

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**BIOQUÍMICA**



**BÚSQUEDA DE GENES DE DEFENSINAS EN  
SOJA (*Glycine max*) Y SU ANÁLISIS DE  
EXPRESIÓN EN LAS VARIEDADES  
TOLERANTES Y SUSCEPTIBLES INFECTADAS  
CON EL HONGO *Macrophomina phaseolina***

**POR**

**ANDREA BELEN ORTIZ ACUÑA**

**San Lorenzo – Paraguay**

**Julio 2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**BIOQUÍMICA**



**BÚSQUEDA DE GENES DE DEFENSINAS EN  
SOJA (*Glycine max*) Y SU ANÁLISIS DE  
EXPRESIÓN EN LAS VARIEDADES  
TOLERANTES Y SUSCEPTIBLES INFECTADAS  
CON EL HONGO *Macrophomina phaseolina***

**POR**

**ANDREA BELEN ORTIZ ACUÑA**

**TUTOR**

**Prof. Dr. PABLO H.  
SOTELO**

**CO-TUTOR**

**Dr. JULIO C. MASARU  
IEHISA OUCHI**

**Trabajo de grado presentado por Andrea Belén Ortiz  
Acuña para optar al título de Bioquímico/a**

**San Lorenzo - Paraguay**

**Julio 2020**

**Ortiz Acuña, Andrea Belén.**

**Búsqueda de genes de defensinas en soja (*Glycine max*) y su análisis de expresión en las variedades tolerantes y susceptibles infectadas con el hongo *Macrophomina phaseolina*. / Andrea Belén Ortiz Acuña. - - San Lorenzo: La Autora, 2020.**

**IX, 31 p.: fig. ; 30 cm.**

**Trabajo de grado presentado a la Facultad de Ciencias Químicas - UNA para optar al Título de Bioquímica.**

**1. FITOPATÓGENO. 2. MACROPHOMINA PHASEOLINA. 3. SOJA. I. Título.**

**CDD: 632  
Or77b**



**El Prof. Dr. PABLO H. SOTELO**, DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN, Y **El Dr. JULIO C. MASARU IEHISA**, INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**CERTIFICAN:** Que el presente documento, titulado “**BÚSQUEDA DE GENES DE DEFENSINAS EN SOJA (*Glycine max*) Y SU ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN LAS VARIETADES TOLERANTES Y SUSCEPTIBLES INFECTADAS CON EL HONGO *Macrophomina phaseolina***”, constituye la Memoria del Trabajo de Grado que presenta la estudiante **ANDREA BELEN ORTIZ ACUÑA** para optar al Título Universitario de Bioquímica, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que el trabajo reúne los requisitos necesarios para ser presentado ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firman el presente informe en San Lorenzo, a los 09 días del mes de marzo de 2020.

---

**Prof. Dr. Pablo H. Sotelo**

---

**Dr. Julio C. Masaru Iehisa Ouchi**



LA **COORDINACIÓN DE TRABAJO DE GRADO** DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

**CERTIFICA:** Que el presente documento, titulado “**BÚSQUEDA DE GENES DE DEFENSINAS EN SOJA (*Glycine max*) Y SU ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN LAS VARIETADES TOLERANTES Y SUSCEPTIBLES INFECTADAS CON EL HONGO *Macrophomina phaseolina***”, constituye la Memoria del Trabajo de Grado que presenta la estudiante ANDREA BELEN ORTIZ ACUÑA para aspirar al Título Universitario de Bioquímica bajo la dirección de los profesores Prof. Dr. Pablo H. Sotelo y Dr. Julio C. Masaru Iehisa.

Considerando que el trabajo reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentado ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 09 días del mes de marzo del 2020.

---

**Prof. Dra. Ma. Eugenia Flores Giubi**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios, por sus bendiciones durante el transcurso de la carrera y guiarme paso a paso.

A mi familia; por su incondicional apoyo, por ser parte todos estos años en mi formación académica y profesional.

A los profesores de todos estos años, por la paciencia y enseñanzas diarias que aportaron a mi formación académica

Al Dr. Julio Masaru Iehisa, por sus infinitas enseñanzas y acompañamiento durante la realización de este trabajo y permitirme iniciar en la investigación.

Al Prof. Dr. Pablo Sotelo, por abrirme las puertas del departamento de biotecnología.

A la Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO) por proveer las semillas para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento para llevar a cabo este trabajo como parte del proyecto asociativo PINV15-315.

A la BQ. Adriana Orrego y BQ. Cecilia Gavilán por la paciencia y ayuda incondicional durante las largas jornadas de trabajo. A mis compañeros de laboratorio de biotecnología por compartir sus conocimientos y contribuir a mi aprendizaje.

A Orlando, por sostenerme en los momentos de debilidad y festejar los logros alentando mi superación.

A mis amigos Meli, Ana, Sumie, Guada, Gio, Negro y Nao, Guaki, por ser parte de este camino haciendo que la carga sea más ligera durante todos estos años.

A mis amigos de siempre, Ali, Iván, y Gisselle quienes estuvieron en cada etapa a lo largo de toda esta aventura y mis amigos tangueros Malu, Chris y María que me dieron su fortaleza durante todo este tiempo.

## INDICE

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Soja ( <i>Glycine max</i> ).....	1
1.1.1 Características .....	1
1.1.2 Impacto económico .....	2
1.2 <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	2
1.2.1 Características .....	2
1.2.2 Impacto y control en el cultivo .....	3
1.2.3 Ciclo de infección.....	4
1.3 Mecanismo de defensa del vegetal .....	5
1.4 Defensinas.....	5
1.4.1 Actividad Biológica.....	6
1.4.2 Mecanismo de acción: Actividad antifúngica .....	7
1.4.3 Clasificación .....	7
2. OBJETIVOS .....	9
2.1 Objetivo General.....	9
2.2 Objetivos específicos .....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Búsqueda de los genes de defensinas en el genoma de soja.....	10
3.2 Construcción de árbol filogenético de las defensinas de soja.....	10
3.3 Diseño de los cebadores .....	10
3.4 Infección de la soja con <i>M. phaseolina</i> .....	11
3.5 Extracción de ácido nucleico.....	12

3.5.1	Extracción de ácido ribonucleico (ARN) .....	12
3.5.2	Cuantificación de los ácidos nucleicos y determinación de pureza .....	13
3.6	Síntesis de Ácido dextrorribonucleico complementario (ADNc).....	13
3.7	Evaluación de la expresión de los genes de defensinas .....	13
3.8	Análisis de expresión génica entre dos variedades de soja.....	14
4.	RESULTADOS.....	17
4.1	Búsqueda de los genes de defensinas en el genoma de la soja .....	17
4.2	Análisis filogenético de genes similares a defensinas de soja .....	19
4.3	Análisis de expresión de genes de defensinas en las variedades DT974290 y A4910 20	
5.	DISCUSIÓN .....	24
6.	CONCLUSIONES.....	26
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	27



**BÚSQUEDA DE GENES DE DEFENSINAS EN SOJA (*Glycine max*) Y SU ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN LAS VARIEDADES TOLERANTES Y SUSCEPTIBLES INFECTADAS CON EL HONGO *Macrophomina phaseolina***

**Andrea Belén Ortiz Acuña\* ; Pablo Hernán Sotelo \*\* Julio César Masaru Iehisa Ouchi \*\***

\*Estudiante de la Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\*Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción

**RESUMEN**

La pudrición carbonosa (PC) es una enfermedad causada por el hongo necrotrófico *Macrophomina phaseolina*, un fitopatógeno que se transmite por el suelo o rastrojos y afecta a varios cultivos de interés comercial entre ellas la soja (*Glycine max*) que constituye el principal cultivo agrícola de importancia económica de nuestro país. Sin embargo, el estudio acerca del mecanismo de defensa de este cultivo frente al hongo *M. phaseolina* es escaso. Debido a que las defensinas, pequeños péptidos ricos en cisteína, presentan actividad antifúngica, en el presente trabajo se realizó una búsqueda de estos en el genoma de la soja y se estudió su rol en la defensa contra *M. phaseolina*. Se encontraron nueve genes codificantes de defensinas en el genoma de la soja. La mayoría de estas defensinas fueron inducidas durante la infección con *M. phaseolina* en la variedad tolerante DT974290 pero no en la susceptible A4910. Sin embargo, el nivel de expresión de las defensinas en la variedad tolerante infectada no fue superior al de la variedad susceptible infectada. Por lo que la tolerancia de la variedad DT974290 con respecto a la variedad A4910 no puede ser explicada por la diferencia en la expresión de estas defensinas. La diferencia en la inducción de los genes codificante de defensinas entre las variedades indica que existe una activación diferencial de alguna vía de señalización que contribuye a la tolerancia de DT974290.

**Palabras Clave:** *Macrophomina phaseolina*, *Glycine max*, defensinas

**GENOME-WIDE IDENTIFICATION OF DEFENSINS IN SOYBEAN (*Glycine max*) AND ITS  
EXPRESSION ANALYSIS IN TOLERANT AND SUSCEPTIBLE VARIETIES DURING INFECTION  
WITH *Macrophomina phaseolina***

**Andrea Belén Ortiz Acuña\* ; Pablo Hernán Sotelo \*\* Julio César Masaru Iehisa Ouchi \*\***

\* Biochemistry student, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\* Biotechnology Department, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción

**ABSTRACT**

Charcoal rot is a disease caused by the necrotrophic fungus *Macrophomina phaseolina*. This phytopathogen is transmitted by soil or stubble and affects several crops of commercial interest including soybean (*Glycine max*) which is the main agricultural crop of economic importance of our country. However, the mechanism of defense against *M. phaseolina* in soybean is not known. Because plant defensins, small cysteine-rich peptides, have antifungal activity, a search of these genes on soybean genome was performed in this study, and their role on defense against *M. phaseolina* was studied. Nine defensin-coding genes were found on soybean genome. Many of them were up-regulated during infection with *M. phaseolina* in the tolerant variety DT974290 but not in the susceptible variety A4910. However, expression levels of these defensin genes were not higher in infected DT974290 compared to A4910. Therefore, the tolerance of DT974290 respect to A4910 cannot be explained by the difference in the expression level of the defensins. The up-regulation of defensin genes in DT974290, but not in A4910, indicates that a differential activation of some signaling pathway contributes in the tolerance of this variety.

**Key words:** *Macrophomina phaseolina*, *Glycine max*, defensins

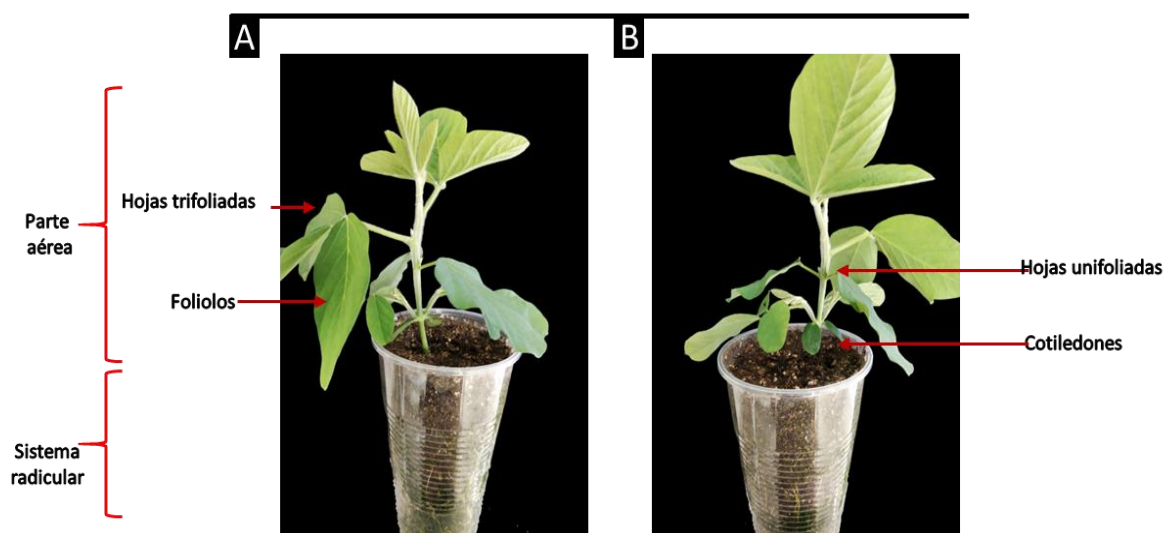
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Soja (*Glycine max*)

### 1.1.1 Características

La soja (*Glycine max* L. Merr.), es un vegetal originaria del continente asiático (China), una especie de las leguminosas (Fabaceae) (1), pertenece a una planta anual, en el cual su ciclo vegetativo se estima entre tres a cuatro meses con 40 a 100 cm de envergadura. En cuanto a su morfología característica se puede apreciar en el tallo, hojas y vainas una especie de pilosidad o pubescencia (2).

El cultivo de esta planta exige temperaturas entre 20-30°C siendo las temperaturas de 30°C óptima para su desarrollo, sin embargo, para la siembra se recomienda temperaturas entre 15-18°C y para la floración una temperatura de 25°C. Este vegetal es sensible a la duración del día pudiendo traducirse esto a una planta de días cortos, en el cual su desarrollo y reproducción están determinadas por las horas de luz y oscuridad durante su cultivo (3).



**Figura 1.1** Planta de soja con sus estructuras de crecimiento. A: planta de soja de la variedad DT974290. B: planta de soja de la variedad A 4910 RG.

Posee dos estados: vegetativos y reproductivos; en el cual el estado vegetativo de la planta comienza desde el momento en que la planta emerge del suelo, comienza con nudos unifoliados, para luego dar lugar partiendo del segundo nudo en adelante a las hojas trifoliadas y nudos laterales (**Fig. 1.1**); y el estado reproductivo constituye la floración, formación de vainas y semillas, y posterior madurez de la planta (4).

### **1.1.2 Impacto económico**

El sector denominado Complejo Sojero, refleja que la soja constituye el principal cultivo del sector agrícola de importancia económica en nuestro país (5), siendo el cuarto exportador de soja y con el quinto lugar como productor a nivel mundial, teniendo el impacto agroindustrial más importante (6).

Esta oleaginosa es caracterizada como principal fuente de aceite comestible y por el alto contenido en proteínas, permite ser utilizada como alimento nutritivo, ya sea del grano o sub productos fabricados para humanos o animales (7).

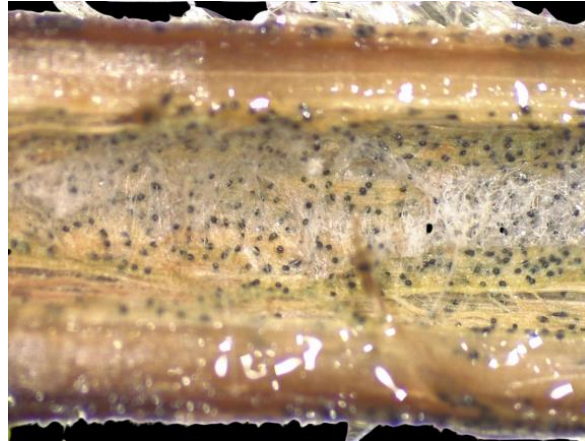
No obstante, este cultivo es afectado por numerosos patógenos y enfermedades que contribuyen a la disminución de productividad de soja en Paraguay, en las cuales se pueden citar enfermedades fúngicas. El suelo es uno de los medios de transmisión de estos patógenos, en las cuales sobreviven de forma indefinida por poseer estructuras de resistencia. Y entre ellas se encuentra *Macrophomina phaseolina*, que causa la enfermedad podredumbre carbonosa de la soja (PCS), y es uno de los hongos con mayor predominancia (8).

## **1.2 *Macrophomina phaseolina***

### **1.2.1 Características**

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. pertenece a la familia Botryosphaeriaceae, clase Dothideomycetes y phylum Ascomycota (9). Es un hongo fitopatógeno necrotrófico, que utiliza como fuente primaria de inóculo el suelo, rastrojos y diseminación por semillas. Se encuentra ampliamente distribuido en áreas cálidas e infectan tejidos inmaduros o dañados, principalmente cuando las condiciones favorecen la infección con climas cálidas y secas (10).

Este hongo es denominado polífago, capaz de afectar a más de 500 hospedadores de importancia económica, se hospeda en el suelo y sobrevive tras la producción de estructuras de resistencia denominados microsclerocios, de color negro o gris produciendo lesiones en la plántula que conducen a la muerte de la misma (11) **(Fig.1.2)**.



**Figura 1.2. Microsclerocios:** Tallo infectado con *Macrophomina phaseolina*.

### **1.2.2 Impacto y control en el cultivo**

*M. phaseolina* posee una amplia variabilidad morfológica (12), fisiológica, patogénica y genética (13). Debido a que la soja es uno de los cultivos más importantes del Paraguay, la disminución del rendimiento debido a la PCS puede impactar a la economía nacional. Actualmente las medidas de control consisten en prácticas culturales (14): el uso de semillas de alta sanidad, rotación con cultivos menos susceptibles (15), uso de fungicidas (16) y la irrigación para el mantenimiento de la humedad del suelo (17), además de la utilización de biocontroleros (18). Sin embargo, el desarrollo de la resistencia genética de la planta huésped podría resultar en un control más eficiente de esta enfermedad (19).

### 1.2.3 Ciclo de infección

Este patógeno sobrevive en el suelo en forma de microesclerocios de forma libre o como rastrojos. Infecta la raíz en crecimiento de una planta susceptible, estos dejan su estado inactivo y germinan cuando las condiciones climáticas son favorecidas (**Fig. 1.3**) (20). Posteriormente el hongo crece sobre la superficie de la raíz del vegetal y penetra por las células epidérmicas en la corteza de la raíz colonizando por dentro llegando así hasta la raíz principal.

Los síntomas que provocan a la plántula se observan por un retardo en el crecimiento, clorosis foliar y finalmente la muerte cuando este haya provocado la destrucción radicular del vegetal. Los microesclerocios pueden ser observados en el interior de las raíces y la parte inferior del tallo, caracterizados como pequeños y negros. Es así como la planta infectada y luego muerta libera microesclerocios, los cuales sobreviven en el suelo y este es capaz de infectar como un inóculo a la próxima cosecha (21).

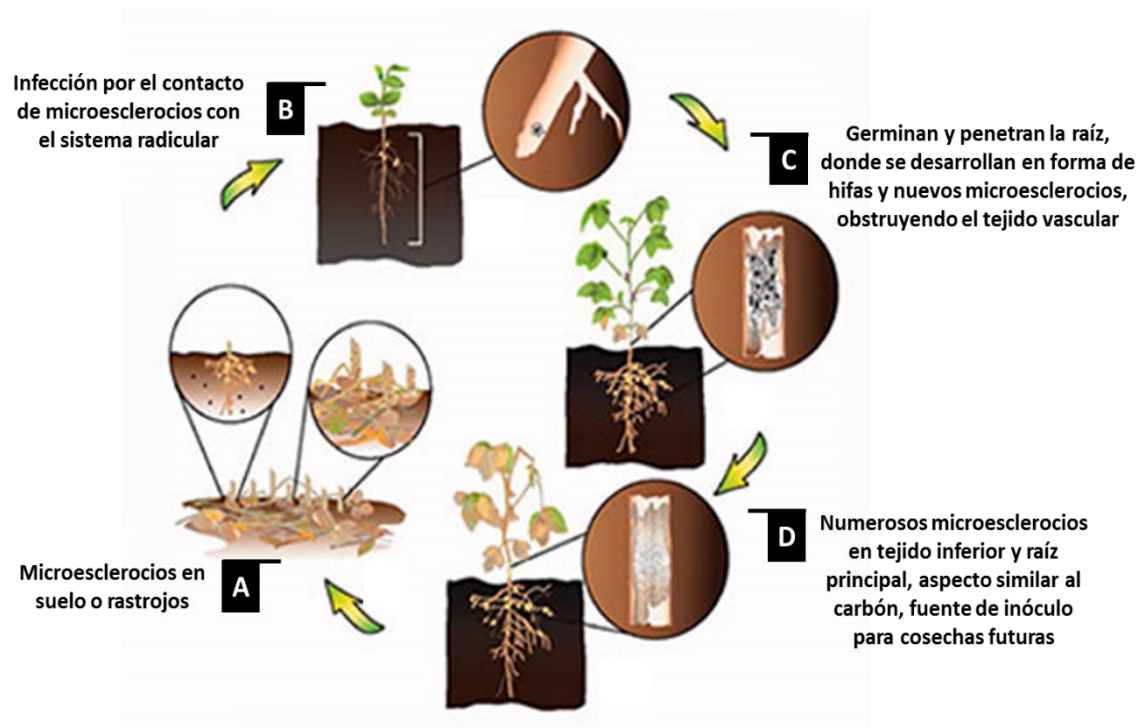


Figura 1.3. Ciclo de infección de *M. phaseolina*. Adaptado de Smith et al (22).

### 1.3 Mecanismo de defensa del vegetal

Los vegetales se encuentran expuestos de manera constante a patógenos e insectos y éstos a su vez producen respuesta defensiva natural que pueden ser físicos y químicos de forma constitutiva o inducida, los cuales desarrollan mecanismo de defensa complejos para su protección (23). Algunos de estos mecanismos de resistencia se encuentran mediados por fitohormonas: ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), de los cuales a su vez son activados mediante el reconocimiento de los diferentes atacantes a la planta huésped (24).

Se han reportado estudios acerca de la interacción de patógenos necrotróficos (25,26) con plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (27) donde la actividad de patógenos necrotróficos como *Alternaria brassicicola* (28,29), *Botrytis cinerea* (29) entre otros se encuentra disuadida por la vías de jasmonato principalmente así como la de etileno (24). Por otro lado, el SA que actúa en forma antagónica a JA/ET, media en las plantas la resistencia sistémica adquirida (RSA), un mecanismo de defensa contra un amplio espectro de patógenos de hongos y bacterias (30,31).

Entre las proteínas relacionadas a la defensa vegetal se encuentran las defensinas que poseen bajo peso molecular y forman parte de los denominados péptidos antimicrobianos (32). Se han reportado que la expresión de las defensinas es inducida con jasmonato pero no con ácido salicílico. (28,33,34)

### 1.4 Defensinas

Las defensinas son moléculas básicas catiónicas, péptidos pequeños ricos en cisteína (6-8 residuos) que comprenden 45 a 54 aminoácidos, presentan un motivo alfa-helicoidal y lámina beta antiparalela (CS $\alpha\beta$ ) formado por puente disulfuro a partir de cisteína, el cual le confiere estabilidad termodinámica y estructural a la molécula. Fueron clasificados primeramente como  $\gamma$ -thioninas, por similitudes de tamaño y peso molecular, pero diferencias estructurales las determinaron como una familia aparte (32,35,36). A pesar del patrón conservado que presentan, el nivel de identidad entre defensinas de plantas es bajo.

Se presume que comparten un ancestro procariota, que durante eventos de ganancia o pérdida de genes durante la evolución, fueron transferidos al reino eucariota y estas defensinas de plantas se encuentran estrechamente relacionadas con hongos e invertebrados (37).

Abundan en las semillas, pero también están presentes en otros tejidos como flores, tallo, tubérculos, vainas y hojas en la que participan directamente en el proceso de germinación y desarrollo del vegetal (38), debido a que se encuentran localizadas donde potencialmente se produce la entrada del patógeno, como en capas celulares periféricas, estomáticas y cavidad subestomática (39).

Se han reportado que la sobre-expresión de defensinas en plantas como arroz, trigo, entre otros, confieren resistencia a patógenos fúngicos (40,41).

Cabe resaltar que, solamente se han identificado dos defensinas de la soja: SE60 (42) que ha demostrado actividad antimicrobiana (43) y por otro lado la dehidrina 8 (Dhn8) (44), que no ha sido caracterizada en cuanto a la función que desempeña en la planta.

#### **1.4.1 Actividad Biológica**

La expresión de las defensinas en plantas puede ser constitutiva encontrándose en los tejidos mencionados, o bien inducido por factores abióticos (condiciones físicas o químicas extremas) (45), así como factores bióticos (hongos o bacterias) (46), además, en algunos casos, la expresión es específica de cada tejido con variación en los niveles de producción (47).

Poseen varias actividades biológicas, desde la inhibición de proteasas y amilasas (48), bloqueo de canales iónicos e inhibición de la síntesis de proteínas (49) para llegar a la acción insecticida, antibacteriana y principalmente antifúngica (50,51).



### **1.4.2 Mecanismo de acción: Actividad antifúngica**

La información acerca del mecanismo de acción es escasa, dado que existen estudios de defensinas de diferentes plantas, existen hipótesis que intentan explicar esta actividad.

Existen dos mecanismos propuestos; modelo de barril-bastón y modelo alfombra-poro. Donde ambos modelos consideran la interacción de defensinas con moléculas con carga negativa del patógeno, que provoca el aumento del potencial y posterior permeabilización de membrana, teniendo en cuenta lo anterior el primer modelo propone; que los péptidos antimicrobianos interaccionen con la bicapa fosfolipídica de la membrana (región hidrofóbica) y puede dar lugar al interior de la formación del poro (regiones hidrofílicas).

Mientras que el segundo modelo propone que los péptidos antimicrobianos queden sobre la membrana celular, donde son atraídos electrostáticamente en numerosos sitios dando lugar a múltiples poros, en el que a altas concentraciones del péptido pueda permeabilizar la membrana, formando estructuras como micelios, actuando como un detergente.

Sin embargo; no hay certeza del daño celular causado por defensinas para explicar su actividad (52).

Otros estudios indican, que mientras se encuentre el motivo alfa-helicoidal y beta hoja antiparalela ( $CS\alpha\beta$ ) a pesar de tolerar mutaciones, son capaces de no perder la actividad antifúngica (53).

### **1.4.3 Clasificación**

De acuerdo a la principal actividad antifúngica, la inhibición del crecimiento de hongos por diferentes mecanismos genera alteraciones sobre las hifas, se ha visto que según el efecto que produce sobre otros tipos de hongos, pueden clasificarse en morfogénicas; en el que reducen el alargamiento de hifas y produce distorsiones morfológicas significativas, y por otro lado en no morfogénicas; donde también se reduce el alargamiento de hifas sin efecto significativo en el patrón de crecimiento (54).

Una segunda clasificación a partir de la estructura del precursor codificante, las defensinas vegetales pueden ser de dos tipos; la mayoría poseen el dominio maduro con el N-terminal y péptido señal que dirige al retículo endoplasmático en el espacio extracelular, y por otra parte algunas defensinas poseen un prodominio adicional en el extremo C-terminal (55), y puede verse principalmente en defensinas florales (56).

Teniendo en cuenta estas informaciones, en el presente trabajo se planteó determinar el nivel de expresión de las defensinas en tallo de soja infectada con *M. phaseolina*. Mediante la comparación del nivel de expresión de las defensinas entre una variedad susceptible y otra tolerante a dicho patógeno, se estudió el rol de las defensinas durante la infección con *M. phaseolina*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Buscar genes codificantes de defensinas en soja (*Glycine max*) y comparar el nivel de expresión entre variedad tolerante y susceptible infectadas con *Macrophomina phaseolina*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Buscar genes codificantes de defensinas en el genoma de soja.
- Analizar dominios presentes en las defensinas de la soja y la homología entre ellas.
- Determinar la expresión de las defensinas en las variedades tolerante y susceptible durante la infección con *M. phaseolina*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Búsqueda de los genes de defensinas en el genoma de soja

Para obtener las secuencias de los genes de defensina en el genoma de la soja se realizó una búsqueda por homología mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) utilizando las secuencias de defensinas de *Medicago truncatula* (código de acceso: KEH35660.1), *Nicotiana glauca* (6B55\_A) y *Raphanus sativus* (XP\_018444508.1). El proteoma de la soja fue descargado de Phytozome v12 (57). Las secuencias obtenidas fueron alineadas para construir un árbol filogenético y luego fueron seleccionadas una secuencia de cada grupo del árbol para realizar una segunda búsqueda BLASTp, para obtener más secuencias de probables defensinas en el genoma de la soja. Posteriormente el análisis de dominios conservados presentes en las secuencias obtenidas se realizó utilizando el programa InterProScan5 (58). El dominio conservado de las defensinas fueron alineadas mediante el algoritmo CLUSTALW de Geneious 7.1.3 (59).

#### 3.2 Construcción de árbol filogenético de las defensinas de soja.

El árbol filogenético de las defensinas de soja fue construida mediante el método de máxima verosimilitud empleando el modelo de sustitución de aminoácidos de Dayhoff con distribución gamma utilizando el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (60). Para evaluar el soporte del árbol se utilizó el método de bootstrap con 500 repeticiones.

#### 3.3 Diseño de los cebadores

Para cada gen seleccionado de defensina presente en la soja, y su posterior análisis de expresión génica, se diseñó pares de cebadores mediante el uso del programa Primer3Plus (61) en el cual se tuvieron en cuenta ajustes en los parámetros como: el tamaño del producto de amplificación entre 100 a 150 pares de base (pb), la temperatura de desnaturalización entre 57-60°C (**Tabla 3.1**).

**Tabla 3.1:** Cebadores de los genes seleccionados para la amplificación.

Gen	Secuencias en orientación 5'→3'	Tamaño del amplicón	Temperatura de Hibridación (°C)
Glyma.04G205200	F: ACGATTTGGGCTTTTCTTCA	132 pb	59,7
	R: TCAAGATGGCTAACCGAAGC		60,4
Glyma.05G198000	F: GAGGCGAAAGATTGCTTGAC	105 pb	60,0
	R: CTGACCACCGATGAAACCAT		60,8
Glyma.06G160300	F: ACGGAGGGAAGAGTGTGTGA	148 pb	60,7
	R: AAATCCTGGTGCAAAAGCAG		60,2
Glyma.06G160400	F: TGTGAGTCAAAGAGCCATCG	113 pb	60,0
	R: CGTCTACGAAATCCACGACA		59,7
Glyma.08G005300	F: TGCTTTAGCGACACCAACTG	105 pb	60,0
	R: TCAACAAATCCTGGTGCAAA		60,1
Glyma.08G165000	F: TAGGCCATGCACCTTAAC	125 pb	60,1
	R: ATTCTTCGACACGGAGCATC		60,2
Glyma.08G228600	F: CAAGAACGTGCGAAGAAACA	107 pb	60,0
	R: GGCATTGCAATCACCATT		59,5
Glyma.08G268000.2	F: GTTTC AAGGGGCCATGTTTA	103 pb	59,8
	R: CAGAAGCATCTGCGACTGAA		60,3
Glyma.13G278000	F: CTGGGTTGTGCTTCCTTTC	105 pb	59,8
	R: TGAAGCATGGACCCCTGTAT		60,3
Glyma.16G100400	F: ATGGTGGCAGAAGCAAGAAC	116 pb	60,3
	R: CAGTGCCTCCAGTGAAACG		59,3
Glyma.18G027700	F: TATGTGCTAAGCGCAGCAAG	110 pb	60,3
	R: GTTACCGTGACAGGCTCCAT		60,0

### 3.4 Infección de la soja con *M. phaseolina*

Se utilizaron semillas de la variedad susceptible A4910 y tolerante DT974290 a *M. phaseolina* proveídas por la Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO) en el marco del proyecto CONACYT PINV15-315. Las semillas de estas variedades fueron sembradas en vasos de plástico de 500 mL conteniendo sustrato para planta CAROLINA SOIL (Carolina Soil do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil) y fueron cultivadas en una sala a 22-24°C, en condiciones de días largos (16 h luz/8 h oscuridad) por dos semanas, para luego continuar por dos semanas en una sala de cultivo a 26-28°C. Las plantas fueron seleccionadas para el corte al tallo “cut stem” (62), con una altura de 2,5 cm por encima de la primera hoja verdadera. Los tallos recién cortados fueron inoculados con discos de medio papa dextrosa agar (PDA) colonizado con *M. phaseolina*. Estos discos fueron mantenidos en el tallo utilizando una punta de pipeta de 200 µl (Fig. 2.1). Con el fin de mantener la virulencia del hongo, éste fue re-aislado de la raíz de soja y cultivados en oscuridad durante 4-5 días en medio PDA. Para el grupo control se utilizó el medio PDA sin el hongo (63). Las plantas inoculadas como no

inoculadas se mantuvieron a 26-28°C con el mismo fotoperiodo. Se obtuvieron al menos tres réplicas biológicas para el análisis de expresión y la colecta de muestras se realizó al tercer día post-inoculación, donde se observó la lesión necrótica del tallo.



**Figura 2.1 Método del tallo cortado “cut stem”.** Plántulas con cuatro semanas de crecimiento.

### **3.5 Extracción de ácido nucleico**

#### **3.5.1 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)**

La extracción del ARN total se realizó a partir de tallo principal de plántulas infectadas como no infectadas con el hongo *M. phaseolina* de la variedad DT974290 (tolerante) y A4910 (susceptible).

Para la colecta de los tallos infectados, se consideró el doble de la longitud de la lesión, mientras que para el grupo control se calculó el promedio de la longitud de la lesión del grupo infectado. La extracción se realizó macerando las muestras con nitrógeno líquido y utilizando el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, E.E.U.U.) en base al método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (64).

### **3.5.2 Cuantificación de los ácidos nucleicos y determinación de pureza**

La cuantificación del ARN total extraído se realizó utilizando el equipo Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific E.E.U.U.), mediante la lectura de absorbancia de 220 a 330 nm. Durante la medición de las muestras se obtuvieron datos como: concentración del ácido nucleico total en ng/μl y valores de la relación de absorbancia a 260nm/280nm y 260nm/230nm que brinda información acerca del valor de la pureza del ácido nucleico extraído, y de esta manera realizar un control de calidad del mismo.

### **3.6 Síntesis de Ácido dextrorribonucleico complementario (ADNc)**

El ARN total se utilizó para la síntesis de ADN complementario (ADNc) realizando una primera incubación a 70°C por 5 min, en un tubo tipo Eppendorf de 0,2 mL en el termociclador (SimpliAmp™, Thermo Fisher Scientific, E.E.U.U.); el volumen de la muestra contiene 2 μg ARN total, 1,66 μL oligodT (100 μM) y el volumen de agua libre de nucleasas necesario para completar 14 μL. Luego, la mezcla fue transferida de inmediato a hielo y transcurrido un tiempo se le agregó una mezcla que contiene: 5 μL buffer 5X transcriptasa inversa de virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Promega, E.E.U.U.), 1,25 μL de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) 10 mM, 0,75 μL de enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) y 0,5 μL de RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega), en un volumen final de reacción de 25 μL. La reacción de transcripción inversa se realizó a 42°C durante 60 minutos, seguido de un aumento de temperatura a 65°C por 20 minutos y luego descendiendo a 10°C para finalizar la reacción.

### **3.7 Evaluación de la expresión de los genes de defensas**

Con el objetivo de verificar la expresión de los genes de defensas presentes en la soja y confirmar la amplificación de los cebadores diseñados se realizó la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes seleccionados, en el que fueron utilizados los ADNc previamente sintetizados. Para ello se utilizó Taq DNA polymerase, recombinant (Invitrogen) y las reacciones fueron llevadas a cabo en el termociclador (SimpliAmp™), con las condiciones descritas en las **Tablas 3.2 y 3.3**.

**Tabla 3.2:** Componentes de la mezcla para la PCR.

Componentes	Volumen
Buffer 10x	1,50 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0,45 µL
dNTPs 10 mM	0,30 µL
Taq Polimerasa 1U	0,03 µL
Cebadores 10 µM (forward y reverse)	0,75 µL
Templado	1,00 µL
Agua libre de nucleasas	10,97 µL
Total	15,00 µL

**Tabla 3.3:** Condiciones de la PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización Inicial	94°C	3 min	-
Desnaturalización	94°C	45 seg	
Hibridación	55°C	30 seg	35
Extensión	72°C	20 seg	
Extensión final	72°C	10 min	-

Para la PCR de cada se incluyó un control negativo que contenía la mezcla de reacción y agua libre de nucleasas en vez del templado correspondiente.

Luego de obtener el producto de amplificación, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 2% con el agente intercalante SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific). Este fue revelado en el transiluminador UV, verificando la presencia de una sola banda.

### 3.8 Análisis de expresión génica entre dos variedades de soja

Para el análisis de expresión génica fueron empleados los cebadores diseñados específicamente para cada gen de defensina de manera a realizar la amplificación por PCR en tiempo real utilizando como templado cDNA sintetizado (RT-qPCR) y SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, E.E.U.U.) que contiene agente intercalante SYBR Green en medio de reacción (**Tabla 3.4**). Las reacciones fueron llevadas a cabo en StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) (**Tabla 3.5**) y se obtuvieron datos como el valor de ciclos de cuantificación (Cq), así como valores de temperatura de



desnaturalización de los productos de amplificación. El gen de factor de elongación beta de la soja (*GmEF1b*) fue utilizado para la normalización de los datos. Por lo tanto, el nivel de expresión de los genes fue expresado como  $2^{-\Delta Cq}$ , donde  $\Delta Cq$  es el valor de  $Cq$  del gen de interés de una muestra menos el valor de  $Cq$  del gen de referencia de la misma muestra.

**Tabla 3.4:** Componentes de la mezcla para la RT-qPCR

Componentes	Volumen
SSoAdvanced SYBR Green supermix	5,0 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	3,5 $\mu$ L
Cebadores 10 $\mu$ M (forward y reverse)	0,5 $\mu$ L
Templado	1,0 $\mu$ L
Total	10,0 $\mu$ L

**Tabla 3.5:** Condiciones de la RT-qPCR.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización Inicial	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	15 seg	40
Hibridación y extensión	60°C	30 seg	

El análisis de temperatura de desnaturalización tuvo una incubación inicial de 95°C por 15 segundos, aumentando cada 0,6 seg hasta llegar a 95°C.

Para cada corrida de RT-qPCR se incluyó el control negativo que contiene agua libre de nucleasas en vez del volumen de templado.

Para comparar el nivel de expresión entre las variedades se aplicó la prueba *t* de Student utilizando Microsoft Excel, definiendo como significativo la diferencia con un valor de  $P < 0,05$ . Los gráficos de cajas y bigotes fueron hechos utilizando el paquete 'ggplot2' del software estadístico R versión 3.6.2.

### **3.9 Consideraciones éticas**

El protocolo de trabajo fue evaluado por el Comité de Ética en la Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas en fecha 01 de noviembre de 2019 con código número 507/19, resolviendo que el trabajo no involucra empleo de seres humanos o sus muestras, ni reactivos biológicos.

Los solventes orgánicos utilizados fueron desechados en contenedores para residuos líquidos. Los cultivos de hongos y frascos utilizados para la infección fueron autoclavados para la esterilización y su contenido fue desechado en depósitos para desechos sólidos. Estos contenedores fueron retirados por una empresa tercerizada encargada del tratamiento de los residuos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Búsqueda de los genes de defensinas en el genoma de la soja

Mediante la búsqueda BLAST, se encontraron diecisiete genes codificantes de defensinas en el genoma de la soja (**Tabla 4.1**). Mediante el uso del programa InterProScan5 (58), se determinaron los dominios conservados que presentan, por un lado nueve genes que presentaron los dominios Puro-tionina y/o Gamma-tionina, y por otra parte los ocho genes restantes no presentaron un dominio en particular.

**Tabla 4.1:** Genes de defensina presentes en el genoma de la soja.

Gen	Dominio Puro tionina/Gamma tionina*	Nº residuos cisteína	Longitud de la proteína (aa)
<i>Glyma.04G205200</i>	✓	6	69
<i>Glyma.05G198000</i>	✓	8	75
<i>Glyma.06G160300</i>	✓	9	77
<i>Glyma.06G160400</i>	✓	8	74
<i>Glyma.08G005300</i>	✓	8	85
<i>Glyma.08G165000</i>	-	8	96
<i>Glyma.08G228600</i>	-	8	75
<i>Glyma.08G268000.2</i>	✓	8	85
<i>Glyma.13G278000</i>	✓	9	75
<i>Glyma.16G100400</i>	✓	8	80
<i>Glyma.18G027700</i>	✓	11	87
<i>Glyma.09G058200</i>	-	18	135
<i>Glyma.15G164400</i>	-	18	130
<i>Glyma.15G164300</i>	-	19	130
<i>Glyma.12G159500</i>	-	10	83
<i>Glyma.05G120900</i>	-	18	123
<i>Glyma.UO43800</i>	-	18	138

\*El código del dominio puro-tionina es PR00288 y gamma-tionina PF00304 o PS00940

El número de residuos de cisteína osciló entre 6 y 19 y el tamaño del péptido entre 69 a 138 aminoácidos. Teniendo en cuenta que las defensinas de la planta contienen ocho residuos de cisteínas y presentan un tamaño pequeño (típicamente entre 45 y 54 aminoácidos, excluyendo el péptido señal (65), y la presencia del dominio puro-tionina/gamma-tionina, fueron seleccionados los primeros 11 genes de la **Tabla 4.1** para el análisis posterior.

La alineación de las secuencias peptídicas de las 11 probables defensinas reveló la alta variabilidad que presenta estos genes (**Fig. 4.1**). Además, se confirmó la presencia de los ocho residuos de cisteína altamente conservados necesarios para formar los cuatro

puentes de disulfuro. Sin embargo, en una de ellas (*Glyma.04G205200*) solamente se observó seis residuos de cisteína donde uno de ellos se perdió mediante una deleción y el otro mediante la sustitución a un residuo de serina. Con el fin de averiguar si otras leguminosas poseen esta defensina atípica con tres puentes de disulfuro, se realizó una búsqueda BLAST en Phytozome y la base de datos de NCBI para extraer los homólogos más cercanos. El alineamiento de estas secuencias indica que poseen cuatro puentes disulfuro en comparación con el de soja (**Fig. 4.2**).



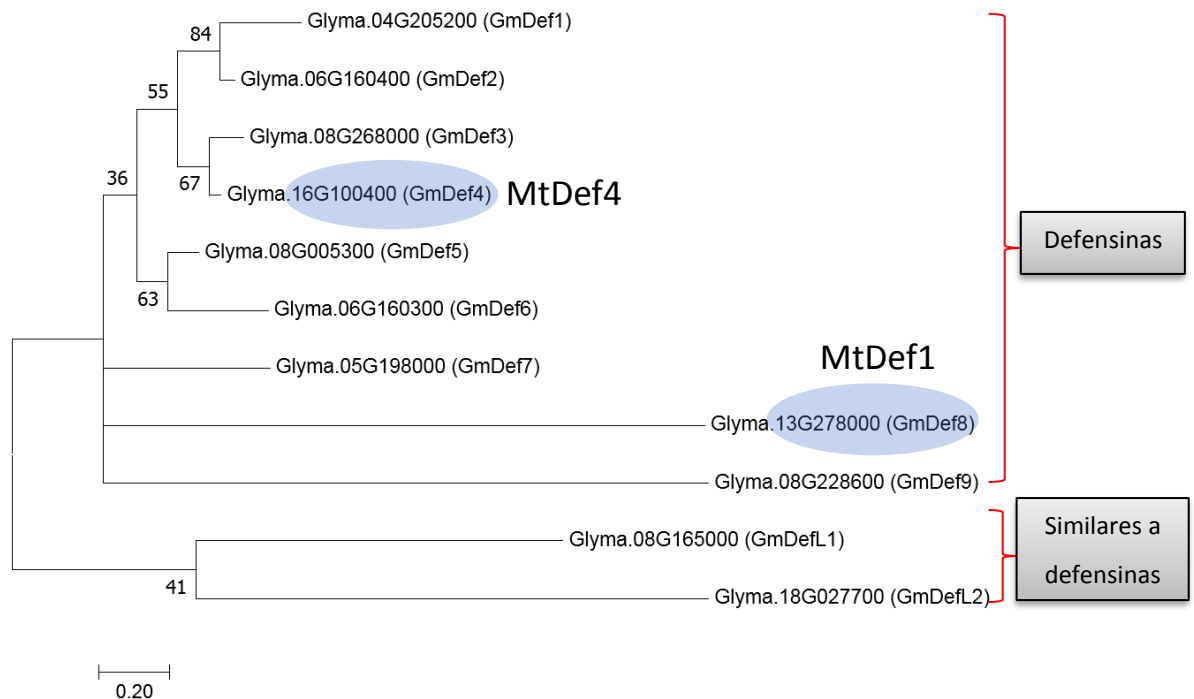
**Figura 4.1: Alineación de aminoácidos de 11 péptidos similares a defensinas presentes en soja.** Se muestra solamente la región altamente conservada de estos péptidos. Los residuos conservados de cisteína se indican de color amarillo y los corchetes los posibles puente disulfuro según (65).



**Figura 4.2: Alineación de homólogos de Glyma.04G205200 en otras leguminosas** Se muestra solamente la región altamente conservada de estos péptidos. Los residuos conservados de cisteína se indican de color amarillo y los corchetes los posibles puente disulfuro según (65). Gm (*Glycine max*), Lj (*Lotus japonicus*), Ap (*Abrus precatorios*), Mt (*Medicago truncatula*), Tp (*Trifolium pratense*), Pv (*Phaseolus vulgaris*), Vu (*Vigna unguiculata*), Cc (*Cajanus cajan*).

## 4.2 Análisis filogenético de genes similares a defensinas de soja

El análisis filogenético de los 11 péptidos similares a defensinas indica que estos se pueden diferenciar en dos grandes grupos o clados (**Fig. 4.3**). En *Medicago truncatula*, una de las leguminosas más cercanas a la soja, se han estudiado las defensinas MtDef1/2 (MTR\_2g079440/MTR\_2g079430) y MtDef4 (MTR\_8g070770) (66). Mediante la búsqueda BLAST, se encontró que el ortólogo de MtDef1 es Glyma.13G278000 y el de MtDef4 Glyma.16G100400, ambos pertenecientes al clado más grande del árbol filogenético. Por lo tanto, este grupo grande será considerado como las defensinas de la soja nombrados GmDef1 a GmDef9; mientras que los dos miembros del otro lado, péptidos similares a defensinas GmDefL1 (*Glycine max* Defensin-Like 1) y GmDefL2.



**Figura 4.3: Árbol filogenético de las defensinas y péptidos similares a defensinas de soja.** El árbol fue construido en base al alineamiento de aminoácidos de la región altamente conservada mediante el método de máxima verosimilitud. Se utilizó el modelo de sustitución de Dayhoff con distribución gamma. El número en los nudos indica el soporte del árbol (en porcentaje) evaluado mediante el análisis de bootstrap con 500 repeticiones. Se indican los ortólogos de las defensinas MtDef1 y MtDef4 de *M. truncatula*.

### 4.3 Análisis de expresión de genes de defensinas en las variedades DT974290 y A4910

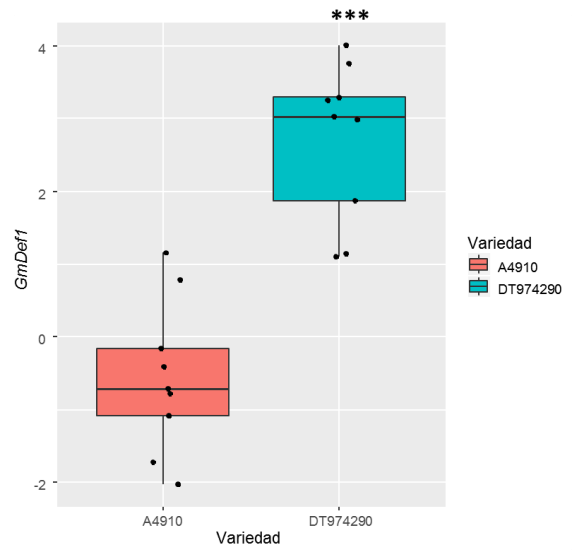
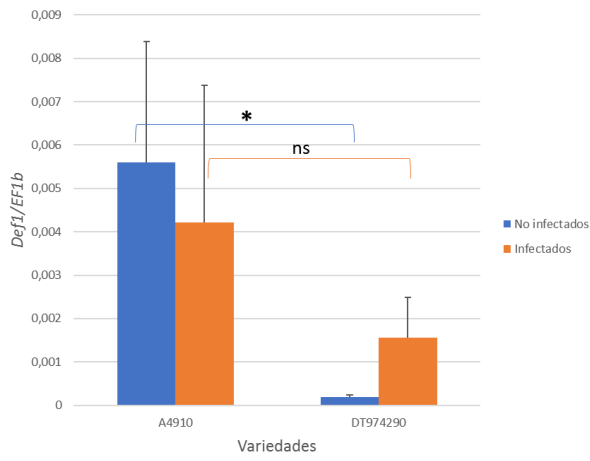
Para estudiar el rol de estas defensinas en la defensa de la soja contra el hongo *M. phaseolina*, se determinó la expresión de estos genes en la variedad A4910 (susceptible al hongo) y DT974290 (tolerante). Para ello, el tallo de las plántulas de aproximadamente cuatro semanas de edad fue cortadas a unos 2,5 cm por encima del nudo unifoliado y fueron inoculados con *M. phaseolina*. A los tres días de inoculación, se extrajo el ARN de la zona infectada con el hongo para cuantificar el nivel de expresión de las defensinas mediante RT-qPCR.

Se pudo observar la expresión de *GmDef1*, *GmDef2*, *GmDef3*, *GmDef4*, *GmDef6* y *GmDef8* tanto como en el grupo infectado como control de ambas variedades (**Fig. 4.4**). Sin embargo, no se ha detectado la expresión de los genes *GmDef5*, *GmDef7*, *GmDef9*, *GmDefL1* y *GmDefL2* en la condición estudiada.

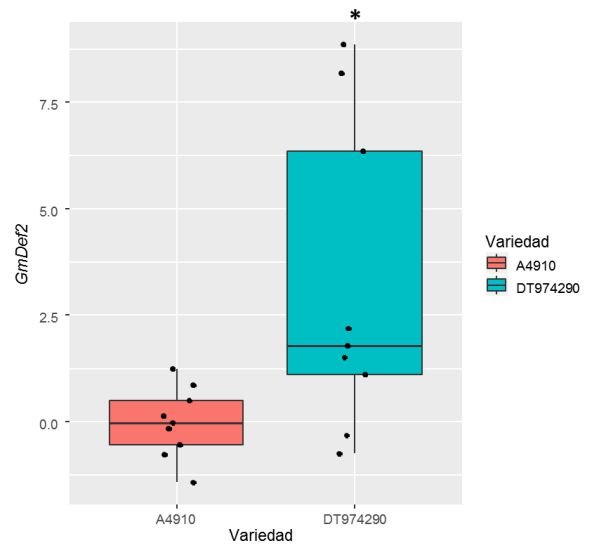
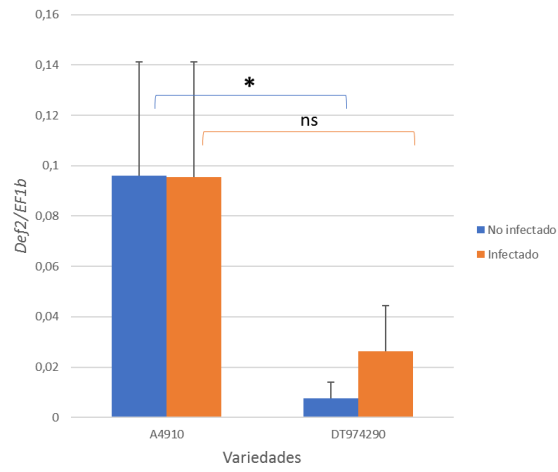
Con respecto a las defensinas *GmDef1* al *GmDef4*, el nivel de expresión fue significativamente mayor en la variedad A4910 no infectada comparada con el de la variedad DT974290 no infectada (**Fig. 4.4A-D, panel izquierdo**). En la variedad susceptible A4910 este nivel de expresión se mantuvo durante la infección con *M. phaseolina*. Sin embargo, la infección con el hongo ha inducido la expresión de estas defensinas en la variedad tolerante DT974290, aunque este nivel fue inferior al de la variedad susceptible. Para comparar el grado de inducción de estos genes durante la infección, se calculó el  $\log_2 \frac{\text{nivel de expresión del grupo infectado}}{\text{nivel de expresión del grupo control}}$  (**Fig. 4.4A-D, panel derecho**). El grado de inducción fue significativamente superior en la variedad tolerante. La defensina *GmDef6* también demostró un comportamiento similar, aunque no se observó una diferencia significativa en la expresión basal de este gen (**Fig. 4.4E**).

Por otro lado, el nivel de expresión basal de *GmDef8* fue significativamente superior en la variedad tolerante pero el grado de inducción durante la infección fue significativamente superior en la variedad susceptible (**Fig. 4.4F**).

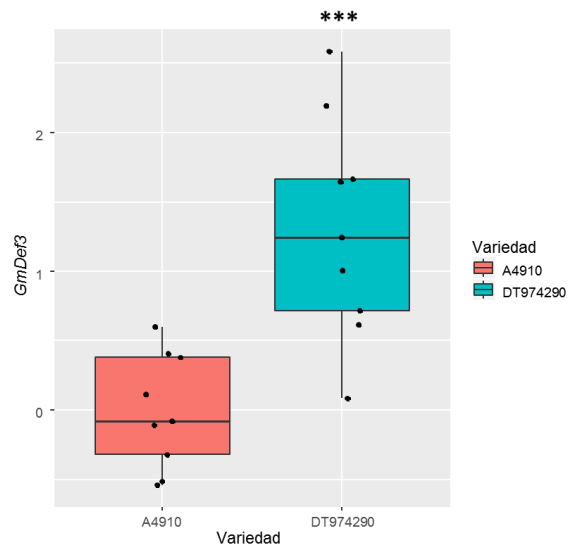
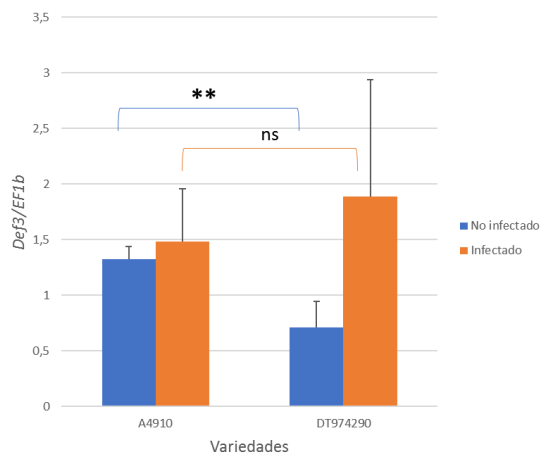
**A)**



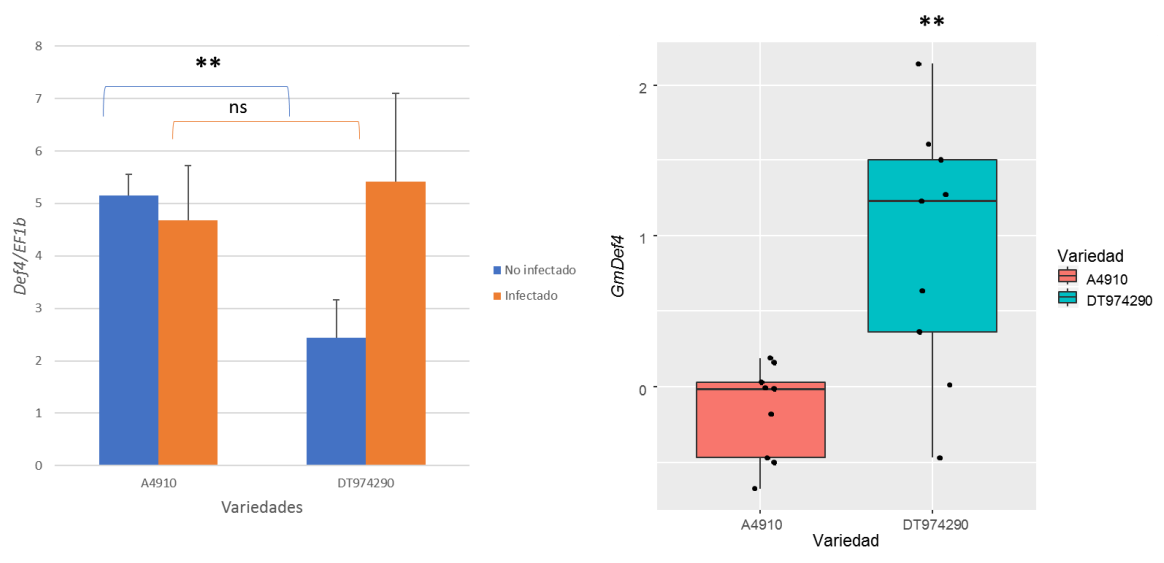
**B)**



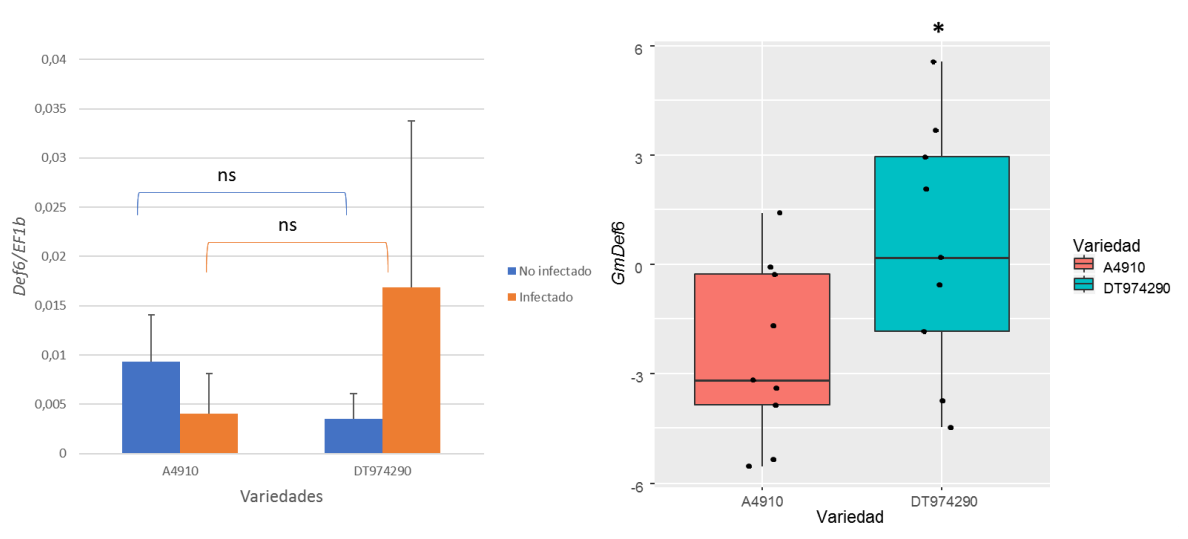
**C)**



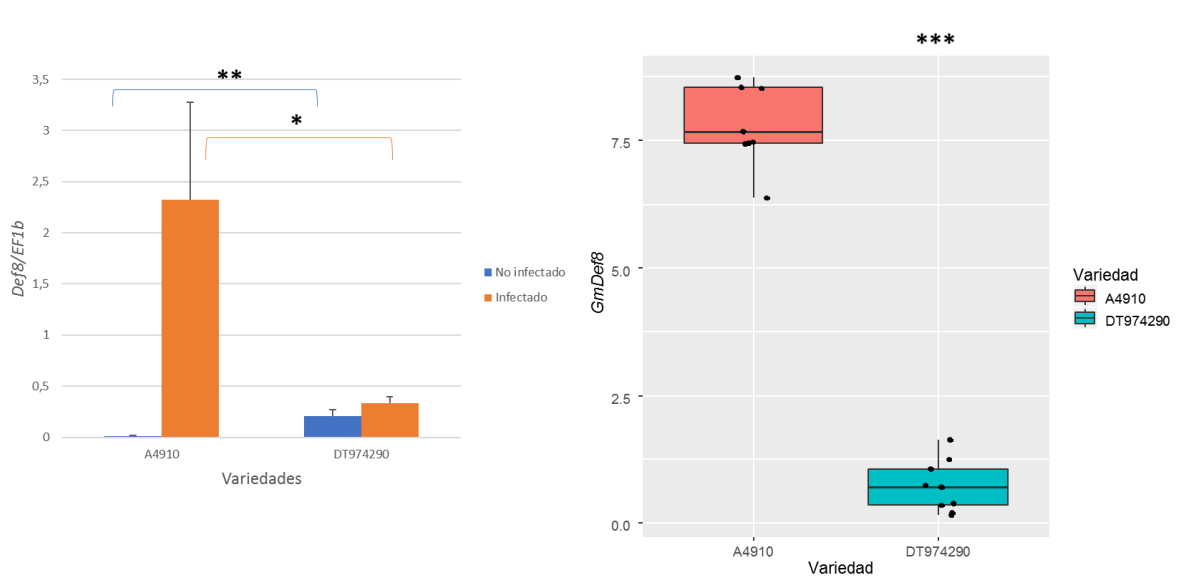
D)



E)



F)





**Figura 4.4: Comparación del nivel de expresión de los genes de defensinas de soja a los tres días de inoculación.** Se analizaron la expresión de: A) *GmDef1*, B) *GmDef2*, C) *GmDef3*, D) *GmDef4*, E) *GmDef6* y F) *GmDef8*. En el panel izquierdo, las barras de error indican la desviación estándar obtenida en promedio de tres réplicas biológicas. La expresión de los genes fue normalizada con el nivel de expresión del gen de factor de elongación beta (*GmEF1b*) en cada muestra. Panel derecho: diagrama de cajas y bigotes donde dentro de las cajas se encuentran los valores del primero al tercer cuartil y la línea horizontal indica la mediana. Los bigotes (líneas verticales) se extienden hasta los valores mínimos o máximos si no existen valores atípicos. Se aplicó la prueba *t* de Student de dos colas donde \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  y ns = no significativo.

## 5. DISCUSIÓN

Las defensinas forman parte del mecanismo de defensa del vegetal frente a patógenos fúngicos, sin embargo, no hay reportes sobre la participación de las defensinas de la soja en respuesta a patógenos. Hasta la actualidad, solamente se han registrado dos defensinas de la soja: SE60 (42) con actividad antibacteriana (43) y la dehidrina 8 (Dhn8) (44), sin información sobre el rol que cumple en la planta. En *M. truncatula*, se han identificado aproximadamente 60 defensinas clásicas en su genoma (66). Por lo tanto, primeramente, se realizó una búsqueda de las defensinas en el genoma de la soja, encontrándose diecisiete genes candidatos donde nueve de ellos se consideraron defensinas de acuerdo a los dominios conservados, número de residuos de cisteínas y el tamaño de los péptidos (**Tabla 4.1**). De hecho, los ortólogos de las defensinas de *M. truncatula* (MtDef1/2 y MtDef4) se encuentran entre las nueve defensinas de soja (**Fig. 4.3**).

Se observó una gran variación en la secuencia peptídica de las defensinas y péptidos similares a defensinas. De hecho, se sabe que las defensinas de plantas presentan muy pocos sitios conservados, exceptuando los ocho residuos de cisteínas (65) necesarias para formar los cuatro enlaces disulfuro.

Todas las defensinas de la soja poseen ocho residuos de cisteínas conservadas, excepto GmDef1 que presenta solamente seis residuos de cisteína debido a una deleción y la sustitución (**Fig. 4.1**). Se desconoce el impacto que tiene estos cambios sobre la actividad y/o la estabilidad de las defensinas debido a que probablemente cambie el patrón de la formación de los enlaces disulfuros comparados con las defensinas canónicas. La comparación de secuencias de los homólogos de GmDef1 en otras leguminosas demostró que existe diferencia en cuanto al número de cisteínas, puesto que sus homólogos presentan un total de ocho residuos a diferencia del mismo, se presume que esta variación génica ocurrió durante la diferenciación de género o especie de la soja (**Fig.4.2**).

De las defensinas reportadas de soja, SE60 corresponde a GmDef6 que fue encontrado en las semillas de la soja (42) y Dhn8 corresponde a GmDef4 cuya expresión

es inducida por la sequía (44). La expresión de ambas defensinas fue observada tanto en el tallo no infectado como infectado con el hongo *M. phaseolina* (Fig. 4.4).

De los nueve genes de defensinas de la soja, tres de ellos (*GmDef5*, *GmDef7* y *GmDef9*) no se expresaron en las condiciones estudiadas. Algunas defensinas podrían estar expresados en tejidos específicos como el caso de las defensinas de *M. truncatula* donde algunas son específicas de nódulos (66).

La mayoría de las defensinas expresadas (*GmDef1* al 4 y *GmDef6*) presentaron un patrón de expresión similar en ambas variedades (expresión constante en A4910 e inducción durante la infección con *M. phaseolina* en DT974290) sugiriendo que son regulados de la misma manera. Por otro lado, *GmDef8* presentó un patrón opuesto (inducción en A4910 durante la infección con *M. phaseolina* y una expresión casi constante en DT974290) indicando la existencia de mecanismo de regulación distinta al primer grupo. Se han reportado que la expresión de las defensinas es inducida con jasmonato pero no con ácido salicílico (28,33,34) Es necesario estudiar si las defensinas de soja son reguladas por alguna fitohormona, principalmente el jasmonato.

Ninguna de las defensinas de soja estudiadas presentó una mayor expresión en la variedad tolerante, al menos en el tercer día después de la inoculación. Por lo que no se puede explicar la tolerancia de la variedad DT974290 solamente con la expresión de estas defensinas en el tercer día de la inoculación. Por lo tanto, es necesario analizar la expresión en otros estadios de la infección para conocer la contribución de estas defensinas en la tolerancia a *M. phaseolina*. Debido a que se observó una diferencia en la regulación de la expresión de las defensinas, se puede pensar que existe una activación diferencial de las vías de señalización (probablemente mediada por fitohormonas como jasmonato y ácido salicílico) que conducen a la tolerancia o la susceptibilidad en la soja.

## 6. CONCLUSIONES

En el genoma de la soja se encontraron diecisiete genes que codifican a péptidos similares a defensinas. De acuerdo a los dominios conservados, número de residuos de cisteínas y el tamaño de los péptidos, se consideraron como defensinas a nueve de ellos. Estos péptidos presentaron muy pocos sitios conservados, exceptuando los ocho residuos cisteínas altamente conservados. Entre estas nueve defensinas, *GmDef1* presentó seis residuos de cisteínas en vez de ocho debido a delección y sustitución de dos de ellas. Se encontró que esta defensina es única de la soja.

La expresión de *GmDef1*, *GmDef2*, *GmDef3*, *GmDef4*, *GmDef6* y *GmDef8* fue observada tanto en el tallo no infectado como infectado con el hongo *M. phaseolina* en las variedades A4910 (susceptible) y DT974290 (tolerante) a los tres días de inoculación. La mayoría de estas defensinas fueron inducidas durante la infección con *M. phaseolina* en la variedad tolerante pero no en la susceptible. Sin embargo, el nivel de expresión de las defensinas en la variedad tolerante infectada no fue superior al de la variedad susceptible infectada. Por lo que la tolerancia de la variedad DT974290 con respecto a la variedad A4910 no puede ser explicada por la diferencia en la expresión de estas defensinas. Sin embargo, la diferencia en la inducción de los genes codificante de defensinas entre las variedades indica que existe una activación diferencial de alguna vía de señalización que contribuye a la tolerancia de DT974290.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Morales R, Rafaela M. Soja. Febrero de 2006;25(2):80-6.
2. Valladares, César. Taxonomía y Botánica de los Cultivos de Grano. La Ceiba: Departamento de Producción Vegetal, Universidad Nacional Autónoma de Honduras; 2010
3. Biblioteca de la Agricultura, 1997. Técnicas Agrícolas en Cultivos Extensivos. La soja. Ed. Idea Books. Pág. 496-499.
4. *Glycine max*. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas [Internet] Buenos Aires. [citado 26 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/glycine-max>
5. Soja. Plataforma Nacional. [Internet] [citado 26 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://greencommoditiesparaguay.org/soja/>
6. USDA: United States Department of Agriculture. Oilseeds: World Markets and Trade. 2020. [Internet]. [citado 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tx31qh68h/c247f928p/h415pt06n/oilseeds.pdf>
7. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. Costa Rica. [Internet]. [citado 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-0658soya.pdf>
8. Principales enfermedades que podrían afectar en la presente campaña de soja [Internet]. Campo Agropecuario. [citado 26 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://www.campoagropecuario.com.py/principales-enfermedades-que-podrian-afectar-en-la-presente-campana-de-soja/>
9. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Macrophomina phaseolina* em soja. Londrina: Thais Cavalari Rosa; 2014. pp. 6–8.
10. Herbario Virtual. Podredumbre carbonosa del tallo de la soja (*Macrophomina phaseolina*) [Internet]. [citado 26 de febrero de 2020]. Disponible en: [http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page\\_id=605](http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=605)
11. Ivancovich A, Flores C, Lavilla M. Podredumbre carbonosa de la soja, causada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., un hongo oportunista muy dependiente del estrés hídrico y térmico. Mayo. 2016
12. Leyva-Mir S, et al. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. Revista Argentina de Microbiología. 1 de abril de 2015;47(2):143-7.
13. Sarr M, et al. - 2014 - Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. Phytopathologia Mediterranea (2014) 53, 2, 250–268
14. Gupta G, Sharma S, Ramteke R. Biology, Epidemiology and Management of the Pathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with Special Reference to Charcoal Rot of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Journal of Phytopathology. 2012;160(4):167-80.
15. Ivancovich A. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Enfermedades de soja. Diagnóstico y manejo.
16. Mengistu A, Reddy K, Bellaloui N, Walker E, Kelly H. Effect of glyphosate on *Macrophomina phaseolina* in vitro and its effect on disease severity of soybean in the field. Crop Protection. Diciembre de 2013;54:23-8.
17. Kendig S, Rupe J, Scott H. Effect of Irrigation and Soil Water Stress on Densities of *Macrophomina phaseolina* in Soil and Roots of Two Soybean Cultivars. Plant Disease. Agosto de 2000;84(8):895-900.
18. Vasebi Y, Safaie N, Alizadeh A. Biological control of soybean charcoal root rot disease using bacterial and fungal antagonists In Vitro and greenhouse condition. Journal of crop protection. Marzo de 2013, 2 (2):139-150

19. Mengistu A, Ray J, Smith R, Paris R. Charcoal Rot Disease Assessment of Soybean Genotypes Using a Colony-Forming Unit Index. *Crop Science*. 1 de noviembre de 2007;47.
20. Instituto Nacional de Investigacion Agropecuaria. Uruguay. Manual de Identificacion de enfermedades de la soja. 2013 (104): 64-65
21. Short G, Wyllie T, Bristow P. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and Residue of Soybean. *Phytopathology*. 1980. 70:13-17
22. Smith D, et al. Charcoal Rot Management in the North Central Region. :8.
23. Sels J, Mathys J, De Coninck B, Cammue B, De Bolle M. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology Biochemistry*. noviembre de 2008;46(11):941-50.
24. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 2005;43:205-27.
25. McDowell J, Dangl J. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci*. Febrero de 2000;25(2):79-82.
26. Thomma B, Penninckx I, Broekaert W, Cammue B. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr Opin Immunology*. Febrero de 2001;13(1):63-8.
27. Thomma B, Tierens K, Penninckx I, Mauch-Mani B, Broekaert W, Cammue B. Different microorganisms differentially induce Arabidopsis disease response pathways. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1 de julio de 2001;39(7):673-80.
28. Penninckx I, Eggermont K, Terras F, Thomma B, Samblanx G, Buchala A, et al. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell*. 1 de diciembre de 1996;8(12):2309-23.
29. Thomma B, Eggermont K, Penninckx I, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue B, et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 8 de diciembre de 1998;95(25):15107-11.
30. Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, et al. A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science*. 18 de noviembre de 1994;266(5188):1247-50.
31. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 2005;43:205-27.
32. Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, et al. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*. mayo de 1995;7(5):573-88.
33. Terras FRG, Penninckx IAMA, Goderis IJ, Broekaert WF. Evidence that the role of plant defensins in radish defense responses is independent of salicylic acid. *Planta*. 1 de julio de 1998;206(1):117-24.
34. Pervieux I, Bourassa M, Laurans F, Hamelin R, Séguin A. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1 de junio de 2004;64(6):331-41.
35. Kobayashi Y, Takashima H, Tamaoki H, Kyogoku Y, Lambert P, Kuroda H, et al. The cysteine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers*. septiembre de 1991;31(10):1213-20.
36. Zhu S, Gao B, Tytgat J. Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS $\alpha\beta$  superfamily. *Cell Mol Life Sci*. octubre de 2005;62(19-20):2257-69.
37. Zhu S. Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins. *Immunogenetics*. diciembre de 2007;59(12):949-54.
38. García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P. Plant defense peptides. *Biopolymers*. 1998;47(6):479-91.
39. Moreno M, Segura A, García-Olmedo F. Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. *Eur J Biochem*. 1 de julio de 1994;223(1):135-9.

40. Jha S, Chattoo BB. Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Res.* junio de 2010;19(3):373-84.
41. Li Z, Zhou M, Zhang Z, Ren L, Du L, Zhang B, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Funct Integr Genomics.* marzo de 2011;11(1):63-70.
42. Choi Y, Choi YD, Lee JS. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a low molecular weight sulfur-rich protein in soybean seeds. *Plant Physiol.* febrero de 1993;101(2):699-700.
43. Choi Y, Choi YD, Lee JS. Antimicrobial activity of gamma-thionin-like soybean SE60 in *E. coli* and tobacco plants. *Biochem Biophys Res Commun.* 17 de octubre de 2008;375(2):230-4.
44. Maitra, N. and Cushman, J.C. Characterization of a Drought-Induced Soybean cDNA Encoding a Plant Defensin. *Plant Physiol.* 118 (4), 1536 (1998)
45. Carvalho AO, Filho GAS, Ferreira BS, Branco AT, Okorokova-Façanha AL, Gomes VM. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. *Protein Pept Lett.* 2006;13(10):1029-36.
46. Manners JM, Penninckx IAMA, Vermaere K, Kazan K, Brown RL, Morgan A, et al. The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Mol Biol.* 1 de diciembre de 1998;38(6):1071-80.
47. Vijayan S, Guruprasad L, Kirti PB. Prokaryotic expression of a constitutively expressed *Tephrosia villosa* defensin and its potent antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* octubre de 2008;80(6):1023-32.
48. Wijaya null, Neumann null, Condron null, Hughes null, Polya null. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci.* 6 de noviembre de 2000;159(2):243-55.
49. Liu Y-J, Cheng C-S, Lai S-M, Hsu M-P, Chen C-S, Lyu P-C. Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins.* 1 de junio de 2006;63(4):777-86.
50. Chen G-H, Hsu M-P, Tan C-H, Sung H-Y, Kuo CG, Fan M-J, et al. Cloning and characterization of a plant defensin VaD1 from azuki bean. *J Agric Food Chem.* 23 de febrero de 2005;53(4):982-8.
51. Terras FR, Goderis IJ, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF. In Vitro Antifungal Activity of a Radish (*Raphanus sativus* L.) Seed Protein Homologous to Nonspecific Lipid Transfer Proteins. *Plant Physiol.* octubre de 1992;100(2):1055-8.
52. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* marzo de 2005;3(3):238-50.
53. Valente AP, de Paula VS, Almeida FCL. Revealing the properties of plant defensins through dynamics. *Molecules.* 13 de septiembre de 2013;18(9):11311-26.
54. Osborn RW, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, et al. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* 17 de julio de 1995;368(2):257-62.
55. Lay FT, Anderson MA. Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci.* febrero de 2005;6(1):85-101.
56. Lay FT, Brugliera F, Anderson MA. Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia. *Plant Physiology.* 1 de marzo de 2003;131(3):1283-93.
57. Phytozome v12.1: The plant genomics resource. [Internet]. [citado 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>
58. InterProScan: Protein sequence analysis & classification [Internet]. [citado 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>
59. Geneious. Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis [Internet]. Geneious. [citado 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.geneious.com/>
60. MEGA X (64 bits) Molecular Evolutionary Genetics Analysis software.

61. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio de 2007;35(suppl\_2):W71-4.
62. Twizeyimana M, Hill CB, Pawlowski M, Paul C, Hartman GL. A Cut-Stem Inoculation Technique to Evaluate Soybean for Resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease.* 4 de abril de 2012;96(8):1210-5.
63. Ishikawa M, Ribeiro N, Oliveira E, Almeida A, Balbi-Peña M. Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). *Summa Phytopathologica.* 1 de marzo de 2018;44:38-44.
64. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* abril de 1987;162(1):156-9.
65. Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K. Plant defensins. *Planta.* diciembre de 2002;216(2):193-202.
66. Maróti G, Downie JA, Kondorosi É. Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Current Opinion in Plant Biology.* 1 de agosto de 2015;26:57-63.