el genotipo ND-4 estaría en condiciones de soportar mejor el estrés abiótico. En apoyo de esta idea, cuando el genotipo ND-4 fue

sometido a sequía mostró mayor tolerancia, evaluada en parámetros de crecimiento y bioquímicos, comparado con el genotipo de soja, D-1 (Salloum et al. 2017). Por otro lado, el contenido de pinitol y manitol fue similar con y sin inoculación micorrícica en el genotipo ND-4, lo cual podría relacionarse con el hecho que las plantas se encontraban en condiciones de riego normal sin necesidad de requerir de los HMA para el aumento de estos metabolitos al no estar sometidas a un estrés. En apoyo de esta idea, Patel y Williamson (2016) enunciaron que el manitol puede actuar como un osmoprotector en plantas y hongos bajo estrés abiótico, así como servir como un antioxidante. Además, en ensayos realizados en genotipos de soja micorrizadas en condiciones de sequía, se observó que la soja micorrizada D-1 mantuvo un alto nivel de pinitol en sequía, sugiriendo que la simbiosis con HMA induce la acumulación de metabolitos osmoprotectores para mitigar el estrés abiótico (Grümberg 2015). Por su parte, el inositol es un carbohidrato similar al azúcar producido por la mayoría de las plantas, el cual, también se encontró aumentado en las raíces del genotipo ND-4. Este metabolito es considerado de gran importancia por participar en la vía de metabolismo del fosfato, la biosíntesis de la pared celular, la producción de moléculas relacionadas con el estrés, la comunicación de célula a célula, el almacenamiento y el transporte de hormonas vegetales (Loewus y Loewus 1983; Loewus y Murthy 2000).

El contenido de inositol fue menor en el genotipo ND-4 CM comparado a su control ND-4 SM. Por el contrario, Schliemann et al. (2008) observaron aumentos en los niveles de inositol en las raíces de *Medicago Truncatula* a los 35 días de su inoculación con *Glomus intraradices*.

Los incrementos en azúcares como glucosa, fructuosa y galactosa en las raíces del genotipo ND-4 sugieren un mayor metabolismo de la vía de la glucólisis (Figura 18) y en la vía del ciclo del citrato (Figura 19) proporcionando esqueletos de C en el genotipo ND-4. Tal efecto, podría permitir al genotipo ND-4 estar mejor preparado para mantener una futura simbiosis, ya que es conocido que durante la interacción de la simbiosis el carbono fluye hacia el hongo y los nutrientes inorgánicos se mueven hacia la planta (Smith y Read 2008). Particularmente, en el citosol, los niveles de azúcar aumentan debido al aumento de la fotosíntesis, lo que favorece las altas tasas de flujo de C entre el arbusculo y la célula huésped (Gaude et al. 2015).

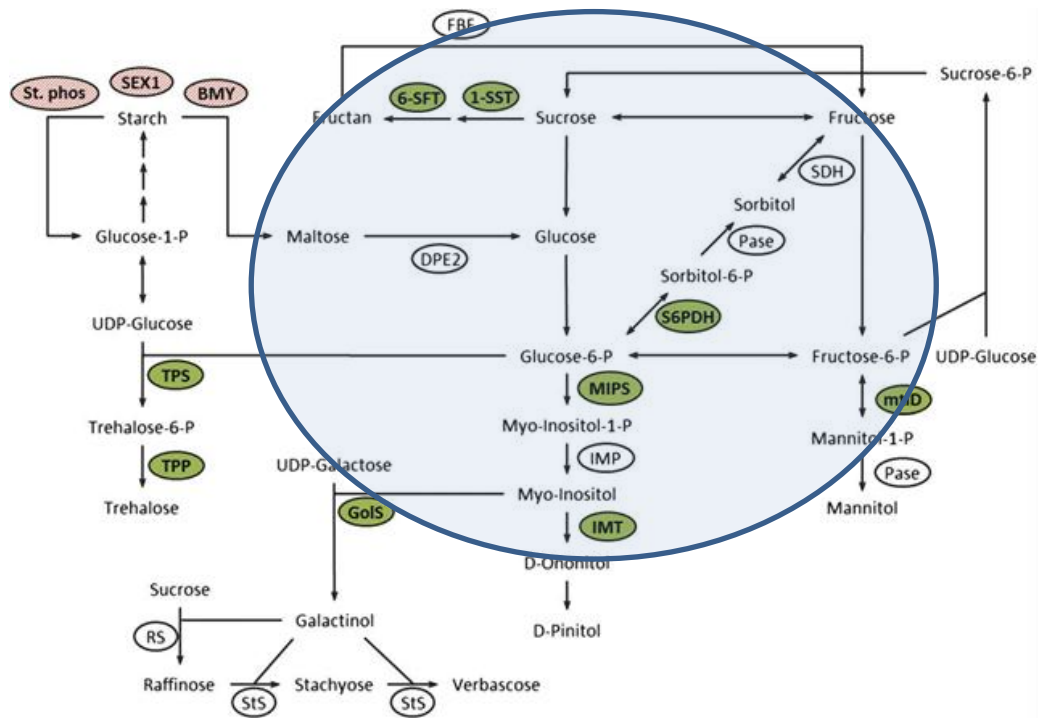


Figura 18. Descripción esquemática del metabolismo de polioles y azúcares. Tomado de Krasensky y Jonak (J. Exp. Bot. 2012).

Otro metabolito aumentado en las raíces fue la metionina, que es fundamental en las células vegetales dado su rol como constituyente de las proteínas y en la traducción del ARNm. Es conocido que la metionina tiene una vida media corta debido a un metabolismo rápido hacia S-adenosilmetionina (SAM) (Amir 2008) y desde allí controla los niveles de varios metabolitos claves de las PAs (Figura 19) y del etileno. La presencia de metionina fue mayor en el genotipo ND-4, comparado con el D-1, CM y SM, lo cual podría guardar relación con una mejor regulación de las vías mencionadas. En apoyo de esta idea, nuestros resultados mostraron aumentos endógenos de las PAs en las raíces del genotipo ND-4 CM y SM, comparado con el D-1 (Salloum et al. 2018, aceptado y en proceso de publicación). Por su parte, Zsögön et al. (2008) sugirieron que el etileno podría jugar un importante papel en el control del crecimiento intraradical micorrícico.

En resumen en el genotipo ND-4, con y sin HMA, se encontró un mayor contenido de metabolitos relacionados con las vías de los azúcares, de los polioles y de la metionina, mientras que en el D-1 estos metabolitos se vieron disminuidos. Tales resultados sugieren que el proceso de domesticación de soja alteró de algún modo, las vías metabólicas mencionadas.

Metabolitos en raíces de genotipos de soja en función de la inoculación con HMA

En relación al efecto de la inoculación con HMA, en las raíces del genotipo ND-4, comparado con su control SM, se encontraron aumentados los niveles de los siguientes ácidos: ácido málico, ácido butírico y ácido aspártico. En general éstos ácidos en forma soluble son participantes claves en el metabolismo general de las plantas, siendo su papel principal como constituyente de proteínas (Medici et al. 2004 a, b). También actúan como intermediarios de la vía metabólica y en el almacenamiento de moléculas de nitrógeno (Ferreira et al. 2005). Es interesante destacar que todos los ácidos mencionados en el ND-4 CM, mostraron aumentos significativos, comparados con el genotipo D-1 CM.

El malato ocupa un papel central en el metabolismo de las plantas. Su importancia en la nutrición mineral se refleja en el papel que desempeña en la fijación simbiótica de nitrógeno y la adquisición de fósforo (Gietl 1992; Martinoia y Rentsch 1994; Schulze et al. 2002). El ácido málico y su anión, el malato, juegan un papel muy importante en la bioquímica y fisiología de las plantas, y además de su participación en el ciclo de Krebs, puede convertirse en un reservorio de CO₂. También, puede servir como un transportador indirecto de equivalentes reductores, amortiguador del pH y de la osmolaridad del citosol, quelante de cationes tóxicos y acidificantes del suelo para solubilizar los fosfatos insolubles (Camacho y Salinas 2005). En el genotipo ND-4 CM los mayores niveles de málico en las raíces podrían ser eficaces en la adquisición del fósforo, comparado con el genotipo D-1 CM. En este sentido, en Salloum et al. (2017) se observaron mayores niveles de micorrización y contenido de P₀₄ en el genotipo ND-4, comparado con el D-1. Además, el malato es el sustrato primario para la respiración bacteroidal, en los nódulos radicales fijadores de nitrógeno, alimentando así la enzima nitrogenasa (Driscoll y Finan 1993); y además proporciona los esqueletos de C para la asimilación de nitrógeno fijado en aminoácidos (Rosendahl et al. 1990). El papel crítico que desempeña el malato en los nódulos radiculares se evidencia por el hecho de que los nódulos ineficaces, (ya sea inducida por cambios en las bacterias o el genotipo de la planta), han reducido drásticamente los niveles de malato en comparación con los nódulos efectivos (Schulze et al. 2002). Posiblemente, la presencia de malato en mayor nivel en el genotipo ND-4 CM podría también relacionarse con el mayor número y peso de los nódulos observados, comparado con el genotipo D-1 CM (ver capítulo 2 y Salloum et al. 2016).

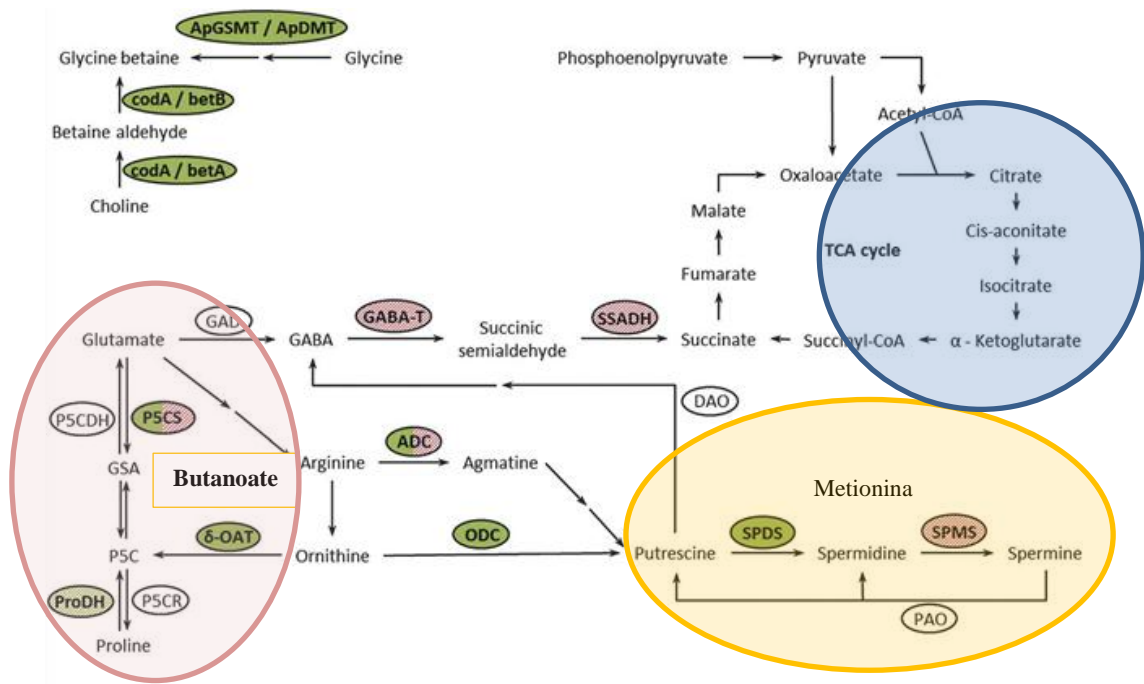


Figura 19. Descripción esquemática del metabolismo de los aminoácidos. Tomado de Krasensky y Jonak 2012. (J. Exp. Bot. 2012).

Es conocido que, en la simbiosis con HMA, el carbono se trasloca como hexosas a los arbusculos e hifas fúngicas intraradicales y posteriormente se metaboliza a trehalosa, glucógeno y lípidos. Los lípidos se traslocan a las hifas extraradicales donde se usan para el crecimiento y mantenimiento del hongo (Shachar-Hill et al. 1995; Javot et al. 2007). En tal sentido, Gaude et al. (2012) observaron cambios transcripcionales en genes implicados en el metabolismo de los lípidos durante la simbiosis con HMA y especialmente durante el desarrollo y el funcionamiento de los arbusculos, en las raíces de *Medicago truncatula* inoculadas con *Glomus intraradices*, lo que conllevó a concluir la importancia del metabolismo de los lípidos en la simbiosis. Los resultados mencionados estarían en estrecha relación con el aumento en la formación de arbusculos del genotipo ND-4 CM (Ver capítulo 2 y Salloum et al. 2016), comparado con los genotipos de soja domesticados, donde el genotipo D-2 mostró un número más reducido de arbusculos, mientras el D-1 no formó arbusculos en todo el ensayo.

Los resultados obtenidos en el análisis metabólico sobre el genotipo ND-4 CM, mostraron la importancia de la participación de los HMA en el aumento de metabolitos relacionados con la fijación de nitrógeno, del carbono y la adquisición del fósforo,

sugiriendo que el proceso de domesticación de soja afectó la colonización micorrícica alterando estas vías claves.

Por su parte, en el genotipo D-1 CM se encontraron incrementos en los contenidos de ácido cítrico e isocítrico, en comparación con las raíces SM. Estos compuestos están implicados en el ciclo de Krebs (Figura 19), y participan en la fijación de C, carboxilación y descarboxilación, anabolismo y catabolismo (Gawronska y Niewiadomska 2015). Sin embargo, la inoculación con HMA disminuyó significativamente el resto de los metabolitos con respecto a su control D-1 SM, y el genotipo D-1 no tuvo un buen desarrollo en el crecimiento, comparado con el resto de los genotipos (Ver capítulo 2). Nuestros hallazgos concuerdan con varios autores que informaron aumento de la fijación de C incluso en ausencia de una respuesta de crecimiento significativo de la planta (Schliemann et al. 2008; Moche et al. 2010, Walker et al. 2012). Consecuentemente sugerimos que, en el caso del genotipo D-1, las micorrizas le estarían causando un detrimento en su crecimiento, debido a una mayor demanda de los compuestos carbonados, estableciéndose un estado de parasitismo, en donde la planta se está perjudicando en relación a un estado no simbiótico (Smith y Smith 2015).

Metabolitos relacionados con las vías metabólicas de las poliaminas y los flavonoides, en la simbiosis HMA-soja domesticada vs no domesticada

En el genotipo ND-4 CM, se observó un aumento significativo del ácido butírico, el cual interviene en el metabolismo del butanoato, precursor de glutamato, aspartato, arginina y prolina (Kanehisa et al. 2016) (Figura 19). Tanto glutamato como el aspartato participan activamente en la síntesis de PAs claves (Figura 19). Así, el glutamato es el precursor de la ornitina que es un aminoácido dibásico, sintetizado en el citosol, el cual, a través de la acción de la ornitina descarboxilasa, es el punto de partida para la síntesis de PAs tales como la put (Tiburcio et al. 1997). Es interesante destacar que en el capítulo 3, la put fue una de la PAs que aumentó significativamente en el genotipo ND-4 CM, comparado con el D-1 CM.

Govindarajulu et al. (2005) y Schliemann et al. (2008), reportaron aumentos en la molécula de aspartato en las raíces de *Daucus carota* y *Medicago truncatula* inoculadas con HMA. El aspartato es un precursor común de los aminoácidos esenciales: lisina,

treonina, isoleucina y particularmente metionina (Azevedo et al. 2006), siendo esta última precursora en la síntesis de PAs claves. Es conocido que las PAs son biosintetizadas en presencia de metionina, debido a la transferencia de un grupo aminopropilo proporcionado por una molécula de S-adenosil metionina descarboxilada. El genotipo ND-4 CM y SM mostró altos valores de metionina y esto unido al hecho que el ND-4 CM presentó aumentos significativos de ácido butírico, sugiere la activación de la vía de síntesis de PAs en este genotipo. Apoyando esta idea, nuestros resultados mostraron un mayor contenido de PAs en las raíces del genotipo ND-4 CM y SM, comparado con el genotipo D-1 CM y SM (Salloum et al. 2018, aceptado y en proceso de publicación).

Relacionado con el contenido de las isoflavonas, se midieron tres isoflavonas específicas de soja: daidzeína, genisteína y daidzeína total, consideradas como compuestos fenólicos típicos que actúan como potentes antioxidantes. Es de destacar que las isoflavonas totales en la soja son en general, el 37 por ciento daidzeína, 57 por ciento de genisteína y 6 por ciento glycitein, según datos de USDA. Es conocido el efecto positivo de los flavonoides sobre la germinación de las esporas, el crecimiento de las hifas y la colonización de las raíces por HMA (Scervino et al. 2009). Además la participación de los flavonoides es importante en la nodulación de las raíces (Weston y Mathesius 2013; Liu y Murray 2016).

Los cambios registrados en los niveles de isoflavonoides en raíces durante la micorrización, pueden depender de dos factores: (i) la especie de planta involucrada y/o la especie micorrícica y (ii) el tiempo de cosecha de las raíces micorrizadas (Harrison y Dixon 1993; Larose et al. 2002).

En general, el análisis dirigido o específico mostró mayores niveles de las tres isoflavonas en el genotipo ND-4 CM y SM comparado al genotipo D-1 CM y SM. Concordando con este resultado en el genotipo ND-4 CM y SM, el análisis no dirigido, registró un incremento del ácido quínico precursor de fenilpropanoides tales como isoflavonas. Según nuestros resultados, en el genotipo ND-4 CM, la genisteína, identificada como la flavona mayoritaria en soja, fue la única que aumentó significativamente, comparada con su control SM. Se conoce que la genisteína en soja, es requerida para el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno induciendo la expresión del gen nod rhizobial (Subramanian et al. 2006; Juan et al. 2007). Aunque se dispone de pocos datos sobre el efecto de la genisteína en la simbiosis con HMA, encontraron genisteína acumulada en las raíces colonizadas por HMA in vitro en *M. sativa* independientemente del HMA utilizado (Larose et al. 2002).

La inoculación con HMA en el genotipo D-1, mostró niveles disminuidos de las tres isoflavonas evaluadas en raíz, comparado a su control SM. Schliemann et al. (2008) reportaron que la estimulación de la biosíntesis de las isoflavonas se produjo sólo en etapas tardías de la micorrización (a partir de los 35 días). Nuestros datos en general, fueron evaluados a tiempos más tempranos (20 días).

Resumiendo, el análisis metabólico de las raíces de soja reveló una alteración en los metabolitos en respuesta a la domesticación. Este análisis demuestra claramente los cambios en las vías metabólicas de flavonoides específicos de soja o de algunos metabolitos precursores de las síntesis de PAs que pueden afectar el crecimiento y el desarrollo de la soja.

El presente estudio tiene potencial para apoyar la mejora asistida por metabolómica para el desarrollo de variedades de soja con mayor capacidad de colonización micorrícica. Además de revelar la alteración dinámica en las vías metabólicas, los enfoques metabolómicos también proporcionan una visión paralela de la composición del metabolito que puede utilizarse para proyectos de mejora de cultivos (Fernie et al. 2009). Estudios en tomates que utilizan perfiles metabólicos integrales revelaron rasgos para mejorar la calidad de los cultivos (Schauer et al. 2006). Los estudios también han informado sobre la importancia emergente del uso de metabolitos como marcadores de selección para cultivos, ya que los biomarcadores de metabolitos están asociados con rasgos relevantes bajo distintas condiciones (Eldakak et al. 2013; Ramalingam et al. 2015).

Conclusiones

La domesticación de genotipos de soja promovió un efecto negativo en el contenido de numerosos metabolitos, y la inoculación con HMA en soja D-1, fue incapaz de revertir el efecto.

Se acepta la hipótesis 3: la respuesta diferencial en el perfil metabólico entre los genotipos domesticados vs no domesticados se relaciona con su capacidad contrastante de micorrización. Se predice que los genotipos no domesticados mostraran un aumento significativo de metabolitos asociados a PAs y flavonoides en sus raíces.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Discusión general

Como las plantas y sus comunidades microbianas asociadas dependen una de la otra (Vandenkoornhuyse et al. 2015), una comprensión más completa de estas relaciones es crítica para los esfuerzos de administrar o manipular el microbioma de la planta para mejorar los rendimientos de los cultivos (Farrar et al. 2014). Las investigaciones se han centrado en la importancia de la salud del suelo para los agroecosistemas (Altieri y Nicholls 2003), pero no han tenido en cuenta el papel central de la planta huésped en la conversión de la salud del suelo en rendimiento. Los microorganismos de la rizósfera como los HMA pueden reducir la necesidad de insumos externos ayudando en la adquisición de recursos escasos, resultando una estrategia atractiva para los sistemas de agricultura sustentable (Douds et al. 2010).

La transición de los ecosistemas silvestres a la agricultura moderna se ha centrado en seleccionar los rasgos que produjeron la mayor producción de superficie con niveles crecientes de manejo de cultivos e insumos de nutrientes. La contribución de los genotipos silvestres a la agricultura moderna, que ayuda a aumentar el rendimiento, la calidad y la resistencia a las enfermedades, es significativa (Foyer et al. 2016). En esta tesis doctoral se propuso estudiar al cultivo de soja en función de la domesticación en simbiosis con HMA, con el objetivo de contribuir al desarrollo de estrategias sustentables mediante la generación de conocimiento básico y aplicado sobre la capacidad de colonización micorrícica de genotipos de soja domesticados.

Se eligió utilizar un inóculo nativo de HMA aislado de raíces de soja, creciendo en suelos de tradición sojera de la EE INTA Manfredi. Esta decisión se apoya en el conocimiento que el efecto de esta simbiosis sobre la respuesta de defensa del hospedante también depende del HMA involucrado (Bezemer y van Dam 2005) y es conocido el mayor beneficio de utilizar especies de HMA autóctonas por sobre las especies introducidas de banco (Querejeta et al. 2006; Marulanda et al. 2007).

Dada la heterogeneidad de microorganismos en el suelo, se hace sumamente complejo entender el efecto particular de la simbiosis micorrícica, y es en este aspecto donde el desarrollo de sistemas experimentales en condiciones controladas puede brindar conocimientos valiosos. Consecuentemente, otro de los aportes de esta tesis doctoral fue la construcción del sistema experimental en condiciones controladas, donde se pudo evaluar

en función del tiempo, los efectos de la simbiosis HMA-soja, en la formación de arbuscúlos y otras estructuras.

Es conocido que el proceso de domesticación y la selección de germoplasma en condiciones fertilizadas pueden reducir la simbiosis micorrícica y la frecuencia de genes que promueven asociaciones de micorrizas (Pérez Jaramillo et al. 2016). Existe abundante información sobre la mayor asociación de los HMA con plantas silvestres en comparación con sus parientes domesticados en numerosos cultivos de trigo (Zhu et al. 2001) maíz (An et al. 2010) árbol de pan (Xing et al. 2012) trigo duro (Singh et al. 2012) sorgo (Leiser et al. 2016). Sin embargo datos sobre el efecto de la domesticación en el cultivo de soja en simbiosis con HMA no han sido reportados desde Khalil et al. (1994, 1999), por lo que esta tesis doctoral aportaría resultados actualizados en el efecto domesticación HMA- soja. En tal sentido, nuestros resultados confirmaron que la domesticación de genotipos de soja disminuyó la capacidad de colonización micorrícica total y como otro aporte sumamente original, se observó disminuida la formación de arbuscúlos y nódulos, en los genotipos de soja domesticados en comparación a los no domesticados. Recientemente, Park et al. (2015) demostraron que la formación de arbuscúlos se relaciona con diferentes niveles de colonización y de simbiosis micorrícica productiva.

Las asociaciones con HMA provocan significativos cambios en las plantas hospedadoras, tanto a nivel nutricional como en posibles mecanismos de tolerancia (Rapparini y Peñuelas 2014) y esta tesis plantea diferencias en la dependencia micorrícica (DM), en función de la domesticación de soja. En general, los genotipos de soja no domesticados mostraron una respuesta temprana y positiva en la DM evaluada como parámetros de crecimiento, contenido en nutrientes y bioquímicos relacionados con la defensa antioxidante. Esta tesis doctoral aporta datos muy originales acerca del comportamiento del estrés oxidativo durante la domesticación de la soja-HMA, mostrando una respuesta variable en la capacidad de la defensa antioxidante con la domesticación de soja-HMA.

Existen antecedentes previos que muestran la importancia y participación de los flavonoides y PAs, en la colonización micorrícica de plantas de *Trifolium repens* (Ponce et al. 2004; Scervino et al. 2009), *Pisum sativum* (El Ghachtouli et al. 1996), melón (Akiyama et al. 2002), *Citrus tangerine* (Wu et al. 2010 a). Sin embargo la participación de estos metabolitos en la colonización micorrícica en genotipos de soja domesticados vs no domesticados, no ha sido reportada. Por lo expuesto, esta tesis doctoral aporta conocimientos originales sobre el efecto de estos metabolitos en la colonización

micorrícica, en función de la domesticación del cultivo de soja. Mediante el desarrollo de sistemas experimentales que regulan el nivel de flavonoides (agregado exógeno de flavonoides totales) y PAs (por silenciamiento de genes claves en las raíces micorrizadas) pudimos revertir el efecto de la domesticación, sobre la colonización micorrícica, estimulando la formación de arbusculos en el genotipo domesticado, y confirmando la participación de estos metabolitos en la formación de arbusculos durante la colonización micorrícica. Por otro lado, existen antecedentes de la presencia de especies reactivas del oxígeno (EROs) durante la colonización con HMA. Así, en la simbiosis *M. truncatula*, Salzer et al. (1999) y Hause y Fester (2005) reportaron acumulación de H₂O₂ en la proximidad de la membrana periarbuscular, especialmente en las células arbusculares. Más recientemente, Wu et al. (2009) sugirieron que el H₂O₂ interviene en la degradación de los arbusculos, y además observaron O₂ en los arbusculos de raíces micorrizadas durante la sequía de citrus. Teniendo en cuenta que entre las funciones de los flavonoides y las PAs en las plantas se incluye la regulación de las EROs (Falcone Ferreyra et al. 2012; Alet et al. 2008), proponemos que en función de la domesticación de soja la disminución de la colonización micorrícica, particularmente la formación de arbusculos observada, podría guardar relación con la disminución de estos metabolitos y su capacidad para regular la generación de EROs.

Es conocido que la metabolómica se usa para medir la abundancia diferencial de metabolitos a nivel global; y se ha utilizado con éxito en muchos cultivos como la soja, el arroz, el maíz y la cebada (Shu et al. 2008; Takuji et al. 2010; Frank et al. 2012; Saito et al. 2013; Jung et al. 2015). En la actualidad, los estudios metabolómicos de cultivos importantes desde el punto de vista económico, como la soja que se utiliza para la alimentación, son de especial interés y son útiles para la selección asistida por genómica para que los mejoradores de plantas desarrollen germoplasma mejorado y liberen nuevas variedades resilientes en el futuro (Fernie et al. 2009). Particularmente, esta tesis aporta conocimiento original, sobre el comportamiento metabolómico de genotipos de soja domesticados y no domesticados en simbiosis con HMA, hasta entonces no estudiados. Los resultados del análisis metabolómico, mostraron la presencia disminuida de flavonoides específicos y de precursores de las PAs, en soja domesticada, confirmando los resultados previamente hallados en el contenido endógeno de estos metabolitos.

A futuro, se propone realizar un estudio más profundo y detallado, evaluando un mayor número de genotipos provenientes de banco de germoplasma de soja, que permita

confirmar la presencia de metabolitos como PAs y flavonoides en la colonización de genotipos de soja micorrizados domesticados y no domesticados.

Conclusiones generales

El relevamiento morfotaxonómico de un inóculo de HMA nativo de suelos con tradición sojera, permitió identificar 6 especies de esporas de Glomeromycotina: siendo *F. mosseae* la especie mayoritaria (57,78 %) seguida por *P. Occultum* (23,68 %); *D. spurca* (15,15 %); *A. scrobiculata* (2,87 %) y *Gigaspora* sp.1 (0,41 %).

En genotipos de soja domesticados de interés comercial se pudo confirmar la existencia de variabilidad en la respuesta a la micorrización. Algunos mostraron baja capacidad de colonización y escasa formación de arbusculos y otros un comportamiento similar a los genotipos no domesticados.

En la simbiosis HMA-soja la domesticación se relacionó con variabilidad en la respuesta de flavonoides y PAs relacionados con la regulación de la colonización micorrízica y formación de estructuras, especialmente arbusculos.

La variabilidad observada en estas respuestas entre los genotipos domesticados, sugiere que la selección de genotipos de soja con una buena y temprana colonización micorrízica, particularmente alta relación arbusculos / hifas y la mayor concentración de flavonoides y PAs en sus raíces, podría ser una estrategia útil para el desarrollo de genotipos que optimicen la contribución de los HMA en los sistemas agrícolas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott LK, Gazey C (1994) An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. *Plant and Soil*, 159(1): 69
- Acquaah G (2009) *Principles of Plant Genetics and Breeding*. John Wiley & Sons
- Adesemoye AO, Kloeppe JW (2009) Plant-microbe interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1): 1-12
- Akiyama K, Matsuoka H, Hayashi H (2002) Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosyl flavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 15(4): 334-340
- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6):1237-1249
- Alet A, Chávez A, Fracaroli V, Sánchez D, Ruíz O, Maiale SG (2008) Transformación vegetal con genes de la biosíntesis de poliaminas regulados por estrés su potencial aplicación biotecnológica a variedades nacionales de arroz. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1): 143-148
- Alet AI, Sánchez DH, Cuevas JC, Marina M, Carrasco P, Altabella T (2012) New insights into the role of spermine in *Arabidopsis thaliana* under long-term salt stress. *Plant Science*, 182: 94-100
- Altieri MA, Nicholls CI (2003) Soil fertility management and insect pests: harmonizing soil and plant health in agroecosystems. *Soil and Tillage Research*, 72(2): 203-211
- Amir R (2008) Towards improving methionine content in plants for enhanced nutritional quality. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 2: 36-46
- An GH, Kobayashi S, Enoki H, Sonobe K, Muraki M, Karasawa T, Ezawa T (2010) How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype?. An example based on maize (*Zea mays*) germplasms. *Plant and Soil*, 327(1-2): 441-453
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1): 1
- Asghari HR, Cavagnaro TR (2012) Arbuscular mycorrhizas reduce nitrogen loss via leaching. *PLoS One*, 7(1): e29825
- Ashoka P, Meena RS, Kumar S (2017) Green nanotechnology is a key for eco-friendly agriculture. *Journal of Cleaner Production*, 142: 4440-4441
- Asif M, Rooney LW, Ali R, Riaz MN (2013) Application and opportunities of pulses in food system: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(11): 1168-1179

- Auge RM (2001) Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 11(1): 3-42
- Azcon R, Ocampo JA (1981) Factors affecting the vesicular arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytologist*, 87(4): 677-685
- Azevedo RA, Lancien M, Lea PJ (2006) The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids*, 30(2): 143-162
- Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6): 642-650
- Bagni N, Tassoni A (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, 20(3): 301-317
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Schachar-Hill Y (1999) Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology*, 121(1): 263-272
- Bago B, Pfeffer PE, Schachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant physiology*, 124(3): 949-958
- Bago B, Pfeffer PE, Schachar-Hill Y (2001) Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis?. *New Phytologist*, 149(1): 4-8
- Bandyopadhyay P, Bhuyan SK, Yadava PK, Varma A, Tuteja N (2017) Emergence of plant and rhizospheric microbiota as stable interactomes. *Protoplasma*, 254(2): 617-626
- Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2002) Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4): 343-351
- Becard G, Taylor LP, Douds DD, Pfeffer PE, Doner LW (1995) Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 8(2): 252-258
- Bender SF, Conen F, Van der Heijden MG (2015) Mycorrhizal effects on nutrient cycling, nutrient leaching and N₂O production in experimental grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 80: 283-292
- Benkeblia N, Shinano T, Osaki M (2007) Metabolite profiling and assessment of metabolome compartmentation of soybean leaves using non-aqueous fractionation and GC-MS analysis. *Metabolomics*, 3(3): 297-305

- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76
- Berbery E, Doyle M, Barros V, Barros V, Clarke R, Silva Dias P (2006) Tendencias regionales en la precipitación. El cambio climático en la Cuenca del Plata. CONICET, Buenos Aires, 67-92
- Bert FE, Podestá GP, Rovere SL, Menéndez ÁN, North M, Tatara E, Laciana CE, Weber E, Toranzo FR (2011) An agent based model to simulate structural and land use changes in agricultural systems of the argentine pampas. *Ecological Modelling*, 222(19): 3486-3499
- Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA (1996) Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of Ecology*, 71-82
- Bezemer TM, van Dam NM (2005) Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(11): 617-624
- Biermann B, Linderman RG (1983) Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist*, 95(1): 97-105
- Bitocchi E, Bellucci E, Giardini A, Rau D, Rodriguez M, Biagetti E, Santilocchi R, Spagnoletti ZP, Gioia T, Logozzo G, Attene G, Nanni L, Papa R (2013) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytologist*, 197(1): 300-313
- Borde M, Dudhane M, Kulkarni M (2017) Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in Salinity Tolerance and Growth Response in Plants Under Salt Stress Conditions. In *Mycorrhiza-Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials*, 71-86
- Bressano M, Curetti M, Vargas Gil S, Cabello M, March G, Ducasse DA, Luna CM (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced paraquat tolerance to soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 167(18): 1622-1626
- Brundrett M, Melville L, Peterson L (1994) Practical methods in mycorrhiza research [based on a workshop organized in conjunction with the ninth North American Conference on mycorrhizae, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. Mycologue Publications
- Bryla DR, Koide RT (1990) Role of mycorrhizal infection in the growth and reproduction of wild vs. cultivated plants. *Oecologia*, 84(1): 82-92

- Bulgarelli RG, Marcos FCC, Ribeiro RV, Andrade SAL (2017) Mycorrhizae enhance nitrogen fixation and photosynthesis in phosphorus-starved soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Environmental and Experimental Botany*.
- Camacho JLM, Salinas JVC (2005) La función y transporte del ácido l-málico en plantas: un dicarboxílico estrella. *Rwanda Education Board*, 39
- Camenzind T, Hempel S, Homeier J, Horn S, Velescu A, Wilcke W, Rillig MC (2014) Nitrogen and phosphorus additions impact arbuscular mycorrhizal abundance and molecular diversity in a tropical montane forest. *Global Change Biology*, 20(12): 3634-3659
- Cataldi TR, Margiotta G, Del Fiore A, Bufo SA (2003) Ionic content in plant extracts determined by ion chromatography with conductivity detection. *Phytochemical Analysis*, 14(3): 176-183
- Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73(3): 203-266
- Chung WH, Jeong N, Kim J, Lee WK, Lee YG, Lee SH, Moon JK (2013) Population structure and domestication revealed by high-depth resequencing of Korean cultivated and wild soybean genomes. *DNA Research*, 21(2): 153-167
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11(2): 80-88
- Cuenca G, De Andrade Z, Lovera M, Fajardo L, Meneses E, Márquez M, Machuca R (2003) Pre-selección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de la Gran Sabana, Estado Bolívar, Venezuela. *Ecotropicos*, 16: 1
- Davison J, Moora M, Öpik M, Adholeana A, Ainsaar L, Ba A, Burla S, Diedhiou A, Hiiesalu I, Jairus T (2015) Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349(6251): 970-973
- Delis C, Dimou M., Flietakis E, Aivalakis G, Katinakis P (2006) A root- and hypocotyl-specific gene coding for copper-containing amine oxidase is related to cell expansion in soybean seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 57(1): 101-111
- Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007) Mass spectrometry based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1): 51-78
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2011) *InfoStat*. Software Estadístico. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2013) InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dias DA, Hill CB, Jayasinghe NS, Atieno J, Sutton T, Roessner U (2015) Quantitative profiling of polar primary metabolites of two chickpea cultivars with contrasting responses to salinity. *Journal of Chromatography B*, 1000: 1-13
- Douds DD, Millner PD (1999) Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1): 77-93
- Douds DD, Nagahashi G, Hepperly PR (2010) Production of inoculum of indigenous AM fungi and options for diluents of compost for on-farm production of AM fungi. *Bioresource Technology*, 101: 2326-2330
- Driscoll BT, Finan TM (1993) NAD⁺-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *Molecular Microbiology*, 7(6): 865-873
- Druille M, Cabello MN, Omacini M, Golluscio RA (2013 a) Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 64: 99-103
- Druille M, Omacini M, Golluscio RA, Cabello MN (2013 b) Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Applied Soil Ecology*, 72: 143-149
- Druille M, Cabello M, Parisi PG, Golluscio R, Omacini M (2015) Glyphosate vulnerability explains changes in root-symbionts propagules viability in pampean grasslands. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 202: 48-55
- Dwivedi SL; Upadhyaya HD; Stalker HT; Blair MW; Bertoli DJ; Nielsen S; Ortiz R (2008) Enhancing crop gene pools with beneficial traits using wild relatives. *Plant Breeding Reviews*, 30: 179
- Eason WR, Webb KJ, Michaelson-Yeates TPT, Abberton MT, Griffith GW, Culshaw CM, Dhanoa MS (2001) Effect of genotype of *Trifolium repens* on mycorrhizal symbiosis with *Glomus mosseae*. *The Journal of Agricultural Science*, 137(1): 27-36
- Edathil TT, Manian S, Udaiyan K (1996) Interaction of multiple VAM fungal species on root colonization, plant growth and nutrient status of tomato seedlings (*Lycopersicon Esculentum* Mill.). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 59(1): 63-68

- Egerton-warburton LM, Allen EB (2000) Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecological Applications*, 10(2): 484-496
- Eldakak M, Milad SI, Nawar AI, Rohila JS (2013) Proteomics: A biotechnology tool for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 4
- El Ghachtouli N, Paynot M, Morandi D, Martin-Tanguy J, Gianinazzi S (1995) The effect of polyamines on endomycorrhizal infection of wild-type *Pisum sativum*, cv. Frisson (nod+ myc+) and two mutants (nod- myc+ and nod- myc-). *Mycorrhiza*, 5(3): 189-192
- El Ghachtouli N, Martin-Tanguy J, Paynot M, Gianinazzi S (1996) First report of the inhibition of arbuscular mycorrhizal infection of *Pisum sativum* by specific and irreversible inhibition of polyamine biosynthesis or by gibberellic acid treatment. *FEBS Letters*, 385(3): 189-192
- Eom AH, Hartnett DC, Wilson GW (2000) Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia*, 122(3): 435-444
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sanchez F (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, 2(7): 1819-1824
- Faggioli VS (2016) Estudio de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares en soja: Relación con la nutrición fosforada en agroecosistemas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata. 162 páginas
- Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P (2012) Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3
- FAO. How to Feed the World 2050 Available. <http://www.fao.org/wsfs/forum2050/wsfs-forum/en/> (accessed on 29 January 2017)
- Farrar K, Bryant D, Cope-Selby N (2014) Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnology Journal*, 12(9): 1193-1206
- Fernie AR, Schauer N (2009) Metabolomics-assisted breeding: A viable option for crop improvement?. *Trends in Genetics*, 25(1): 39-48
- Ferreira RR, Varisi VA, Meinhardt LW, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Are high-lysine cereal crops still a challenge?. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7): 985-994

- Fiehn O (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2(3): 155-168
- Fiehn O (2006) Metabolite profiling in Arabidopsis. *Arabidopsis Protocols*, 439-447
- Foyer CH, Lam HM, Nguyen HT, Siddique KH, Varshney RK, Colmer TD, Cowling W, Bramley H, Mori TA, Hodgson JM (2016) Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*, 2: 16112
- Frank T, Röhlig RM, Davies HV, Barros E, Engel KH (2012) Metabolite profiling of maize kernels—genetic modification versus environmental influence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12): 3005-3012
- Friese CF, Allen MF (1991) The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*, 409-418
- Fuell C, Elliott KA, Hanfrey CC, Franceschetti M, Michael AJ (2010) Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7): 513-520
- Gadkar V, David-Schwarz R, Kunik T, Kapulnik Y (2001) Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant physiology*, 127(4): 1493-1499
- Gai JP, Christie P, Feng G, Li XL (2006) Twenty years of research on community composition and species distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in China: a review. *Mycorrhiza*, 16(4): 229-239
- García-Garrido JM, Ocampo JA (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 53(373): 1377-1386
- Garnett T, Conn V, Kaiser B (2009) Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant, Cell & Environment*, 32(9): 1272-1283
- Gaude N, Bortfeld S, Duensing N, Lohse M, Krajinski F (2012) Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal*, 69(3): 510-528
- Gaude N, Bortfeld S, Erban A, Kopka J, Krajinski F (2015) Symbiosis dependent accumulation of primary metabolites in arbuscule-containing cells. *BMC Plant Biology*, 15(1): 234

- Gawronska K, Niewiadomska E (2015) Participation of citric acid and isocitric acid in the diurnal cycle of carboxylation and decarboxylation in the common ice plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(3): 61
- Gemperline E, Keller C, Li LJ (2016) Mass spectrometry in plant omics. *Analytical Chemistry*, 88(7): 3422-3434
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2): 235-244
- Gietl C (1992) Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between cytoplasm and cell organelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1100(3): 217-234
- Gong M, Tang M, Chen H, Zhang Q, Feng X (2013) Effects of two *Glomus* species on the growth and physiological performance of *Sophoradavidii* seedlings under water stress. *New Forests*, 44(3): 399-408
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Shachar-Hill Y (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435(7043): 819-823
- Graham JH, Abbott LK (2000) Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 220(1): 207-218
- Grimoldi AA, Kavanová M, Lattanzi FA, Schnyder H (2005) Phosphorus nutrition-mediated effects of arbuscular mycorrhiza on leaf morphology and carbon allocation in perennial ryegrass. *New Phytologist*. 168(2): 435-444
- Groppa MD, Benavides MP (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, 34(1): 35-45
- Gross BL, Olsen KM (2010) Genetic perspectives on crop domestication. *Trends in Plant Science*, 15(9): 529-537
- Grümberg BC (2015) Utilización de cepas nativas de hongos micorrízicos arbusculares en la regulación del estrés por sequía en un genotipo de soja susceptible. Participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Física y Naturales. 170 páginas
- Grümberg BC, Urcelay C, Shroeder MA, Vargas-Gil S, Luna CM (2015) The role of inoculum identity in drought stress mitigation by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. *Biology and Fertility of Soils*, 51(1): 1-10

- Gutjahr C, Parniske M (2013) Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29: 593-617
- Harrison MJ, Dixon RA (1993) Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6: 643-654
- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153(2): 335-344
- Hart MM, Reader RJ (2005) The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies. *Pedobiologia*, 49(3): 269-279
- Haudry A, Cenci A, Ravel C, Bataillon T, Brunel D, Poncet C, Hochu I, Poirier S, Santoni S, Glémin S, David J (2007) Grinding up wheat: a massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Molecular Biology and Evolution*, 24(7): 1506-1517
- Hause B, Fester T (2005) Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*, 221(2): 184-196
- Hernández AF (2008) La coinoculación *Glomushoilike-Bradyrhizobium japonicum* en la producción de soya (*Glycine max*) variedad Verónica para semilla. *Cultivos Tropicales*, 29(4): 41-45
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Cox TS (1992) Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces, and ancestors. *Canadian Journal of Botany*, 70(10): 2032-2040
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Cox TS (1993) Mycorrhizal dependence of modern wheat cultivars and ancestors: a synthesis. *Canadian Journal of Botany*, 71(3): 512-518
- Hibbett DS, Donoghue MJ (1998) Integrating phylogenetic analysis and classification in fungi. *Mycologia*, 90(3): 347-356
- Hirst (2016) Soybeans (*Glycine max*) The Plant History of the Marvelous Soybean Available online: <http://archaeology.about.com/od/Domesticated-Plants/fl/Soybeans-Glycine-max-The-Plant-History-of-the-Marvelous-Soybean.htm> (accessed on 18 January 2017)
- Hodges DM, DeLong JM, Forne CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4): 604-611
- Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC, Wilson GWT, Klironomos JN, Umbanhowar J

- (2010) A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 13(3): 394-407
- Hong J, Yang L, Zhang D, Shi J (2016) Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6): 767
- Huang MJ, Wang WQ, Wei SL (2010) Investigation on medicinal plant resources of *Glycyrrhiza uralensis* in China and chemical assessment of its underground part. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 35(8): 947-952
- Huang XH; Han B (2014) Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 531-551
- Hummel I, Couée, I, El Amrani A, Martin- Tanguy J, Hennion F (2002) Involvement of polyamines in root development at low temperature in the subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica*. *Journal of Experimental Botany*, 53(373): 1463-1473
- Hymowitz T, Newell C (1980) Taxonomy, speciation, domestication, dissemination, germplasm resources and variation in the genus *Glycine*. *Advances in Legume Science*, 251-264
- Isobe K, Murakami S, Tateishi A, Nomura K, Inoue H, Tsuboki Y (2002) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the morphology of kidney bean root (Crop Morphology). *Japanese Journal of Crop Science*, 71(1): 91-95
- Jackson LE (1995) Root architecture in cultivated and wild lettuce (*Lactuca* spp). *Plant, Cell & Environment*, 18(8): 885-894
- Janos DP (2007) Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 17(2): 75-91
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?. *New Phytologist*, 177(3): 779-789
- Jasper D, Abbott L, Robson A (1989) Hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus maintain infectivity in dry soil, except when the soil is disturbed. *New Phitologist*, 112(1): 101-107
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5): 1720-1725

- Juan Z, Subramanian S, Zhang Y, Yu O (2007) Flavone Synthases from *Medicago truncatula* are flavanone-2-hydroxylases and are important for nodulation. *Plant Physiology*, 144(2): 741-751
- Jung, Y, Ha M, Lee J, Ahn YG, Kwak JH, Ryu DH, Hwang GS (2015) Metabolite profiling of the response of burdock roots to copper stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(4): 1309-1317
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M (2016) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1): D457-D462
- Kapulnik Y, Kushnir U (1991) Growth dependency of wild, primitive and modern cultivated wheat lines on vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi. *Euphytica*, 56(1): 27-36
- Kennedy AC, Smith KL (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soil. In *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*, 75-86
- Khabou W, Hajji B, Zouari M, Rigane H, Ben Abdallah F (2014) Arbuscular mycorrhizal fungi improve growth and mineral uptake of olive tree under gypsum substrate. *Ecological Engineering*, 73: 290-296
- Khalil S, Loynachan TE, Tabatabai MA (1994) Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. *Agronomy Journal*, 86(6): 949-958
- Khalil S, Loynachan TE, Tabatabai MA (1999) Plant determinants of mycorrhizal dependency in soybean. *Agronomy Journal*, 91(1): 135-141
- Kiers E, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*, 333(6044): 880-882
- Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics*, 21(8): 1635-1638
- Koske RE, Tessier B (1983) A convenient, permanent slide mounting medium. *Mycological Society of America Newsletter*, 34(2): 59
- Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4): 1593-1608

- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3): 367-381
- Lam HM, Xu X, Liu X, Chen W, Yang G, Wong FL, Li J (2010) Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nature Genetics*, 42(12): 1053-1059
- Landis FC, Gargas A, Givnish TJ (2004) Relationships among arbuscular mycorrhizal fungi, vascular plants and environmental conditions in oak savannas. *New Phytologist*, 164(3): 493-504
- Larose G, Chênevert R, Moutoglis P, Gagné S, Piché Y, Vierheilig H (2002) Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, 159(12): 1329-1339
- Lehmann A, Barto EK, Powell JR, Rillig MC (2012) Mycorrhizal responsiveness trends in annual crop plants and their wild relatives—a meta-analysis on studies from 1981 to 2010. *Plant and Soil*, 355(1-2): 231-250
- Leiser WL, Olatoye MO, Rattunde HFW, Neumann G, Weltzien E, Haussmann BI (2016) No need to breed for enhanced colonization by arbuscular mycorrhizal fungi to improve low-P adaptation of West African sorghums. *Plant and soil*, 401(1-2): 51-64
- Li MW, Muñoz NB; Wong CF, Wong FL, Wong KS, Wong JWH, Qi X, Li KP, Ng MS, Lam HM (2016) QTLs regulating the contents of antioxidants, phenolics, and flavonoids in soybean seeds share a common genomic region. *Frontiers in Plant Science*, 7
- Li YH, Zhou G, Ma J, Jiang W, Jin LG, Zhang Z, Guo Y, Zhang J, Sui Y, Zheng L (2014) De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. *Nature Biotechnology*, 32(10): 1045-1052
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1(1): 387-396
- Liu CW, Murray J (2016) The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update. *Plants*, 5(3): 33
- Liu JH, Nakajima I, Moriguchi T (2011) Effects of salt and osmotic stressed on free polyamine content and expression of polyamine biosynthetic genes in *Vitis vinifera*. *Biologia Plantarum*, 55(2): 340-344

- Liu W (2010) Do genetically modified plants impact arbuscular mycorrhizal fungi?. *Ecotoxicology*, 19(2): 229-238
- Liu Y, Mao L, Li J, Shi G, Jiang S, Ma X, An L, Du G, Feng H (2015) Resource availability differentially drives community assemblages of plants and their root-associated arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 386(1-2): 341-355
- Lobell DB; Schlenker W; Costa-Roberts J (2011) Climate trends and global crop production since 1980. *Science*, 333(6042): 616-620
- Loewus F, Loewus MW (1983) Myo-inositol: Its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 34(1): 137-161
- Loewus F, Murthy P (2000) Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 150(1): 1-19
- Lovelock CE, Andersen K, Morton JB (2003) Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. *Oecologia*, 135(2): 268-279
- Lovelock CE, Wright SF, Clark DA, Ruess RW (2004) Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*, 92(2): 278-287
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008) Tag Finder for the quantitative analysis of gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*, 24(5): 732-737
- Luximon-Ramma A, Bahorun T, Crozier A, Zbarsky V, Datla KP, Dexter DT, Aruoma OI (2004) Characterization of antioxidant functions of flavonoid and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*, 38(4): 357-367
- Magrin GO, Travasso MI, Rodríguez GR (2005) Changes in climate and crop production during the 20th century in Argentina. *Climatic Change*, 72(1-2): 229-249
- Maherali H, Klironomos JL (2007) Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*, 316(5832): 1746-1748
- Mandal SM, Chakraborty D, Dey S (2010) Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4): 359-368
- Martinoia E, Rentsch D (1994) Malate compartmentation responses to a complex metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 45(1): 447-467

- Marulanda A, Porcel R, Barea JM, Azcón R (2007) Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial Ecology*, 54(3): 543
- Mattoo A, Minocha S, Minocha R, Handa A (2010) Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. *Amino Acids*, 38(2): 405-413
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method, which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115(3): 495-501
- Medici LO, Azevedo RA, Smith RJ, Lea PJ (2004 a) The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. *Functional Plant Biology*, 31(1): 1-9
- Medici LO, Pereira MB, Lea PJ, Azevedo RA (2004 b) Diallel analysis of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. *The Journal of Agriculture Science*, 142(5): 535-541
- Meena RS, Yadav RS, Meena H, Kumar S, Meena YK, Singh A (2015) Towards the current need to enhance legume productivity and soil sustainability worldwide: A book review. *Journal of Cleaner Production*, 104: 513-515
- Meena RS, Gogoi N, Kumar S (2017) Alarming issues on agricultural crop production and environmental stresses. *Journal of Cleaner Production*, 3357-3359
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4): 453-467
- Moche M, Stremlau S, Hecht L, Göbel C, Feussner I, Stöhr C (2010) Effect of nitrate supply and mycorrhizal inoculation on characteristics of tobacco root plasma membrane vesicles. *Planta*, 231(2): 425
- Morón B, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M (2006) Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. En *Fijación de Nitrógeno, fundamentos y aplicaciones*. Granada: Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), 160-171
- Morton JB (1993) Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza*, 2 (3): 97-109
- Muleta D (2017) Legume response to arbuscular Mycorrhizal fungi inoculation in Sustainable Agriculture. In *Microbes for Legume Improvement*, 227-260

- Nepote V, Grosso NR, Guzman CA (2005) Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1): 33-38
- Nijjer S, Rogers WE, Siemann E (2010) The impacts of fertilization on mycorrhizal production and investment in Western Gulf Coast Grasslands. *The American Midland Naturalist*, 163(1): 124-133
- Obata T, Fernie AR (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19): 3225-3243
- Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bösch R, van der Heijden M, Sieverding E (2010) Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5): 724-738
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M (1999) KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(1): 29-34
- Oms-Oliu G, Hertog M, Van de Poel B, Ampofo-Asiama J, Geeraerd AH, Nicolai BM (2011) Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 62(1): 7-16
- Orozco MO, Rodriguez ME, Herrera RA, Ferrer RL (1986) Micorrizas VA, micelio extramático y otras poblaciones microbianas asociadas a troncos en descomposición en un bosque tropical. *Informe Provisional*, 18: 251-271
- Park HJ, Floss DS, Levesque-Tremblay V, Bravo A, Harrison MJ (2015) Hyphal branching during arbuscule development requires RAM1. *Plant physiology*, 01155
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10): 763-775
- Patel TK, Williamson JD (2016) Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions. *Trends in Plant Science*, 21(6): 486-497
- Pawlowska TE, Taylor JW (2004) Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 427(6976): 733-737
- Pérez-Jaramillo JE, Mendes R, Raaijmakers JM (2016) Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology*, 90(6): 635-644
- Pfeffer PE, Bago B, Shachar-Hill Y (2001) Exploring mycorrhizal function with NMR spectroscopy. *New Phytologist*, 150(3): 543-5

- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1): 158-161
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V (1983) Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil*, 70(2): 211-217
- Ponce M, Cervino M, Erra-Balsells R, Ocampo JA, Codeas A (2004) Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry*, 65(13): 1925-1930
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2004) Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 55(403): 1743-1750
- Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcón-Aguilar C (2002) Localized vs systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(368): 525-534
- Pu L, Brady S (2010) Systems biology update: cell type-specific transcriptional regulatory networks. *Plant Physiology*, 152(2): 411-419
- Qaim M, Traxler G (2005) Roundup Ready soybeans in Argentina: farm level and aggregate welfare effects. *Agricultural Economics*, 32(1): 73-86
- Qi X, Li MW, Xie M, Liu X, Ni M, Shao G, Isobe S (2014) Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing. *Nature Communications*, 5
- Querejeta JI, Allen MF, Caravaca F, Roldán A (2006) Differential modulation of host plant g13C and g18O by native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid environment. *New Phytologist*, 169(2): 379-387
- Ram SG, Thiruvengadam V, Vinod KK (2007) Genetic diversity among cultivars, landraces and wild relatives of rice as revealed by microsatellite markers. *Journal of Applied Genetics*, 48(4): 337-345
- Ramalingam A, Kudapa H, Pazhamala LT, Weckwerth W, Varshney RK (2015) Proteomics and metabolomics: Two emerging areas for legume improvement. *Frontiers in Plant Science*, 6

- Rapparini F, Peñuelas J (2014) Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Springer New York, 1: 21-42
- Rea G, Matoui O, Infantino A, Federico R, Angelini R (2002) Copper amine oxidase expression in defence responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology*, 128(3): 865-875
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer S, Morton J, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, 23(7): 515-531
- Rengel Z (2002) Breeding for better symbiosis. *Plant and Soil*, 245(1): 147-16
- Requena N, Serrano E, Ocón A, Breuniger M (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*, 68(1): 33-40
- Rezvanypour S, Hatamzadeh A, Elahinia SA, Asghari HR (2015) Exogenous polyamines improve mycorrhizal development and growth and flowering of *Freesia* hybrid. *Journal of Horticultural Research*, 23(2): 17-25
- Rillig MC, Ramsey PW, Morris S, Paul EA (2003) Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant and Soil*, 253(2): 293-299
- Rillig MC (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, 84(4): 355-363
- Roessner-Tunali U, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D, Fernie AR (2003) Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiology*, 133(1): 84-99
- Rosendahl L, Vance CP, Pedersen WB (1990) Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiology*, 93(1): 12-19
- Ruiz-Lozano JM, Collados C, Barea JM, Azcaan R (2001) Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. *New Phytologist*, 151(2): 493-502
- Ruiz-Lozano JM (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress: new perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13(6): 309-317
- Ruiz-Lozano JM, Aroca R (2010) Modulation of aquaporin genes by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in relation to osmotic stress tolerance. *Symbioses and Stress*, 357-374

- Saito K (2013) Phytochemical genomics-A new trend. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3): 373-380
- Saks Ü, Davison J, Öpik M, Vasar M, Moora M, Zobel M (2013) Root-colonizing and soil-borne communities of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate forest understorey 1. *Botany*, 92(4): 277-285
- Salloum MS, Guzzo MC, Velazquez MS, Sagadin MB, Luna CM (2016) Variability in colonization of arbuscular mycorrhizal fungi and its effect on mycorrhizal dependency of improved and unimproved soybean cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(12): 1034-1040
- Salloum MS, Menduni MF, Luna CM (2017) A differential capacity of arbuscular mycorrhizal fungal colonization under well-watered conditions and its relationship with drought stress mitigation in unimproved vs. improved soybean genotypes. *Botany*, DOI: 10.1139/cjb-2017-0137
- Salzer P, Corbiere H, Boller T (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*, 208(3): 319-325
- Sánchez-Rangel D, Chávez-Martínez AI, Rodríguez-Hernández AA, Maruri-López I, Urano K, Shinozaki K, Jiménez-Bremont JF (2016) Simultaneous silencing of two arginine decarboxylase genes alters development in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7
- Sanders IR (2004) Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity—are we looking at the relevant levels of diversity and are we using the right techniques?. *New Phytologist*, 164(3): 415-418
- Sannazzaro AI, Álvarez CL, Menéndez AB, Pieckenstein FL, Albertó EO, Ruiz OA (2004) Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1): 115-121
- Sarkar A, Asaeda T, Wang Q, Rashid MH (2015) Arbuscular mycorrhizal influences on growth, nutrient uptake, and use efficiency of *Miscanthus sacchariflorus* growing on nutrient-deficient river bank soil. *Flora*, 212: 46-54
- Sawers RJH, Gutjahr C, Paszkowski U (2008) Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. *Trends in Plant Science*, 13(2): 93-97

- Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A (2005) Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research*, 109(7): 789-794
- Scervino JM, Ponce MA, Monica ID, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A (2009) Development of arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of different patterns of *Trifolium repens* shoot flavonoids. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, 9(2): 102-115
- Schauer N, Semel Y, Roessner U (2006) Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology*, 24(4): 447-454
- Schliemann W, Ammer C, Strack D (2008) Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, 69(1): 112-146
- Schmidt H, Gunther C, Weber M, Sporlein C, Loscher S, Bottcher C, Schobert R, Clemens S (2014) Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key metabolic pathway for iron acquisition. *PLoS One*, 9(7): e102444
- Schnepf RD, Dohlman EN, Bolling HC (2001) Agriculture in Brazil and Argentina: Developments and prospects for major field crops. United States Department of Agriculture, Economic Research Service
- Schulze J, Tesfaye M, Litjens RHMG, Bucciarelli B, Trepp G, Miller S, Vance CP (2002) Malate plays a central role in plant nutrition. In *Progress in plant nutrition: plenary lectures of the XIV International Plant Nutrition Colloquium*, 133-139
- Schvarzer J, Tavosnanska A (2007) El complejo sojero argentino. Evolución y perspectivas. Documento de trabajo, 10
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG (1995) Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology*, 108(1): 7-15
- Schalamuk S, Chidichimo H., Cabello M (2006) Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia*, 98(1): 16-22
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(8): 2498-504
- Shu XL, Frank T, Shu QY, Engel KH (2008) Metabolite profiling of germinating rice seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24): 11612-11620

- Shukla V, Ma Y, Merewitz EB (2015) Creeping bentgrass responses to drought stress and polyamine application. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 140(1): 94-101
- Singh AK, Hamel C, De Pauw RM, Knox RE (2012) Genetic variability in arbuscular mycorrhizal fungi compatibility supports the selection of durum wheat genotypes for enhancing soil ecological services and cropping systems in Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(3): 293-302
- Singh RJ, Nelson RL (2014) Methodology for creating alloplasmic soybean lines by using *Glycine tomentella* as a maternal parent. *Plant Breeding*, 133(5): 624-631
- Smith BN, Meeuse BJD (1966) Production of volatiles amines in some Arum lily species. *Plant Physiology*, 41(2): 343-347
- Smith FA, Smith SE (2015) How harmonious are arbuscular mycorrhizal symbioses? Inconsistent concepts reflect different mindsets as well as results. *New Phytologist*, 205(4): 1381-1384
- Smith K (2003) Soybeans-History and Future. Fact Sheet, Soybean Meal Information Center, United Soybean Board. MO. [http://www.soymeal.org/Fact Sheets/History Soybean Use. pdf](http://www.soymeal.org/Fact%20Sheets/History%20Soybean%20Use.pdf) (accessed April 25, 2013)
- Smith SE, Read DJ (2008) Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3: 145-18
- Smith SE, Read DJ (2010) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press. Third Edition, 787 páginas
- Smith SE, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 227-250
- Smith TA, Barker JH (1988) The di- and polyamine oxidases of plants. In *Progress in Polyamine Research*, 573-587
- Solbrig O (2005) La Historia del concepto de Paradigma en la Ciencia y la Agricultura. In *El Futuro y los cambios de Paradigmas*, Manual del XIII Congreso anual de AAPRESID, AAPRESID, 11
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, James TY (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5): 1028-1046
- Strack D, Vogt T, Schliemann W (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3): 247-269

- Streeter JG, Lohnes DG, Fioritto RJ (2001) Pattern of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 24(4): 429-438
- Subramanian S, Stacey G, Yu O (2006) Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal*, 48(2): 261-273
- Takahashi T, Kakehi JI (2010) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany*, 105(1): 1-6
- Takuji N, Keiki O, Noureddine B, Jun W, Toshihiro W, Hideyuki M, Hirofumi U, Setsuko K, Takuro S (2010) *Metabolomics Approach in Soybean*; 307-323
- Talaat NB, Shawky BT (2013) Modulation of nutrient acquisition and polyamine pool in salt-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) plants inoculated with arbuscular mycorrhiza fungi. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(8): 2601-2610
- Tawaraya K (2003) Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(5): 655-668
- Tian H, Lam SM, Shui G (2016) *Metabolomics, a Powerful Tool for Agricultural Research*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11): 1871
- Tiburcio AF, Altabella T; Borrell A, Masgrau C (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum*, 100(3): 664-674
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898): 671-677
- Tisi A, Federico R, Moreno S, Lucretti S, Moschou PN, Roubelakis-Angelakis K A, (2011) Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation. *Plant Physiology*, 157(1): 200-215
- Treseder KK; Turner KM (2007) Glomalin in ecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 71(4): 1257
- Trigo E, Cap E, Malach V, Villarreal F (2009) *The case of zero-tillage technology in Argentina*: International Food Policy Research Institute
- Turrini A, Giovannetti M (2012) Arbuscular mycorrhizal fungi in national parks, nature reserves and protected areas worldwide: a strategic perspective for their in situ conservation. *Mycorrhiza*, 22(2): 81-97
- Upchurch RG (2008) Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30(6): 967-977

- Urcoviche RC, Gazim ZC, Dragunski DC, Barcellos FG, Alberton O (2015) Plant growth and essential oil content of *Mentha crispa* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of phosphorus. *Industrial Crops and Products*, 67: 103-107
- Van der Heijden MG, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706): 69-72
- Van der Heijden MGA, Wiemken A, Sanders IR (2003) Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytologist*, 157(3): 569-578
- Vandenkoornhuysen P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4): 1196-1206
- Verbruggen E, Kiers ET (2010) Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems. *Evolutionary Applications*, 3(5- 6): 547-560
- Verbruggen E, Kiers ET, Bakelaar PNC, Röling FM, van der Heijden MGA (2012) Provision of contrasting ecosystem services by soil communities from different agricultural fields. *Plant and Soil*, 350(1-2): 43-55
- Vierheilig H, Piché Y (2002) Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. *Flavonoids in Cell Function*, 23-39
- Violi HA, Barrientos-Priego AF, Wright SF, Escamilla-Prado E, Morton JB, Menge JA, Lovatt CJ (2008) Disturbance changes arbuscular mycorrhizal fungal phenology and soil glomalin concentrations but not fungal spore composition in montane rainforests in Veracruz and Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 254(2): 276-290
- Vogelsang K, Reynolds HL, Bever J (2006) Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist*, 172(3): 554-562
- Walker C, Mize W, McNabb HS (1982) Populations of endogonaceous fungi at two populations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany*, 60(12): 2518-2529
- Walker C (1992) Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) a possible way forward. *Agronomie*, 12(10): 887-897
- Walker V, Couillerot O, Von Felten A, Bellvert F, Jansa J, Maurhofer M, Comte G (2012) Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by

- inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. *Plant and Soil*, 356(1-2): 151-163
- Walters DR (2000) Polyamines in plant–microbe interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(4): 137-146
- Waterman PG, Mole S (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific
- Weckwerth W (2003) Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1): 669-689
- Weese DJ, Heath KD, Dentinger BT, Lau JA (2015) Long-term nitrogen addition causes the evolution of less-cooperative mutualists. *Evolution*, 69(3): 631-642
- Weisany W, Raei Y, Salmasi SZ, Sohrabi Y, Ghassemi-Golezani K (2016) Arbuscular mycorrhizal fungi induced changes in rhizosphere, essential oil and mineral nutrients uptake in dill/common bean intercropping system. *Annals of Applied Biology*, 169(3): 384-397
- Weston LA, Mathesius U (2013) Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2): 283-297
- Wu QS, Xia RX, Zou YN (2008) Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology*, 44(1): 122-128
- Wu QS, Zou YN (2009) Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. *Plant, Soil and Environment*, 55(10): 436- 442
- Wu QS, Peng YH, Zou YN, Liu CY (2010 a) Exogenous polyamines affect mycorrhizal development of *Glomus mosseae*-colonized citrus (*Citrus tangerine*) seedlings. *Science Asia*, 36: 254-258
- Wu QS, Zou YN, He XH (2010 b) Exogenous putrescine, not spermine or spermidine, enhances root mycorrhizal development and plant growth of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) seedlings. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12: 576-580
- Wu QS, Zou YN, Zhan TT, Liu CY (2010 c) Polyamines participate in mycorrhizal and root development of citrus (*Citrus tangerine*) seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3): 25
- Wu QS, Zou YN, He XH, Luo P (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi can alter some root characters and physiological status in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, 65(2): 273-278

- Wu QS, He XH, Zou YN, Liu CY, Xiao J, Li Y (2012 a) Arbuscular mycorrhizas alter root system architecture of Citrus tangerine through regulating metabolism of endogenous polyamines. *Plant Growth Regulation*, 68(1): 27-35
- Wu QS, Zou YN, Liu M, Cheng K (2012 b) Effects of exogenous putrescine on mycorrhiza, root system architecture, and physiological traits of *Glomus mosseae*-colonized trifoliolate orange seedlings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(2): 80-85
- Wu QS, Lou YG, Li Y (2015) Plant growth and tissue sucrose metabolism in the system of trifoliolate orange and arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae*, 181: 189-193
- Wu QS, Srivastava AK, Zou YN, Malhotra SK (2017) Mycorrhizas in citrus: Beyond soil fertility and plant nutrition. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 87(4): 427-443
- Xing X, Koch AM, Jones AMP, Ragone D, Murch S, Hart MM (2012) Mutualism breakdown in bread fruit domestication. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279(1731): 1122-1130
- Yamaguchi K, Takahashi Y, Berberich T, Imai A, Takahashi T, Michael AJ, Kusano T (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(2): 486-490
- Yao Q, Li X, Christie P (2001) Factors affecting arbuscular mycorrhizal dependency of wheat genotypes with different phosphorus efficiencies. *Journal of Plant Nutrition*, 24(9): 1409-1419
- Yao Q, Wang LR, Xing QW, Chen JZ, Zhu HH (2010) Exogenous polyamines influence root morphogenesis and arbuscular mycorrhizal development of *Citrus limonia* seedlings. *Plant Growth Regulation*, 60(1): 27
- Yucel CO, Özkan H, Ortas I, Yağbasanlar T (2009) Screening of wild emmer wheat accessions (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*) for mycorrhizal dependency. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(5): 513-523
- Zarea MJ, Karimi N, Goltapeh EM, Ghalavand A (2011) Effect of cropping systems and arbuscular mycorrhizal fungi on soil microbial activity and root nodule nitrogenase. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(2): 109-120
- Zhang JY, de Carvalho MHC, Torres-Jerez I, Kang Y, Allen SN, Huhman DV, Tang YH, Murray J, Sumner LW, Udvardi MK (2014) Global reprogramming of transcription

- and metabolism in *Medicago truncatula* during progressive drought and after rewatering. *Plant, Cell & Environment*, 37(11): 2553-2576
- Zhou Z, Jiang Y, Wang Z, Gou Z, Lyu J, Li W, Yu Y, Shu L, Zhao Y, Ma Y (2015) Resequencing 302 wild and cultivated accessions identifies genes related to domestication and improvement in soybean. *Nature Biotechnology*, 33(4): 408-414
- Zhu X, Song F, Liu S (2011) Arbuscular mycorrhiza impacts on drought stress of maize plants by lipid peroxidation, proline content and activity of antioxidant system. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9(2): 583-587
- Zhu YG, Smith SE, Barritt AR, Smith FA (2001) Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. *Plant and Soil*, 237(2): 249-255
- Zsogon A, Lambais MR, Benedito VA, Figueira AVO, Peres LEP (2008) Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. *Scientia Agricola*, 65(3): 259-267

ANEXO DE TÉCNICAS

Índice de anexo

Anexo A: Estimación de los peróxidos de lípidos evaluados como contenido en malondialdehído (MDA)	142
Anexo B: Tinción de raíces y cuantificación de micorrizas	144
Anexo C: Estimación del contenido en clorofila total	146
Anexo D: Estimación del contenido en FRAP	147
Anexo E: Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario	149
Anexo F: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) – Enzimas del sistema antioxidante y del metabolismo de las poliaminas.....	152

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

Preparación de los reactivos

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

Procedimiento

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

Mezcla de reacción

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

Blancos:

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

Cálculos posteriores

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

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

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

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

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

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

ϵ : Coeficiente de extinción molar 155 mM⁻¹ cm⁻¹

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

10⁶: para convertir de mM a nmoles/ml

Bibliografía

- Heath R, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125(1): 189-198
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207(4): 604-611

Anexo B: Tinción de raíces y cuantificación de micorrizas

Preparación de las soluciones

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

Procedimiento

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

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

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

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

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

Bibliografía

Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and VA mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, 55(1): 158-161

McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, 115(3): 495-501

Anexo C: Estimación del contenido en clorofila total

Procedimiento

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

Cálculos posteriores

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

$$34,5 \times \text{PF}$$

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

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

Bibliografía

Modificado a partir de:

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1): 1

Anexo D: Estimación del contenido en FRAP

Reactivos

- Buffer Acetato de Sodio 0,3 M pH 3,6
- Cloruro Férrico 200 mM
- TPTZ 2, 4,6 Tris (2 pyridyl) s- triazine 10 mM
- TROLOX 250 mM 6 Hidroxy-2,5,7,8 tetra methyl chrommane- 2- carboxylic acid

Preparación de reactivos

Buffer Acetato de Sodio 0.3 M pH 3,6

Acetato de sodio PM: 82.03 g VF: 100 ml

2.4609 g de Acetato de Sodio en 50 ml de agua.

Llevar a peachímetro y ajustar el pH con ácido acético glacial. Enrasar con agua hasta 100 ml.

Cloruro Férrico 200 mM

PM: 162.2 g VF: 1 ml

0.0324 g de Cloruro Férrico en 1 ml de agua.

TPTZ 10 Mm

PM: 312.33 g VF: 2 ml

0.00624 g TPTZ y disolver en 2 ml de HCl 40 mM.

HCl 40 mM

PM: 36.46 d: 1.19 Kg/L N: 12.07 VF: 10 ml

33.1 uL de HCl y 9.96 ml de agua.

TROLOX uM.

A partir de TROLOX 2 mM. VF: 10 ml

1.25 ml de TROLOX 2 Mm y 8.75 ml de alcohol 80%.

Procedimiento

Se pesaron 100 mg de muestra vegetal aproximadamente, luego se molieron con mortero y aire líquido. Se añadió 1 ml de alcohol 80%. Posteriormente se trasvaso a eppendorf y se centrifugó durante 20 minutos a 12.000 – 14.000 rpm a 4 °C

Se transfirió el sobrenadante a tubo limpio y se le agregó 1 ml de alcohol 80 % (volumen final: 2 ml)

Se realizó una dilución 1:3 previo al sembrado en placa. (50 microlitros de extracto + 100 microlitros de alcohol 80%. Volumen Final: 150 microlitros).

Se Sembró en placa 30 microlitros de la dilución (por triplicado) y 30 microlitros de cada uno de los puntos de la curva por duplicado.

El volumen final de siembra en la placa fue de 300 microlitros, los cuales se completarán añadiendo 270 microlitros de solución mix (Buffer acetato de sodio 0,3 M pH 3,6 + Cloruro Férrico 200 mM y TPTZ) a los 30 microlitros de dilución.

Se incubó la placa a temperatura ambiente y al resguardo de la luz durante 40 minutos y posteriormente se realizó su lectura en el lector de ELISA a 600 nm.

Preparación de la curva de calibración: TROLOX 250 uM

TROLOX	ALCOHOL 80%
0	100
15	85
30	70
45	55
60	40

Bibliografía

Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76

Anexo E: Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

Procedimiento

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

Purificación del ARN

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

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

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

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

Se realizó la cuantificación de las muestras a través de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop. También se calcularon las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza de la muestra, ya que las proteínas poseen una absorbancia máxima a 280 nm y otros contaminantes presentes en la muestra como

carbohidratos tienen su pico de absorción a 230 nm. Una relación de 2 es generalmente aceptado como un ARN “puro”.

Gel de ARN

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

Preparación de soluciones

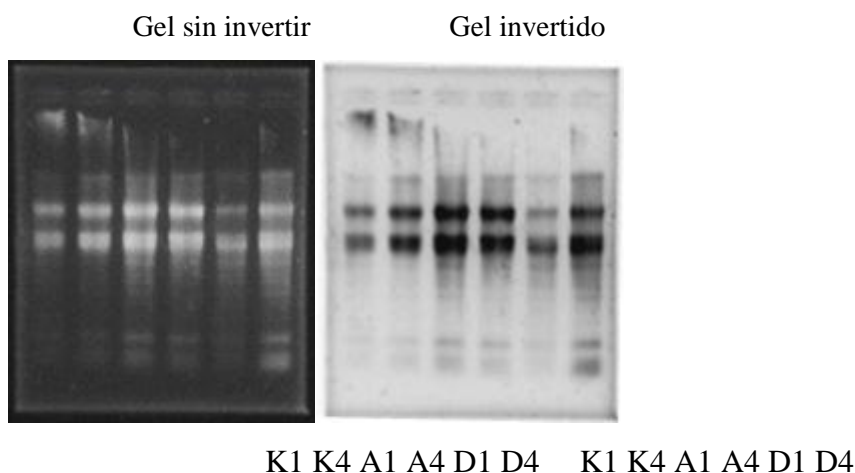
TAE 50X	Reactivo	Cantidad
	Tris base	121 g
	Ácido acético glacial	28,55 ml
	EDTA 0,5 M pH 8	50 ml
	Se completó a 500 ml con agua MilliQ estéril.	
TAE 1X	Reactivo	Cantidad
	TAE 50X	6 ml
	Se completa a 300 ml con agua MilliQ estéril.	
EDTA 0,5 M pH 8	Reactivo	Cantidad
	EDTA	9,305 g
	Se completa a 50 ml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

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

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

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

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



Síntesis de ADN complementario

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

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

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

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

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

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron las siguientes:

Enzima	Cebador F	Cebador R
TEF	5' TGTTGCTGTTAAGGATTTGA AG CG 3'	5' AACAGTTTGACGCATGTCCCTA AC 3'
ADC	5' GAATGTTTTTGGGTGGGGCT TA C 3'	5' CCTTGACAGAATGCCTTATCTG CTG 3'
DAO	5' CAGGATGGAAAGATAGAA GC 3'	5' GGAAGACTGGCCAGTTATGC 3'

Mezcla de reacción

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

Procedimiento

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

Protocolo general:

- 1) 94 °C – 2 minutos
- 2) 94 °C – 1 minuto
- 3) Ta – 30 segundos

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

Variaciones del protocolo para cada gen:

Gen	Producto de amplificación (pb)	Ta (°C)	Número de ciclos
TEF	400	58	30
ADC	320	64	25
DAO	337	60	35

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

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

Bibliografía

Aluru MR, Mazourek M, Landry LG, Curry J, Jahn M, O'Connell MA (2003) Differential expression of fatty acid synthase genes, Acl, Fat and Kas in Capsicum fruit. *Journal of Experimental Botany*, 54(388): 1655-1664