

“Rol de las lipoxigenasas en la regulación de la síntesis de defensas directas de soja (*Glycine max L.*) frente al daño provocado por chinches (*Nezara viridula*) durante el crecimiento de las semillas”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Jésica A. Barneto

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires - 2010

Lugar de trabajo: Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, UBA



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Dr. Eduardo A. Pagano

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Granada, España)

Co-director

Jorge A. Zavala

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor Rerum Naturalis. Especialista en Ecología Química (Max Planck Institute for
Chemical Ecology – Friedrich-Schiller-Universität, Jena,
Alemania)

JURADO DE TESIS

JURADO

Pedro A. Balatti

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata)
Ph.D. Plant Pathology (University of Missouri, Columbia, USA)

JURADO

Javier Moreno

Lic. en Ciencias Biológicas (FCEN, Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Ciencias Biológicas (FCEN, Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Carmen Castresana

Lic. en Biología (Universidad Complutense, Madrid, España)
Ph.D. in Biology, (Universidad Complutense, Madrid, España)

Fecha de defensa de la tesis: 15 de agosto de 2023

*A mis abuelas,
Felipa y Lidia*

Agradecimientos

A mi director de tesis, el Dr. Eduardo Pagano, por guiarme durante este camino, con su paciencia y amor por la bioquímica de las plantas. Por dejarme volar y desarrollar autonomía y criterio propio. A mi codirector, Dr. Jorge Zavala, por enseñarme a hacer ciencia dentro de un equipo de trabajo donde la armonía y el buen compañerismo fueron y son los ejes. Por las reuniones de discusión de resultados o de diseño de experimentos, donde con su paciencia y pasión por la ciencia me enseñó cómo discutir con mis resultados y cómo escribirlos. A ambos por confiar en mí y escuchar mis ideas.

Agradezco a mis padres, Miguel y Silvia, a mis hermanos Lari y Mati y mis hermanos adoptivos Pablo y Yani, por acompañarme en todo este camino. Por la escucha activa, los mates, la compañía, la ayuda en el campito experimental, por contentarse y preocuparse conmigo en los distintos momentos de esta carrera. Por regalarme a los sobris mas hermosos del mundo Azu, Fausti y Valen.

A mi compañero de vida, Sebastián, por alentarme a terminar, por su amor, sus palabras y contención. Por apoyarme en todos los pasos que decido dar y caminar a mi lado ofreciéndome su mirada ecuánime y clara. Por tomar fuerte mi mano y estar ahí con un mate siempre listo. Por invitarme a ver el mundo con valentía.

A mi familia adoptiva, Mario, Idana, Martín y Teresa, por su cariño y compañía.

A la cátedra de Bioquímica, lugar que fue mi segunda casa durante todos estos años, en donde conocí a muchas personas maravillosas. Agradezco, principalmente, a Patri Codó y Andrés Petón quienes me recibieron siendo estudiante de agronomía y confiaron en mí para trabajar en sus tesis enseñándome con mucha paciencia y cariño muchas técnicas de laboratorio y de docencia. A Pedro Sardoy, con quién no solo compartí ensayos y viajes, sino también el amor por la fotografía y el humor absurdo, que hizo que el tiempo compartido fuera muy divertido todo. A Vero Feuring, Sil Monti y Ali Crelier por la ayuda inagotable en el laboratorio. Por siempre hacerse el tiempo para responder a mis dudas y consultas, por enseñarme sobre bioquímica y ofrecer un mate y aliento cuando lo necesité. A Agus Repetto, Yuyo Llamazares Vegh, y Mel Bassedas por acompañarme y seguirme en la locura. A todos por los mates, los almuerzos con charlas y debates, los viajes a recolectar chinches, las juntadas y, sobre todo, por la calidez y amorosidad con la que siempre me escucharon, me abrazaron y me alentaron. También por las enseñanzas todas. Aprender al lado de personas tan grosas es un privilegio.

A Nati Ilina, Guille Arias, Alber Gauna, Lu Giai, Romi Giacometti, Dani Tejedor, Vane Jacobi, Jose Demichelis y Gera Irigoyen por compartir sus saberes, por sentarse codo a codo a resolver protocolos, por su solidaridad, apoyo y entusiasmo.

A Vir Medina, no solo por su amistad, si no también por alentarme a dar pasos importantes. También por sus devoluciones y consejos, en términos de la ciencia y de la vida.

A todos los miembros de la Cátedra de Bioquímica.

A Lu Barriga y Georgi García Inza, con quienes compartimos la vida desde hace muchos años y a quienes admiro profundamente. Contar con sus miradas y su cariño incondicional hizo que el final de este camino sea más ameno.

A mis amigos y amigas de la facu y de la vida, Pabli, July, Mary, Vicka, Ani, Arli, Vero Vivi, Aneta, Sofa, Nico, Juanse, Chino, Pablito, Fercha, Arito y Tuki. Por las juntadas, las historias y la vida compartida.

A la FAUBA y al CONICET por otorgarme los recursos para poder formarme como profesional en las áreas de docencia e investigación.

A todos, muchas gracias.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no ha sido presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Barneto', written over the printed name below.

Ing. Agr. Jéssica Barneto

Índice

Índice de figuras	ix
Índice de cuadros	xv
Abreviaturas.....	xvii
Resumen	xix
Abstract.....	xxi
1. Introducción General.....	2
1.1. Contexto productivo y económico.....	2
1.2. Problema sanitario: el complejo de chinches	4
1.3. Sistema de defensas: interacción planta-insecto.....	8
1.4. Percepción de la herbivoría	10
1.5. Regulación de la respuesta a la herbivoría: Síntesis de ácido jasmónico	11
1.6. Lipoxigenasas	13
1.7. Defensas directas inducidas: Inhibidores de proteasas.....	17
1.8. Regulación de defensas: inhibidores de proteasas.....	18
1.9. Mecanismos propuestos e importancia.....	19
1.10. Hipótesis	y
Objetivos	20
1.10.1. Objetivo general	20
1.10.2. Objetivos específicos	20
2. Metodología general.....	24
2.1. Material botánico.....	24
Material entomológico.....	25
2.2. Tratamientos de herbivoría, daño mecánico y aplicación exógena de hormonas	26
2.3. Metodología para análisis moleculares.....	28
2.3.1. Extracción de ARN	28
2.3.2. Cuantificación de ARNtotal.....	29
2.3.3. Tratamiento con DNAsas.....	30
2.3.4. Síntesis de ADNcopia	31
2.4. Metodología para análisis bioquímicos.....	31
2.4.1. Determinación de actividad de Lipoxigenasas.....	31
2.4.2. Determinación de Actividad de Inhibidores de tripsin proteasas (TPI)	32
2.4.3. Determinación de Actividad de Inhibidores de Cisteín proteasas	33
(CPI)	33
2.5. Medición de Etileno	34
3. “Rol de las lipoxigenasas en respuesta a la herbivoría”.....	37
3.1. Función de las lipoxigenasas como reguladoras de la síntesis del ácido jasmónico y compuestos volátiles.....	37
3.2. Función como defensa antiherbívoro	38
3.3. Objetivos e hipótesis.....	39
3.4. Metodología.....	39

3.4.1.	Material botánico y condiciones de cultivo	39
3.4.2.	Experimento 1	39
3.4.3.	PCR semicuantitativa (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	41
3.4.4.	Revelado y cuantificación de expresión transcripcional.....	43
3.4.5.	Actividad de α -amilasa.....	43
3.4.6.	Análisis estadísticos	44
3.5.	Resultados.....	44
3.5.1.	Respuesta de las lipoxigenasas al daño y la herbivoría.....	44
3.5.2.	Inducción de las lipoxigenasas por exposición a hormonas.....	47
3.5.3.	Inducción de genes vinculados a las vías de etileno y ácido salicílico	49
3.5.4.	Defensas antiherbívoro: Inducción de inhibidores de proteasas	51
3.5.5.	Inhibidores de tripsin proteasas (TPI)	51
3.5.6.	Inhibidores de cisteín proteasas (CPI).....	55
3.6.	Discusión	58
3.7.	Conclusiones.....	62
4.	“Modulación de las defensas durante el llenado del fruto”	64
4.1.	Composición química de la semilla de soja	64
4.2.	Acumulación de reservas lipídicas durante el llenado.....	65
4.3.	Rol de LOX en semillas	65
4.4.	Defensas durante el crecimiento de los órganos.....	67
4.5.	Objetivos e hipótesis.....	69
4.6.	Materiales y métodos.....	69
4.6.1.	Experimento 2: material botánico y entomológico	69
4.6.2.	El diseño experimental.....	69
4.6.3.	Extracción de ARN mensajero.....	71
4.6.4.	Determinación de la expresión transcripcional por PCR en tiempo	73
real		
4.6.5.	Diseño y validación de primers.....	73
4.6.6.	Curva estándar.....	74
4.6.7.	Cuantificación relativa: Método $\Delta\Delta CT$	77
4.6.8.	Análisis estadísticos	79
4.7.	Resultados.....	80
4.7.1.	Caracterización del material estudiado	80
4.7.2.	Respuesta de las lipoxigenasas a la herbivoría a lo largo del llenado	83
de los granos		
4.7.3.	Modulación de las vías del etileno y del ácido salicílico durante el	89
llenado		
4.7.4.	Producción de defensas inducidas durante el llenado: CPI y TPI.....	92
4.8.	Discusión	97
4.9.	Conclusiones.....	100
5.	“Caracterización de la respuesta a las chinches en genotipos carentes	
de LOX”		102
5.1.	Uso de mutantes en estudios de la respuesta antiherbívoro.....	102
5.2.	Calidad de granos de soja para la industria alimentaria	102
5.3.	Herramientas biotecnológicas en el control de plagas.....	103

5.4. Compromiso entre calidad alimentaria post-cosecha y capacidad defensiva durante la producción.....	104
5.5. Objetivos e hipótesis.....	104
5.6. Metodología.....	105
5.6.1. Material botánico	105
5.6.2. Diseño experimental.....	106
5.6.3. Determinación isoflavonoides.....	108
5.6.4. Determinación de la expresión de genes.....	109
5.6.5. Determinación de hormonas	110
5.7. Resultados.....	110
5.7.1. Efecto de la herbivoría sobre de la expresión y actividad de lipoxigenasas en genotipos mutantes lox	110
5.7.2. Respuesta defensiva frente al daño de chinches	115
5.7.3. Efecto de la herbivoría sobre las vías de síntesis de las hormonas ET y SA	120
5.7.1. Efecto de la exposición a MeJA sobre la actividad de lipoxigenasas y la generación de compuestos de defensa.....	122
5.7.2. Supervivencia de ninfas frente a los distintos genotipos	124
5.7.3. Caracterización del perfil hormonal en cada uno de los genotipos.	129
5.8. Discusión	132
5.9. Conclusiones.....	135
6. Discusión general	138
6.1. Cumplimiento de objetivos.....	138
6.2. Contexto teórico y avances.....	141
6.1. Conclusiones finales y perspectivas futuras	146

Índice de figuras

Figura 1-1: Superficie total cosechada de soja (ha) a lo largo del tiempo, porcentaje de la participación por provincia a la producción nacional (%) y posicionamiento a escala mundial de Argentina como exportador de grano y subproductos. Fuente: Estimaciones agrícolas, Min. De Agricultura, Ganadería y Pesca, 2020.....	2
Figura 1-2: Superficie sembrada con soja (Promedio 21012/2014). Ministerio de Agroindustria (2017).....	3
Figura 1-3: Complejo de chinches fitófagas más frecuentes en los ciclos de soja. Fuente: Fotografías propias provenientes de la cría de insectos en el Laboratorio de Bioquímica, FAUBA.	5
Figura 1-4: Ciclo de vida de <i>Nezara viridula</i> . Fuente: Elaboración propia con individuos pertenecientes a la cría en el Laboratorio de Bioquímica, FAUBA.....	6
Figura 1-5: Período crítico del cultivo de soja, ocurrencia del pico poblacional de <i>Nezara viridula</i> y daños severos ocasionados cuando las densidades de población son altas.....	7
Figura 1-6: Esquema de la transducción de señales frente al daño de un herbívoro. Vía de las lipoxigenasas.	12
Figura 1-7: Esquema de interacción del JA-Ile con el complejo SCF ^{COII} ubiquitin ligasa E3 en respuesta a la herbivoría. En presencia de JA-Ile el complejo SCF ^{COII} puede adherirse a las proteínas represoras JAZ y liberar a los factores de transcripción (FT) de los genes de defensa. Las proteínas JAZ son ubiquitinadas y enviadas al proteosoma 26S para su degradación. Esquema adaptado de Zavala (2010).	13
Figura 1-8: Esquema de las vías 9-LOX (a) y 13-LOX (b) para el metabolismo de ácido linolénico y los derivados de ambas reacciones (Howe, 2002).....	14
Figura 1-9: Funciones fisiológicas de las LOXs durante el crecimiento y el desarrollo de la planta (Viswanath et al., 2020).	16
Figura 2-1: Plantas de soja en crecimiento, raleadas y desmalezadas.	25
Figura 2-2: Cría de chinches en el Laboratorio de Bioquímica de FAUBA.....	25
Figura 2-3: Adulto de <i>Trichopoda giacomelli</i> (parasitoide de adultos <i>Nezara viridula</i>).....	26
Figura 2-4: a) Adultos hambreados, aislados para realizar los tratamientos de herbivoría, b) Adulto picando una vaina e soja y c) Aguja utilizada para realizar el daño mecánico en las vainas.	28
Figura 2-5: Ejemplo representativo de los geles de ARNtotal revelados luego de realizar las extracciones. a) Muestras de ARN recién extraído, se puede observar las dos subunidades ribosomales, b) Muestras de ARN del panel “a)” tratadas con DNAsas para eliminar ADN genómico y equiparar concentraciones de ARN y c)	

- ejemplo de muestras de ARN degradado, no se observan las subunidades ribosomales (“chorreado”). 30
- Figura 2-6: a) Cromatógrafo Hewlett Packard 4890 en el cual se realizaron las determinaciones de etileno y b) Frascos herméticos de 110ml con las muestras tratadas. 35
- Figura 3-1: Experimento 1. Esquema de la ubicación de las parcelas (a) y ejemplo de aleatorización de los tratamientos dentro de cada una (b). Imágenes del cultivo establecido (c), protección antipalomas (d) y tratamiento de herbivoría detallado (e). 41
- Figura 3-2: Expresión transcripcional relativa (n=5) de *LOX1* (a), *LOX2* (b) y *LOX3* (c) y Actividad específica (n=3) de *LOX1* (d), *LOX2* (e) y *LOX3* (f) luego de 8, 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos de daño mecánico (DM) y herbivoría con *Nezara viridula* (N.v.). Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. En la parte superior derecha cada panel se indica el valor p del modelo del ANOVA. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos de daño (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$). 46
- Figura 3-3: Expresión transcripcional relativa (n=5) de *LOX1* (a), *LOX2* (b) y *LOX3* (c) y Actividad específica (n=3) de *LOX1* (d), *LOX2* (e) y *LOX3* (f) luego de 8, 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos hormonales: 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos de daño (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$). 48
- Figura 3-4: Expresión transcripcional relativa de *ACC* (a y c) y *PRI* (b y d) luego de 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos de daño: daño mecánico (DM), herbivoría (N.v.) y hormonales: 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras de error representan el error experimental (n=5). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$). Los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad. 50
- Figura 3-5: Expresión transcripcional relativa (n=5) de *PI Kz* (a y d) y *PI BBCII* (b y e) y Actividad de inhibidores de tripsina (c y f) luego de 8, 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos de daño: daño mecánico (DM), herbivoría (N.v.) y los tratamientos hormonales: 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos de daño (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$). 53
- Figura 3-6: Actividad in vitro de α -amilasa expuesta a inhibidores de tripsina extraídos de plantas dañadas mecánicamente y por herbivoría (a) y pulverizadas con

0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras de error representan el error experimental (n=4). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C, barras blancas) y los efectos asociados a los tratamientos (barras grises) (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$). Los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad. 55

Figura 3-7: Expresión transcripcional relativa (n=5) de *N2* (a y d) y *R1* (b y e) y Actividad de inhibidores de cisteín proteasas (n=4) (c y f) luego de 8, 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos de daño: daño mecánico (DM), herbivoría (N.v.) y los tratamientos hormonales: 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos de daño (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$). 57

Figura 4-1: Composición de ác. grasos del aceite de soja (Clemente y Cahoon, 2009). 64

Figura 4-2: Tamaño de semillas en formación en los distintos momentos del llenado. 70

Figura 4-3: a) Diseño experimental DBCA compuesto por 5 bloques. Cada bloque fue dividido en 3 parcelas (b) a las que se le asignaron al azar un tratamiento (C: sin daño, control; CH₂₄: daño con chinche 24 hs; CH₇₂: daño con chinche 72 hs). c) Plantas de soja creciendo y d) Imagen del tratamiento de herbivoría, se puede observar cómo se aislaron vainas con bolsita de tul y un espiral de alambre de aluminio para permitir el movimiento de la chinche hasta el momento del daño como se muestra en la foto..... 71

Figura 4-4: Esquema de la purificación de ARNm utilizando el kit mRNA Isolation Kit® (Roche)..... 73

Figura 4-5: Esquema de la elaboración de las diluciones seriadas de ADNc utilizadas en la validación de los primers para RT-PCR..... 75

Figura 4-6: a) Regresiones lineales entre el logaritmo de la concentración inicial de ADNc (eje X) y ciclo umbral (C_T) para cada par de primers. b) Curva de melting ejemplo para cada fragmento amplificado. 76

Figura 4-7: Diagrama con la disposición de las muestras en la placa de 384 pocillos utilizada para realizar las PCR en el termociclador QuantStudio5™ Real Time, Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific). Las muestras biológicas se enumeraron del 1 al 27 para facilitar la identificación al momento del armado de las PCRs. Por placa de 384 pocillos se cuantificaron 4 genes..... 78

Figura 4-8: Ejemplo de cuantificación de la muestra 1: Control (R₅) (línea azul) y de la muestra 6 (Chinche 24 hs R₅) (línea gris) para el gen *lox1*. El umbral de detección definido para este gen fue 0.061, valor resultante de la validación de primers. 79

Figura 4-9: Características morfológicas de los granos en cada momento de muestreo. a) Peso seco (mg), b) Largo (mm), c) ancho (mm) y d) Espesor (mm). Las

- líneas medias de las cajas representan la media y los bigotes el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 81
- Figura 4-10: a) Concentración de proteína soluble total (mg proteína/mg peso) y b) concentración ARN mensajero (ng/ μ L) en los distintos momentos del llenado. Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 82
- Figura 4-11: a) Expresión transcripcional y b) actividad enzimática de LOX 1 luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 84
- Figura 4-12: a) Expresión transcripcional y b) actividad enzimática de LOX 2 luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de ontogenia (O) mientras que letras minúsculas indican diferencias entre los niveles de herbivoría (H). 86
- Figura 4-13: a) Expresión transcripcional y b) actividad enzimática de LOX3 luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 88
- Figura 4-14: Expresión transcripcional de 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de ontogenia (O) mientras que letras minúsculas indican diferencias entre los niveles de herbivoría (H). 90
- Figura 4-15: Expresión transcripcional de proteína sensible al salicílico (*PRI*) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. 91
- Figura 4-16: Expresión transcripcional de los inhibidores de cisteín proteasas a) *N2*, b) *RI* y c) *LI* y d) actividad de inhibidores de cisteín proteasas luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de ontogenia (O) mientras que letras minúsculas indican diferencias entre los niveles de herbivoría (H). 93

- Figura 4-17: Expresión transcripcional de los inhibidores de tripsin proteasas a) *Kz*, b) *BBCII* y c) concentración de inhibidores de tripsin proteasas luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de ontogenia (O) mientras que letras minúsculas indican diferencias entre los niveles de herbivoría (H)..... 96
- Figura 5-1: a) Expresión transcripcional del gen *LOX1* y b) actividad enzimática de *LOX1* luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI408251, PI86023 PI205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 112
- Figura 5-2: a) Expresión transcripcional del gen *LOX2* y b) actividad enzimática de *LOX2* luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 113
- Figura 5-3: a) Expresión transcripcional del gen *LOX3* y b) actividad enzimática de *LOX3* luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 115
- Figura 5-4: Expresión transcripcional de CPI: *N2* (a), *R1* (b) y *L1* (c) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 117
- Figura 5-5: Actividad de CPI luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ... 117
- Figura 5-6: Expresión transcripcional de inhibidores de tripsin proteasas: *PI Kz* (a) y *PI BBCII* (b) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 119
- Figura 5-7: Actividad de TPI luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ... 120
- Figura 5-8: Expresión transcripcional de *ACC* (a) y *PR1* (b) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 121

- Figura 5-9: Actividad de LOX1 (a), LOX2 (b) y LOX3 (c) luego de aplicados los tratamientos de hormona (H: control, MeJa) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 123
- Figura 5-10: Actividad de CPI (a) y TPI (b) luego de aplicados los tratamientos de hormona (H: control, MeJa) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ... 124
- Figura 5-11: Porcentaje de supervivencia de ninfas de *Nezara viridula* alimentadas sobre plantas de soja en R6 de los genotipos Williams, PI 408251 (mutante *lox1*), PI 86023 (mutante *lox2*) y PI 205085 (mutante *lox3*). 125
- Figura 5-12: Actividad de inhibidores de cisteín proteasas (CPI). Los tratamientos Control representan las bolsas de tul que se colocaron en las ramas sin ninfas de *Nezara viridula* y Ninfas representas las bolsas en las que se colocaron 60 ninfas. Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 127
- Figura 5-13: Actividad de inhibidores de tripsin proteasas (TPI). Los tratamientos Control representan las bolsas de tul que se colocaron en las ramas sin ninfas de *Nezara viridula* y Ninfas representas las bolsas en las que se colocaron 60 ninfas. Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 128
- Figura 5-14: Contenido de isoflavonoides (mg/mg peso fresco): Daidzína (a), Genistína (b), Daidzeína (c) y Genisteína (d). Los tratamientos Control representan las bolsas de tul que se colocaron en las ramas sin ninfas de *Nezara viridula* y Ninfas representas las bolsas en las que se colocaron 60 ninfas. Se realizó un análisis no paramétrico Test de comparaciones múltiples Kruskal Wallis. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 129
- Figura 5-15: Contenido de hormonas JA (a), JAIlle (b), ET (c), SA (d), ABA (e) y IAA (f) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 y PI 205085). Se realizó un análisis prueba t de student - Mann Whitney Test. Los asteriscos indican diferencias significativas de los valores p entre comparaciones de a pares. 131
- Figura 6-1: Esquema de la transducción de señales: vía de las lipoxigenasas, síntesis de hormonas y compuestos de defensas en granos de soja en pleno llenado atacados por *Nezara viridula*. 146

Índice de cuadros

Cuadro 2-1: Indicadores para estimar la pureza de las muestras de ARN total.....	30
Cuadro 3-1: Primers diseñados para los análisis de transcripción semicuantitativa.....	42
Cuadro 3-2: Variaciones del programa de amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR para los genes: LOX 1, LOX 2, LOX 3, ACC, PRI, PIBBCII, PIKz, N2, L1, R1 y ELFB1.	43
Cuadro 3-3: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “Valor p^* ” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.....	49
Cuadro 3-4: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “Valor p^* ” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.....	51
Cuadro 3-5: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.....	54
Cuadro 3-6: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “Valor p^* ” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.....	55
Cuadro 3-7: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “Valor p^* ” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.....	58
Cuadro 4-1: Primers diseñados para el análisis de expresión transcripcional mediante PCR en tiempo real.....	74
Cuadro 4-2: Parámetros de RT-PCR para cada gen target.....	76
Cuadro 4-3: Reactivos necesarios para realizar las PCR.....	77
Cuadro 4-4: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para la expresión y actividad de lipoxigenasas, letras diferentes significan	

diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.	89
Cuadro 4-5: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para el gen <i>ACC</i> , letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.	91
Cuadro 4-6: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para el gen <i>PRI</i> , letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.	91
Cuadro 4-7: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para los genes <i>N2</i> y <i>RI</i> , letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.....	94
Cuadro 4-8: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para el gen <i>LI</i> y actividad de CPI, letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “*” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.....	94
Cuadro 4-9: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para los genes <i>Kz</i> y <i>BBCII</i> y la actividad de TPI, letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.....	97
Cuadro 5-1: χ^2 y valor p de un log-rank test para hipótesis globales de supervivencia de ninfas de <i>Nezara viridula</i> y de comparaciones simples entre genotipos.	125

Abreviaturas

ABA: ácido abscísico

ADNc: ADN copia

ARNm: ARN mensajero

dNTP's: desoxirribonucleótidos trifosforilados

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain

Reaction

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa y

AOC: aleno óxido ciclasa

AOS: aleno óxido sintasa

Bt: *Bacillus turingensis*

CH: Daño de chinche

CPI: inhibidores de cisteín proteasas

CT: ciclo umbral, del inglés Cycle threshold

DES: divinil eter sintasa

DM: Daño mecánico

ET: etileno

H: herbivoría

ha: hectáreas

HPL: hidroperóxido liasa

HPOT: ácido hidroperoxilinoico, del inglés hidroperoxy linoleic acid

HPR: hidroperóxido reductasa

IAA: ácido indol-acético

JA: ácido jasmónico

JA-Ile: jasmonil-isoleucina

LOX: enzima lipoxigenasa

MeJA: Jasmonato de metilo

N.v.: Nezara viridula, daño de chinche

O: Ontogenia, momento del llenado

OPDA: ácido 12-oxo-10,15(Z)-fitodienoico

PI: inhibidores de proteasas

PRI: proteína sensible al salicílico

SA: ácido salicílico

TPI: Inhibidores de tripsin proteasas

Resumen

La soja es el principal cultivo de oleaginosas de Argentina y el complejo de chinches es una de las plagas más importantes ya que causan disminución en el rendimiento y afectan la calidad de la semilla al reducir la viabilidad y el vigor. La única estrategia de control es el uso de insecticidas, lo que genera la aparición de resistencia y sistemas cada vez más insumo-dependiente. En este trabajo de tesis se estudió la interacción soja – *Nezara viridula* con el objeto de dilucidar los mecanismos que le permiten a la chinche alimentarse de soja en pleno llenado sin afectar su supervivencia. Para ello se estudió el impacto del daño de chinches sobre las enzimas lipoxigenasas, enzimas cruciales para la síntesis de ácido jasmónico y sobre la producción de defensas directas, específicamente inhibidores de proteasas que funcionan como elementos disuasivos contra herbívoros. Se sembraron a campo distintos genotipos (un genotipo de referencia y tres genotipos mutantes *lox*) que fueron cultivados hasta R6, momento en el cual se aplicaron los tratamientos de herbivoría, daño mecánico y hormonas. Los resultados permitieron dilucidar que, cuando un insecto se alimenta por única vez de un grano de soja en pleno llenado, se desencadena una serie de reacciones que provocan un aumento de las enzimas lipoxigenasas y, a su vez, un aumento en la producción de los inhibidores de proteasas. Por otro lado, el uso de mutantes *lox* permitió reconocer a la enzima LOX1 como la más importante respecto a la respuesta antiherbívoro. Las chinches alimentadas sobre el genotipo mutante *lox1* tuvieron una menor supervivencia que las alimentadas sobre el genotipo de referencia Williams. El hallazgo de características que producen una resistencia al estrés por herbívoros posibilita el desarrollo de mecanismos de control más amigables con el ambiente, por ejemplo, el

desarrollo de marcadores moleculares para identificación de variedades más tolerantes al daño por chinche

Palabras clave: *Glycine max*, lipoxigenasas, inhibidores de proteasas, *Nezara viridula*, ácido jasmónico.

Abstract

Soybean is the main oilseed crop in Argentina, and the stink bugs complex is one of the most important pests, causing yield reduction and affecting seed quality by reducing viability and vigor. The only control strategy is the use of insecticides, which generates resistance and increasingly input-dependent systems. In this thesis, the soybean - *Nezara viridula* interaction was studied in order to elucidate the mechanisms that allows the bug to feed on soybean without affecting its survival. For this purpose, the impact of stink bugs damage on lipoxygenases, crucial enzymes for the synthesis of jasmonic acid, and on the production of direct defenses, specifically protease inhibitors that function as deterrents against herbivores, were studied. Different genotypes (one reference genotype and three *lox* mutant genotypes) were sown in the field and grown until R6, at which time herbivory, mechanical damage and hormone treatments were applied. The results elucidated that when an insect feeds on a soybean filling grain, it triggers a series of reactions that cause an increase in lipoxygenase enzymes and, in turn, an increase in the production of protease inhibitors. On the other hand, the use of *lox* mutants made it possible to recognize the LOX1 enzyme as the most important enzyme with respect to the anti-herbivore response. Stink bugs fed on *lox1* mutant genotype had a lower survival than those fed on the Williams reference genotype. The finding of traits that produce resistance to herbivore stress makes possible the development of more environmentally friendly control mechanisms, for example, the development of molecular markers for the identification of varieties more tolerant to stink bug damage.

Key words: Glycine max, lipoxygenases, protease inhibitors, *Nezara viridula*, jasmonic acid.

Capítulo 1: Introducción general

1. Introducción General.

1.1. Contexto productivo y económico

En Argentina, el cultivo de soja representa el 93 % del total de la producción de oleaginosas, seguida por el girasol que representa el 5%. El 2 % restante es representado por la producción de maní, colza, cártamo y lino (Ministerio de Agricultura, 2020). Se estima que la producción de la campaña 2018/2019 superó los 55 millones de toneladas, con una superficie cosechada de 20 millones de hectáreas. La concentración de la producción se ubica principalmente en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Santiago del Estero y Entre Ríos (Figura 1-1), con un rendimiento promedio de 33 qq/ha (Ministerio de Agricultura, 2020). Dichos niveles de producción posicionan a la Argentina en tercer puesto como productor y exportador de poroto de soja, luego de Estados Unidos y Brasil y primer puesto como productor y exportador de harina y aceite de soja (Ministerio de Hacienda, 2019).

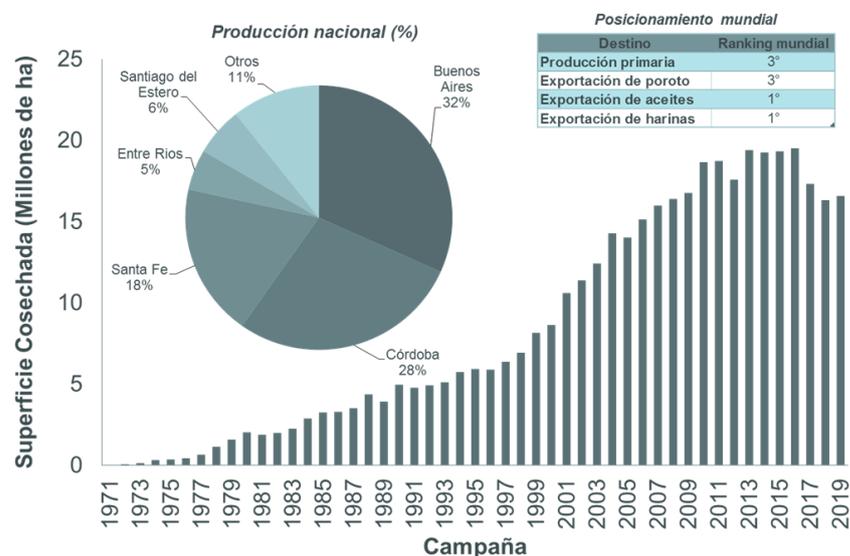


Figura 1-1: Superficie total cosechada de soja (ha) a lo largo del tiempo, porcentaje de la participación por provincia a la producción nacional (%) y posicionamiento a escala mundial de Argentina como exportador de grano y subproductos. Fuente: Estimaciones agrícolas, Min. De Agricultura, Ganadería y Pesca, 2020.

El cultivo de soja tuvo una fuerte expansión en todo el país, desde su introducción en la década del setenta, especialmente a partir de mediados de los noventa, con la introducción de la semilla transgénica (soja RR) y el paquete tecnológico que incluyó el uso del glifosato como herbicida no selectivo. Estas mejoras fueron apoyadas por el empleo de nuevas tecnologías de procesos, como la siembra directa, favoreciendo la conservación del suelo, reduciendo los ciclos de laboreo e incentivando el doble cultivo en una campaña agrícola. El aumento del área sembrada se dio tanto por sustitución de otros cultivos o de campos destinados a la ganadería, como por el avance de la soja sobre tierras desforestadas o de menor productividad que las del área pampeana, ampliando las fronteras de producción. En la Figura 1-2 se puede visualizar la expansión territorial del cultivo, representando el 50 % de la superficie total, concentrándose principalmente en la región Pampeana Norte.

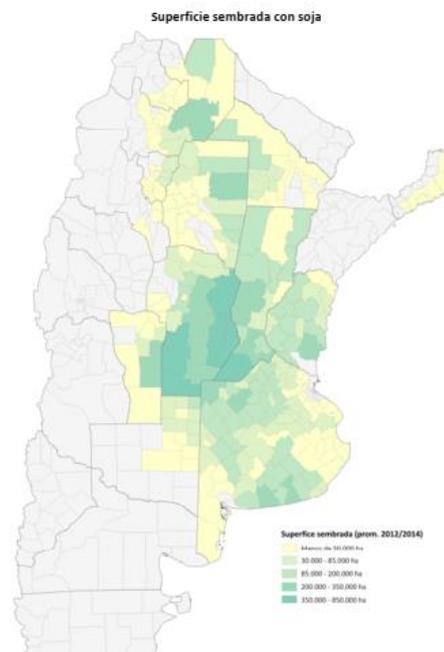


Figura 1-2: Superficie sembrada con soja (Promedio 21012/2014). Ministerio de Agroindustria (2017).

Asociado a estos cambios a nivel productivo y territorial, se observó un cambio en la diversidad y en la incidencia de plagas, enfermedades y malezas. Así, por ejemplo, en los últimos años se produjo un paulatino crecimiento de las enfermedades de fin de ciclo y la aparición de mancha ojo de rana, entre otras. En el caso de malezas hubo un salto de una tecnología de procesos a una de insumos que trajo aparejado el aumento de especies tolerantes a glifosato y la aparición del sorgo de alepo resistente. Algo similar ocurrió con las poblaciones y los daños provocados por plagas, como trips (*Caliothrips phaseoli*, *Frankliniella schultzei*), ácaros, oruga bolillera y el complejo de chinches, provocando la reducción del 50% de los umbrales de daño y, en consecuencia, mayores intervenciones con insecticidas durante el ciclo del cultivo (Gamundi & Sosa, 2007).

1.2. Problema sanitario: el complejo de chinches

Los cultivos son agroecosistemas que favorecen las altas tasas de crecimiento poblacional de insectos herbívoros. El hecho de ser monoculturas facilita la detección y reconocimiento del cultivo por parte de los insectos. Por otro lado, las plantas herbáceas tienen una alta tasa de crecimiento y bajos contenidos de lignina, por lo tanto, sus hojas y tallos son más apetecibles debido a su mayor digestibilidad y mayor contenido de nitrógeno (Schoonhoven et al, 2005).

Las chinches pertenecen al orden de Hemípteros Heterópteros que se alimentan de una gran diversidad de especies vegetales. Como son varias especies fitófagas las que afectan al cultivo de soja, se las denomina complejo de chinches. Dicho complejo se encuentra conformado por: *Nezara viridula* (chinche verde), *Piezodourus guildinii* (chinche de la alfalfa), *Dichelops furcatus* (chinche de los cuernitos) y *Edessa meditabunda* (alquiche chico) (Figura 1-3). Dentro del sistema productivo de soja, conforman una de las plagas más importantes ya que atacan principalmente vainas,

causando un daño directo e irreversible sobre las semillas en desarrollo, afectando el rendimiento final del cultivo. Las especies predominantes en los ciclos de cultivo en Argentina son *N. viridula* y *P. guildini* (Boдрero *et al.*, 2002; Gamundi y Sosa, 2008). *E. meditabunda* manifiesta un comportamiento polífago similar a la chinche verde, mientras que *D. furcatus* muestra preferencia por ciertos cultivos de gramíneas como maíz, sorgo y trigo (Panizzi *et al.*, 2018).



Figura 1-3: Complejo de chinches fitófagas más frecuentes en los ciclos de soja. Fuente: Fotografías propias provenientes de la cría de insectos en el Laboratorio de Bioquímica, FAUBA.

La dinámica poblacional de las chinches está sincronizada con el período reproductivo del cultivo. Por lo general, manifiestan un marcado crecimiento poblacional desde floración en adelante (Gamundi, 2007; Gamundi *et al.*, 2010; Todd, 1989). La colonización comienza en la etapa de floración en forma de manchones y luego se dispersa hacia otros sectores del cultivo, coincidiendo con la formación de vainas. A partir del estado fenológico R5 (Fehr y Caviness, 1977) la población aumenta marcadamente y la distribución comienza a ser uniforme hasta la madurez fisiológica del cultivo (Pilkay *et al.*, 2014). Este comportamiento, posiblemente, esté ligado a la dispersión de las ninfas, las que a partir del cuarto estadio pueden desplazarse aproximadamente 7- 10 m desde el lugar de oviposición (Panizzi *et al.*, 1980). En la

Figura 1-4 se puede observar el ciclo completo de una generación de chinches comenzando desde una postura hasta la eclosión del individuo adulto. Cabe destacar que esta especie es multivoltina, produciéndose varias generaciones en una misma campaña productiva.

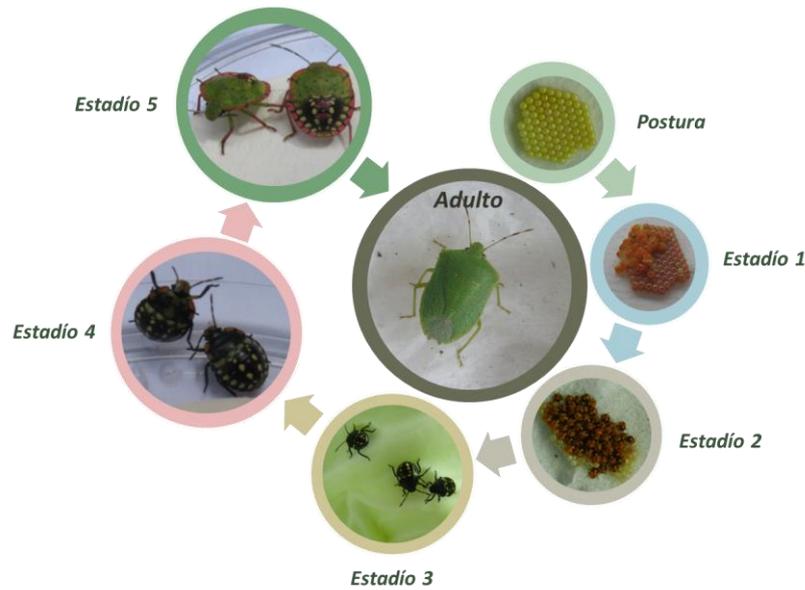


Figura 1-4: Ciclo de vida de *Nezara viridula*. Fuente: Elaboración propia con individuos pertenecientes a la cría en el Laboratorio de Bioquímica, FAUBA.

Así pues, el pico poblacional de este insecto coincide con el período crítico del cultivo, que se extiende desde R4 hasta R6 (Figura 1-5) (McPherson y McPherson, 2000; Todd, 1989). Si el daño ocurre al comienzo del este período se verá afectado el normal desarrollo de las semillas originando semillas pequeñas y vainas vacías. En estados fenológicos más avanzados provoca deformaciones, necrosis y manchas oscuras. Si la picadura ocurre en el eje embrionario puede provocar su muerte, mientras que si ocurre en los cotiledones reduce el poder germinativo de la semilla. Cuando los ataques son muy severos se producen granos verdes (França Neto et al., 2005) y retención foliar, lo cual retrasa la maduración del cultivo y dificulta la cosecha (Boethel et al., 2009). El efecto del daño sobre el margen económico del cultivo es difícil de estimar hasta no realizarse la cosecha y posterior evaluación del control de calidad.

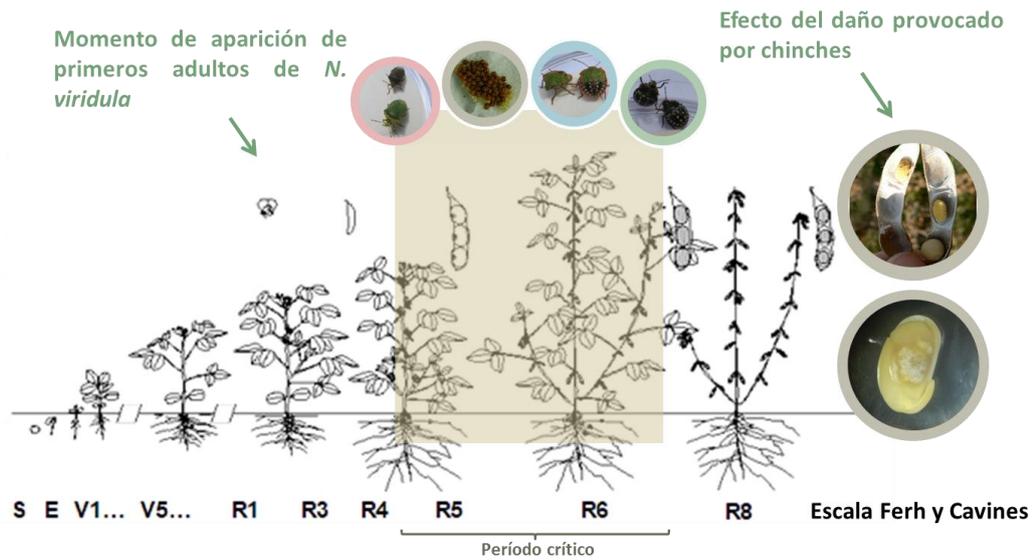


Figura 1-5: Período crítico del cultivo de soja, ocurrencia del pico poblacional de *Nezara viridula* y daños severos ocasionados cuando las densidades de población son altas.

En la actualidad existen herramientas biotecnológicas que permiten controlar el ataque de lepidópteros a partir de cultivos genéticamente modificados que expresan las toxinas del Bt. Sin embargo, para el control de chinchas todavía no existe este tipo de estrategias de control. La herramienta más utilizada es el control químico con insecticidas, lo que genera alta carga ambiental de compuestos tóxicos, una alta presión de selección sobre plagas y, eventualmente, aparición de resistencia, como sucedió con el endosulfan en Estados Unidos (Stadler et al., 2006). Así la eficiencia de control puede disminuir con el tiempo (Tabashnik et al, 2009) e impulsar al sistema de producción hacia una mayor dependencia del uso de agroquímicos, elevando así también, los costos de producción. Por otro lado, el uso desmedido de insecticidas ha provocado la disminución de los enemigos naturales (insectos depredadores, parasitoides) tan importantes en el control biológico natural (Flores, 2009).

1.3. Sistema de defensas: interacción planta-insecto

A través de la evolución, las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa frente a la herbivoría que pueden agruparse en dos grandes grupos: resistencia y tolerancia. La principal diferencia entre ambas radica en que la resistencia tiende a detener el daño y la tolerancia tiende a compensar los efectos negativos del mismo mediante el aumento de la biomasa (Stout, 2013; Mitchell et al., 2016). Dentro de los mecanismos de resistencia se encuentran las defensas directas (que afectan al organismo herbívoro) y las defensas indirectas (compuestos que atraen a enemigos naturales y afectan indirectamente a los insectos herbívoros). A su vez, las defensas pueden ser constitutivas o inducibles (Gatehouse, 2002). A lo largo de este trabajo se profundizará en los mecanismos de defensas directas e inducibles de semillas de soja frente al daño de la chinche verde, *N. viridula*.

La domesticación de especies y el mejoramiento genético se han enfocado en aumentar tanto el rendimiento y como la calidad de los cultivos, logrando así características agrícolas superiores (Ladizinsky, 1998). Si bien la mayoría de los programas de mejoramiento abordan la defensa de las plantas, si la plaga es particularmente amenazante, la resistencia a los insectos a menudo no es una prioridad (Chaudhary, 2013; Mitchell et al., 2016). Sin embargo, existe una gran variabilidad genética, en términos de compuestos de defensa contra los insectos, que podría ser utilizada comparando germoplasma salvaje y domesticado para incorporar dichos rasgos en nuevas variedades (Milla et al., 2015).

Plantas e insectos herbívoros han interactuado a lo largo de millones de años en un proceso llamado co-evolución. Teniendo en cuenta esta larga relación, que implica procesos de selección natural, no es sorprendente encontrar que las estrategias empleadas

por las plantas, para resistir o evadir a la herbivoría, sean muy diversas. Existen especies con ciertos atributos que afectan a la preferencia de los insectos, alterando la selección del hospedero o el comportamiento alimentario. Otras especies, en cambio, alteran la performance de los individuos afectando las tasas de crecimiento y desarrollo. (Gatehouse, 2002). Estos atributos se denominan defensas y pueden ser clasificadas como:

- Defensas físicas: estructuras morfológicas que conforman barreras físicas que dificultan el acceso o disminuyen la digestibilidad del alimento. Por ejemplo: espinas, tricomas, cutículas engrosadas, látex, pelos.

- Defensas químicas: compuestos químicos que funcionan como toxinas, repelentes o antinutritivos. Por ejemplo: glucosinolatos, glucósidos cianogénicos, alcaloides, compuestos fenólicos, inhibidores de proteasas.

Asimismo, las defensas pueden ser constitutivas, es decir, que se encuentran activas todo el tiempo, o inducibles, es decir, se activan sólo cuando se percibe el daño. Las defensas constitutivas pueden representar un elevado costo, en términos de uso de recursos cuando las plantas no son atacadas, ya que los recursos destinados a producción de defensas podrían ser utilizados para otras funciones también importantes, como el crecimiento y producción de semillas. Por otro lado, las defensas inducidas representan una forma más eficiente del uso de los recursos, ya que solo se producirán cuando exista el daño (Fürstenberg-hägg et al, 2013; Gatehouse 2002).

Las plantas enfrentan un dilema constante entre crecer y reproducirse, o defenderse (Herms y Mattson, 1992; Tobias y Agrawal, 2017) . Esta condición puede representar un problema cuando los recursos son limitantes, como es el caso de los cultivos, donde las plantas crecen en ambientes empobrecidos, con alta competencia

intraespecífica y donde se utilizan materiales genéticamente forzados hacia la producción de biomasa (mediante el mejoramiento genético). Es decir, el compromiso entre crecer o defenderse, se encuentra sesgado y la capacidad de responder y defenderse puede verse afectada negativamente en comparación con una especie vegetal silvestre en su hábitat natural (Herms y Mattson, 1992).

1.4. Percepción de la herbivoría

Los insectos utilizan diversas estrategias de alimentación para obtener nutrientes de sus plantas hospederas. El tipo de daño que provocan en los tejidos depende de la estructura de las piezas bucales y del tipo de alimentación, diferenciándose en dos grandes grupos: insectos masticadores (lepidópteros, coleópteros, ortópteros) e insectos fitosuccívoros (hemípteros) (Howe y Jander, 2008). Las plantas son capaces de percibir la herbivoría mediante el reconocimiento de moléculas (elicitors) producidas por los insectos mientras se alimentan u oviponen (Bonaventure, 2012). Algunos ejemplos de estos compuestos son: volicitina, inceptina, glucosa oxidasa, ácidos grasos conjugados y péptidos (Felton y Tumlinson, 2008).

Los elicitors son reconocidos por receptores ubicados en la membrana celular y son percibidos rápidamente por las MAPK quinasas (del inglés: Mitogen Active Protein Kinase), que son enzimas muy importantes a la hora de activar las vías metabólicas de defensa, ya sea frente a patógenos o insectos (Wu et al., 2007). A su vez, el daño generado por el insecto provoca una despolarización de la membrana, liberación de especies reactivas de oxígeno y liberación de iones calcio hacia citosol (Ca^{+2}), que a su vez activan a las MAPK. Todos estos eventos ocurren en los primeros minutos de ocurrido el daño (Bonaventure 2012; Wasternack et al. 2013, Fürstenberg-hägg, et al 2013). Las MAPK quinasas modulan a factores de transcripción vinculados con genes de

defensa y también tienen actividad como activadoras y estabilizadoras de enzimas vinculadas a la producción de defensas (Giacometti et al., 2016). Una de las enzimas activadas por las MAPKs es la fosfolipasa A cloroplastídica, que degrada la membrana tilacoidal y libera ácidos grasos insaturados al estroma, principalmente α -linolénico. Este compuesto es el sustrato de la vía de síntesis del ácido jasmónico (JA), llamada Vía de los Octadecanoides.

1.5. Regulación de la respuesta a la herbivoría: Síntesis de ácido jasmónico

El primer paso de la síntesis del ácido jasmónico es catalizado por las lipoxigenasas (LOX). Estas enzimas tienen actividad oxigenasa y catalizan la incorporación de oxígeno en distintas posiciones del α -linolénico (Farmer y Ryan, 1992; Turner et al., 2002). Luego de una serie de pasos que incluyen lipoxidación, ciclización (cloroplasto) y varias vueltas de β -oxidación (peroxisoma) el α -linolénico se transforma en el ácido (+)-7- isojasmónico, el cual se isomeriza en condiciones naturales en ácido (-)-jasmónico (JA) (Figura 1-6). Por último, el JA es sujeto a modificaciones enzimáticas que los transformarán en conjugados de JA, denominados jasmonatos u oxilipinas (Feussner y Wasternack 2002; Howe y Jander 2008b). La diversidad de jasmonatos está vinculada a la gran diversidad de procesos en los que participa esta hormona. Por un lado, como regulador de la respuesta a estrés como daño mecánico, la exposición a ozono, sequía y el ataque por patógenos y plagas. Por otro lado, como regulador de diferentes procesos de desarrollo como crecimiento de la raíz, tuberización, maduración de frutos, senescencia, desarrollo del polen y enrollamiento de zarcillos (Creelman y Mullet, 1997; Reymond et al., 2000; Turner et al., 2002a; Staswick y Tiryaki, 2004; Kombrink, 2012; Pieterse et al., 2012).

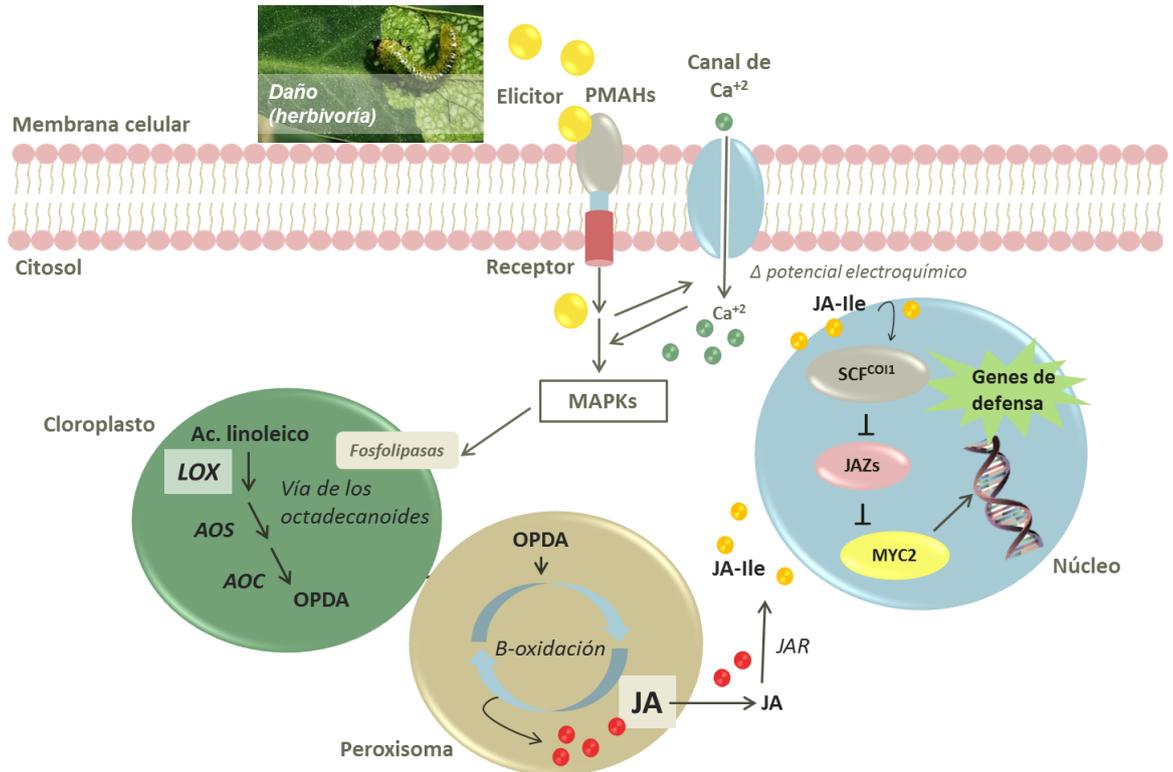


Figura 1-6: Esquema de la transducción de señales frente al daño de un herbívoro. Vía de las lipoxigenasas.

La forma bioactiva del JA es su conjugado con el aminoácido isoleucina, dando como resultado jasmonil-isoleucina (JA-Ile), catalizado por la enzima JAR1 (Staswick y Tiryaki, 2004). Este compuesto interactúa con el complejo SCF^{COI1} (del inglés Skip-Cullin-Fbox) ubiquitin ligasa E3, cuya función es la ubiquitinación de proteínas que serán degradadas en el proteosoma (Lechner et al., 2006; Wasternack et al., 2013). Cuando el JA-Ile se une al complejo $COI1$, este se une a unas proteínas que reprimen a los factores de transcripción (MYC) de genes que codifican para compuestos de defensas o enzimas de las vías que sintetizan estos compuestos. Dichas proteínas se denominan proteínas JAZ (del inglés jasmonate ZIM domain) y una vez unidas al complejo SCF^{COI1} son ubiquitinadas y enviadas al proteosoma 26 para su posterior degradación (Thines et al.,

2007; Chini et al., 2009). De esta manera, en ausencia de los represores, comienza la transcripción de genes de defensa regulados por el JA (Katsir et al., 2008) (Figura 1-7).

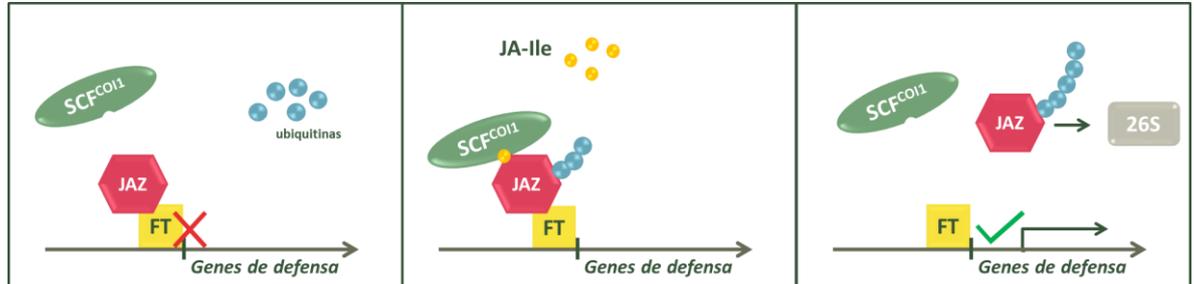


Figura 1-7: Esquema de interacción del JA-Ile con el complejo SCF^{CO11} ubiquitin ligasa E3 en respuesta a la herbivoría. En presencia de JA-Ile el complejo SCF^{CO11} puede adherirse a las proteínas represoras JAZ y liberar a los factores de transcripción (FT) de los genes de defensa. Las proteínas JAZ son ubiquitinadas y enviadas al proteosoma 26S para su degradación. Esquema adaptado de Zavala (2010).

Existen otras hormonas que actúan de manera antagónica al JA como el ácido salicílico (SA) (Zhang et al., 2013; Schweiger et al., 2014) o sinérgica como el etileno (ET) (Del Río y Puppo 2009). En *Arabidopsis thaliana* se encontró que el JA es el principal regulador de las defensas contra larvas de *Spodoptera littoralis* (Bodenhausen y Reymond, 2007). Esta vía se activa especialmente en respuesta a herbívoros masticadores y patógenos necrotrofos (Glazebrook, 2005; Kawazu et al, 2012; Walling, 2000). Por el contrario, la vía del SA se activa si la planta es atacada por insectos fitosucióvoros, como áfidos, y patógenos biotróficos (Kaloshian y Walling, 2005).

1.6. Lipoxigenasas

Las lipoxigenasas (LOX) son una familia de enzimas oxidorreductasas (EC 1.13.11.12), denominadas dioxigenasas, que contienen un grupo hierro no hémico y que están distribuidas en muchas especies de plantas, algas, animales y hongos (Beneytout et al. 1989; Joo and Oh, 2012; Vick y Zimmerman, 1980). La reacción general catalizada por las LOX en plantas, implica la adición de oxígeno molecular a través del sistema cis,cis-1,4-pentadieno encontrado en ácidos grasos insaturados de 18 carbonos, como el

linoleico y linolénico. En el caso de ácido linolénico, esto conduce a dos posibles productos (ya que posee dos sitios con dobles enlaces): los ácidos 9- y 13-hidroperoxilinolénicos, por esta razón, la vía de las LOX se divide en dos subfamilias 9-LOX y 13-LOX de acuerdo al sitio de reacción (Siedow, 1991) (Figura 1-8).

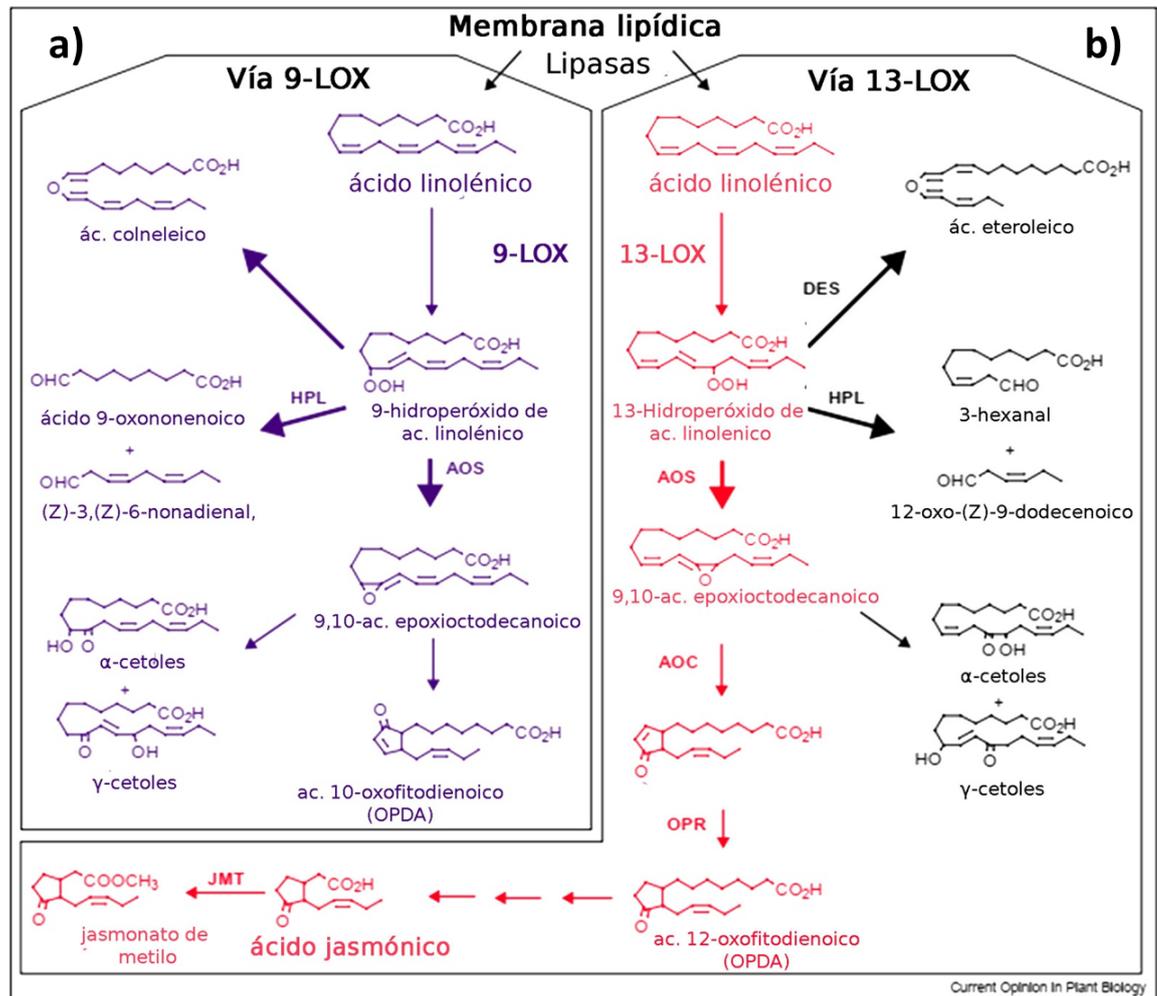


Figura 1-8: Esquema de las vías 9-LOX (a) y 13-LOX (b) para el metabolismo de ácido linolénico y los derivados de ambas reacciones (Howe, 2002).

Los productos de la reacción de ambas vías, los hidroperóxidos de ácidos grasos (HPOT, del inglés hidroperoxy linoleic acid), son metabolizados por liasas, deshidratasas, isomerasas, peroxigenasas y epoxigenasas resultando en epóxidos, alcoholes, aldehídos y cetoles. Este amplio rango de metabolitos secundarios recibe el nombre de oxilipinas y

desempeñan diferentes roles de regulación de diversos procesos celulares, siendo la más importante la síntesis del ácido jasmónico (Howe y Schilmiller, 2002).

Las plantas contienen numerosas enzimas LOX que se pueden diferenciar según la localización subcelular. Por ejemplo, existen isoenzimas que se encuentran en el citosol (Gardner, 1991; Hildebrand, 1989; Siedow, 1991a), en el estroma del cloroplasto (Douillard y Bergeron, 1981), en cuerpos lipídicos (Feussner y Kühn, 1995), en la vacuola como proteínas de reserva vegetativas (VSP, del inglés Vegetative Storage Protein) (Porta y Rocha-sosa, 2002; Tranbarger et al. 1991) o asociadas a membranas (Siedow, 1991; Macri et al., 1994; Royo et al., 1996). Es posible que enzimas con diferente ubicación celular provean diferentes fuentes de ácidos grasos poliinsaturados a distintas vías metabólicas con diferentes funciones fisiológicas como, por ejemplo, germinación de semillas, crecimiento radical, maduración de frutos (Siedow, 1991), respuesta a estrés biótico (Farmer y Ryan, 1992; Saravitz y Siedow 1996; Saravitz y Siedow, 1995) y abiótico, senescencia, muerte celular y síntesis de hormonas (Creelman y Mullet 1997; Vick y Zimmerman 1980; Viswanath et al. 2020)



Figura 1-9: Funciones fisiológicas de las LOXs durante el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Viswanath et al., 2020).

En soja existen varias enzimas LOX cuya función varía según el tejido. En cotiledones se han encontrado las isoenzimas LOX4, LOX5 y LOX6 (Kato et al., 1992) y en hojas LOX7 y LOX8 (Bunker et al., 1995). Saravitz y Siedow (1996) encontraron que los genes *LOX7* y *LOX8* se expresaban más cuando las hojas eran dañadas mecánicamente, indicando su posible relación con la respuesta de defensa. Años más tarde, Zavala et al (2008), confirmaron dicha hipótesis luego de que los mismos genes aumentaran su expresión luego del daño ocasionado por *Popillia japónica*, un coleóptero que se alimenta de hojas de soja. En semillas de soja han sido identificadas 3 enzimas lipoxigenasas LOX1, LOX2 y LOX3 (Axelrod et al., 1981). Sin embargo, aún no se ha identificado las funciones específicas de cada una y cuál de ellas está vinculada con la respuesta antiherbívoro (Liavonchan y Feussner 2006; Siedow 1991b).

1.7. Compuestos de defensas

La función de los jasmonatos como reguladores de defensas fue propuesta por Farmer y Ryan (1992) quienes descubrieron la unión entre el daño ocasionado por insectos, la formación de JA y la inducción de genes codificantes para inhibidores de proteasas que disuadían el consumo en arábidopsis. Se ha informado que tanto el daño mecánico, la aplicación de jasmonato de metilo (MeJA), como el daño producido por el ataque de los insectos produce la acumulación de JA en los tejidos vegetales (Howe y Jander, 2008). Zavala et al. (2008a), demostraron que plantas de soja incapaces de expresar genes relacionados a la síntesis de ácido jasmónico mostraron alta susceptibilidad al ataque de insectos y cuando las mismas eran tratadas con MeJA restituyeron dichos niveles de defensas equiparando a los genotipos normales. En tomate, se ha informado que la aplicación de MeJA en las superficies foliares promovió la síntesis de genes de inhibidores de proteasas (Farmer y Ryan, 1992).

Los compuestos de defensa regulados por el JA involucran defensas directas, como los inhibidores de proteasas (PI) y defensas indirectas, como los compuestos volátiles que atraen a predadores o parasitoides. Por otro lado, el JA también induce la producción de compuestos fenólicos que afectan la actividad de otras enzimas digestivas como las lipasas y las amilasas (Howe y Jander, 2008). Los PI disminuyen la calidad nutricional del alimento, ya que afectan su digestibilidad al bloquear la actividad de las proteasas digestivas y disminuyendo la disponibilidad de aminoácidos libres, esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos (Zhu-salzman y Zeng, 2015). Los inhibidores de tripsina de hojas de tomate fueron la primera defensa antiherbívoro inducible que se asoció al JA (Farmer & Ryan 1990). Desde entonces han sido extensamente estudiados en la relación planta-insecto en diversas especies,

demostrándose su rol defensivo (Zavala et al., 2004). Sin embargo, su efectividad depende de la capacidad del insecto de detoxificar su efecto, ya sea aumentando la síntesis de proteasas de *novo* para reponer a aquellas inhibidas o generando proteasas insensibles a los inhibidores (Jongsma y Bolter, 1997). Se ha demostrado que larvas de *Manduca sexta* alimentadas con hojas de *Nicotiana attenuata* que sobreexpresaban inhibidores de tripsina alcanzaban un peso de pupa y una tasa de crecimiento menor que aquellas larvas que se alimentaron de plantas no transformadas genéticamente (Zavala et al., 2004). Más recientemente, Tejedor (2017) demostró, sin embargo, que larvas de *A. gemmatalis* fueron capaces de superar la barrera defensiva dictada por los inhibidores de tripsinas de soja mediante un aumento en la expresión de tiorredoxinas, proteínas redox que fueron capaces de desactivar a los inhibidores de tripsina. Por otro lado, *A. gemmatalis* fue capaz de sintetizar tripsinas no sensibles a los inhibidores pudiendo utilizar al cultivo de soja como alimento a pesar de sus defensas químicas. Estos antecedentes demuestran la complejidad de los procesos de interacción planta-insecto y la importancia de estudiarlos de cara al desarrollo de herramientas para el manejo integrado.

1.8. Inhibidores de proteasas

Una de las defensas más estudiadas en soja son los inhibidores de proteasas. Los primeros inhibidores de proteasas purificados y caracterizados en soja fueron los conocidos como inhibidores Kunitz (Kunitz M., 1946) e inhibidores Bowman y Birk (Bowman, 1947; Birk et al., 1963). En soja se reportó que en hojas dañadas por larvas de *Anticarsia gemmatalis* y adultos de *Caliothrips phaseoli* la actividad de inhibidores de tripsinas aumentó luego de 6 días de daño (Dillon et al., 2018; Dillon et al., 2017). Por otro lado, los inhibidores de cisteín proteasas fueron descritos por su función antiherbívoro por Zhao Y. et al. (1996), quienes encontraron que, en hojas dañadas por

Diabrotica virgifera y *Leptinotarsa decemlineata*, aumentaba la expresión de dos genes que codifican para este tipo inhibidores: *N2* y *R1*. Ambos genes provocaron una reducción significativa en la actividad de las cisteín proteasas provenientes de los intestinos de ambas especies, demostrando su actividad como defensa. En hojas de soja dañadas por *Popillia japónica*, los niveles de expresión y actividad de inhibidores de cisteín proteasas aumentaron correlacionándose con el aumento de la expresión genes *LOX* (*LOX7* y *LOX8*) (Zavala, et al. 2008). Para entender cómo insectos como las chinches pueden alimentarse de plantas que desarrollan defensas como las de soja un primer paso es, precisamente, establecer cuáles son los principales componentes de la respuesta de las plantas al ataque de insectos fitosuccívoros.

1.9. Mecanismos propuestos e importancia

En soja se desconoce la funcionalidad de las enzimas LOX presentes exclusivamente en semillas (LOX1, LOX2 y LOX3) y cómo se relacionan con la síntesis de JA como regulador de las defensas contra herbívoros. Conocer y entender las interacciones planta-insecto son de crucial importancia desde el punto de vista de la agricultura. Las chinches representan una de las principales plagas del cultivo de soja, por lo que la importancia en términos productivos es alta. Por tales razones, es necesario entender qué factores gobiernan las relaciones entre las semillas de soja en desarrollo y las chinches, y cómo se regulan las defensas frente al daño producido por estos insectos. Alcanzar este tipo de conocimientos es fundamental para crear estrategias de manejo de plagas que intenten evitar o prevenir los daños (Schoonhoven et al., 2005). A pesar de que las semillas son el producto final de muchos cultivos y son el componente principal para la dispersión de especies, hasta el momento no se conocen estudios sobre la regulación de las defensas en semillas frente al ataque de insectos. El aporte al

conocimiento que realizará el presente estudio se centra en la respuesta de las semillas de soja en desarrollo a las condiciones de estrés por insectos picadores, como la chinche verde y la comprensión del rol del JA en la respuesta defensiva. Asimismo, el hallazgo de características que produzcan una resistencia al estrés por herbívoros posibilitaría el desarrollo posterior de mecanismos de control más amigables con el ambiente, por ejemplo, el desarrollo de marcadores moleculares para identificación de variedades más resistente al daño por chinche.

1.10. Hipótesis y Objetivos

1.10.1. Objetivo general

Dilucidar las bases bioquímicas y moleculares de las respuestas defensivas inducidas por el ácido jasmónico como respuesta al ataque de chinche verde (*Nezara viridula*) en granos de soja en pleno llenado.

1.10.2. Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Conocer cómo es la respuesta de las lipoxigenasas de plantas de soja frente al daño de chinche verde (Capítulo 3).

Hipótesis 1) *El daño ocasionado por chinches activa la vía de las lipoxigenasas.*
Predicción: El daño de chinches provocará un aumento de la expresión de los genes *LOX1*, *LOX2* y *LOX3* y de la acumulación de ácido jasmónico en semillas de soja en pleno llenado.

Hipótesis 2) *Al menos una de las tres enzimas LOX participa en la regulación de defensas.*
Predicción: Los genotipos mutantes que no expresen algunos de los tres genes *LOX* no serán capaces de producir defensas comparando con el genotipo de referencia.

Objetivo específico 2: Establecer el vínculo que existe entre la inducción hormonal exógena, la producción de lipoxigenasas y el efecto sobre la producción de las defensas.

Hipótesis 3) *Las hormonas de defensa, ácido jasmónico y ácido salicílico, modulan la concentración de lipoxigenasas y de los inhibidores de proteasas, induciéndolos y suprimiéndolos, respectivamente.* Predicción: La aplicación exógena de ác. jasmónico provocará un aumento en la producción de lipoxigenasas mientras que la aplicación exógena de ác. salicílico provocará una disminución en la síntesis de lipoxigenasas y compuestos de defensa.

Objetivo específico 3: Conocer cómo es la respuesta de las lipoxigenasas al daño de las chinches durante el llenado de los granos y si esta relación afecta a la producción de las defensas directas (Capítulo 4).

Hipótesis 4) *Existe una variación de la respuesta a la herbivoría a lo largo del llenado de los granos, siendo mayor dicha respuesta al comienzo comparado con el final del llenado.* Predicción: Al comienzo del llenado hay una mayor producción de lipoxigenasas y de las defensas comparando con estadíos más avanzados (fin del llenado).

Objetivo específico 4: Determinar si la ausencia de lipoxigenasas aumenta la susceptibilidad de la soja al ataque de chinches (Capítulo 5).

Hipótesis 5) *Aquellas plantas de soja que no produzcan lipoxigenasas no son capaces de producir defensas directas cuando son dañadas por chinches y, su vez, los insectos se ven beneficiados al encontrarse con un alimento libre de compuestos antinutritivos.* Predicción: La supervivencia de *N. viridula* será mayor en un genotipo que no expresa al menos uno de los genes *LOX* comparado con genotipo normal.

Objetivo específico 5: Estudiar la relación de la respuesta de las lipoxigenasas luego del ataque de chinches con la producción de inhibidores de cisteín proteasas. (Capítulo 5)

Hipótesis 6) *Las lipoxigenasas regulan la expresión de genes que codifican para inhibidores de proteasas induciendo su síntesis tras el daño de chinches.* Predicción: Genotipos que presentan una mutación para la expresión de genes *LOX* producirán menos inhibidores de proteasas comparado con el genotipo de referencia.

Capítulo 2: Materiales y métodos generales

2. Metodología general

2.1. Material botánico

Para alcanzar los objetivos planteados en el capítulo anterior se utilizaron 4 genotipos de soja: Williams 82 (expresa los 3 genes *LOX* de semillas) y tres genotipos mutantes de lipoxigenasas: PI408251 (mutante *lox1*), PI86023 (mutante *lox2*) y PI205085 (mutante *lox3*) (Lenis et al., 2010). Si bien cada experimento llevado a cabo tuvo sus particularidades, en términos generales, todos los genotipos fueron sembrados en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires en el mes de diciembre durante los años 2011-2012, 2012-2013, 2013-2014 y 2014-2015. Los tratamientos se realizaron a partir del estado de referencia R5 de acuerdo con la escala de Fehr y Caviness (Fehr and Caviness 1977).

La siembra se realizó a chorrillo con una distancia entre hileras de 20 cm y luego de la emergencia se realizó un raleo para mantener una distancia de 15 cm entre plantas dentro de la hilera. Las plantas fueron abastecidas con agua suplementaria a las precipitaciones cuando fuera necesario. Desde el momento de la siembra hasta la emergencia de las primeras hojas verdaderas, los lotes fueron cubiertos con tela plástica media sombra para protegerlos del daño de las palomas. Así mismo, se controló la incidencia de orugas cortadoras y bichos bolita con insecticidas. Una vez emergidas las plántulas de soja, se mantuvo el desmalezado manualmente (Figura 2-1).



Figura 2-1: Plantas de soja en crecimiento, raleadas y desmalezadas.

Material entomológico

Se criaron chinches de la especie *Nezara viridula* en cámaras SANYO MLR-350H bajo un fotoperiodo de 14 horas de luz, 10 h de oscuridad, temperatura de 26 °C constante y humedad relativa de 60 % (Figura 2-2, a y b).

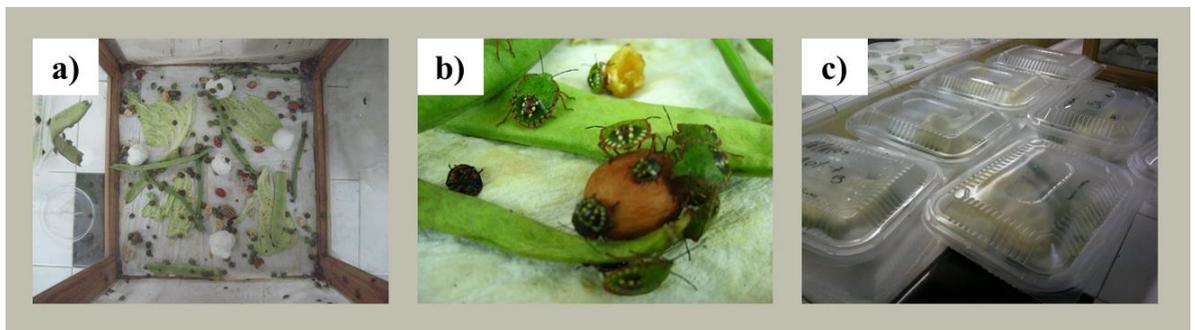


Figura 2-2: Cría de chinches en el Laboratorio de Bioquímica de FAUBA.

Para comenzar la cría y para renovar el material genético se realizaron viajes de colecta a cultivos de soja del norte de la provincia de Buenos Aires (zonas de Pergamino, Carabelas, Junín, Pila, Vedia). Una vez en el laboratorio, los insectos nuevos, fueron colocados en bandejas separadas a la cría general para controlar a sus parasitoides naturales (Bandejas de cuarentena, Figura 2-2, c). El más común de estos parasitoides fue *Trichopoda giacomelli* (Diptera: Tachinidae), un díptero que ovipone sobre el pronoto del adulto (Figura 2-3). Por lo tanto, el objetivo de este paso fue eliminar al parasitoide y

contar con individuos sanos. Una vez finalizado ese periodo, los individuos se dispusieron en cajas plásticas con tapas de tul en donde se colocaron los adultos y las ninfas de último estadio conformando la jaula de cría propiamente dicha. Los insectos fueron mantenidos con una dieta artificial basada en semillas de soja, girasol, hojas de repollo, chauchas y maní.



Figura 2-3: Adulto de *Trichopoda giacomelli* (parasitoide de adultos *Nezara viridula*).

2.2. Tratamientos de herbivoría, daño mecánico y aplicación exógena de hormonas

Para evaluar la respuesta de las plantas de soja al daño ocasionado por la chinche se realizaron tratamientos accesorios al de herbivoría. Por un lado, se seleccionaron plantas individuales dentro de cada parcela y se aisló una vaina en estado R6 del centro de la planta utilizando una bolsita de tul. Los tratamientos se realizaron sobre las vainas y el material analizado fueron las semillas que se encontraban creciendo en su interior, ya que las chinches atraviesan el tegumento de la vaina y se alimentan de las semillas en crecimiento. Según correspondiera se realizaron los tratamientos que consistieron en:

- **Control:** sin provocarle ningún daño
- **Herbivoría:** Colocándole 1 adulto de *Nezara viridula* por vaina (Ver Figura 2-4, a y b)

- **Daño mecánico:** con una aguja se realizaron 2 heridas punzantes a las vainas en la zona media, sobre el lóculo (Ver Figura 2-4, c)

- **Jasmonato de metilo (MeJA):** se pulverizaron 2 veces las vainas seleccionadas con una solución de MeJA 0,1mM (un volumen aproximado de 0,75 mL por vez) (Balestrazzi et al., 2004; Cerrudo et al., 2012; Giacometti et al., 2016)

- **Ácido salicílico (SA):** se pulverizaron 2 veces las vainas seleccionadas con una solución de SA 1,5mM (un volumen aproximado de 0,75 mL por vez) (Giacometti et al., 2016; Dillon, 2017; Romero et al., 2020).

Para realizar los tratamientos de herbivoría los insectos fueron aislados del alimento 48 h previas a colocarlas en planta y luego fueron colocadas de manera individual en bolsas de tul. Los insectos fueron observados hasta que comenzaron a picar y alimentarse. Una vez comenzado el tiempo de alimentación, permanecieron sobre la vaina por un período de tiempo de 30 minutos. Luego, fueron retirados y las vainas quedaron marcadas con una bolsa de tul y cinta indicadora para ser recolectadas a las 8, 24 o 72 hs según correspondiera.

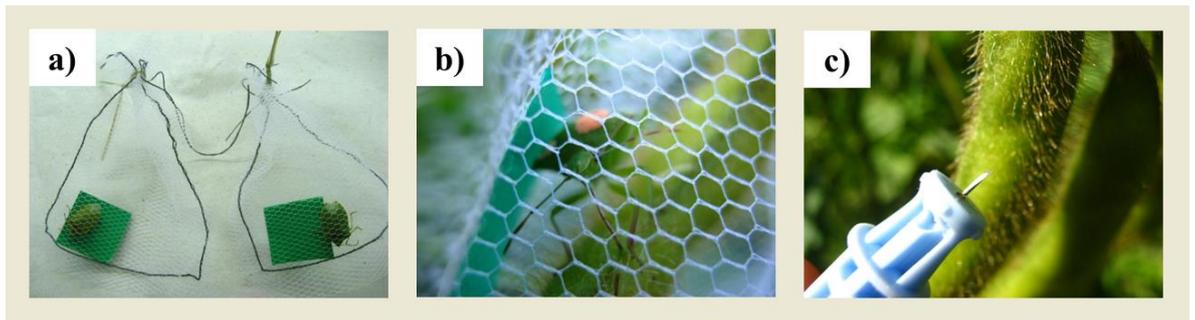


Figura 2-4: a) Adultos hambreados, aislados para realizar los tratamientos de herbivoría, b) Adulto picando una vaina e soja y c) Aguja utilizada para realizar el daño mecánico en las vainas.

2.3. Metodología para análisis moleculares

Las muestras colectadas en los experimentos fueron identificadas y congeladas *in situ* con nitrógeno líquido y luego, reservadas en ultrafreezer (-80°C) hasta el momento de realizar las determinaciones.

2.3.1. Extracción de ARN

Para realizar los análisis de expresión transcripcional el ARN fue extraído con el método TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo a lo descrito en el protocolo del reactivo. Las muestras fueron molidas en mortero con nitrógeno líquido y colocadas en tubos eppendorf de 2 mL. 100 mg de muestra fueron homogeneizados con 1 mL de Trizol utilizando un vortex para facilitar la ruptura celular. Luego se centrifugó a 12.000 g a 4°C durante 15 minutos para remover los restos de material vegetal (polisacáridos, ADN de alto peso molecular y membranas celulares). Se conservó el sobrenadante y se agregaron 200 μL de cloroformo a fin de extraer los lípidos presentes en la muestra agitando vigorosamente durante 3 min a temperatura ambiente. Se separó la fase acuosa de la fase lipídica por centrifugación a 12.000 G y 4°C durante 15 minutos. El ARN que se encontraba en la fase acuosa se precipitó con isopropanol y centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos generándose un pellet bien definido. Posteriormente se realizaron 3

lavados con etanol 75% colocando 1 mL de etanol y centrifugando a 7.500 g y 4 °C durante 5 minutos. El ARN precipitado se re-suspendió en 50 µL de agua tratada con DEPC. Para facilitar la re-suspensión, se incubaron las muestras a 57 °C durante 10 min. Finalmente, para su preservación, se añadió a cada muestra 0,5 µL de inhibidor de RNAsas y fueron conservadas en ultrafreezer (-80°C) hasta su utilización

2.3.2. Cuantificación de ARNtotal

Para poder sintetizar ADNc, el ARN extraído fue evaluado para descartar muestras degradadas, contaminadas o con baja concentración. Para determinar la integridad del ARN se sembraron las muestras colocando 3 µL de muestra con 2 µL de solución reguladora de carga 6x (azul de bromofenol 0,3 % glicerol 30%) en un gel de agarosa 1,5% p/v. El gel de agarosa se preparó con buffer TAE 1x (20 mL de TAE 50x/1L de agua destilada, pH8.5) más 3 µL de Gel Red® (Biotium) como intercalante y marcador de ácidos nucleicos. La corrida electroforética se realizó a 100mV, corriente constante, durante 15 min. Al finalizar, el gel fue revelado en un transiluminador UV 2000 (Biorad) para visualizar las 2 subunidades del ARN ribosomal. En los casos en los cuales no se visualizaron las bandas correspondientes, se repitió la extracción para dicha muestra (Figura 2-5).

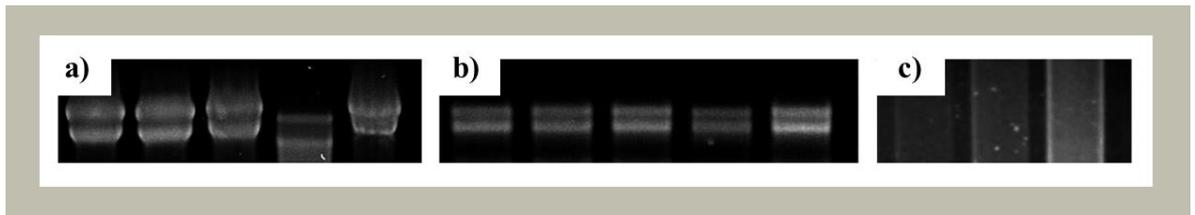


Figura 2-5: Ejemplo representativo de los geles de ARNtotal revelados luego de realizar las extracciones. a) Muestras de ARN recién extraído, se puede observar las dos subunidades ribosomales, b) Muestras de ARN del panel “a)” tratadas con DNAsas para eliminar ADN genómico y equiparar concentraciones de ARN y c) ejemplo de muestras de ARN degradado, no se observan las subunidades ribosomales (“chorreado”).

Para determinar la pureza de cada muestra se midieron las absorbancias a 230, 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro Agilent UV 8453 (Cuadro 2-1). Luego, se determinó la concentración de ARN utilizando un fluorómetro Qubit (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron preparadas realizando diluciones 1:50 con agua tratada con DEPC. Cada muestra fue medida por duplicado.

Cuadro 2-1: Indicadores para estimar la pureza de las muestras de ARN total.

Relación de Absorbancias	Coficiente	Indicador
Abs_{260}/Abs_{280}	> 1.8	Relación Ac. Nucleicos con proteínas. Muestras con menores coeficientes fueron descartadas del análisis.
Abs_{230}/Abs_{260}	~ 2 - 2.2	Relación ác. Nucleicos con posibles contaminantes (fenol)

2.3.3. Tratamiento con DNAsas

Antes de sintetizar el ADNcopia (ADNc) se realizó un tratamiento para remover el ADN genómico utilizando una enzima DNasa I, RNase-free (Fermentas). El tratamiento consistió en la incubación de las muestras con la enzima a 37 °C durante 30 min, en presencia del buffer adecuado respetando la proporción 1 U de DNasa/ 1 µg de ARN. Luego, se incorporó 1 µL de 50 mM EDTA y se incubó durante 10 min a 65 °C. De esta manera la enzima quedó inactivada para no interferir en los usos posteriores del

ARN (Síntesis de ADNc y PCRs subsiguientes). Las muestras fueron reservadas a -80°C hasta su utilización.

2.3.4. Síntesis de ADNcopia

Para la síntesis de ADN copia (ADNc) se preparó una mezcla con 1000 ng de ARN, 1 µL de oligo dT primer (0,5 mg/mL, Fermentas) y agua libre de RNAsas (DEPC) en cantidad suficiente para alcanzar un volumen de 11 µL. La mezcla se incubó en termociclador durante 5 min a 70 °C y luego 3 min a 4 °C. Luego, se agregó en orden los siguientes componentes: 4 µL de buffer de reacción MMV 5x (Tris-HCl 250 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 20 Mm, DTT 50Mm, Fermentas), 2 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL inhibidor de RNAsas y 1,5 µL de agua DEPC. Finalmente, luego de un paso de incubación de 5 min a 37 °C, se agregó a la mezcla 0,5 µL de enzima transcriptasa reversa MMLV High Performance Reverse Transcriptase (Fermentas). Las muestras fueron incubadas durante 60 min a 42 °C. La reacción terminó elevando la temperatura a 70 °C durante 10 min. De esta manera, se obtuvo ADN a partir del ARNm y sobre ese material se realizaron las PCR para medir la expresión de los genes de interés.

Durante el desarrollo de esta tesis se emplearon dos técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) distintas. Las características particulares de cada técnica se desarrollarán en los capítulos correspondientes (Capítulo 3 y Capítulo 4).

2.4. Metodología para análisis bioquímicos

2.4.1. Determinación de actividad de Lipoxigenasas

Las determinaciones de la actividad específica de cada fracción de LOX (LOX 1, LOX 2 Y LOX 3) fueron realizadas según lo propuesto por Mandal y Dahuja (2013). Las

muestras fueron molidas con nitrógeno líquido y fraccionadas de a 100 mg en tubos eppendorfs de 2 mL. Las extracciones fueron realizadas agregando a cada tubo 1,5 mL de buffer Bórico 0,2 M, pH 9 (LOX 1), buffer Fosfato sódico pH 6.8 (LOX 2) o buffer Fosfato sódico pH 7.1 (LOX 3) según correspondiera. Luego de ser agitadas con vórtex durante 15 segundos, se centrifugaron a 10.000 g y 4°C por 20 minutos. El sobrenadante fue separado en un tubo limpio y reservado para la posterior determinación. 20 µL de sobrenadante fue colocado en un tubo tipo KHAN junto a 970 µL de buffer de extracción y 10 µL de ácido linoléico. Las muestras fueron incubadas a 30 °C durante 10 minutos para permitir la reacción. Luego fueron colocadas en hielo hasta realizar la medición para detener la actividad enzimática. 700 µL del incubado fueron colocados en una cubeta de cuarzo y se realizaron las lecturas de absorbancia de acuerdo a la enzima a determinar: 234 nm, 238 nm y 280 nm (LOX1, LOX2 y LOX3, respectivamente). Las determinaciones se realizaron en el espectrofotómetro Agilent UV 8453. Luego, se midió la concentración de proteína utilizando el método Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate®, BioRad)) usando albúmina bovina como standard para la curva de calibración.

2.4.2. Determinación de Actividad de Inhibidores de tripsin proteasas (TPI)

Las muestras destinadas a las determinaciones de ambos tipos de inhibidores de proteasas fueron molidas con nitrógeno líquido hasta lograr un polvo homogéneo y se acondicionaron en tubos eppendorf de 2 mL, colocando 100 mg/tubo. El buffer de extracción se realizó agregándole a un litro de buffer Tris-Cl 0,1 M, pH 7.6: 50g polivinil polipirrolidona (PVPP), 2g Feniltiourea, 5g dietilditiolcarbamato; 18,6 g Na₂EDTA. Para

realizar la extracción se agregaron 400 μL de buffer de extracción a cada tubo y se mezclaron por vórtex durante 30 seg. Los homogenatos fueron centrifugados 2 veces a 12000g durante 20 minutos. Luego de este tiempo, se recuperó el sobrenadante (extracto de inhibidores) y se transfirió a un tubo limpio para su posterior utilización. La reacción enzimática se realizó utilizando tripsina bovina (Sigma) y el sustrato cromogénico BapNA (N-benzoyl-L-arginine, p-nitroanilide, hydrochloride, Invitrogen). 10 μL de tripsina bovina 3,3 μM fueron incubados con 10 μL de extracto de TPI y 140 μL de buffer de corrida (Tris-Cl 0,1 M; pH 7.8; Cl_2Ca 20mM). Para permitir la unión del inhibidor con la enzima, las muestras se incubaron a 37 °C durante 10 min. Por último, se añadieron 40 μL de sustrato BapNA y se registró la absorbancia de la reacción cada 30 seg utilizando un lector de microplacas configurado en λ 410nm. El valor de inhibición de la actividad de tripsina se relativizó a la concentración de proteína soluble del extracto, la cual fue medida usando Protein Assay Dye Reagent Concentrate®, BioRad y albúmina bovina como standard.

2.4.3. Determinación de Actividad de Inhibidores de Cisteína proteasas (CPI)

Para extraer los CPI, 100 mg de muestras molidas con nitrógeno líquido fueron mezcladas en mortero con 400 μL de buffer de extracción (NaPO_4 50 nM, NaCl 150 mM, EDTA 2 nM; pH 7.2). Los homogenatos se centrifugaron a 12.000g durante 20 minutos a 4 °C. La actividad de los CPI fue medida contra papaína comercial (Biopack) y utilizando sustrato p-Glu-Phe-Leu-pNA como sustrato cromogénico (Invitrogen). La reacción enzimática se llevó a cabo en un lector de microplacas, mezclando 30 μL de papaína 28 $\mu\text{g/ml}$ con 10 μL de extractos de CPI y 150 μL de buffer de corrida (Na_3PO_4 0,1 M, KCl

0,3 M, EDTA 0,1 mM; pH 6.5). Para permitir la unión del inhibidor con la enzima, las muestras fueron incubadas a 37 °C por 10 min con agitación suave y constante. Luego de ese período, se agregaron 20 µL de sustrato y se midió la absorbancia cada 30 seg durante un período de 30 min. El lector de microplacas fue fijado a λ 405 nm. El valor de inhibición de la actividad de papaína se relativizó a la concentración de proteína del extracto, la cual fue medida usando el kit Protein Assay Dye Reagent Concentrate®, BioRad y albúmina bovina como standard

2.5. Medición de Etileno

Para medir la emisión de etileno se encerró herméticamente el material vegetal tratado en frascos de 110 ml. La cuantificación de etileno en la atmósfera de los envases herméticos se realizó por cromatografía gaseosa (CG) en un Cromatógrafo Hewlett Packard 4890, equipado con una columna Porapak N 80/100, de 2 m de largo (Figura 2-6, a). Las condiciones de la corrida fueron las siguientes: temperatura del Inyector 110 °C/ temperatura del horno: 90 °C/temperatura Detector de llama por ionización (FID): 250 °C/Gas Carrier: Nitrógeno/Volumen de Inyección: 1 ml tomado de la atmósfera interna del envase (Figura 2-6, b). Previamente se realizó una curva de calibración con concentraciones crecientes de etileno patrón (15,5 ppm). Los valores de concentración de etileno se relativizaron al peso de las hojas o vainas (se pesaron luego de medir el etileno).

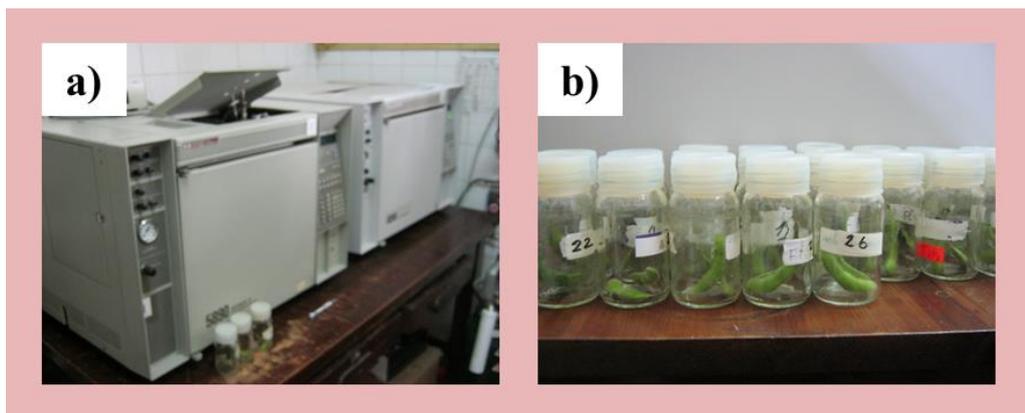


Figura 2-6: a) Cromatógrafo Hewlett Packard 4890 en el cual se realizaron las determinaciones de etileno y b) Frascos herméticos de 110 ml con las muestras tratadas.

Capítulo 3: “Rol de las lipoxigenasas en respuesta a la herbivoría”

3. “Rol de las lipoxigenasas en respuesta a la herbivoría”

3.1. Función de las lipoxigenasas como reguladoras de la síntesis del ácido jasmónico y compuestos volátiles

La síntesis del JA comienza con la oxigenación del ácido α -linolénico libre, que se convierte en ácido 13-HPOT en una reacción catalizada por una 13-lipoxigenasa (13-LOX). El 13-HPOT sirve como sustrato para varias enzimas como divinil-eter sintasa (DES), peroxigenasa, hidroperóxido liasa (HPL), hidroperóxido reductasa (HPR) (Schaller et al., 2001), aleno óxido sintasa (AOS) (Vick y Zimmerman, 1980), alcohol epoxi-sintasa y la propia lipoxigenasa (Howe y Schillmiller 2002). La AOS convierte 13-HPOT en un epóxido inestable que es ciclado por la aleno óxido ciclasa (AOC) dando origen a un compuesto cíclico y biológicamente activo llamado ácido 12-oxo-10,15(Z)-fitodienoico (OPDA). La reducción del doble enlace 10-11 por una OPDA-reductasa dependiente de NADPH produce ácido-3-oxo-2(2W(Z)-pentenil) octanoico (OPC-8:0) que luego de 3 ciclos de β -Oxidación da como producto final de la vía al JA (Howe y Schillmiller, 2002; Viswanath et al., 2020).

Por otro lado, la vía 9-LOX ha sido vinculada mayormente con respuestas frente al ataque de patógenos (Vellosillo et al., 2007; Marcos et al., 2015). Por ejemplo, la expresión antisentido de un gen *9-LOX* en el tabaco aumentó la susceptibilidad de la planta a patógenos fúngicos (Rancé, Fournier y Esquerré-Tugayé, 1998). Los productos oxidados de la vía 9-LOX (9-HPOT) también han sido vinculados a la respuesta hipersensible frente a hongos (Rustérucci et al., 1999). Weber et al. (1999) demostraron que las oxilipinas de éter divinilo derivadas de 9-LOX se acumulan en las hojas de papa que están infectadas con *Phytophthora infestans* y que estos compuestos inhiben el crecimiento y desarrollo de hongos. A su vez, la vía 9-LOX genera precursores de compuestos volátiles (GLVs, del inglés green leaf volatiles) que pueden atraer a

enemigos naturales o bien, actuar como señal de alarma para los tejidos o las plantas vecinas (Howe y Schillmiller, 2002; Arimura et al., 2009)

3.2. Función como defensa antiherbívoro

Además de regular la producción de JA y, por consiguiente, la síntesis de compuestos de defensa, las lipoxigenasas funcionan como compuestos de defensa *per se*. Las LOX son capaces de oxidar a los ácidos grasos disponibles en el tracto digestivo de los insectos, impidiendo su asimilación. Por otro lado, estos hidroperóxidos generados son nutricionalmente inertes y altamente inestables y sus derivados pueden formar complejos con algunas proteínas, disminuyendo así también la disponibilidad de aminoácidos libres (Gardner, 1979; Uchida y Stadtman, 1992; Felton, 2005) y contribuyendo a una deficiencia nutricional. Dietas enriquecidas con LOX provocaron una reducción entre 24-63 % en el crecimiento de larvas de *Helicoverpa zea*. Además, el daño ocasionado por las larvas sobre hojas de soja provocó un aumento significativo de la actividad de LOX y esto se correlacionó con un aumento en el daño oxidativo del epitelio del tracto digestivo de las larvas (Felton et al. 1994). En otro estudio de dietas artificiales, la presencia de LOX provenientes de soja provocaron un 80 % de mortalidad en *Nilaparvata lugens*, un hemíptero que conforma una de las plagas más importante de arroz (Powell et al., 1995).

Otra de las reacciones catalizadas por las LOX involucra a la oxidación de los carotenoides y vitaminas liposolubles. A pH neutro se observó que la actividad de LOX oxidan al α -tocoferol y carotenoides (Gordon y Barimalaa, 1989). En hojas de soja dañadas por herbivoría, la pérdida total de carotenoides se correlacionó con un aumento de la actividad de LOX y exacerbó la actividad de enzimas redox (peroxidasas y polifenol oxidasas) (Bi y Felton 1995).

3.3. Objetivos e hipótesis

El objetivo principal de este capítulo fue conocer cómo es la respuesta de las lipoxigenasas de plantas de soja frente al daño de chinche verde. Por otro lado, estudiar la relación de esta respuesta con la producción de defensas directas inducidas, más específicamente, de inhibidores de cisteín proteasas. Por último, establecer el vínculo que existe entre la inducción hormonal exógena, la producción de lipoxigenasas y el efecto sobre la producción de las defensas. Las hipótesis asociadas a estos objetivos son que el daño de *Nezara viridula* provoca un aumento en la síntesis de lipoxigenasas y al menos una de las tres enzimas LOX participa en la regulación de defensas. El daño ocasionado por *N. viridula* provoca un aumento de los inhibidores de proteasas, específicamente de los del tipo inhibidores de cisteín proteasas. Por último, la aplicación exógena de ácido jasmónico y ácido salicílico, modulan la concentración de lipoxigenasas y de los inhibidores de proteasas, induciéndolos y suprimiéndolos, respectivamente.

3.4. Metodología

3.4.1. Material botánico y condiciones de cultivo

Para alcanzar los objetivos planteados en este capítulo se llevó a cabo un experimento en la campaña 2011/2012 en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía, UBA (34°35'S, 58°29'O).

3.4.2. Experimento 1

El diseño respondió a un DCA el cual estuvo conformado por 4 parcelas dentro de las cuales se asignaron aleatoriamente los distintos tratamientos (Figura 3-1). Cada parcela estuvo conformada por 18 hileras de 2,5 m de longitud, distanciadas a 0,35 m. Entre parcelas se dejaron pasillos de 0,5 m para facilitar el tránsito. Se aplicaron riegos

suplementarios cuando fue necesario y se mantuvo el cultivo desmalezando las hierbas manualmente. Solo se aplicaron insecticidas al inicio del cultivo. El cultivo se mantuvo protegido con tela mediasombra hasta que las plántulas emergieron y desplegaron las primeras hojas verdaderas (Figura 3-1, d). Luego de quitar la protección se ralearon algunas plantas dejando aproximadamente 16 plantas por hilera (288 plantas/parcela).

Dentro de cada parcela se seleccionaron 90 plantas (este número surge de combinar el número de tratamientos (5), los tiempos de cosecha (3) y el destino de uso de las mismas (6). Se seleccionó un racimo de la parte central del tallo principal y a una vaina de dicho racimo se le colocó una bolsa de tul, de manera de aislarlo del resto e identificarlo. Se aplicaron los tratamientos descritos en la pág. 26, sección 2.2 (Figura 3-1, b). Las vainas fueron cosechadas luego de 8, 24 y 72 hs de realizados los tratamientos y reservadas en freezer a -80 °C hasta su análisis en el laboratorio (expresión transcripcional, actividad de lipoxigenasas, actividad de inhibidores de proteasas).

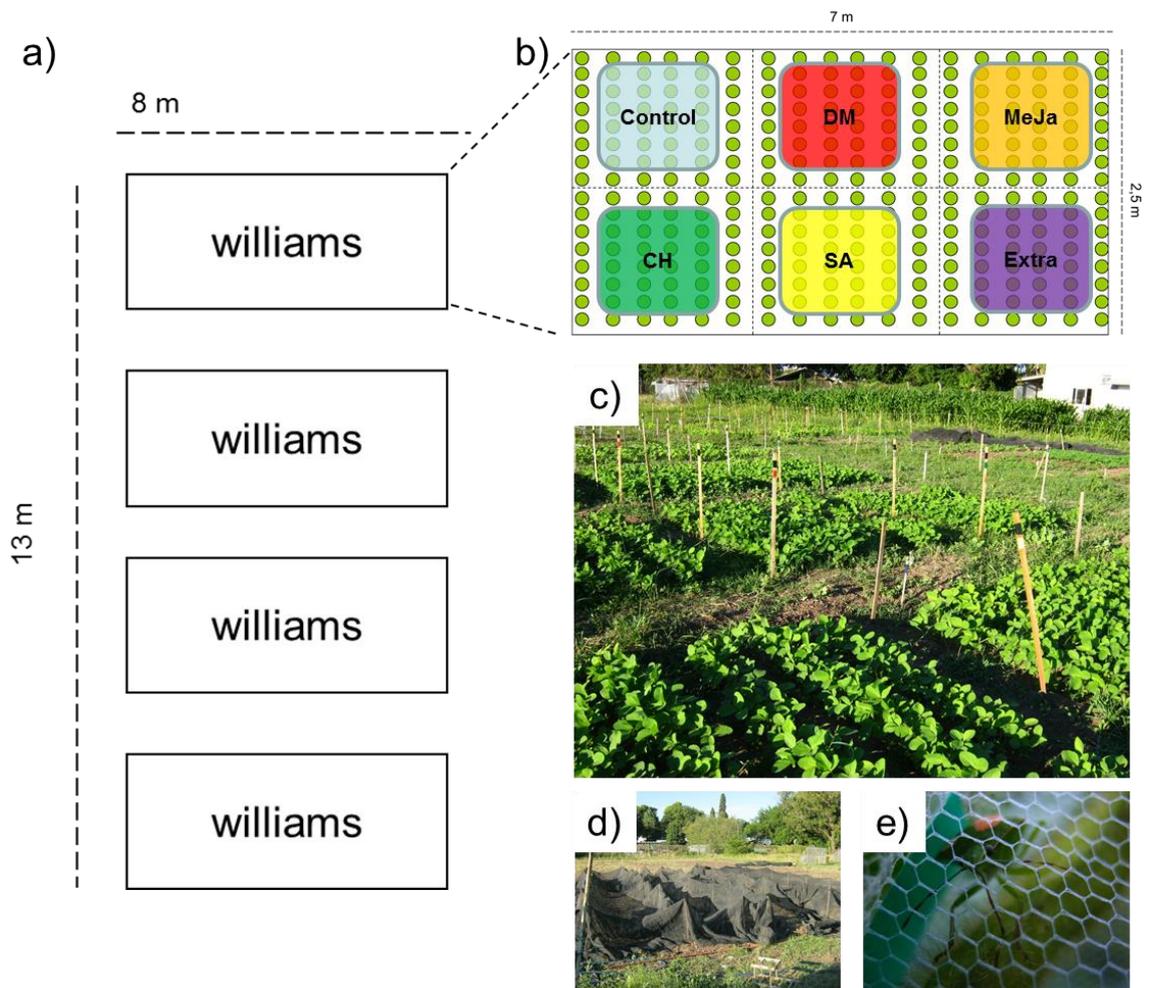


Figura 3-1: Experimento 1. Esquema de la ubicación de las parcelas (a) y ejemplo de aleatorización de los tratamientos dentro de cada una (b). Imágenes del cultivo establecido (c), protección antipalomas (d) y tratamiento de herbivoría detallado (e).

3.4.3. PCR semicuantitativa (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La técnica de RT-PCR semicuantitativa se utilizó para la medición de los transcritos de ARNm de los genes de interés y la detección de cambios en sus niveles de transcripción bajo los diferentes tratamientos, utilizando siempre como referencia un gen constitutivo. Los cebadores (primers) específicos fueron diseñados a partir de secuencias conocidas disponibles en el GenBank, utilizando el programa Oligo PerfectTM Designer (Invitrogen). Las secuencias de los primers utilizados se pueden encontrar en el Cuadro 3-1.

Cuadro 3-1: Primers diseñados para los análisis de transcripción semicuantitativa.

Nombre	Identificación	Sentido	Secuencia 5'–3'
Lipoxigenasa 1	LOX1-1	Forward	TACCAAGGCTGATGCACAT
	LOX1-2	Reverse	CGACGTGAGGTTGTGGA
Lipoxigenasa 2	LOX2-1	Forward	CAACACTTGATAACCTCACT
	LOX2-2	Reverse	TATGCAAGAAAATCCGAGGA
Lipoxigenasa 3	LOX3-1	Forward	TTTCCTTGAGTTTGACT
	LOX3-2	Reverse	GATAAACATCATTGCTCCTG
1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa	ACC-1	Forward	TGAGGTGGAGAACAGGAATT
	ACC-2	Reverse	TTTGAACAGCCATATCATCC
Proteína sensible al salicílico	PR1-1	Forward	GATGCTGACCTTGTTCGAG
	PR1-2	Reverse	CCAGCAAACCTCAGATGTTGTC
Inhibidores de tripsina Bowman-Birk	PIBBCII-1	Forward	CGCATGGAAGTGAACCTCTT
	PIBBCII-2	Reverse	TGTAGCAGAAGTCGGTGGTG
Inhibidores de tripsina Kunitz	PIKZ-1	Forward	CGATTCTCCCAACATTGCTT
	PIKZ-2	Reverse	TATGAGGTGGTGAAGGCACA
Inhibidores de cisteín proteasas 1	N2-1	Forward	AGAGAAAGTGCAAGAATTAG
	N2-2	Reverse	GAGTTCAACCATTCCCTC
Inhibidores de cisteín proteasas 2	R1-1	Forward	TGGCTTTACCGACATCACC
	R1-2	Reverse	GTCACCGAAAGAGGATTAAGT
Inhibidores de cisteín proteasas 3	L1-1	Forward	TGGGAATCGTGATGTGACA
	L1-2	Reverse	ACCAGGCTGTCTCATTCTT
Factor de elongación	ELFB1-1	Forward	GTTGAAAAGCCAGGGGACA
	ELFB1-2	Reverse	ATCTTACCCCTTGAGCGTG

Para realizar las PCRs se utilizaron distintos programas en el termociclador Veriti™ 96-Well (Apply Biosystems), donde se repitió la desnaturalización inicial de 2 min a 95° como así también la extensión final de 10 min a 72 °C. Para cada par de primers se puso a punto los programas de amplificación con el fin de obtener el número de ciclos, el tiempo y la temperatura apropiados de todos los pasos del proceso (Cuadro 3-2). En la reacción de PCR se utilizó la enzima Taq polimerasa (GoTaq® DNA polymerase, Promega), con los primers apropiados, y los desoxirribonucleóticos trifosforilados (dNTP's), sustrato de la polimerización en la nueva cadena sintetizada.

Cuadro 3-2: Variaciones del programa de amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR para los genes: *LOX1*, *LOX2*, *LOX3*, *ACC*, *PR1*, *PIBBCII*, *PIKz*, *N2*, *L1*, *R1* y *ELFB1*.

Nombre del gen	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	N° de ciclos
<i>LOX 1</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	20
<i>LOX 2</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	25
<i>LOX 3</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	20
<i>ACC</i>	30 seg a 94 °C	1 min a 55 °C	1 min, 30seg a 72 °C	35
<i>PR1</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	30
<i>PIBBCII</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	20
<i>PIKz</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	30
<i>N2</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	30
<i>R1</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	25
<i>L1</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	30
<i>ELFB1</i>	30 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	25

3.4.4. Revelado y cuantificación de expresión transcripcional

La detección de los productos de PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en presencia de PAGE Gel Red™ (Biotium), colorante que permite visualizar el ADN en presencia de luz UV. El revelado se realizó en un Transiluminador UV 2000 (Bio-Rad) donde se pudieron visualizar las bandas correspondientes a cada gen. La cuantificación de la expresión se realizó con el software Fluorchem (Alpha Ease® FC Software, Alpha Innotech Corporation) a partir de las imágenes tomadas en el transiluminador. Los resultados de expresión de los genes se relativizaron a la expresión del gen constitutivo (*ELFB1*).

3.4.5. Actividad de α -amilasa

Para determinar el poder inhibitorio de los Inhibidores de tripsina (TPI) del tipo Kunitz sobre las α -amilasas, se llevó a cabo la medición de este tipo de enzimas en contacto con el extracto de TPI (Ver sección 2.4.2, pág. 32), La actividad de α -amilasa se determinó mediante el uso del kit Ceralpha® (Megazyme), utilizando como sustrato al p-nitrofenil maltoheptaósido. 5 μ L de α -amilasa (7,4 U/ μ L) fueron incubados con 5 μ L de

extractos de TPI y 10 μ L p-nitrofenil maltoheptaósido durante 5 min a 37 °C. La reacción fue detenida agregando 150 μ L de buffer fosfato trisódico 20 %, pH 11. Se midió la absorbancia a 405 nm y se determinó la cantidad de unidades enzimáticas con una curva de calibración realizada con malta como control. Luego, se determinó la concentración de proteína soluble de cada muestra mediante el método Bradford, utilizando albúmina bovina como estándar.

3.4.6. Análisis estadísticos

Para poder realizar los análisis de la varianza (ANOVA), primero se analizó si cada variable cumplía con los supuestos del modelo de homogeneidad de varianza y normalidad, utilizando la prueba de Levene y la prueba de Shapiro-Wilk, respectivamente (INFOSTAT). Cuando estos supuestos no fueron satisfechos, los datos fueron transformados por la inversa (para los resultados de PCR). Luego, los datos en ambos casos se analizaron mediante un ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples Dunnet, que compara las medias de cada tratamiento con el control (semillas sin dañar) utilizando el programa PRISM 6.

3.5. Resultados

3.5.1. Respuesta de las lipoxigenasas al daño y la herbivoría

Para alcanzar los objetivos de este capítulo y determinar el efecto de la herbivoría y los tratamientos exógenos con hormonas sobre la vía de las lipoxigenasas se analizaron los niveles de expresión transcripcional y actividad de las lipoxigenasas de semillas en ambos tipos de escenarios.

En el análisis de expresión transcripcional de las lipoxigenasas se encontró que dos de las tres enzimas aumentaron significativamente luego del daño mecánico y la

herbivoría. Los genes *LOX1* y *LOX2* fueron fuertemente inducidos por la herbivoría desde las 8 y 24 hs, respectivamente ($p < 0,0007$ y $p = 0,0035$, Figura 3-2, a y b), mientras que el daño mecánico provocó un salto desde las 8 hs ($p = 0,0136$) hacia las 24 y 72 hs, donde la expresión fue mucho mayor ($p < 0,0001$, Figura 3-2, a y b). Por otro lado, ni el daño mecánico ni la herbivoría tuvieron efecto sobre el nivel de transcritos de *LOX3* (Figura 3-2, c).

A continuación del análisis transcripcional se determinó la actividad específica de cada enzima LOX. Mientras que el daño de chinche verde indujo un aumento significativo en la actividad de LOX1 sólo luego de 24 hs ($p = 0,0005$, Figura 3-2, d), LOX2 no se vio afectada por la herbivoría (Figura 3-2, e). De manera opuesta a los niveles de transcritos, el daño de chinche provocó una inducción muy fuerte de la actividad de LOX3, alcanzando el pico máximo a las 24 hs ($p = 0,0007$, Figura 3-2, f). El daño mecánico no se tradujo en una mayor actividad de estas enzimas.

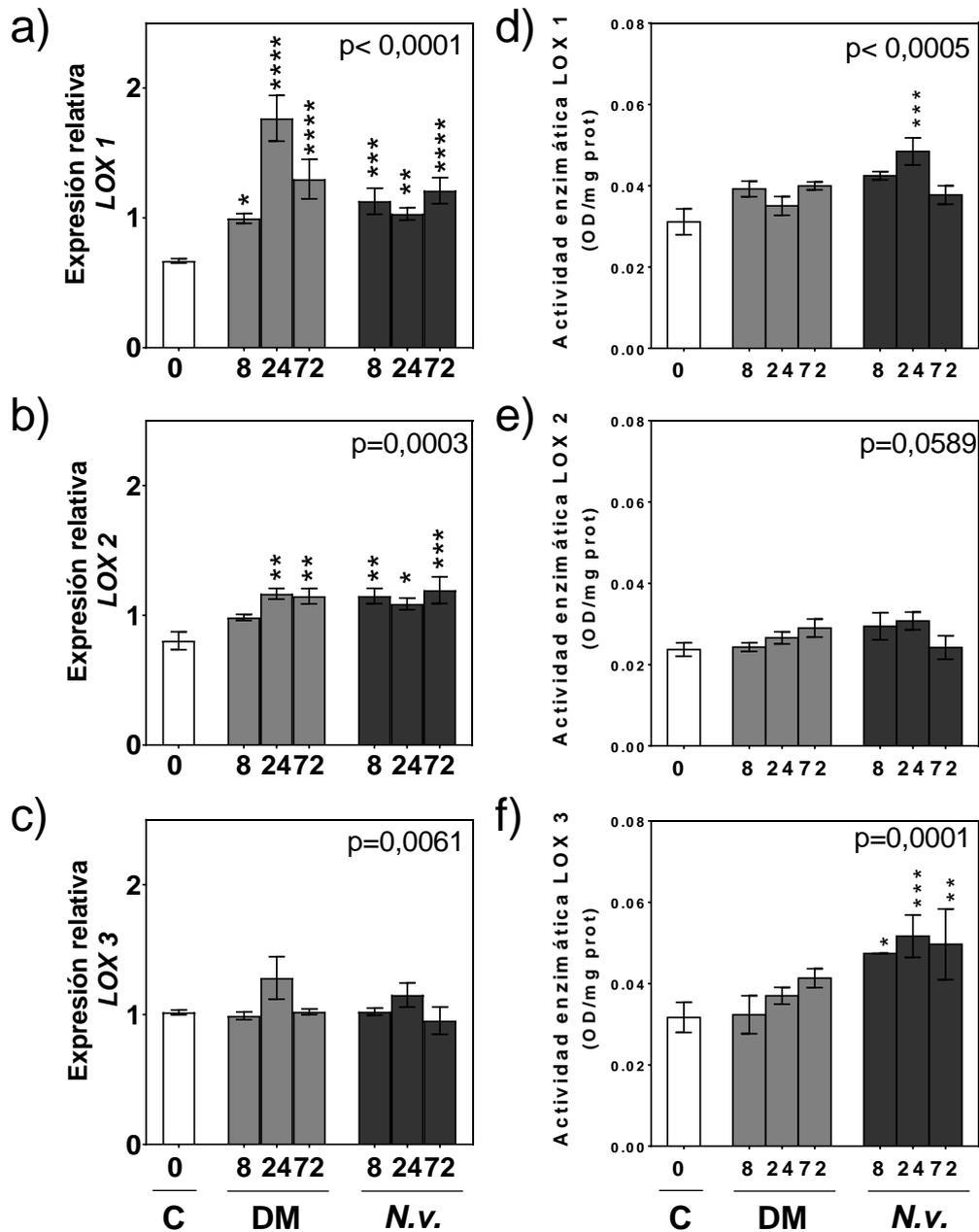


Figura 3-2: Expresión transcripcional relativa (n=5) de *LOX1* (a), *LOX2* (b) y *LOX3* (c) y Actividad específica (n=3) de *LOX1* (d), *LOX2* (e) y *LOX3* (f) luego de 8, 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos de daño mecánico (DM) y herbivoría con *Nezara viridula* (N.v.). Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. En la parte superior derecha cada panel se indica el valor p del modelo del ANOVA. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos de daño (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$).

3.5.2. Inducción de las lipoxigenasas por exposición a hormonas

Además de los tratamientos de daño, se realizaron tratamientos de exposición a hormonas que regulan la respuesta defensiva frente a insectos: JA y SA. La aplicación de 0,1 mM de MeJA sobre las vainas provocó un gran aumento de la expresión de *LOX1* y *LOX2* en todos los tiempos de detección: 8, 24 y 72 hs ($p= 0,0035$, $p= 0,0004$ y $p < 0,0001$, respectivamente, Figura 3-3, a y b), así como también en los niveles de *LOX3* a las 24 y 72 hs ($p=0,0331$ y $p=0,0459$, respectivamente, Figura 3-3, c). Por otro lado, la exposición a SA provocó un aumento en la expresión de *LOX1* y *LOX2* en todos los tiempos, pero el pico más alto se observó a las 24 hs ($p=0,0004$, Figura 3-3, a y b). No sucedió lo mismo respecto a la respuesta en la expresión de *LOX3*, quien no se vio afectada por la exposición a esta hormona (Figura 3-3, c).

Al igual que con los tratamientos de daño, también se determinó el efecto de la pulverización con hormonas sobre la actividad de las LOX. Sólo el tratamiento con MeJA provocó un aumento en la actividad de las tres enzimas, diferenciándose entre respuesta más temprana de *LOX1* y *LOX 2* (8 hs, $p= 0,0036$ y $p= 0,0313$, respectivamente, Figura 3-3, d y e) y una respuesta más tardía de *LOX 3* (24 hs, $p= 0,0025$, Figura 3-3, f). El tratamiento con SA no generó diferencias entre los niveles enzimáticos de ninguna de las isoenzimas. En el Cuadro 3-3 se detallan los valores de la media, error estándar, valor p y nivel de significancia para cada tratamiento.

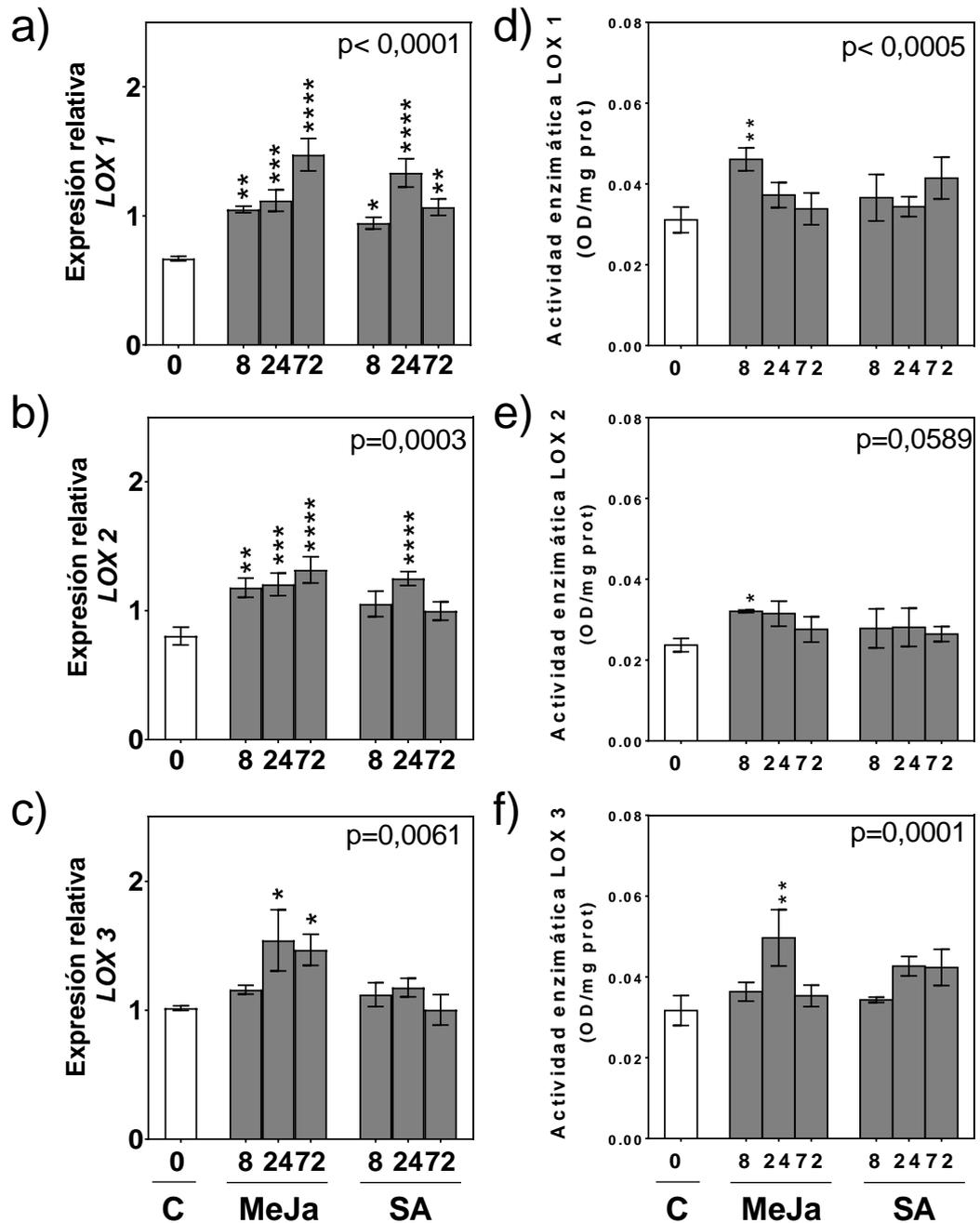


Figura 3-3: Expresión transcripcional relativa (n=5) de *LOX1* (a), *LOX2* (b) y *LOX3* (c) y Actividad específica (n=3) de *LOX1* (d), *LOX2* (e) y *LOX3* (f) luego de 8, 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos hormonales: 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos de daño (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$).

Cuadro 3-3: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “Valor p^* ” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.**

ANOVA, Dunnet ($\alpha = 0,05$)		Control	8 hs				24 hs				72 hs			
			DM	SA	JaMe	CH	DM	SA	JaMe	CH	DM	SA	JaMe	CH
Expresión LOX 1	Media	0,6689	0,9950	1,129	1,050	0,9436	1,767	1,031	1,119	1,333	1,298	1,210	1,474	1,067
	EE	0,01715	0,03802	0,1002	0,02550	0,04528	0,1762	0,04686	0,08300	0,1100	0,1519	0,1001	0,1255	0,06336
	Sig.	-	*	*	**	***	****	****	***	**	****	**	****	****
	valor p^*	-	0,0136	0,0456	0,0035	0,0007	< 0,0001	< 0,0001	0,0004	0,0034	< 0,0001	0,0014	< 0,0001	< 0,0001
Expresión LOX 2	Media	0,6689	0,995	0,9436	1,05	1,129	1,767	1,333	1,119	1,031	1,298	1,067	1,474	1,21
	EE	0,01715	0,03802	0,04528	0,0255	0,1002	0,1762	0,11	0,083	0,04686	0,1519	0,06336	0,1255	0,1001
	Sig.	-	ns	ns	**	**	**	****	***	*	**	ns	****	***
	valor p^*	-	0,1953	0,0561	0,0016	0,0035	0,001	< 0,0001	0,0004	0,0102	0,0019	0,1296	< 0,0001	0,0007
Expresión LOX 3	Media	1,016	0,9895	1,121	1,16	1,022	1,282	1,176	1,542	1,195	1,021	1,004	1,469	0,9527
	EE	0,01774	0,02953	0,09182	0,03464	0,02753	0,1632	0,07176	0,2374	0,104	0,02165	0,1178	0,1208	0,1053
	Sig.	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns
	valor p^*	-	0,9997	0,9957	0,9411	> 0,9999	0,55	0,8859	0,0331	0,8676	> 0,9999	0,9996	0,0459	0,9915
Actividad enzimática LOX 1	Media	0,0331	0,03923	0,03661	0,0461	0,04247	0,03506	0,03439	0,0373	0,04844	0,03998	0,04145	0,03384	0,03774
	EE	0,00299	0,00135	0,00407	0,00199	0,00072	0,00163	0,00174	0,0022	0,00236	0,00069	0,00366	0,00279	0,00161
	Sig.	-	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns
	valor p	-	0,4131	0,925	0,0036	0,0621	0,9991	0,9994	0,8273	0,0005	0,2862	0,122	0,9997	0,7299
Actividad enzimática LOX 2	Media	0,02328	0,0243	0,02783	0,03207	0,0294	0,02658	0,02811	0,0315	0,03074	0,02643	0,02899	0,02759	0,0242
	EE	0,00124	0,00075	0,00342	0,00023	0,00235	0,00107	0,00334	0,0022	0,00153	0,00131	0,00158	0,00223	0,00205
	Sig.	-	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	valor p	-	0,9995	0,5766	0,0313	0,2425	0,8754	0,5061	0,0508	0,0936	0,9019	0,3138	0,6367	0,9996
Actividad enzimática LOX 3	Media	0,032	0,03475	0,03433	0,03633	0,0474	0,04	0,04268	0,0497	0,05168	0,04133	0,04233	0,03533	0,04968
	EE	0,00265	0,00409	0,00047	0,00165	4,1E-05	0,00178	0,0017	0,0049	0,00368	0,00165	0,00317	0,00189	0,00614
	Sig.	-	ns	ns	ns	*	ns	ns	**	***	ns	ns	ns	**
	valor p	-	0,999	0,9992	0,9493	0,0106	0,4226	0,1412	0,0025	0,0007	0,2557	0,1658	0,9908	0,0025

3.5.3. Inducción de genes vinculados a las vías de etileno y ácido salicílico

Se determinó el efecto del daño y de hormonas exógenas sobre los niveles de transcritos de genes que están involucrados en las vías de transducción de señales del etileno y del ácido salicílico: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (*ACC*) y proteína sensible al salicílico (*PRI*), respectivamente. Se encontró que la expresión de *ACC* aumentó significativamente luego de 24 y 72 hs de aplicados todos los tratamientos ($p < 0,001$, Figura 3-4, a y c). Por otro lado, el daño por chinche provocó un aumento muy importante en la expresión de *PRI* 24 hs después de la herbivoría ($p < 0,0001$, Figura 3-4, b) mientras que dicha diferencia respecto al control desapareció a las 72 hs. Un efecto similar se observó con el daño mecánico, donde la inducción de *PRI* aumentó luego de 24 hs ($p < 0,013$, Figura 3-4, b). Respecto a los tratamientos hormonales, solo se encontró

inducción en la expresión de *PR1* luego de 72 hs de aplicar 0,1mM de MeJA ($p < 0,0007$, Figura 3-4, d). En el Cuadro 3-4 se detallan los valores de la media, error estándar ($n = 5$), valor p y nivel de significancia para cada tratamiento.

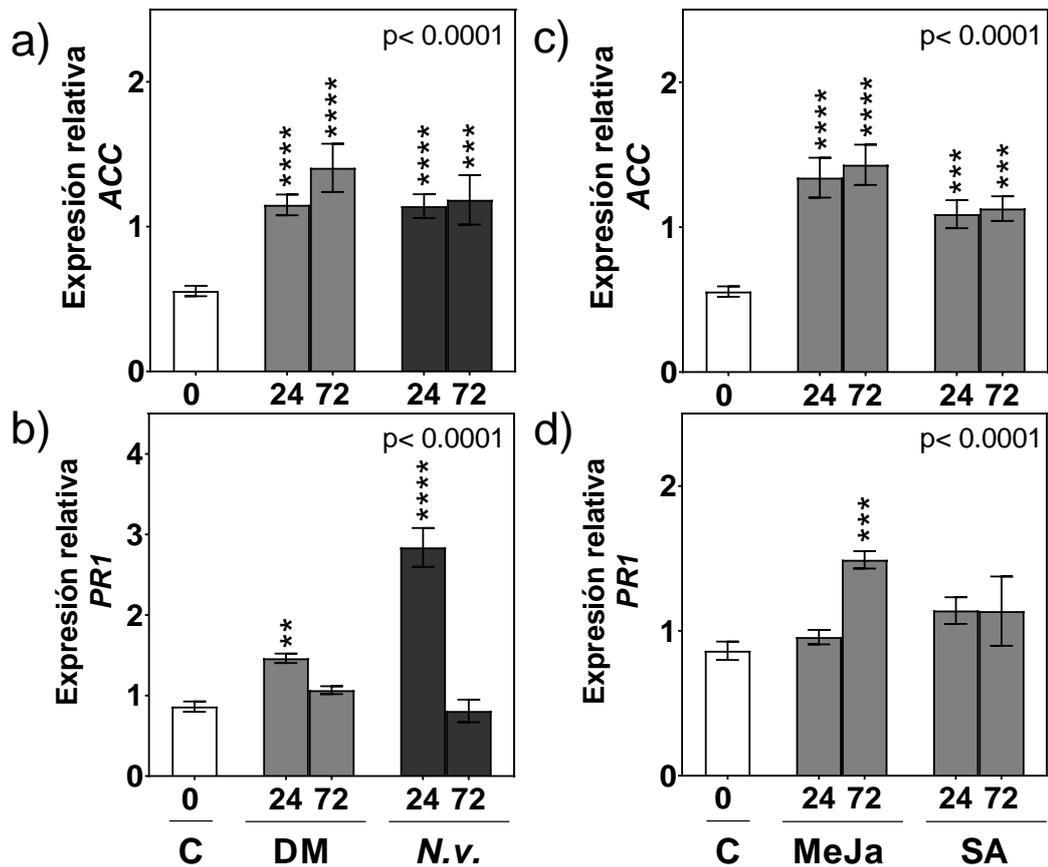


Figura 3-4: Expresión transcripcional relativa de *ACC* (a y c) y *PR1* (b y d) luego de 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos de daño: daño mecánico (DM), herbivoría (N.v.) y hormonales: 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras de error representan el error experimental ($n=5$). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$). Los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.

Cuadro 3-4: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “Valor p^* ” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.**

ANOVA, Dunnet ($\alpha=0,05$)		Control	24 hs				72 hs			
			DM	SA	JaMe	CH	DM	SA	JaMe	CH
Expresión ACC	Media	0,5554	1,15	1,09	1,342	1,141	1,406	1,128	1,431	1,027
	EE	0,03599	0,07158	0,09688	0,1376	0,08245	0,1665	0,08532	0,1388	0,08477
	Sig.	-	****	***	****	****	****	***	****	***
	valor p^*	-	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	0,0008
Expresión PR 1	Media	0,8625	1,463	1,14	0,957	2,839	1,067	1,136	1,491	0,8088
	EE	0,04936	0,04539	0,07142	0,0385	0,1528	0,03813	0,1854	0,0464	0,109
	Sig.	-	**	ns	ns	****	ns	ns	***	ns
	valor p^*	-	0,0013	0,2883	0,9872	< 0,0001	0,6091	0,3019	0,0007	0,9994

3.5.4. Defensas antiherbívoro: Inducción de inhibidores de proteasas

3.5.5. Inhibidores de tripsin proteasas (TPI)

La expresión de los TPI de tipo kunitz (*PI Kz*) y Bowman-Birk (*PI BBCII*) fueron modulados tanto por efecto de la herbivoría como del daño mecánico. El daño por chinche (una sola picadura, durante 30 min) provocó un aumento en la expresión del gen *PI Kz* a las 8 hs que se mantuvo hasta las 72 hs. A su vez, en la expresión de *PI BBCII* sólo evidenció diferencias respecto al control luego de 24 hs y 72 hs (Figura 3-5, a y b). Por otro lado, también se determinó la actividad de los inhibidores de tripsina. Al igual que los niveles de transcritos de *PI Kz* y *PI BBCII*, la actividad de los inhibidores aumentó luego de la herbivoría y del daño mecánico después de 8 hs ($p = 0,0478$ y $p = 0,0049$, respectivamente, Figura 3-5, c). Dicho efecto se disipó tras 24 hs de aplicados los tratamientos, mientras que solo el tratamiento de herbivoría provocó el aumento en la actividad hasta las 72 hs, ($p < 0,0001$, Figura 3-5, c).

Por otro lado, se determinó el efecto de la aplicación exógena de hormonas a vainas en estado R6. La exposición a jasmónico (MeJA) provocó un aumento en la

expresión de ambos genes, *PI Kz* y *PI BBCII*, en todos los tiempos de recolección de muestras, así como también un aumento en la actividad de los inhibidores de tripsín proteasas (TPI). En la Figura 3-5, f se puede visualizar que en tiempos tempranos la inducción fue mucho más alta ($p=0,0001$) que en tiempos intermedios (24 hs, $p=0,0041$) y desapareció en tiempos tardíos (72 hs). Respecto a la exposición al SA, se encontró una respuesta diferencial entre ambos genes. Mientras que la expresión de *PI Kz* aumentó luego de 8 y 24 hs, *PI BBCII* no se vio afectado por este tratamiento (Figura 3-5, d y e, respectivamente). La actividad de TPI sólo se diferenció del control cuando las muestras fueron colectadas a las 8 hs ($p=0,0017$). En el Cuadro 3-5 se detallan los valores de la media, error estándar ($n= 5$), valor p y nivel de significancia para cada tratamiento.

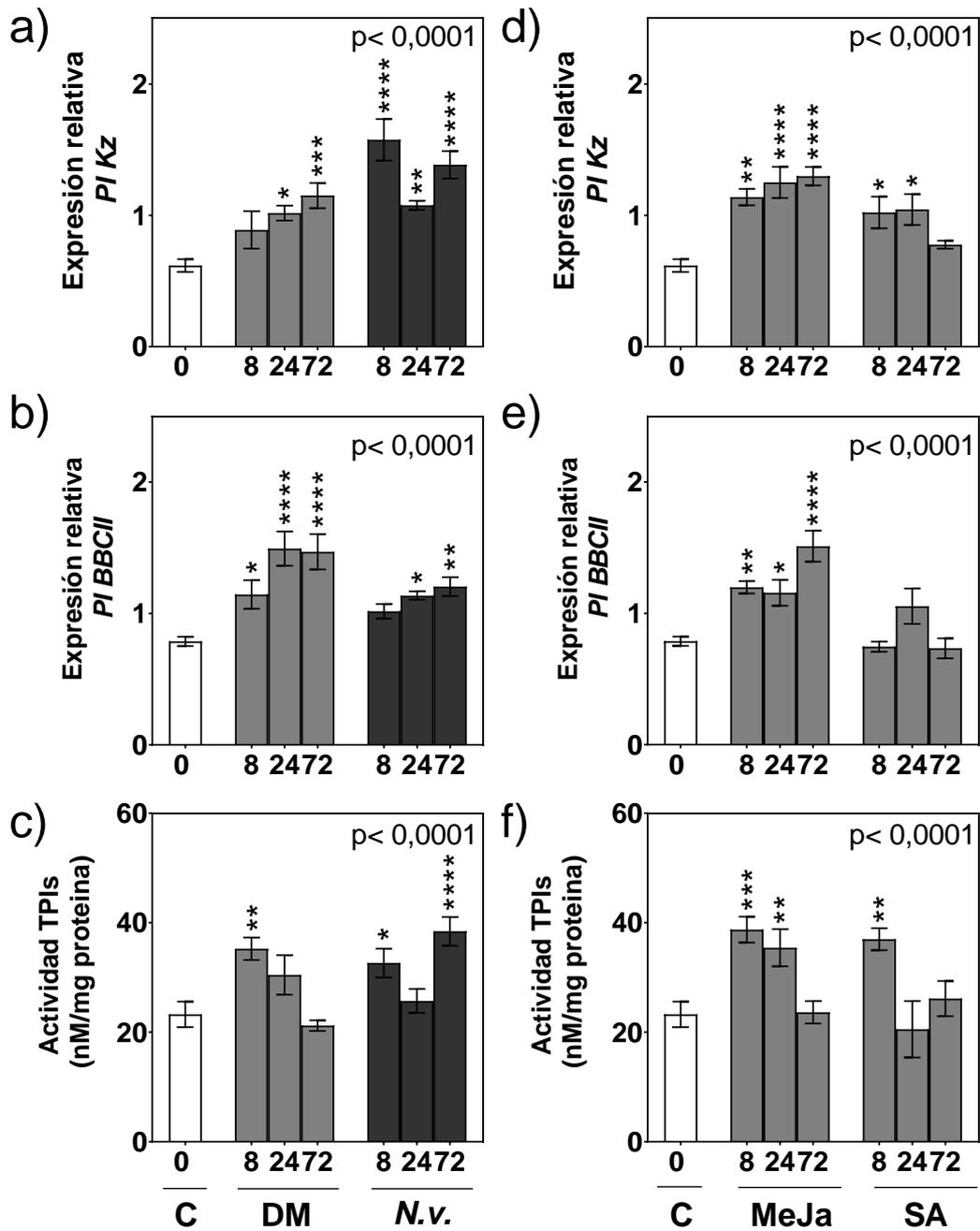


Figura 3-5: Expresión transcripcional relativa (n=5) de *PI Kz* (a y d) y *PI BBCII* (b y e) y Actividad de inhibidores de tripsina (c y f) luego de 8, 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos de daño: daño mecánico (DM), herbivoría (*N.v.*) y los tratamientos hormonales: 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos de daño (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$).

Cuadro 3-5: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.**

ANOVA, Dunnet ($\alpha = 0,05$)		Control	8 hs				24 hs				72 hs			
			DM	SA	JaMe	CH	DM	SA	JaMe	CH	DM	SA	JaMe	CH
Expresión PI Kz	Media	0,6178	0,8896	1,022	1,139	1,576	1,018	1,045	1,251	1,077	1,151	0,7771	1,299	1,385
	EE	0,04875	0,1106	0,09358	0,04833	0,1577	0,05683	0,1176	0,1185	0,03483	0,09579	0,03058	0,0705	0,1047
	Sig.	-	ns	*	**	****	*	*	****	**	***	ns	****	****
	valor p	-	0,2265	0,0191	0,0012	< 0,0001	0,021	0,0115	< 0,0001	0,0055	0,0009	0,8078	< 0,0001	< 0,0001
Expresión PI BBCII	Media	0,7878	1,144	0,7461	1,198	1,017	1,494	1,054	1,157	1,136	1,47	0,7339	1,511	1,204
	EE	0,02738	0,08378	0,03805	0,04679	0,04318	0,1009	0,1045	0,0765	0,0318	0,1041	0,05874	0,118	0,07209
	Sig.	-	*	ns	**	ns	****	ns	*	*	****	ns	****	**
	valor p	-	0,0151	0,9994	0,0035	0,2459	< 0,0001	0,1224	0,0108	0,0187	< 0,0001	0,9993	< 0,0001	0,003
Actividad TPIs	Media	23,59	35,25	36,35	38,74	32,64	30,46	20,53	35,44	25,72	23,27	22,55	23,63	40,51
	EE	2,789	1,595	1,209	1,838	2,043	2,801	3,99	2,631	1,689	1,31	1,434	1,59	2,152
	Sig.	-	**	**	***	*	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	****
	valor p	-	0,0049	0,0017	0,0001	0,0478	0,2212	0,9538	0,0041	0,9958	0,9999	0,9996	> 0,9999	< 0,0001

Luego de analizar la respuesta de TPI a la herbivoría, se analizó el efecto de los TPI sobre la actividad de α -amilasas. Tras el análisis de las muestras se encontró que la actividad *in vitro* de α -amilasa disminuyó significativamente cuando estuvo en contacto con los TPI extraídos de semillas dañadas mecánicamente y por chinches ($p < 0,0001$, Figura 3-6, a), coincidiendo con el aumento en la expresión y actividad de los TPI. Por otro lado, los TPI provenientes de las vainas tratadas con hormonas (JA y SA), también provocaron una disminución significativa de la actividad de α -amilasa respecto al control ($p < 0,0001$, Figura 3-6, b). En el Cuadro 3-6 se detallan los valores de la media, error estándar ($n = 5$), valor p y nivel de significancia para cada tratamiento. En este caso, para que los valores cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, los datos fueron transformados por la raíz cuadrada.

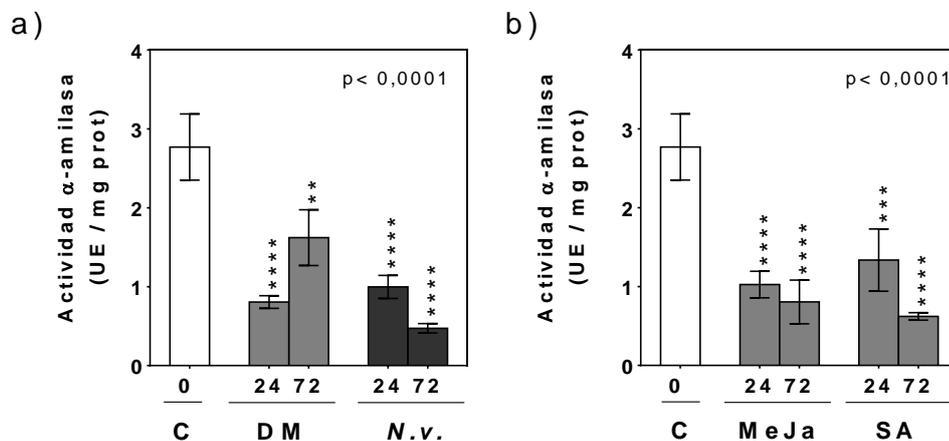


Figura 3-6: Actividad in vitro de α -amilasa expuesta a inhibidores de tripsina extraídos de plantas dañadas mecánicamente y por herbivoría (a) y pulverizadas con 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras de error representan el error experimental (n=4). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C, barras blancas) y los efectos asociados a los tratamientos (barras grises) (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = *$; valor de $p < 0,0001 = ****$). Los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.**

Cuadro 3-6: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “Valor p **” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.**

ANOVA, Dunnet ($\alpha=0,05$)		Control	24 hs				72 hs			
			DM	SA	JaMe	CH	DM	SA	JaMe	CH
Actividad α-amilasa	Media	2,77	0,8053	1,336	1,026	0,997	1,622	0,6215	0,5387	0,4728
	EE	0,4196	0,07992	0,394	0,1677	0,1464	0,3533	0,04794	0,1066	0,05921
	Sig.	-	****	***	****	****	**	****	****	****
	valor p^*	-	< 0,0001	0,0003	< 0,0001	< 0,0001	0,0015	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

3.5.6. Inhibidores de cisteín proteasas (CPI)

La expresión transcripcional de genes que codifican para CPI (*N2* y *R1*) tuvo una respuesta similar a la encontrada en los TPI. *N2* mostró un fuerte aumento en su expresión desde tiempos tempranos (8 hs, $p=0,0004$) y se mantuvo hasta las 72 hs ($p=0,0027$) (Figura 3-7, a). Una respuesta similar se observó en la expresión del gen *R1*, pero a diferencia de *N2* sólo se diferenció del control a las 8 hs ($p=0,07273$) y a las 72 hs ($p=0,0233$) (Figura 3-7, b). Estos resultados fueron consistentes con la actividad de los CPI, donde se encontró que la herbivoría indujo un aumento en la actividad tanto a las 24 como a las 72 hs ($p=0,0029$ y $p=0,0072$, respectivamente).

Por otro lado, la exposición a MeJA y SA provocaron un aumento en la expresión de *N2* ($p < 0,001$, ver detalle en el Cuadro 3-7), al igual que el tratamiento de herbivoría. Dicho efecto se desvaneció a las 72 hs (Figura 3-7, d). Mientras el SA no provocó cambios en los niveles de expresión de *R1*, el MeJA indujo primero una disminución de la expresión (24 hs, $p < 0,0001$) y luego un aumento significativo respecto al control de tratamiento (72 hs, $p < 0,0233$) (Figura 3-7, e). A diferencia de lo observado tras los

tratamientos de daño, el MeJA no generó un aumento en la actividad de CPI mientras que el SA sí. En la Figura 3-7, f se puede visualizar que a las 8 y 24 hs la actividad de CPI fue mayor que la situación sin daño.

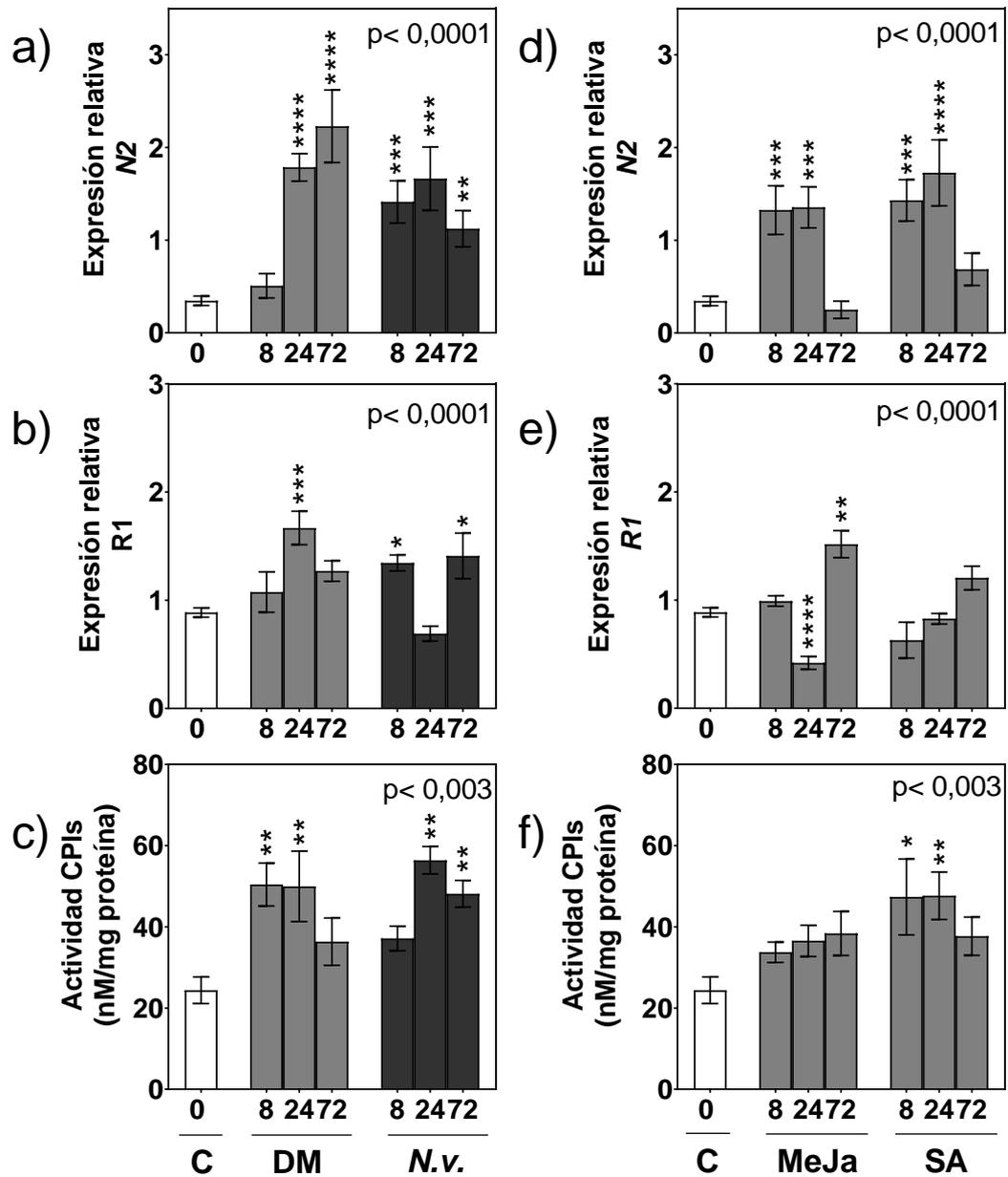


Figura 3-7: Expresión transcripcional relativa (n=5) de *N2* (a y d) y *R1* (b y e) y Actividad de inhibidores de cisteín proteasas (n=4) (c y f) luego de 8, 24 y 72 hs de aplicados los tratamientos de daño: daño mecánico (DM), herbivoría (N.v.) y los tratamientos hormonales: 0,1mM de jasmonato de metilo (MeJA) y 1,5 mM de ácido salicílico (SA). Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Dunnet. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el control (C) y los efectos asociados a los tratamientos de daño (valor de $p < 0,05 = *$; valor de $p < 0,01 = **$; valor de $p < 0,001 = ***$; valor de $p < 0,0001 = ****$).

Cuadro 3-7: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Dunnet (comparando cada tratamiento con el control): *, p < 0,05; **, p < 0,01; *, p < 0,001; ****, p < 0,0001, ns= no significativo. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia. “Valor p **” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.**

ANOVA, Dunnet ($\alpha=0,05$)		Control	8 hs				24 hs				72 hs			
			DM	SA	JaMe	CH	DM	SA	JaMe	CH	DM	SA	JaMe	CH
Expresión N2	Media	0,297	0,5073	1,43	1,37	1,413	1,785	1,727	1,247	1,663	2,228	0,6866	0,2516	1,123
	EE	0,02022	0,1314	0,1574	0,22	0,2279	0,1479	0,3553	0,1904	0,3417	0,3913	0,174	0,06563	0,1955
	Sig.	-	ns	***	***	***	****	****	***	***	****	ns	ns	**
	valor p*	-	0,7639	0,0003	0,0009	0,0004	< 0,0001	< 0,0001	0,001	0,0001	< 0,0001	0,2631	0,9887	0,0027
Expresión R1	Media	0,8629	1,075	0,7388	0,9912	1,345	1,668	0,8284	0,4197	0,6917	1,27	1,205	1,517	1,41
	EE	0,04676	0,1867	0,06317	0,03411	0,07273	0,1546	0,04855	0,06	0,06859	0,09403	0,1087	0,1259	0,2109
	Sig.	-	ns	ns	ns	*	***	ns	****	ns	ns	ns	**	*
	valor p*	-	0,7983	0,9347	0,9472	0,0299	0,0005	0,9996	< 0,0001	0,5578	0,0817	0,1923	0,0035	0,0233
Actividad CPI	Media	24,38	50,43	47,36	33,74	37,15	49,96	47,67	36,56	50,13	36,35	37,69	38,37	48,16
	EE	2,543	4,092	7,239	2,507	3,021	6,721	5,835	2,985	5,514	5,816	3,646	4,202	3,282
	Sig.	-	**	*	ns	ns	**	**	ns	**	ns	ns	ns	**
	valor p	-	0,0025	0,0101	0,7143	0,3545	0,0032	0,0088	0,4097	0,0029	0,4304	0,3091	0,2571	0,0072

3.6. Discusión

El esclarecimiento de la señalización de JA se ha logrado principalmente a través de estudios en hojas de arábido y tomate, por lo que es necesaria la investigación en cultivos de campo y en otros órganos, como semillas (Wasternack y Song, 2017). Mientras que en los últimos años se han llevado a cabo estudios para descubrir las respuestas de semillas de soja al ataque de chinches (Giacometti et al., 2016; Dillon et al., 2020), ningún estudio se ha centrado en los mecanismos que regulan la acumulación de JA en las semillas de soja cultivada en el campo como respuesta a la herbivoría. En este estudio, el ataque de chinches aumentó la expresión de los genes *LOX1* Y *LOX2*, y las actividades de las isoenzimas *LOX1* y *LOX3*, lo que puede conducir a la biosíntesis de JA y compuestos volátiles en semillas dañadas. Las enzimas *LOX* son clave para la síntesis de JA que regula la producción de defensas, como los inhibidores de proteasas (PI) (Halitschke y Baldwin, 2004; Howe y Jander, 2008). El daño por chinches y la aplicación de MeJA indujeron la expresión y actividad tanto de CPI como de TPI, sugiriendo que la herbivoría induce la producción de JA en semillas de soja, como se describió anteriormente (Giacometti et al., 2016). Además, los altos niveles de PI en las semillas atacadas redujeron la actividad de α -amilasas *in vitro*.

Aunque diferentes ramas de la vía LOX producen una gran variedad de compuestos activos (oxilipinas), la rama de la aleno óxido sintasa es la que conduce a la formación de JA (Feussner y Wasternack, 2002; Mosblech et al., 2009). Curiosamente, en este trabajo, el ataque de chinches indujo la expresión de 13-LOX (*LOX1* y *LOX2*), mientras que la expresión de 9-LOX (*LOX3*) se mantuvo en niveles basales. Sin embargo, la herbivoría no solo aumentó la actividad LOX1, sino también la actividad LOX3, lo que sugiere que, además de JA, se acumulan otras oxilipinas después del ataque de chinches. En *Arabidopsis*, genes *LOX1* y *LOX5* son 9-LOX y están involucradas en los procesos de muerte celular programada mediante la formación de fitoalexinas (Christensen et al., 2015). Los resultados aquí presentados son consistentes con estudios previos del equipo de investigación en los que se encontró que el ataque de la chinche verde indujo la acumulación de JA en semillas de soja cultivadas en el campo (Giacometti et al., 2016; Dillon et al., 2020). La participación de LOX en la producción de defensas de plantas se ha demostrado también en hojas de *Arabidopsis*, donde la ausencia de *AtLOX2* se correlacionó con una débil acumulación de JA en respuesta a heridas mecánicas (Bell et al., 1995). De manera similar, el silenciamiento del gen *NaLOX3* en hojas de *Nicotiana attenuata* redujo la resistencia contra herbívoros ya que afectó los niveles de defensas inducidas reguladas por JA (nicotina y TPI) provocando un aumento de la ganancia de peso de orugas de *Manduca sexta* (Halitschke y Baldwin, 2003).

Las defensas químicas contra las chinches en granos de soja no solo están reguladas por JA, sino también por ET y SA de manera dependiente del tiempo (Giacometti et al., 2016). El ET y el JA actúan sinérgicamente regulando el aumento de las defensas en respuesta al daño de los insectos (Schmelz et al., 2003; Zavala et al., 2008a; Onkokesung et al., 2010). Aunque la vía SA actuaría de forma antagónica contra JA, experimentos previos mostraron que el daño con *N. viridula* aumentó tanto la

combinación JA/ET como SA (Giacometti et al., 2016). De manera similar, en este estudio, el ataque de chinches no solo indujo la actividad y la expresión de lipoxigenasas, sino también la expresión del gen *ACC*, precursor de ET, y el gen *PR1*, proteína sensible al SA. Tanto la expresión de LOX como de ACC sintasa también fueron inducidas luego de la aplicación de MeJA y de SA. Llamativamente, el tratamiento con SA no indujo la expresión *PR1* de manera significativa como si lo hicieron los demás tratamientos. Esta respuesta pudo estar relacionada a la sensibilidad de técnica de detección (PCR de punto final) o al experimento, ya que en trabajos previos dentro del equipo de investigación se encontró que el mismo tratamiento indujo la expresión de PR1 luego de las 72 hs de exposición a SA (Giacometti et al, 2016).

Se ha demostrado que los altos niveles de emisión de ET pueden eliminar el antagonismo SA-JA, permitiendo la acumulación concomitante de SA y JA en semillas de soja después del daño por chinches (Leon-reyes et al., 2009; Giacometti et al., 2016). Por otro lado, los tratamientos con hormonas también provocaron un aumento de la expresión y actividad de los inhibidores de proteasas. Específicamente la aplicación de SA provocó un efecto opuesto al que se esperaba, ya que indujo la producción de inhibidores de proteasas comúnmente regulados por JA. Esta respuesta también fue encontrada en plantas de arabis en donde diferentes combinaciones de aplicaciones de hormonas exógenas demostraron que el antagonismo entre SA y JA es dependiente del momento y la secuencia en la que éstas son producidas. El SA es capaz de reprimir la vía del JA sólo cuando es producido antes que el JA y en ausencia de ET. Sin embargo, si el par JA/ET son sintetizados antes que el SA, el efecto represor desaparece (Leon-reyes et al., 2010). Los inhibidores de soja son una de las defensas más importantes estudiadas contra los herbívoros, ya que inhiben la actividad de las proteasas digestivas y disminuyen la disponibilidad de aminoácidos (ej. (Bolter y Jongsma, 1995; Zavala et al.,

2004; Howe y Jander, 2008; Sardoy et al., 2021). Mientras que los TPI son una defensa importante contra las larvas de lepidópteros con tripsinas como principales proteasas digestivas, en el intestino de los insectos hemípteros y coleópteros, las cisteín proteasas son las principales enzimas digestivas y los vuelven más vulnerables a los CPI (Zavala et al., 2008b, 2008a; Curzi et al., 2012; Sardoy et al., 2021). En este estudio, la expresión y la actividad tanto de TPI como de CPI aumentaron con el ataque de chinches. De manera similar, la aplicación de SA o MeJA indujo la expresión de PI, lo que sugiere que SA puede regular positivamente la expresión de LOX y, por lo tanto, algunos genes regulados por JA, como se sugirió anteriormente en soja y arabidopsis (Liu et al., 2016; Dillon et al., 2018a). La herbivoría indujo la actividad de CPI y la expresión de los genes *L1*, *R1* y *N2* coincidiendo con un estudio previo en donde hojas de soja fueron dañadas por adultos de *Popilia japonica* y larvas de *Diabrotica virgifera* durante 3 días (Zavala et al., 2008a; Curzi et al., 2012). A su vez, mientras que el daño mecánico y la herbivoría indujeron la expresión de *PIKz*, la actividad de TPI disminuyó luego del daño mecánico. Estos resultados sugieren que solo el daño mecánico realizado por las chinches no es suficiente para desencadenar la respuesta defensiva. La saliva contiene los elicitores que son percibidos y desencadenan la respuesta de defensa específica (Giacometti et al., 2016).

La regulación positiva de TPI *PIKz* después de la herbivoría disminuyó la actividad de α -amilasas *in vitro*. Estudios previos sugirieron la función dual de *PIKz*, como inhibidor de las actividades de tripsina y α -amilasas (Alves et al., 2009). De manera similar, los inhibidores de la α -amilasa de *Alternanthera sessilis* y *Chenopodium quinoa* afectaron a las α -amilasas de diferentes especies de coleópteros, lo que disminuyó la digestibilidad de los carbohidratos (Rane et al., 2020). Estos resultados destacan la

función defensiva no solo de los CPI, sino también del TPI Kunitz contra el ataque de chinches en la soja.

3.7. Conclusiones

La primera hipótesis asociada a los objetivos de este capítulo establecía que el daño de *Nezara viridula* provoca un aumento en la síntesis de lipoxigenasas. De acuerdo con los resultados alcanzados dicha hipótesis quedaría parcialmente aceptada, ya que las isoenzimas más destacadas en respuesta a la herbivoría fueron LOX1 y LOX3. De esta manera se alcanzó el primer objetivo que fue determinar el efecto de la herbivoría sobre los granos de soja en pleno llenado.

Con relación a la segunda hipótesis planteada, de acuerdo con el segundo objetivo, queda rechazada debido a que la exposición a JA y SA provocaron la inducción de lipoxigenasas y defensas, al contrario de lo planteado en donde se asignaba un efecto inductor al JA e inhibidor al SA, aportando un nuevo conocimiento en la interacción y participación de ambas hormonas en la interacción planta-insecto.

Por último, respecto a la tercera hipótesis que planteaba que el daño de *N. viridula* induciría la producción de CPI, en este trabajo se encontró que no sólo se induce la síntesis de este tipo de inhibidores, sino que también se inducen los TPI, por lo que la hipótesis queda parcialmente aceptada y el objetivo alcanzado.

Capítulo 4: “Modulación de las defensas durante el llenado del fruto”

4. “Modulación de las defensas durante el llenado del fruto”

4.1. Composición química de la semilla de soja

La calidad química de los granos de soja está determinada principalmente por el contenido de proteínas y aceites. El contenido promedio de proteína representa entre el 35-40% del peso seco de la semilla, mientras que los lípidos representan el 7-30 % dependiendo de los rasgos genéticos y condiciones ambientales durante el crecimiento (Adams et al., 1983; Collakova et al. 2013; Li et al. 2015; Weselake et al. 2009). La proporción de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico y ácido linolénico) (Figura 4-1), da como resultado una baja estabilidad oxidativa que limita los usos del aceite de soja en productos alimenticios y aplicaciones industriales (Clemente y Cahoon, 2009). Históricamente, la industria de alimentos y piensos ha abordado este problema mediante la hidrogenación parcial, reduciendo los ácidos grasos poliinsaturados por debajo del 18% del total (2% de ác. linolénico) y un aumento concomitante de los ácidos oleico y esteárico. La desventaja de esta herramienta es que genera una preponderancia de ácidos grasos trans, que han sido relacionados con enfermedades cardiovasculares (Clemente y Cahoon, 2009).

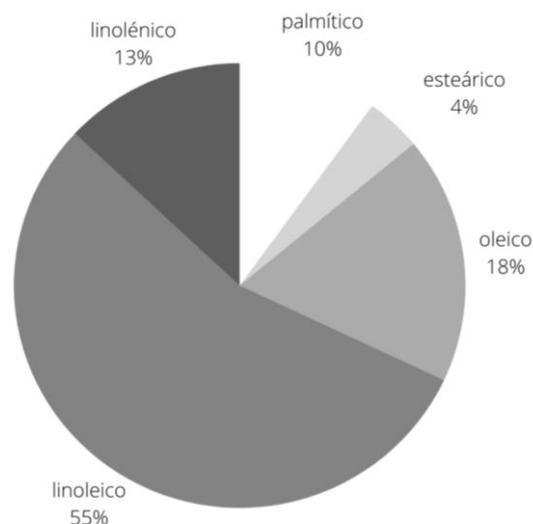


Figura 4-1: Composición de ác. grasos del aceite de soja (Clemente y Cahoon, 2009).

4.2. Acumulación de reservas lipídicas durante el llenado

Entre el comienzo del llenado y la madurez fisiológica de los granos ocurre una serie de procesos relacionados principalmente con la elongación celular y la acumulación de proteínas, lípidos y polisacáridos. A medida que se van depositando las reservas seminales, el tejido va perdiendo humedad hasta comenzar la etapa de maduración (Angelovici et al., 2010). Collakova et al. (2013) demostraron que en esta etapa aumenta la señalización hormonal vinculada a este proceso y la respuesta de defensa frente a estrés biótico y abiótico (metabolismo secundario), mientras que el metabolismo del carbono y del nitrógeno es mínimo (metabolismo primario).

En estas dos etapas bien diferenciadas (acumulación de reservas y desecación), la acumulación de lípidos aumenta casi linealmente desde el inicio del llenado hasta el comienzo de la madurez mientras que el contenido de proteína se mantiene constante (Li et al., 2015). La deposición de lípidos de reserva se encuentra correlacionada positivamente con el rendimiento y a su vez, con las temperaturas cálidas durante el llenado (Dardanelli et al., 2006). Los factores ambientales a los que esté expuesto el cultivo determinarán el resultado de estos procesos afectando a la cantidad y composición de aceites en las semillas (Kambhampati et al., 2021).

4.3. Rol de LOX en semillas

En semillas de soja, las tres isoenzimas LOX presentes desaparecen durante la germinación y emergencia de las plántulas (Siedow, 1991; Weber et al., 1999; Feussner y Wasternack, 2002). Si bien, la remobilización de reservas lipídicas durante la germinación es un proceso independiente de la acción de las LOX, existen antecedentes que proponen una función vinculada a la protección frente al estrés oxidativo que puede desencadenarse por la presencia de especies reactivas de oxígeno al momento de la

remobilización de reservas lipídicas durante la germinación o frente a la respuesta defensiva frente a herbívoros (patógenos e insectos). Una de las teorías plantea que las LOX son secuestradas en vacuolas y separadas del contacto con sus sustratos hasta tanto exista un daño celular que implique estrés oxidativo y sea necesario neutralizarlo (Wang et al., 1999; Han et al., 2013). En arroz (*Oriza sativa*), la enzima OsLOX2 afectó a la longevidad de las semillas durante el almacenamiento. La sobreexpresión del gen *OSLOX2* aceleró el envejecimiento y disminuyó la viabilidad de las semillas, mientras que su represión provocó el efecto opuesto (Huang et al., 2014). Algo similar se encontró en diferentes variedades de trigo en las cuales la disminución de la actividad específica de LOX resultó en una marcada disminución de la oxidación lipídica y extendió la longevidad de los granos durante el almacenamiento (Leenhardt et al., 2006). En semillas de soja con bajo contenido de ác. linolénico y baja actividad de LOX se encontró un menor deterioro y presentaron mayor poder germinativo, comparado con semillas con niveles normales de LOX (Lima et al., 2010).

Durante la germinación se sintetizan nuevas isoenzimas LOX en los cotiledones y en el embrión y los niveles tanto del ARNm como de las proteínas son inducidos con la aplicación de ácido jasmónico, ácido abscísico o estrés como sequía, daño mecánico, infección por patógenos (Melan et al., 1994; Park et al. 1994; Porta et al. 1999). A medida que avanza la emergencia de las plántulas, la síntesis de LOX en semillas disminuye hasta desaparecer luego de los primeros días desde la germinación (Porta y Rocha-Sosa 2002).

Por otro lado, en leguminosas, las LOX han sido identificadas como proteínas vegetativas de reserva (VSP, del inglés vegetative storage protein) y su función se encuentra vinculada a la acumulación y transporte de nitrógeno desde las células del mesófilo paravenal de hojas fuente hacia frutos en crecimiento (Franceschi y Giaquinta,

1983; Tranbarger et al., 1991; Klauer y Franceschi, 1997). Bunker et al. (1995) demostró la remoción de vainas de soja provocó un aumento en la acumulación de VSP, sugiriendo que estas proteínas estarían asociadas a la partición de asimilados. Sin embargo, Turner et al., (2011) plantearon que no se trata de proteínas de reserva, por lo que esta funcionalidad no está clara.

4.4. Defensas durante el crecimiento de los órganos

El desarrollo de una planta desde semilla hasta la madurez involucra una serie de cambios en la asimilación de nutrientes, crecimiento, producción de defensas, mantenimiento, acumulación de reservas y reproducción (Herms y Mattson, 1992; Farnsworth, 2004; Weiner, 2004). Dichos cambios son influenciados por el tipo de planta (leñosa, herbácea, suculenta, etc), la disponibilidad de recursos y la prioridad en la asignación de estos según el estado ontogénico. Por dicha razón, los rasgos característicos de una especie varían a lo largo del ciclo ontogénico, incluyendo también las defensas antiherbívoro (Barton y Koricheva, 2010). A medida que las plantas se desarrollan, la ontogenia puede limitar la expresión de resistencia al daño de los herbívoros y, en este sentido, existen diferentes hipótesis sobre los mecanismos de defensas que operan a lo largo del ciclo de vida. Por ejemplo, la hipótesis del balance crecimiento-diferenciación establece que la adquisición y distribución de recursos limita la producción de metabolitos de defensa en plantas jóvenes lo que conduce a un aumento de las defensas con el avance de la ontogenia, es decir, cuando debido al crecimiento la captación de recursos es mayor y en consecuencia la disponibilidad para reasignarlos a defensas es mayor (Herms y Mattson, 1992). En contraste, la hipótesis de defensa óptima plantea que debido a que las defensas son costosas, los recursos se asignan a la defensa de manera que optimicen esa inversión. Las plantas defenderán los tejidos en proporción directa al

costo de su pérdida. Los tejidos y órganos fáciles de reemplazar y menos críticos estarán menos protegidos que los indispensables y difíciles de reemplazar. Por ejemplo, órganos más jóvenes poseen altos niveles de defensa y estos niveles disminuyen a medida que las plantas maduran (Herms y Mattson, 1992). En una revisión bibliográfica, Barton y Koricheva (2010), no hallaron consenso en la definición sobre cuál es el patrón más común ni cuáles son los factores que contribuyen evidencias para las distintas hipótesis. Por ejemplo, en especies leñosas las defensas aumentan con la edad de las plantas mientras que en especies herbáceas los metabolitos secundarios disminuyen con el desarrollo de estas (Dominy et al., 2003; Barton y Koricheva, 2010). En el caso de *Nicotiana attenuata* y *Lycopersicon esculentum* se ha encontrado que la edad de la planta se correlacionó negativamente con la producción de TPI (Wolfson y Murdock, 1990; Van Dam et al., 2001). En *Nicotiana sylvestris*, además, se encontró que la producción de nicotina se indujo más en estados juveniles que estados maduros (Jongsma et al., 1994; Baldwin y Schmelz, 1996).

En el caso del cultivo de soja, reviste principal importancia estudiar cómo se modulan las defensas a lo largo del llenado, particularmente frente al ataque de chinches ya que el daño reduce el rendimiento, la calidad y el poder germinativo de las semillas (McPherson y McPherson, 2002). La herida provocada por estos insectos ofrece, a su vez, una vía de ingreso a microorganismos patógenos (Gamundi y Sosa A., 2007) y, en condiciones de almacenamiento post-cosecha, aumenta la probabilidad de daño por gorgojos (Todd y Womack, 1973). Hasta el momento no se ha estudiado el efecto de la ontogenia sobre la síntesis de defensas frente a esta plaga y cuál es la participación de las lipoxigenasas en su regulación.

4.5. Objetivos e hipótesis

El objetivo principal de este capítulo fue conocer cómo es la respuesta de las lipoxigenasas al daño de las chinches durante el llenado de los granos y si esta relación afecta a la producción de las defensas directas. La hipótesis asociada es que existe una variación de la respuesta a la herbivoría a lo largo del llenado de los granos, siendo mayor dicha respuesta al comienzo del llenado comparado con el final del llenado.

4.6. Materiales y métodos

4.6.1. Experimento 2: material botánico y entomológico

Para alcanzar los objetivos de este capítulo: determinar el efecto del momento del llenado sobre la respuesta de las plantas de soja al daño de chinches se cultivaron plantas del genotipo Williams 82 en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (2014-2015). Las condiciones de siembra y mantenimiento del cultivo fueron las mismas que las descritas en el capítulo 2, sección 2.1.

4.6.2. El diseño experimental

El diseño experimental respondió a un DBCA (5 bloques) con diseño factorial, en el cual los factores fueron:

- Momento del llenado (R_5 , $R_{5,5}$ y R_6). En la Figura 4-2 se puede observar una representación del tamaño de los granos en cada estadio, que se diferenció por peso y tamaño de los granos en cada momento.



Figura 4-2: Tamaño de semillas en formación en los distintos momentos del llenado.

- Herbivoría (Control, Daño con chinche 24 hs y Daño con chinche 72 hs) se utilizaron adultos de la especie *Nezara viridula*, tal como se ha descrito en el capítulo 2, sección 2.2.

De esta manera quedaron conformados 9 tratamientos. Luego de aplicar los tratamientos con insectos en los distintos momentos del llenado de granos, se recolectaron las muestras a las 24 y 72 hs, colocándolas en sobres de papel aluminio y reservándolas en nitrógeno líquido. Una vez en el Laboratorio, fueron conservadas en ultrafreezer (-80°C) para su posterior análisis.

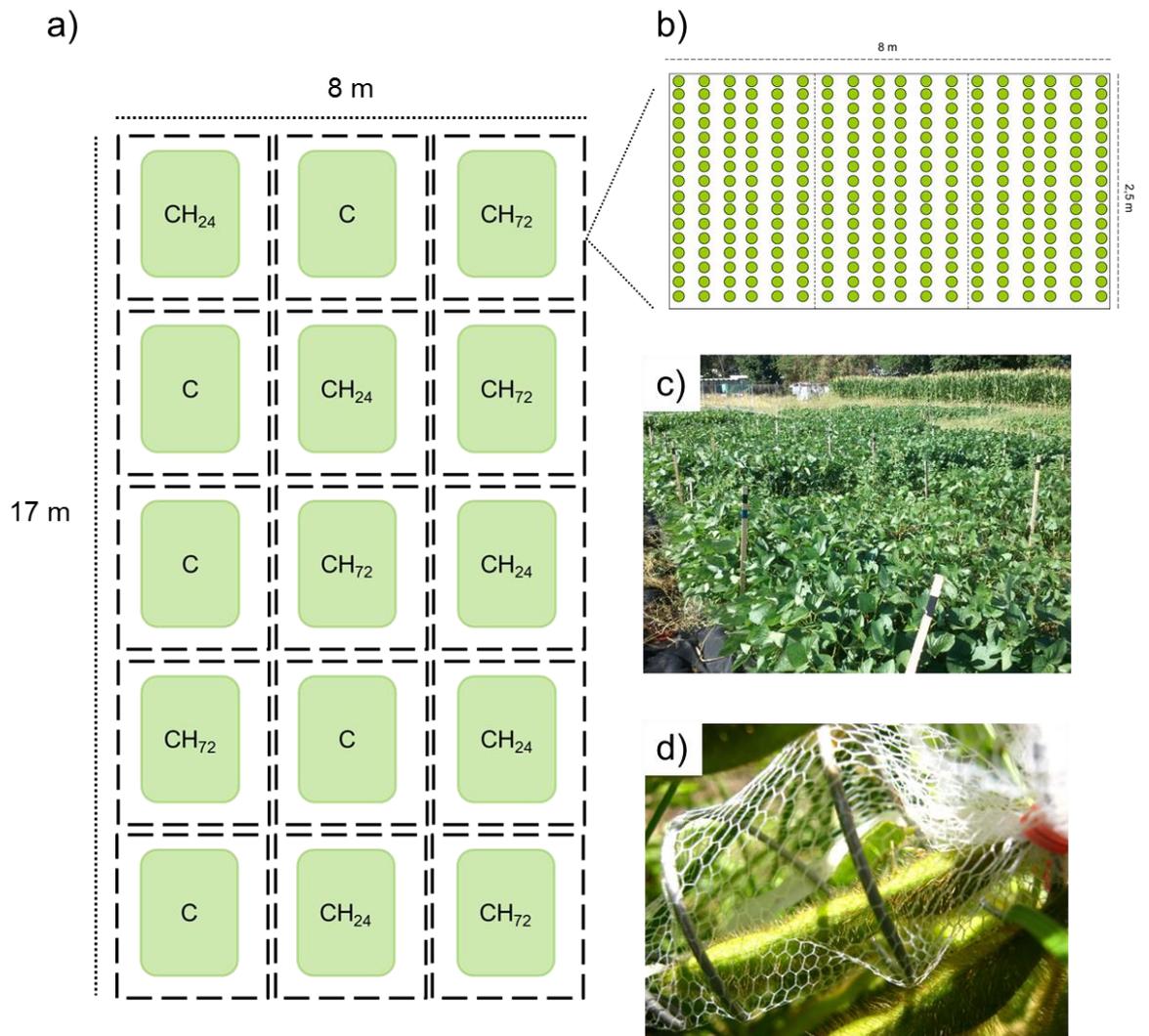


Figura 4-3: a) Diseño experimental DBCA compuesto por 5 bloques. Cada bloque fue dividido en 3 parcelas (b) a las que se le asignaron al azar un tratamiento (C: sin daño, control; CH₂₄: daño con chinche 24 hs; CH₇₂: daño con chinche 72 hs). c) Plantas de soja creciendo y d) Imagen del tratamiento de herbivoría, se puede observar cómo se aislaron vainas con bolsita de tul y un espiral de alambre de aluminio para permitir el movimiento de la chinche hasta el momento del daño como se muestra en la foto.

4.6.3. Extracción de ARN mensajero

Para estudiar la expresión transcripcional se purificó el ARN mensajero utilizando un kit mRNA Isolation Kit® (Roche), debido a que permite la obtención de ARNm sin contaminación con ADN genómico. En un tubo eppendorf de 2 mL se colocaron 100 mg de tejido y 1 mL de buffer de lisis. Para maximizar la homogeneización se utilizó un vórtex y luego se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente (paso 1 y 2, Figura 4-4). Durante este tiempo el ARNm es liberado del interior de las células,

dada la ruptura de las membranas. Por último, se centrifugaron los tubos a 10.000 rpm durante 2 min. En un tubo limpio y rotulado se transfirió todo el sobrenadante. A dicho tubo se agregaron 1,5 μL de la solución de biotina unida a oligo dT primer a cada tubo. De esta manera, las moléculas de ARNm se unen al oligo dT por complementariedad de bases (paso 3, Figura 4-4). Por otro lado, en un tubo limpio se colocaron 100 μL de partículas magnéticas de estreptavidina, que fueron atraídas por el magneto y preparadas para unirse a las muestras. Las moléculas de estreptavidina se unen a la biotina, permitiendo la purificación segura de los ácidos nucleicos, ARNm en este caso. Finalmente se colocó el sobrenadante + biotina previamente mezclados en el tubo que contenía las partículas magnéticas. Se incubaron las muestras durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se colocaron en el imán durante 5 min. En este momento el ARNm se une con el imán separándose del homogenato.

A continuación, se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 μL de Washing buffer (buffer de lavado). Se mezcló con *tip* 5 veces haciendo pasar a la muestra por el *tip* para maximizar el lavado. Luego, las muestras se colocaron sobre el imán durante 5 min. Se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió 3 veces (paso 5, Figura 4-4).

El último paso de la purificación consistió en eluir el ARNm de las partículas magnéticas de estreptavidina. Para ello, se colocaron 50 μL de agua re-destilada en los tubos y se incubaron a 65 °C durante 5 min. Por último, se colocaron los tubos en el imán para permitir la separación y se recolectó el sobrenadante, transfiriendo a un tubo limpio el ARNm purificado (paso 6, Figura 4-4).

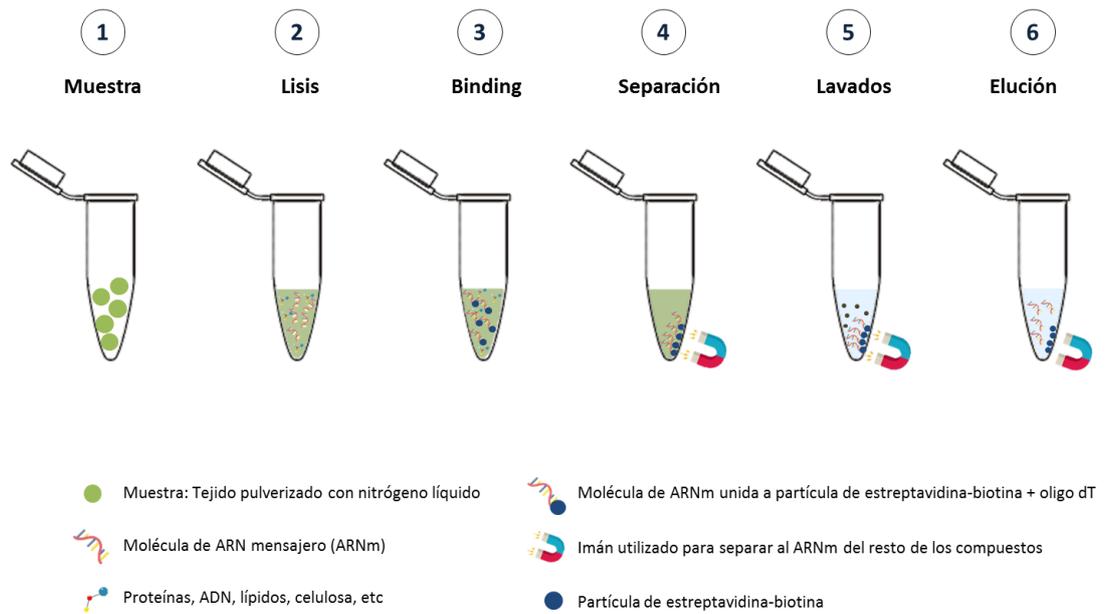


Figura 4-4: Esquema de la purificación de ARNm utilizando el kit mRNA Isolation Kit® (Roche).

La concentración de RNA fue determinada con un fluorómetro Qubit™ (Invitrogen). La pureza se determinó mediante espectrofotometría con NanoDrop One/One^C UV-Vis (Thermo Scientific) utilizando 2 µL de ARNm y colectando la relación A260/280. Para la síntesis de ADN copia (ADNc) se siguieron los mismos pasos descritos en la sección 2.3.4.

4.6.4. Determinación de la expresión transcripcional por PCR en tiempo real

El análisis de la expresión transcripcional se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), utilizando el termociclador QuantStudio5™ Real Time, Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific).

4.6.5. Diseño y validación de primers

La detección de cambios en los niveles de transcripción bajo los diferentes tratamientos se realizó mediante qPCR, utilizando el método $\Delta\Delta CT$ (Pfaffl, 2001). Los cebadores (primers) específicos fueron diseñados a partir de secuencias conocidas

disponibles en el GenBank, utilizando el programa Oligo Perfect™ Designer (Invitrogen).

Las secuencias de los primers utilizados se pueden encontrar en el Cuadro 4-1.

Cuadro 4-1: Primers diseñados para el análisis de expresión transcripcional mediante PCR en tiempo real.

Nombre	Identificación	Sentido	Secuencia 5'–3'
Factor de elongación	ELFB1	Forward	GTTGAAAAGCCAGGGGACA
	ELFB1	Reverse	TCTTACCCCTTGAGCGTGG
Lipoxigenasa 1	LOX1 F	Forward	AGCTGCCGTCAGTCAAGTCG
	LOX1 R	Reverse	TCCATCGCCGCATGAGTATT
Lipoxigenasa 2	LOX 2 F	Forward	ATGCCAAGGCTTATGCGACA
	LOX 2 R	Reverse	ACAGGTCCCCAGCAGGATGT
Lipoxigenasa 3	LOX 3 F	Forward	CAGTGGTGTGATGCGCAAG
	LOX 3 R	Reverse	ATCGGCCCAAGAAGGCAGTA
1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa	ACCs F	Forward	TGCCCCGAGTTCAGAAATGCT
	ACCs R	Reverse	AGTGACTTCGTGTGCTCCAG
proteína sensible al salicílico	PR 1 F	Forward	GCAAAGGTGACTGCCAACTG
	PR 1 R	Reverse	TCACTGCATCTGTGCCACTT
Inhibidores de tripsina Bowman-Birk	PIBBCII F	Forward	CGGGTTCTTTTCTCTTCACACTT
	PIBBCII R	Reverse	TGCGTGCATTAGTAACCCCC
Inhibidores de tripsina Kunitz	PIKz F	Forward	CATCGCTGATTTCTGTGCTCG
	PIKz R	Reverse	GGGCTGCTCTTATTCCACCA
Inhibidores de cisteín proteasas 1	CPI N2 F	Forward	GTGCAAAGCAGCAAGTGTT
	CPI N2 R	Reverse	TCCCTCACCCAAACCTTCG
Inhibidores de cisteín proteasas 2	CPI R1 F	Forward	AAGTGACTACTTGGCCGCAA
	CPI R1 R	Reverse	ATGGCAAACATGCACAACCC
Inhibidores de cisteín proteasas 3	CPI L1 F	Forward	GGCAAAAGATGGTGGGCAAA
	CPI L1 R	Reverse	TGCAGGTGCATCTCCAACAA

Se realizó un experimento de validación para comprobar que la eficiencia de los primers fuera alta (entre 90-110 %). Para ello se construyó una curva estándar que consistió en preparar alícuotas de concentraciones conocidas de ADNc (diluciones seriadas) y realizar las reacciones de PCR para cada par de primers de interés.

4.6.6. Curva estándar

Para obtener el gradiente de concentraciones de ADNc necesario se tomaron 5 µL de ADNc de cada muestra (27 muestras) y se transfirieron a un mismo tubo identificado como tubo “pool”. Colectándose en total 125 µL de ADNc. Partiendo del ADNc “pool”

se realizaron 5 diluciones seriadas con un factor de dilución 1:4 (Figura 4-5), mezclando 10 μL de ADN con 30 μL de agua miliQ.

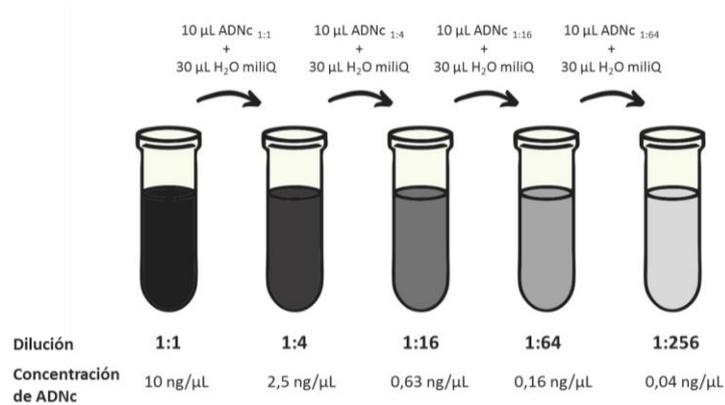


Figura 4-5: Esquema de la elaboración de las diluciones seriadas de ADNc utilizadas en la validación de los primers para RT-PCR.

A partir de una regresión lineal entre el logaritmo de la cantidad de ADN (eje X) y el valor de C_T (eje Y) se construyó la curva estándar, dónde la pendiente de cada función (Figura 4-6, a) se utilizó para calcular la eficiencia de amplificación de cada par de primers, según la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001):

$$Eficiencia = 10^{\left(-\frac{1}{pendiente}\right)} - 1$$

Un 100 % de eficiencia corresponde a la duplicación perfecta del fragmento de interés (templado) en cada ciclo de PCR. Sin embargo, el rango aceptable para validación se encuentra entre 90-110 %. En el Cuadro 4-2, se detallan los valores de las pendientes, coeficiente de correlación (R^2), eficiencias y el ciclo umbral (C_T) para cada gen target. Por otro lado, se construyeron las curvas del melting (Figura 4-6, b), para comprobar que las reacciones de PCR eran específicas y no hubo dimerización de primers. Debido a que la temperatura de melting (temperatura de unión de fragmentos de ADN) es afectada por la longitud del fragmento y el contenido de GC, entre otros factores, los productos de PCR pueden diferenciarse según este parámetro. De esta manera se determinó que todos los primers superaron la validación.

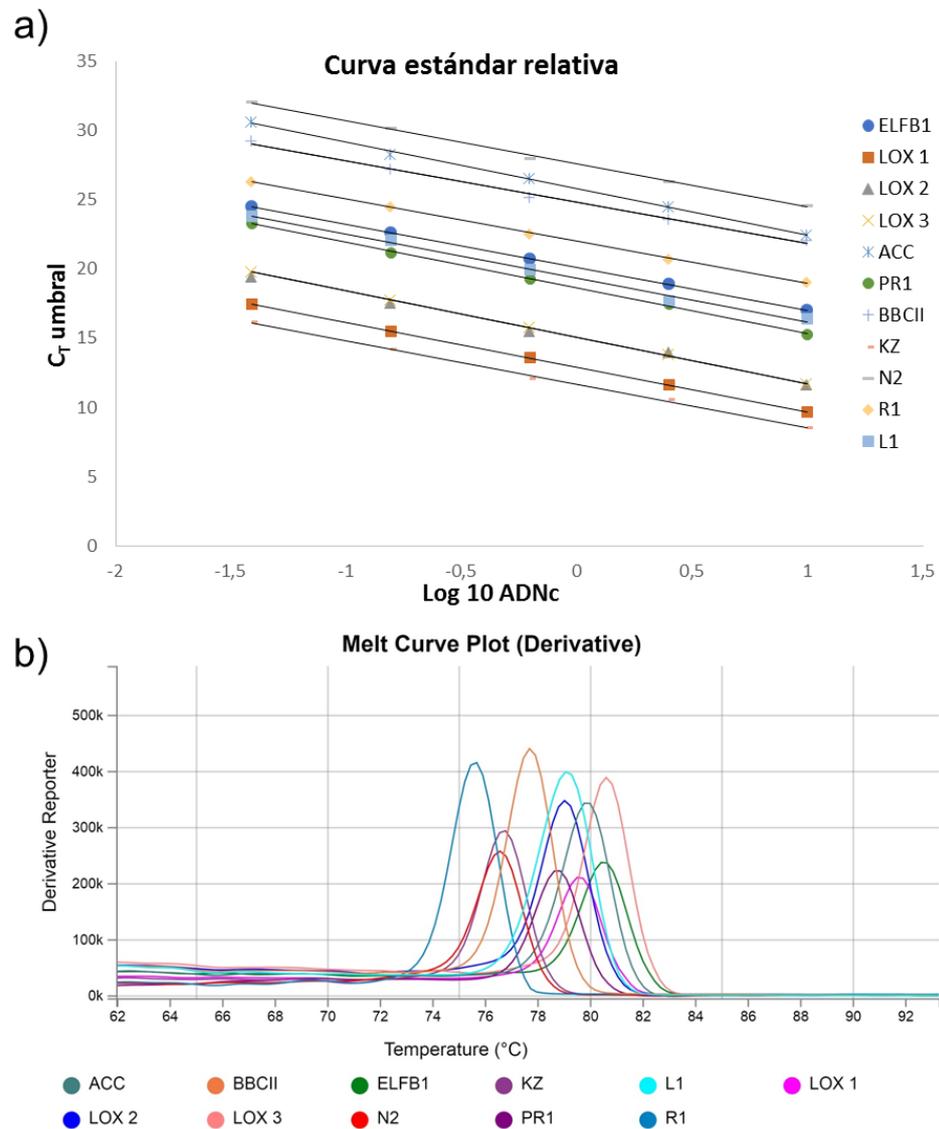


Figura 4-6: a) Regresiones lineales entre el logaritmo de la concentración inicial de ADNc (eje X) y ciclo umbral (C_T) para cada par de primers. b) Curva de melting ejemplo para cada fragmento amplificado.

Cuadro 4-2: Parámetros de RT-PCR para cada gen target.

Gen	Pendiente	R^2	Eficiencia	Umbral
<i>ELFB1</i>	-3,10	99,4	1,10	0,32817
<i>LOX 1</i>	-3,22	99,6	1,04	0,06122
<i>LOX 2</i>	-3,17	99,5	1,07	0,28105
<i>LOX 3</i>	-3,34	99,5	0,99	0,25582
<i>ACC</i>	-3,35	99,3	0,99	0,10131
<i>PR1</i>	-3,29	98,3	1,01	0,19236
<i>BBCII</i>	-2,98	99,2	1,17	0,29183
<i>KZ</i>	-3,13	99,6	1,09	0,15496
<i>N2</i>	-3,12	98,6	1,09	0,10131

<i>R1</i>	-3,06	99,1	1,12	0,34888
<i>L1</i>	-3,18	97,3	1,06	0,37432

4.6.7. Cuantificación relativa: Método $\Delta\Delta C_T$

Tanto en la etapa de validación como en la de cuantificación, se realizaron las PCR con la misma mezcla de reacción (Cuadro 4-3). El volumen final de reacción fue de 10 μL . En esta etapa de la cuantificación se utilizaron pipetas secuenciales para dispensar de manera pareja el mismo volumen de mezcla (8 μL) en todos los pocillos de la placa de PCR. Lo único que se dispensó de manera individual fue el volumen de ADNc (2 μL /pocillo).

Cuadro 4-3: Reactivos necesarios para realizar las PCR.

Reactivos	Volumen (μL)/muestra	Mix (x 100 muestras)
Fast EvaGreen® qPCR Master Mix	5	500
Rox reference dye	0,1	10
Primer F	0,4	40
Primer R	0,4	40
H ₂ O miliQ	2,1	210
ADNc	2	-

Para todas las PCRs se realizaron 3 réplicas técnicas. El número de tratamientos fue 27 (3 momentos del llenado x 3 tratamientos de herbivoría x 3 réplicas biológicas), por lo tanto, el número total de pocillos utilizados para cada gen fue de $84 = 81$ pocillos con muestras (27 muestras x 3 repeticiones técnicas) y 3 pocillos con controles negativos (NTC: reemplazando al ADNc por agua).

placa 384 - Q55																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	6	11	17	22	27	1	6	11	17	22	27	1	6	11	17	22	27	1	6	11	17	22	27
B	1	6	12	17	22	ntc	1	6	12	17	22	ntc	1	6	12	17	22	ntc	1	6	12	17	22	ntc
C	1	7	12	17	23	ntc	1	7	12	17	23	ntc	1	7	12	17	23	ntc	1	7	12	17	23	ntc
D	2	7	12	18	23	-	2	7	12	18	23	-	2	7	12	18	23	-	2	7	12	18	23	-
E	2	7	13	18	23	ntc	2	7	13	18	23	ntc	2	7	13	18	23	ntc	2	7	13	18	23	ntc
F	2	8	13	18	24	-	2	8	13	18	24	-	2	8	13	18	24	-	2	8	13	18	24	-
G	3	8	13	19	24	-	3	8	13	19	24	-	3	8	13	19	24	-	3	8	13	19	24	-
H	3	8	14	19	24	-	3	8	14	19	24	-	3	8	14	19	24	-	3	8	14	19	24	-
I	3	9	14	19	25	-	3	9	14	19	25	-	3	9	14	19	25	-	3	9	14	19	25	-
J	4	9	14	20	25	-	4	9	14	20	25	-	4	9	14	20	25	-	4	9	14	20	25	-
K	4	9	15	20	25	-	4	9	15	20	25	-	4	9	15	20	25	-	4	9	15	20	25	-
L	4	10	15	20	26	-	4	10	15	20	26	-	4	10	15	20	26	-	4	10	15	20	26	-
M	5	10	15	21	26	-	5	10	15	21	26	-	5	10	15	21	26	-	5	10	15	21	26	-
N	5	10	16	21	26	-	5	10	16	21	26	-	5	10	16	21	26	-	5	10	16	21	26	-
O	5	11	16	21	27	-	5	11	16	21	27	-	5	11	16	21	27	-	5	11	16	21	27	-
P	6	11	16	22	27	-	6	11	16	22	27	-	6	11	16	22	27	-	6	11	16	22	27	-
	Gen 1						Gen 2						Gen 3						Gen 4					

Figura 4-7: Diagrama con la disposición de las muestras en la placa de 384 pocillos utilizada para realizar las PCR en el termociclador QuantStudioTM Real Time, Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific). Las muestras biológicas se enumeraron del 1 al 27 para facilitar la identificación al momento del armado de las PCRs. Por placa de 384 pocillos se cuantificaron 4 genes.

El programa de PCR utilizado para todos los genes fue el mismo:

- **Instrument:** QuantStudioTM 5

- **Block:** 384-Well

- **Analysis Module:** Relative Quantification

- **Run Mode:** Standard.

Paso 1: 5 min a 95 °C (Activación de la enzima Taq polimerasa)

Paso 2: PCR – 15 seg a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 60 °C por 40 ciclos (hibridación y elongación)

Paso 3: Curva de melting - 15 seg a 95 °C, 1 min a 60 °C, rampa

Luego de finalizada cada PCR se realizó un análisis post-run cargando en el software del equipo los parámetros estimados en la validación previa (umbral de detección y eficiencia de cada par de primers) (Figura 4-8). Los resultados (valores de C_T) fueron descargados y analizados utilizando las planillas de cálculo Excel. La metodología empleada para realizar la cuantificación relativa fue la propuesta por Pfaffl (2001) en donde los valores de C_T del gen de interés son relativizados a los C_T del gen constitutivo (en este caso *ELFBI*) y a su vez cada muestra es relativizada a su control de tratamiento. De esta manera es posible comparar los niveles de expresión entre los diferentes tratamientos.

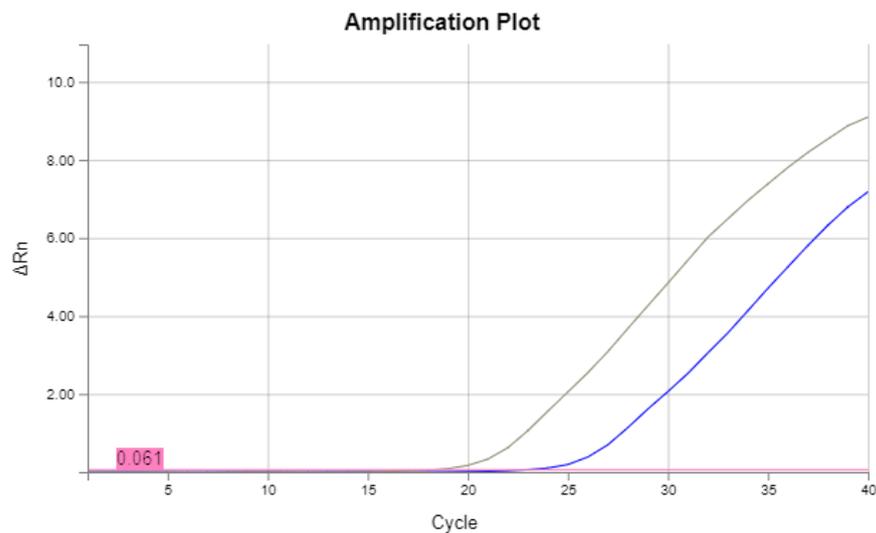


Figura 4-8: Ejemplo de cuantificación de la muestra 1: Control (R_5) (línea azul) y de la muestra 6 (Chinche 24 hs R_5) (línea gris) para el gen *lox1*. El umbral de detección definido para este gen fue 0.061, valor resultante de la validación de primers.

4.6.8. Análisis estadísticos

Para poder realizar los análisis de la varianza (ANOVA), primero se analizó si cada variable cumplía con los supuestos del modelo de homogeneidad de varianza y normalidad, utilizando la prueba de Levene y la prueba de Shapiro-Wilk, respectivamente (INFOSTAT). Cuando estos supuestos no fueron satisfechos, los datos se transformaron según la función matemática más adecuada. En el caso de la expresión transcripcional se

transformaron por el logaritmo (en base 2). Luego los datos fueron analizados según el modelo de ANOVA para DBCA bifactorial y se realizó un test de comparaciones múltiples, Tukey (α 0,05).

4.7. Resultados

4.7.1. Caracterización del material estudiado

En esta sección se describirán los resultados correspondientes al Experimento 2, el cual se realizó para determinar el efecto del momento del llenado sobre la respuesta a la herbivoría generada por *Nezara viridula*. El primer paso fue determinar las características morfológicas de los granos en crecimiento en cuanto al peso seco (en mg) y su tamaño (largo, ancho y espesor, en mm). Como se puede observar en la Figura 4-9, los tres estadios dentro del llenado en los cuales se realizaron los tratamientos de herbivoría fueron significativamente diferentes entre sí (valor $p < 0,0001$, ANOVA).

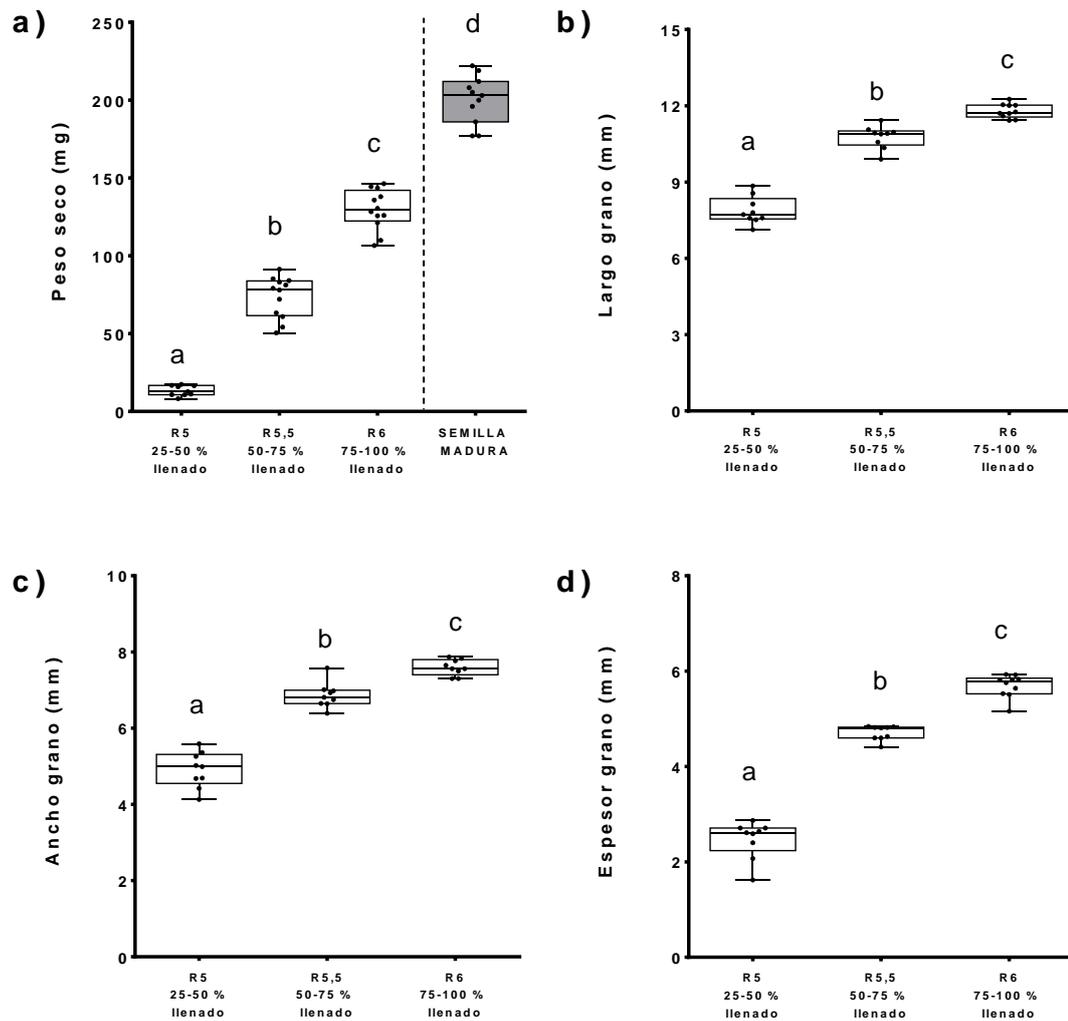


Figura 4-9: Características morfológicas de los granos en cada momento de muestreo. a) Peso seco (mg), b) Largo (mm), c) ancho (mm) y d) Espesor (mm). Las líneas medias de las cajas representan la media y los bigotes el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, se tomaron los valores de concentración de ARN mensajero y proteína soluble total de las determinaciones de expresión transcripcional y actividad enzimática, respectivamente, para todos los tratamientos dentro de cada momento del llenado. De esta manera se puede observar que a medida que los granos se fueron llenando la concentración de proteína soluble (Figura 4-10, a) aumentó mientras que la concentración de ARNm (Figura 4-10, b) disminuyó. Estos resultados preliminares indicaron diferentes escenarios celulares estadísticamente significativos ($p < 0,05$), por lo

cual en el caso de las actividades enzimáticas o de inhibidores de proteasas, ambas variables fueron relativizadas a la cantidad de proteína soluble. Mientras que el caso de la expresión transcripcional cada momento del llenado se relativizó a su control de tratamiento.

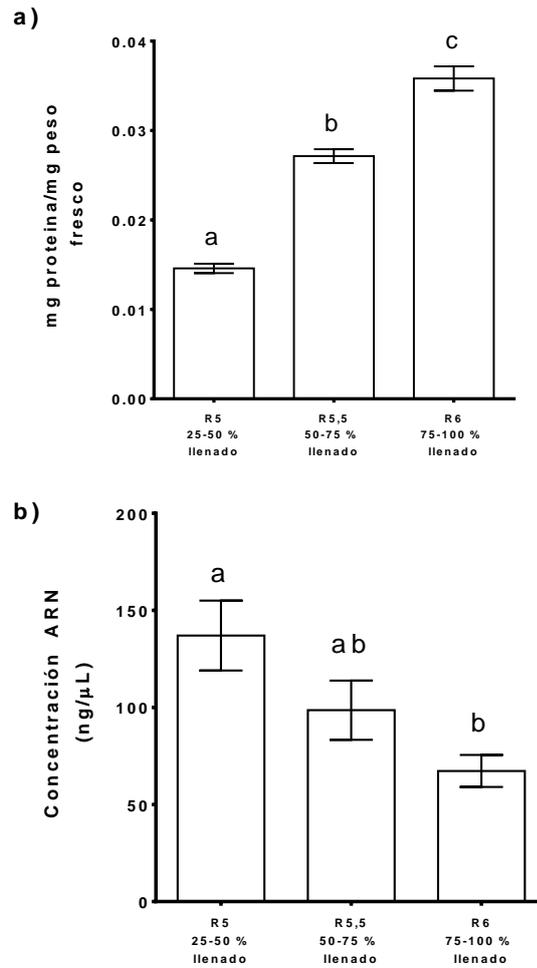


Figura 4-10: a) Concentración de proteína soluble total (mg proteína/mg peso) y b) concentración ARN mensajero (ng/μL) en los distintos momentos del llenado. Las barras representan la media y el error experimental. Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.7.2. Respuesta de las lipoxigenasas a la herbivoría a lo largo del llenado de los granos

Para saber si la regulación de las defensas antiherbívoro se modifica a lo largo del llenado de los granos, se analizaron los niveles de transcriptos y actividad de las tres enzimas lipoxigenasas LOX1, LOX2 y LOX3, bajo la hipótesis planteada en la cual se establecía que la respuesta defensiva sería mayor en momentos tempranos del llenado (25-50% del llenado), comparado con estadíos más avanzados cercanos al comienzo de la madurez (75-100 % del llenado).

En la Figura 4-11 a, se puede observar que el gen *LOX1* se indujo significativamente luego de la herbivoría, pero de manera diferencial de acuerdo al estado del llenado. El análisis estadístico demostró la interacción significativa entre factores (valor p_{O*H} 0,0001). Mientras que en el estadío R5 no se observaron cambios en los niveles de transcripto, en R5.5 y R6 la herbivoría provocó un aumento de la expresión, encontrándose la mayor inducción luego de 24 hs del daño de chinche en R5.5. Estos resultados fueron similares a lo detectado en la actividad enzimática de LOX1 (Figura 4-11, b), en donde la actividad basal (control) se mantiene a lo largo del llenado mientras que los tratamientos con chinches provocaron un aumento de la actividad, que perdura hasta las 72 hs (en el caso de R6). En el Cuadro 4-4 se detallan los valores de la media, error estándar, valor p y nivel de significancia para cada tratamiento.

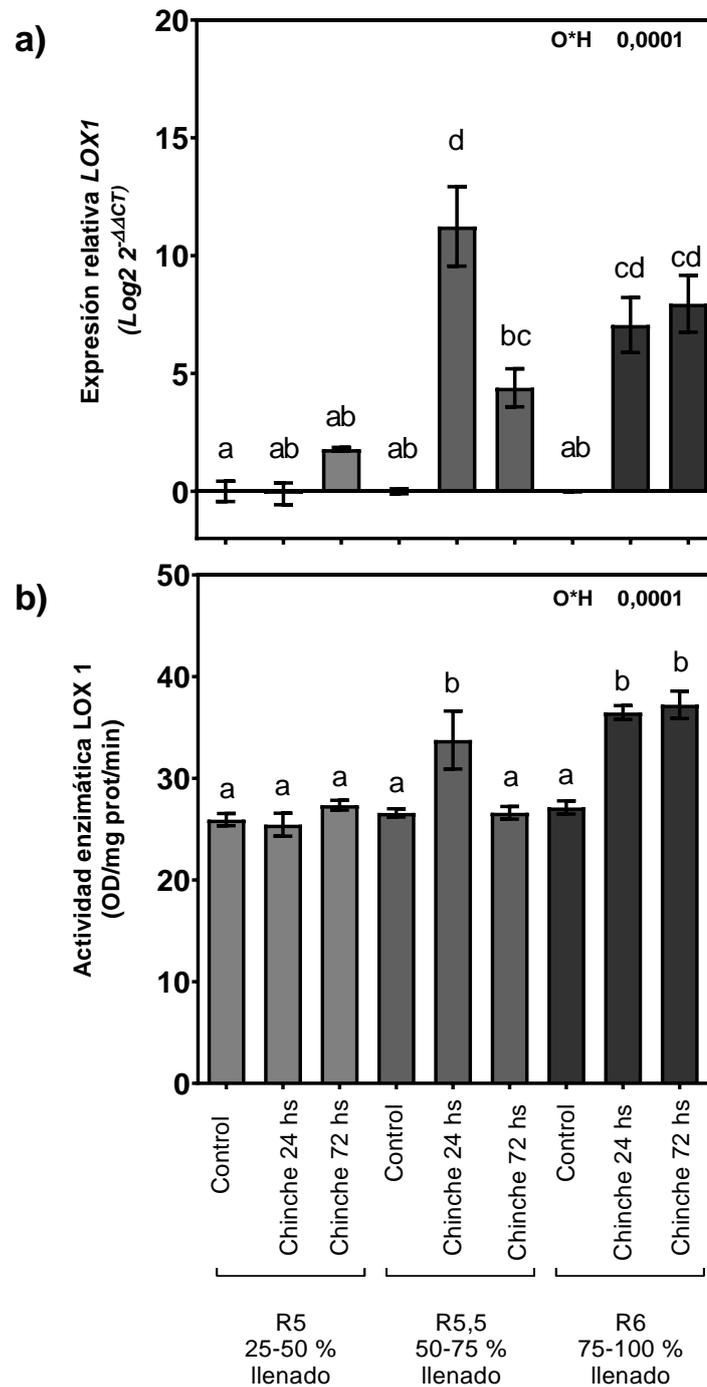


Figura 4-11: a) Expresión transcripcional y b) actividad enzimática de LOX 1 luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para el caso del gen *LOX2*, se observó un patrón similar a *LOX1* en cuanto a la expresión transcripcional, donde las respuestas fueron diferentes de acuerdo con el momento del llenado (Figura 4-12, a). En R5 la expresión no cambió luego de los

tratamientos con chinches mientras que el R5.5 y en R6 la herbivoría generó un aumento significativo luego de las 24 hs. Solo en R6 se encontró que dichos niveles se mantuvieron hasta las 72 hs. En cuanto a la actividad de LOX2, se encontró que a medida que avanza el llenado de los granos, los niveles basales de esta enzima aumentan (valor $p_0 < 0,0001$) diferenciándose el estadio R5 del R6. Por otro lado, dentro de cada estadio, el daño de chinches provocó un aumento de la actividad de LOX2 a las 72 hs de aplicados los tratamientos (Figura 4-12, b). En el Cuadro 4-4 se detallan los valores de la media, error estándar, valor p y nivel de significancia para cada tratamiento.

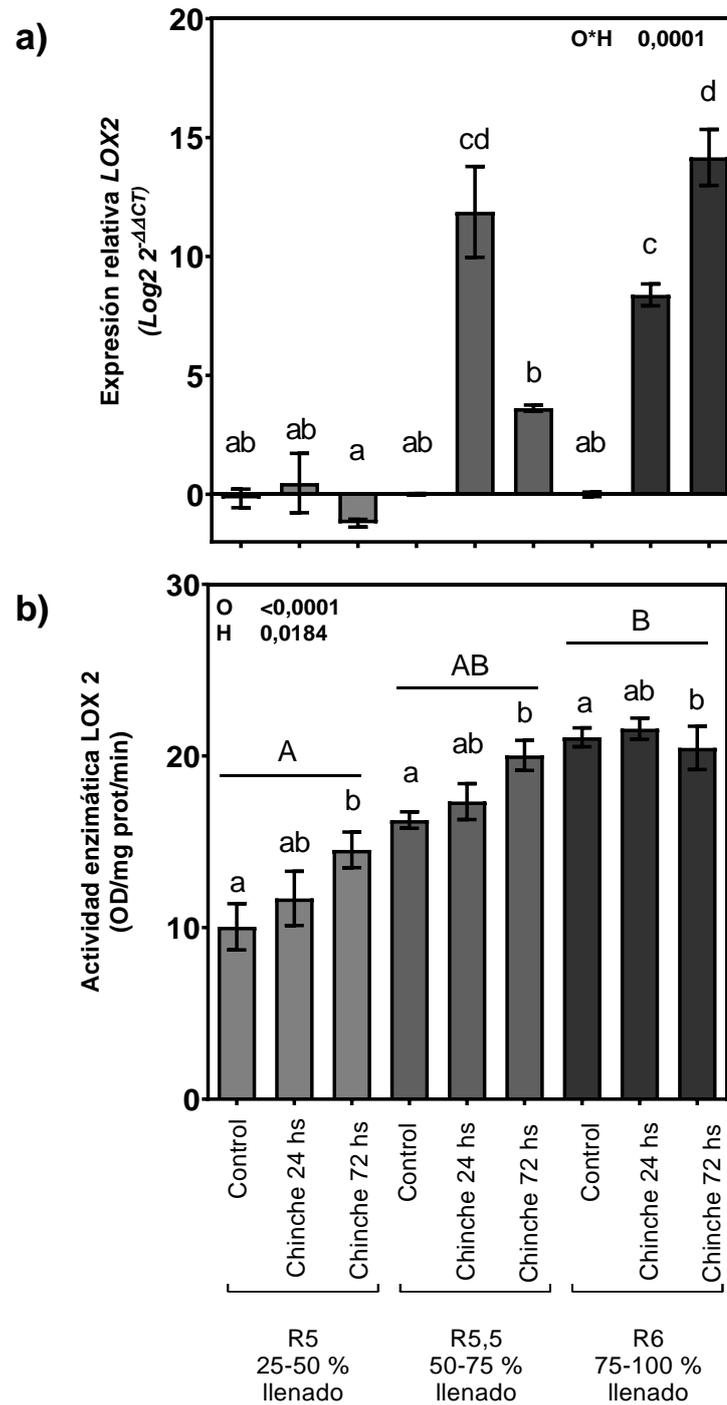


Figura 4-12: a) Expresión transcripcional y b) actividad enzimática de LOX 2 luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de ontogenia (O) mientras que letras minúsculas indican diferencias entre los niveles de herbivoría (H).

Por último, la expresión del gen *LOX3* se vio modulada de manera diferencial dependiendo del momento del llenado (Figura 4-13, a). Al comienzo del llenado (R5) la herbivoría no generó cambios en los niveles de expresión de *LOX3*. Sin embargo, en estadíos más avanzados del llenado la inducción se hizo evidente observándose un aumento luego de las 24 hs del daño de chinche en R5.5 y en R6, siendo este último estadío en el cual se encontró que los niveles de inducción fueron mayores y se mantuvieron hasta las 72 hs de la herbivoría. Respecto a la actividad enzimática, si bien hubo interacción entre factores (valor p_{O*H} 0,009), se puede observar que la actividad de *LOX3* aumentó a medida que avanza el llenado y que la herbivoría provocó un aumento significativo de su actividad hacia finales del llenado (R6) (Figura 4-13, b). En el Cuadro 4-4 se detallan los valores de la media, error estándar, valor p y nivel de significancia para cada tratamiento.

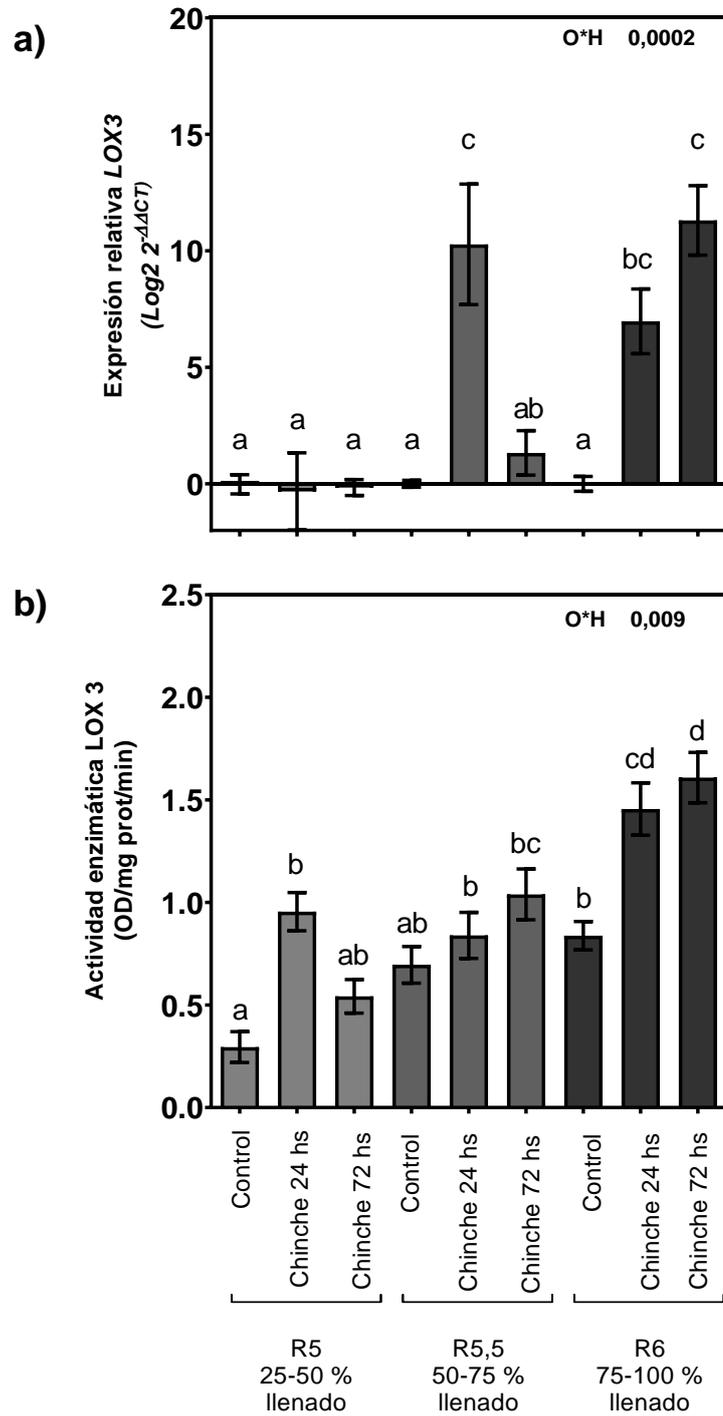


Figura 4-13: a) Expresión transcripcional y b) actividad enzimática de LOX3 luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuadro 4-4: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para la expresión y actividad de lipoxigenasas, letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.

Expresión de LOX1	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,55087	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	-0,46	0,34	1,79	6,70E-07	11,24	4,39	1,00E-06	7,06	7,96
	Error: 2,4547 gl: 16	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		E.E.	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Sig.		A	AB	AB	AB	D	BC	AB	CD	CD	
Expresión de LOX2	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,63824	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	-1,70E-01	0,47	-1,21	3,3E-09	11,87	3,62	0,00E+00	8,39	14,16
	Error: 2,5499 gl: 16	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		E.E.	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
Sig.		AB	AB	A	AB	CD	B	AB	C	D	
Expresión de LOX3	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,55087	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	-0,02	-0,33	-0,16	0	10,28	1,33	-3,30E-08	6,97	11,3
	Error: 2,4547 gl: 16	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		E.E.	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32	1,32
Sig.		A	A	A	A	C	AB	A	BC	C	
Actividad de LOX 1	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,94606	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	19,45	25,43	27,36	26,6	33,76	26,61	27,13	36,47	37,23
	Error: 11,0957 gl: 36	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		E.E.	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49	1,49
Sig.		A	AB	BC	B	CD	B	BC	D	D	
Actividad de LOX 2	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,07597	Ontogenia	R5	R5.5	R6	Herbivoría			CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	12,09	17,88	21,05	Medias			15,8	16,88	18,34
		n	15	15	15	n			15	15	15
	Error: 5,4100 gl: 36	E.E.	0,6	0,6	0,6	E.E.			0,6	0,6	0,6
		Sig.	A	B	C	Sig.			A	A B	B
Actividad de LOX 3	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,47435	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	0,29	0,96	0,54	0,7	0,84	1,04	0,84	1,46	1,61
	Error: 0,0517 gl: 36	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		E.E.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sig.		A	BC	AB	ABC	BC	CD	BC	DE	E	

4.7.3. Modulación de las vías del etileno y del ácido salicílico durante el llenado

Así como se determinaron los niveles de expresión de lipoxigenasas, se analizó la expresión de genes relacionados a la transducción de señales del etileno y del ácido salicílico: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (*ACC*) y proteína sensible al salicílico (*PRI*), respectivamente. En el caso de *ACC* se encontró que el daño de chinches provoca un aumento de la expresión que es mayor a las 24 hs en todos los estadíos del llenado (valor p 0,0058) y a su vez, dichas inducciones aumentan a lo largo del llenado, encontrándose los mayores niveles en el estadío R6 (valor $pH < 0,0001$) (Figura 4-15).

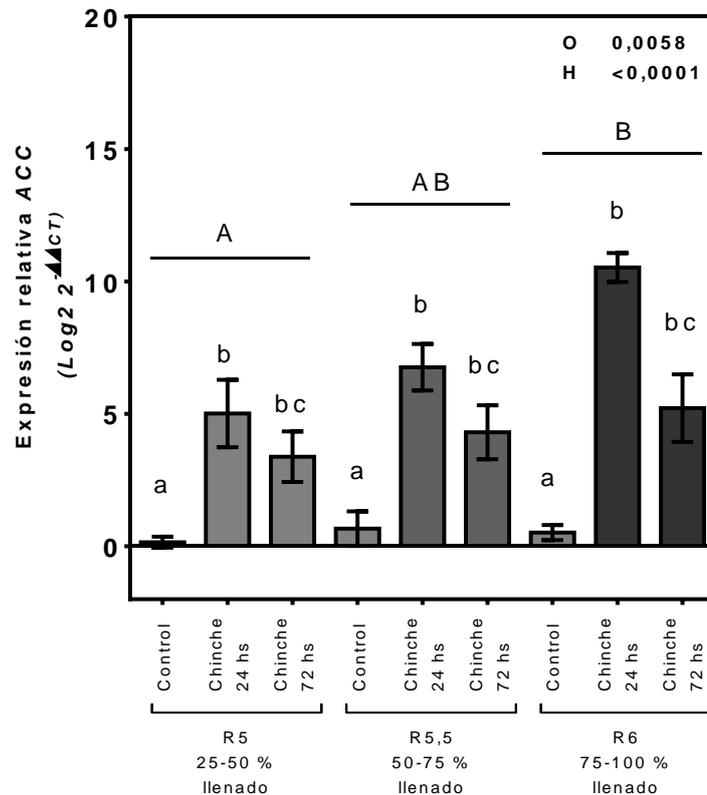


Figura 4-14: Expresión transcripcional de 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de ontogenia (O) mientras que letras minúsculas indican diferencias entre los niveles de herbivoría (H).

Por otro lado, la expresión transcripcional de *PR1* fue modulada de manera similar pero los mayores niveles de inducción tras la herbivoría se encontraron en R6 (valor p_{O*H} 0,0277), sin embargo, la respuesta frente a chinches evidencio un patrón similar en los tres momentos, un pico a las 24 hs que luego desaparece a las 72 hs, a excepción del estadio R6 en el cual se mantuvo diferenciado de la situación control (Figura 4-15). En los Cuadro 4-5 y Cuadro 4-6 se detallan los valores de la media, error estándar, valor p y nivel de significancia para cada tratamiento.

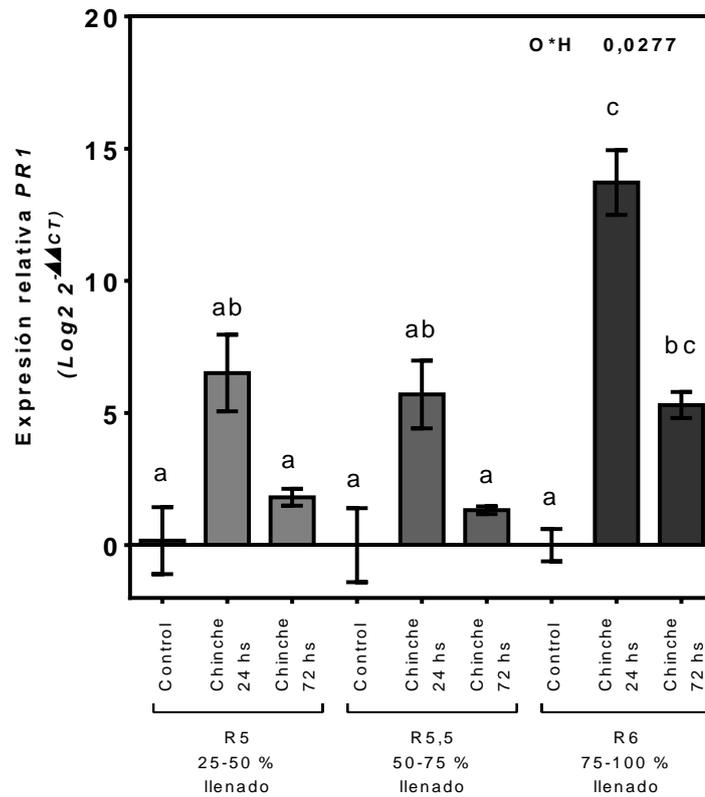


Figura 4-15: Expresión transcripcional de proteína sensible al salicílico (*PR1*) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Cuadro 4-5: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para el gen *ACC*, letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.

Expresión de ACC	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,78774	Ontogenia	R5	R5.5	R6	Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	2,8	3,91	5,42	Medias	0,4	4,3	7,43
		n	9	9	9	n	9	9	9
	Error: 2,1601 gl: 16	E.E.	0,49	0,49	0,49	E.E.	0,49	0,49	0,49
	Sig.	A	AB	B	Sig.	A	B	C	

Cuadro 4-6: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para el gen *PR1*, letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.

Expresión de PR1	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,61324	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	0,17	6,51	1,81	-6,70E-07	5,7	1,32	0	13,72	8,74
	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	Error: 5,1837 gl: 16	E.E.	1,31	1,31	1,31	1,31	1,31	1,31	1,31	1,31	
	Sig.	A	AB	A	A	AB	A	A	A	C	BC

4.7.4. Producción de defensas inducidas durante el llenado: CPI y TPI

Hasta ahora se ha descrito la respuesta de la expresión de genes vinculados a la vía de las lipoxigenasas frente al daño provocado por *Nezara viridula*. Ahora bien, para determinar si existe un efecto del momento del llenado y la herbivoría sobre la producción de defensas, se evaluaron la expresión y actividad de los dos tipos de inhibidores de proteasas estudiados anteriormente en el capítulo 3: CPI y TPI.

- Inhibidores de cisteín proteasas (CPI)

En la Figura 4-16 se puede observar la respuesta encontrada para distintos genes que codifican para inhibidores de cisteín proteasas (*N2*, *R1* y *LI*). Luego de realizado el experimento descrito en 4.6.2, se encontró que los tres genes responden de manera diferencial a lo largo del llenado. Los niveles de expresión de *N2* no se vieron modificados por el momento del llenado (valor p_O 0,3609) mientras que la herbivoría provocó un aumento significativo de la expresión de igual magnitud en los tres momentos (valor p_H 0,0001) (Figura 4-16, a). Distinta fue la respuesta de *R1* que no mostró cambios en su expresión a lo largo del llenado y tras la herbivoría, a excepción del estadio R6, momento en el cuál los niveles de transcritos fueron significativamente mayores luego del daño de chinches (siendo mayor a las 24 hs, valor $p_{O*H} < 0,0001$) (Figura 4-16, b). Por último, dependiendo del momento del llenado (valor p_O 0,0416), la respuesta a la herbivoría (valor p_H 0,053) fue distinta para el gen *LI*. En R5 el daño de chinches provocó un aumento de la expresión luego de 24 hs, efecto que desapareció a las 72 hs. En R5.5 y R6 se observó el mismo patrón de inducción, donde el efecto de la herbivoría se halló a las 72 hs, alcanzando el mayor nivel de expresión en el estadio R6 (Figura 4-16, c). La actividad de los CPI disminuyó a lo largo del llenado (valor $p_O < 0,0001$). Sin embargo, la herbivoría indujo la producción de estas defensas desde las 24 hs que se

mantuvo hasta las 72 hs en todos los momentos del llenado (valor p_H 0,0001) (Figura 4-16, d). Los Cuadro 4-7 y Cuadro 4-8 se detallan los valores de la media, error estándar, valor p y nivel de significancia para cada tratamiento.

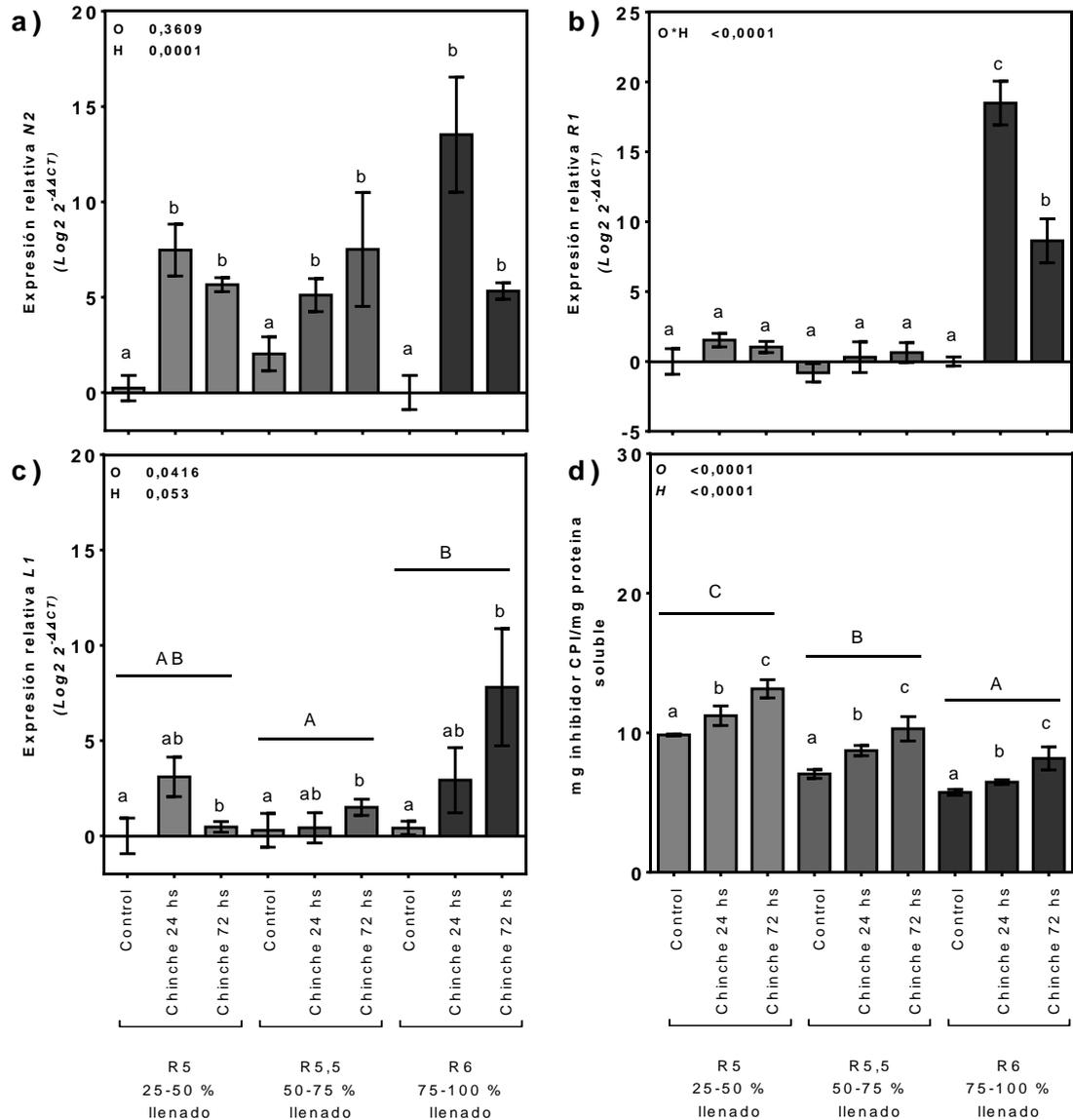


Figura 4-16: Expresión transcripcional de los inhibidores de cisteín proteasas a) *N2*, b) *R1* y c) *L1* y d) actividad de inhibidores de cisteín proteasas luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de ontogenia (O) mientras que letras minúsculas indican diferencias entre los niveles de herbivoría (H).

Cuadro 4-7: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para los genes *N2* y *R1*, letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores *p* y nivel de significancia.

Expresión de <i>N2</i>	Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=9,89312	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	0,23	7,47	5,66	2,03	5,11	7,51	6,70E-08	13,52	5,33
		n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Error: 7,5843 gl: 16	E.E.	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59	1,59
		Sig.	A	AB	AB	A	AB	AB	A	B	AB
Expresión de <i>R1</i>		Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,98962	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6
	Herbivoría		CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	2,70E-07	1,53	1,04	-0,81	0,3	0,63	1,70E-08	18,49	8,63
		n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Error: 2,9508 gl: 16	E.E.	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
		Sig.	A	A	A	A	A	A	A	C	B

Cuadro 4-8: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para el gen *L1* y actividad de CPI, letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores *p* y nivel de significancia. “*” implica que los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.

Expresión de <i>L1</i>	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,96074	Ontogenia	R5	R5.5	R6	Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	1,19	0,74	3,71	Medias	0,24	2,15	3,26
		n	9	9	9	n	9	9	9
	Error: 5,9246 gl: 16	E.E.	0,81	0,81	0,81	E.E.	0,81	0,81	0,81
		Sig.	AB	A	B	Sig.	A	AB	B
Actividad de CPI*	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16133	Ontogenia	R5	R5.5	R6	Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72
		Medias	3,38	2,91	2,54	Medias	2,73	2,93	3,24
		n	15	13	14	n	15	14	13
	Error: 0,0298 gl: 29	E.E.	0,04	0,05	0,05	E.E.	0,04	0,05	0,05
		Sig.	C	B	A	Sig.	A	B	C

- Inhibidores de tripsin proteasas (TPI)

En la Figura 4-17, se puede observar la respuesta TPI a los tratamientos de herbivoría en los distintos momentos del llenado. Dentro del grupo de los inhibidores del tipo kunitz (gen *Kz*) se encontró una fuerte inducción de la expresión luego de las 72 hs del daño de chinche y dicha inducción aumentó a medida que avanza el llenado, alcanzando el mayor nivel de inducción en el estadio R6 (Figura 4-17, a). Por otro lado, dentro del grupo de los inhibidores del tipo Bowman-Birk (gen *BBCII*) se encontró que la respuesta frente a la herbivoría depende del momento del llenado en que ocurra (valor p_{O*H} 0,0039). Al principio del llenado, la herbivoría provoca un aumento de la expresión de *BBCII* a las 72 hs mientras que en R5.5 dicha inducción aparece a las 24 hs y desaparece en R6, en donde no se detectó efecto de la herbivoría (Figura 4-17, b).

La actividad TPI en el control (sin daño) no se modificó a lo largo del llenado, pero si fue distinta la respuesta frente a la herbivoría en cada estadio (valor p_{O*H} 0,0207) donde la mayor diferencia respecto al control se detectó en R5 luego de las 24 y 72 hs. Una respuesta diferente se encontró en los siguientes estadios (R5.5 y R6) donde a las 72 hs no se mantuvo en el mismo nivel la actividad de TPI, como ocurre en R5 (Figura 4-17, c).

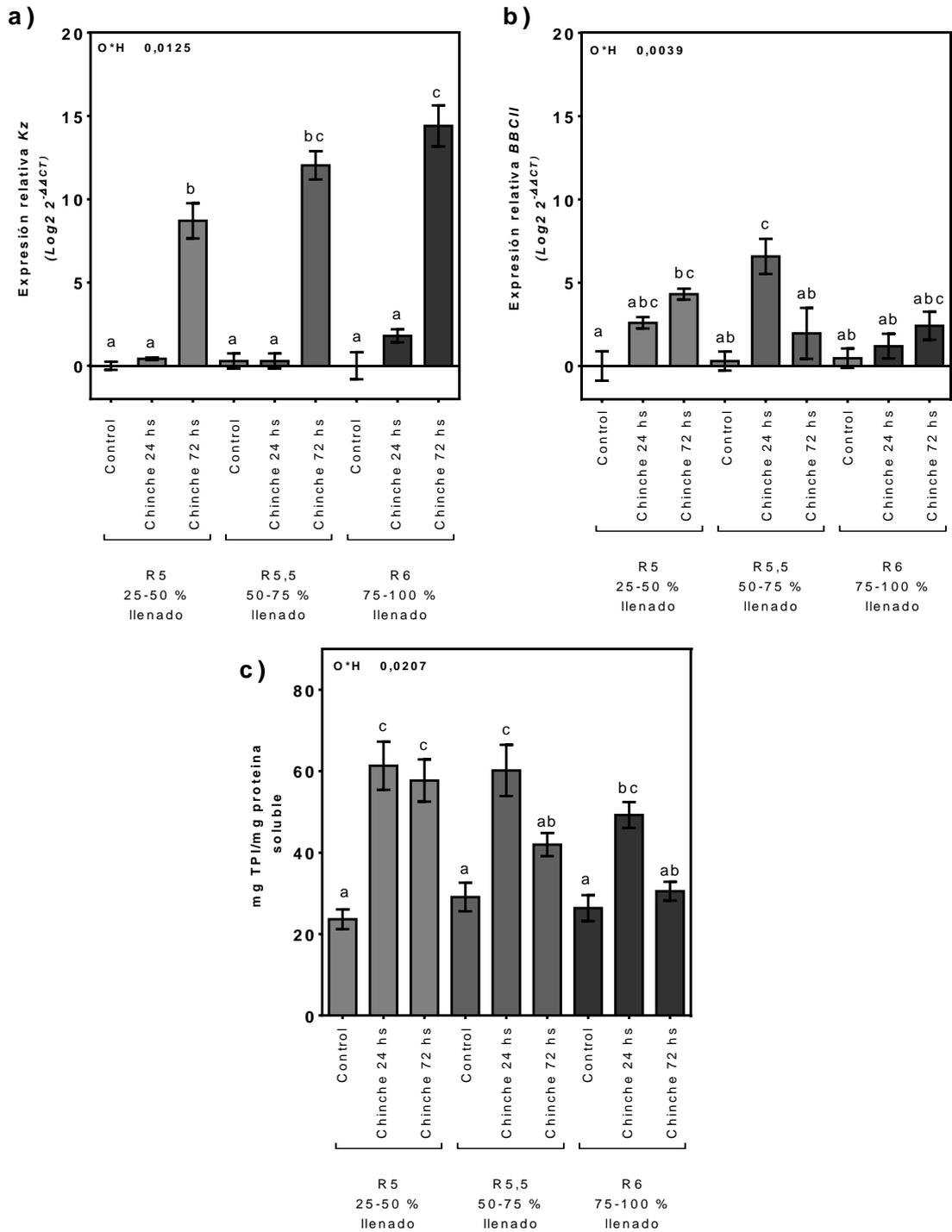


Figura 4-17: Expresión transcripcional de los inhibidores de tripsin proteasas a) *Kz*, b) *BBCII* y c) concentración de inhibidores de tripsin proteasas luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs y chinche 72 hs) en cada momento de ontogenia (O: R5; R5.5 y R6). Se realizó un ANOVA seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de ontogenia (O) mientras que letras minúsculas indican diferencias entre los niveles de herbivoría (H).

Cuadro 4-9: Resumen del análisis estadístico ANOVA seguido del Test de comparación múltiple Tukey para los genes *Kz* y *BBCII* y la actividad de TPI, letras diferentes significan diferencias significativas. Para cada variable se detalla la media, Error Estándar (EE), los valores p y nivel de significancia.

Expresión de <i>Kz</i>	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,65363	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
	Medias	3,30E-08	0,42	8,71	0,28	0,28	12,04	6,30E-08	1,8	14,41	
	Error: 1,5822 gl: 16	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	E.E.	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73
Expresión de <i>BBCII</i>	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,98962	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
	Medias	1,00E-07	2,59	4,31	0,29	6,58	1,96	0,47	1,19	3,23	
	Error: 2,9508 gl: 16	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	E.E.	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
Actividad de TPI	Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=19,97632	Ontogenia	R5	R5	R5	R5.5	R5.5	R5.5	R6	R6	R6
		Herbivoría	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72	CONTROL	CH 24	CH 72
	Medias	23,64	61,36	57,74	29,11	60,2	41,99	26,37	49,25	30,56	
	Error: 90,3848 gl: 32	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	E.E.	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25	4,25
Sig.	A	C	C	A	C	ABC	A	BC	AB		

4.8. Discusión

Con el llenado de los granos comienza la acumulación de proteínas y aceites de reserva (Li et al., 2015). A su vez, los granos pierden gradualmente humedad en el proceso llamado desecación, regulado hormonalmente por el etileno (Collakova et al., 2013). De esta manera, la calidad del alimento con el que se encuentran las chinches va modificándose a medida que avanza el llenado. Molina y Trumper (2012) han demostrado que el tiempo de alimentación de las chinches esta positivamente correlacionado al daño ocasionado y que a su vez tanto adultos como ninfas prefieren vainas jóvenes (R4-R6) en comparación a vainas maduras (R7-R8). Las vainas maduras contienen mayor pilosidad y son más resistentes al daño mecánico debido al mayor contenido de lignina (Capeleti et al., 2005). Por dicha razón, los insectos deben realizar más pruebas (más picaduras) y desplazarse durante más tiempo alrededor de la vaina hasta encontrar un sitio donde picar. Esta inversión de tiempo reduce el tiempo disponible para la alimentación propiamente dicha, por eso se observan más picaduras en vainas maduras comparando con vainas jóvenes, donde el daño puede ser mayor debido al

tiempo que los insectos permanecen en un mismo sitio alimentándose (Molina y Trumper, 2012).

Las plantas han desarrollado sistemas de defensas muy sofisticados para hacer frente a la gran diversidad de amenazas que deben enfrentar a lo largo de su ciclo de vida. Al comienzo del llenado las vainas acumulan proteínas de reserva (VSP, del inglés *vegetative storage protein*). Dichas proteínas fueron identificadas como lipoxigenasas acumuladas en vacuolas. Esta acumulación es transitoria y ocurre por el exceso de nitrógeno que hay en las hojas debido a alta tasa de fotosíntesis (fijación de CO₂ y asimilación de nitrógeno), quedando disponibles para ser utilizadas en el crecimiento del fruto (Franceschi y Giaquinta, 1983; Bunker et al., 1995). Por otro lado, varios estudios han reportado el aumento de la actividad de las lipoxigenasas a medida que los tejidos senescen (ej. Grossman y Leshem, 1978; Thompson et al., 1987; Tanteeratarm et al., 1989; Gregorio et al., 2000; Zhang et al., 2022). Si bien no es clara la función específica de estas enzimas durante la senescencia, una posible respuesta es que son capaces de neutralizar a las especies reactivas de oxígeno (anión superóxido principalmente) generadas por la ruptura de membranas celulares (Parkhey et al., 2012).

Los resultados alcanzados en este capítulo aportan nuevos conocimientos acerca de la dinámica de las lipoxigenasas en granos de soja en el crecimiento, ya que se demuestra que los niveles de enzimas LOX aumentan con el avance del llenado. La subrama 13-LOX, representada por LOX1, se indujo luego de la herbivoría a partir de R5.5 hasta R6, mientras que la vía 9-LOX, representada por LOX3, aumentó sus niveles constitutivos desde R5 hasta R6 pero, a su vez, fue inducida por el daño de chinches desde comienzo del llenado hasta fin del mismo. LOX 2, 13/9-LOX, se comportó como la suma de ambas vías, es decir, se observó un aumento de los niveles constitutivos y se mantuvo la inducción frente a la herbivoría. Por otro lado, estos resultados permiten

jerarquizar en función de la importancia fisiológica frente a respuesta defensiva de la siguiente manera: LOX1>LOX2>LOX3, como se puede observar en los valores de actividad enzimática de las Figuras 4.11, 12 y 13.

Respecto al impacto de estas diferencias en los niveles de genes *LOX* durante el llenado sobre la regulación de las defensas, se encontró que si bien la expresión transcripcional de los inhibidores de proteasas (*N2*, *R1*, *L1*, *Kz* y *BBCII*) aumentó a lo largo del llenado, la actividad de inhibidores parece verse afectada de manera inversa. Los niveles constitutivos de TPI se mantuvieron iguales en los tres estadíos analizados pero la inducción luego de la herbivoría mostró diferencias, tales como mantenerse hasta las 72 hs posteriores al daño (R5) y solo mantenerse hasta las 24 hs (R5.5 y R6). Los niveles constitutivos de CPI, en cambio, disminuyeron a lo largo del llenado, pero dentro de cada estadío, el daño de chinches tuvo el mismo efecto, es decir, provocó un aumento de la actividad tanto a las 24 como a las 72 hs.

Las proteasas digestivas predominantes en el tracto digestivo de *N. viridula* pertenecen al grupo de las catepsinas (cisteín proteasas) (Sardoy et al., 2021). A su vez los granos de soja contienen inhibidores de proteasas que representan el 6 % de las proteínas totales (Duffey y Stout, 1996), de los cuales los CPI representan a un tipo de inhibidores que se llaman competitivos, es decir, que compiten con las proteínas o polipéptidos por el sitio activo de las cisteín proteasas y su efecto puede contrarrestarse aumentando la concentración de proteínas blanco (es decir, las proteínas que al ser degradadas liberan aminoácidos esenciales para los insectos). El tipo de alimento con el que se encuentran las chinches al colonizar el cultivo de soja sería peor que con el que se encuentran las generaciones siguientes dentro de la misma campaña, ya que al principio del llenado los niveles de CPI son mayores y los de proteína soluble menores (resultando una mayor concentración relativa) mientras que hacia fin del llenado los niveles de CPI

son menores, debido a un efecto de dilución por una mayor acumulación de proteínas solubles y totales (Li et al., 2015). Esta razón podría estar explicando por qué a pesar de la inducción de la respuesta defensiva, las chinches logran alimentarse exitosamente de los granos de soja.

4.9. Conclusiones

La hipótesis planteada en este capítulo establecía que en estados de desarrollo iniciales la herbivoría por *Nezara viridula* provocaría una inducción de la vía de las LOX mucho mayor que en estadios más avanzados en el desarrollo de la semilla. Las diferencias que se encontraron en la expresión de genes *LOX* y la actividad de las enzimas LOX estuvieron asociadas al momento del llenado, siendo mayores hacia el final del mismo, rechazando la hipótesis inicial y alcanzando objetivo de determinar el efecto del momento del llenado de los granos sobre la respuesta a la herbivoría.

Asimismo, la segunda parte del objetivo planteado fue determinar el efecto del estado del llenado sobre la producción de defensas. Se esperaba que, al comienzo del llenado, los granos de soja fueran más sensibles al daño de chinches y por lo tanto la respuesta defensiva fuera mayor, respecto a estados más avanzados el llenado. Si bien la señalización hormonal parece haber sido mayor hacia el final del llenado, la actividad de los inhibidores de proteasas fue mayor en R5 (comienzo del llenado) que en R6 (final del llenado), aceptándose parcialmente la hipótesis planteada.

Capítulo 5: “Caracterización de la respuesta a las chinches en genotipos carentes de LOX”

5. “Caracterización de la respuesta a las chinches en genotipos carentes de LOX”

5.1. Uso de mutantes en estudios de la respuesta antiherbívoro

Las modificaciones genéticas para interferir en la producción de LOX ha dado como resultado una reducción en la emisión de compuestos volátiles, en la expresión de genes de defensa, en la atracción de parasitoides y un aumento del daño en las plantas en varias especies: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana attenuata* y *Solanum tuberosum*, entre otras (Royo et al., 1999; Kessler et al., 2004; Van Poecke y Dicke, 2004). El uso de plantas transgénicas ha sido crucial para el entendimiento de estas respuestas. De esta manera se ha encontrado que la supresión de la expresión de genes *LOX* se traduce en una disminución en la emisión de compuestos volátiles y en la producción de inhibidores de proteasas (Ferrie et al., 1994; Griffiths et al., 1999; León et al., 2002; Chen et al., 2004). El uso de mutantes de especies modelo, como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* y *Nicotiana attenuata* han permitido caracterizar bioquímica y molecularmente la síntesis de jasmónico, así como descubrir su rol fundamental en la regulación de defensas contra herbívoros y patógenos necrotróficos (Howe, 2004; Browse, 2009; Zhai et al., 2017).

5.2. Calidad de granos de soja para la industria alimentaria

En soja existen numerosos trabajos que han buscado reducir la actividad de las lipoxigenasas de semillas debido que al oxidar ácidos grasos poliinsaturados (preferentemente linoleico y linolénico) producen hidroperóxidos conjugados que se convierten en compuestos volátiles asociados con sabor desagradable, afectando el consumo humano de los aceites y proteínas (Start et al., 1986; Song et al., 1990; Brash, 1999; Liavonchanka y Feussner, 2006).

En la industria alimentaria, tratamientos como calor, microondas y extracción con solventes orgánicos han sido utilizados para eliminar dichas características indeseables en los subproductos de soja (aceites, leche, tofu) aumentando los costos de producción (Nishiba et al., 1995) y la solubilidad y actividad de las proteínas (MacLeod y Ames, 1988). De las tres isoenzimas de semillas, LOX2 ha sido identificada como la responsable más importante en el proceso de pérdida de calidad (Hildebrand y Kito, 1984; Davies et al., 1987; Moreira et al., 1993). La eliminación genética de lipoxigenasas fue un camino para resolver esta problemática, sin afectar los rasgos asociados al rendimiento (número y peso de los granos) (Martins et al., 2002; Wang et al., 2020). Rawal et al (2020) demostraron que la eliminación del gen *LOX2* de granos de soja realizando introgresiones de una variedad comercial con una línea recesiva *lox2lox2* fue posible de manera exitosa sin afectar los rasgos de interés del cultivo, como días a floración, días a madurez, peso y número de granos, rendimiento, contenido de proteínas y a su vez, mejorando la longevidad de las semillas.

5.3. Herramientas biotecnológicas en el control de plagas

Hasta el día de hoy existen herramientas biotecnológicas para el control de lepidópteros en maíz, como barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) e isoca de la espiga (*Helicoverpa zea*) y en soja, como oruga militar (*Spodoptera frugiperda*), oruga medidora (*Rachiplusia un* y *Pseudoplusia includens*) e isoca de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*) que son controladas por la transformación genética de ambos cultivos con el gen *Bt*. Este gen codifica para una proteína tóxica para lepidópteros, producida por una bacteria llamada *Bacillus turingensis*. Esta tecnología ha sido utilizada durante más de 20 años de manera efectiva. Para el control de chinches aun no existen herramientas de este tipo, por dicha razón es

importante indagar y estudiar con qué estrategias defensivas cuenta el cultivo de soja para regular la respuesta antiherbívoro.

5.4. Compromiso entre calidad alimentaria post-cosecha y capacidad defensiva durante la producción

Varios estudios han indicado la relevancia fisiológica de la vía de las lipoxigenasas en plantas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, y sobre su rol como reguladores de la producción de defensas. Desde este punto de vista, la eliminación de las lipoxigenasas de los granos de soja se vuelve un tema controversial ya que se podría estar afectando la capacidad de respuesta frente a plagas, como las chinches, que se alimentan directamente de los granos. En la primera parte de esta tesis, se caracterizó la respuesta defensiva de un genotipo de soja de referencia (Williams) tanto en un momento específico dentro del llenado de los granos (R6) (Capítulo 4) como a lo largo del llenado (R5→R6) (Capítulo 5) y lo que se observó es que luego del daño provocado por la chinche verde, tanto la expresión como la actividad de lipoxigenasas aumenta y, a su vez esto se correlacionó con un aumento en los niveles de transcriptos y actividad de inhibidores de proteasas. Ahora bien, para definir cuál de las lipoxigenasas es la más relacionada a la regulación de las defensas frente a chinches se trabajó con tres genotipos mutantes para las isoenzimas LOX1, LOX2 y LOX3: PI408251 (mutante *lox1*), PI86023 (mutante *lox2*) y PI205085 (mutante *lox3*) (Lenis et al., 2010) de manera de poder evaluar si existe una enzima más importante para regular dicha respuesta.

5.5. Objetivos e hipótesis

El objetivo de este capítulo fue determinar si la ausencia de lipoxigenasas aumenta la susceptibilidad de la soja al ataque de chinches. Las hipótesis asociadas son

que aquellas plantas de soja que no produzcan lipoxigenasas no serán capaces de producir defensas directas cuando sean dañadas por chinches y, su vez, los insectos se verán beneficiados al encontrarse con un alimento libre de compuestos antinutritivos (presentarán una mayor supervivencia).

5.6. Metodología

5.6.1. Material botánico

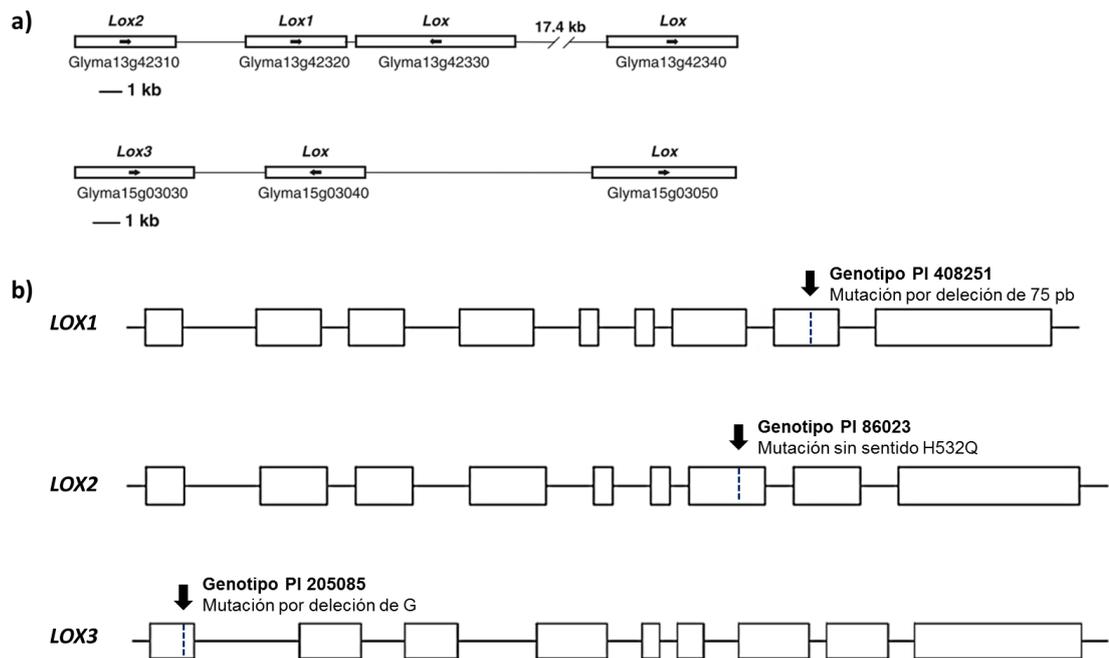
Para determinar cuál de las lipoxigenasas de semillas se encuentra vinculada a la respuesta antiherbívoro se utilizaron 4 genotipos:

- Williams 82 (*Lox1*, *Lox2*, *Lox3*): expresa normalmente los genes de cada una de las isoenzimas y es el genotipo de referencia

- PI408251 (mutante *lox1*): posee una mutación de delección de 74 pb en el exón 8, creando un codón de stop prematuro. Esto provoca que la proteína traducida se encuentre truncada y pierda funcionalidad. En Esquema 5-1, se puede observar el sitio de mutación (Lenis et al., 2010)

- PI86023 (mutante *lox2*): posee una mutación de substitución en sitio conservado rico en histidinas que no impide la expresión del gen, pero si afecta a la funcionalidad de la proteína, ya que afecta a su estructura y estabilidad (Kitamura, 1984; Wang et al., 1994)

- PI205085 (mutante *lox3*): posee una mutación por delección de una base en el exón 1, lo que provoca un cambio en el marco de lectura dando como resultado un codón de stop, por lo que la proteína también se encuentra truncada y sin funcionalidad (Lenis et al., 2010).



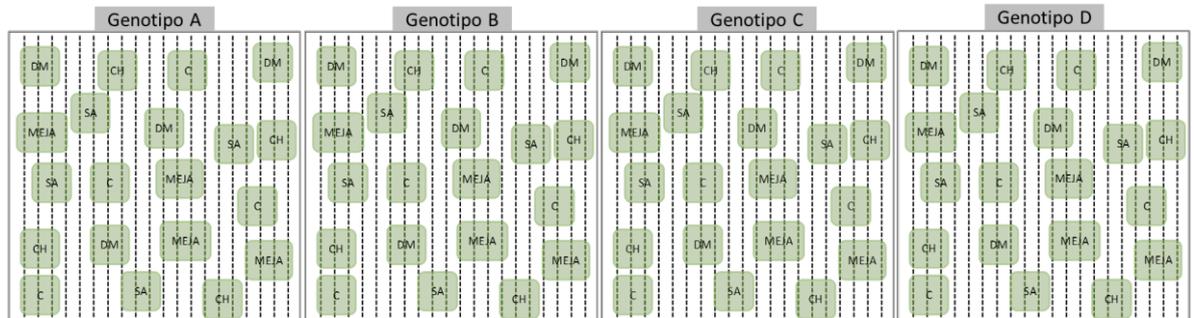
Esquema 5-1: Representación de la ubicación cromosómica de *LOX1*, *LOX2* (cromosoma 13) y *LOX3* (cromosoma 15) (a), ubicación de las mutaciones en los genes *lox1*, *lox2* y *lox3* en los genotipos mutantes utilizados en este trabajo. Se esquematiza la estructura completa de cada gen en el genotipo de referencia Williams 82. Las flechas negras indican los sitios de mutación.

5.6.2. Diseño experimental

Experimento 3

Para completar el objetivo 1 (identificar la/s enzima LOX involucrada en la regulación de las defensas en semillas de soja en crecimiento) se realizó un experimento en el cual se utilizaron los 4 genotipos descritos anteriormente. El diseño experimental respondió a un DCA (diseño completamente aleatorizado) en parcelas divididas, donde el factor genotipo se asignó al azar en parcelas mayores (4 parcelas de 6 m x 6 m) y el factor herbivoría se asignó aleatoriamente cuando las plantas se alcanzaron en el estado R6. Las condiciones de siembra, raleo y mantenimiento de las plantas hasta alcanzar el estadio R6 fueron las mismas que las descritas en la sección 2.1 del capítulo 2. De acuerdo con la finalidad de uso (análisis de expresión, actividades enzimáticas y compuestos de defensa)

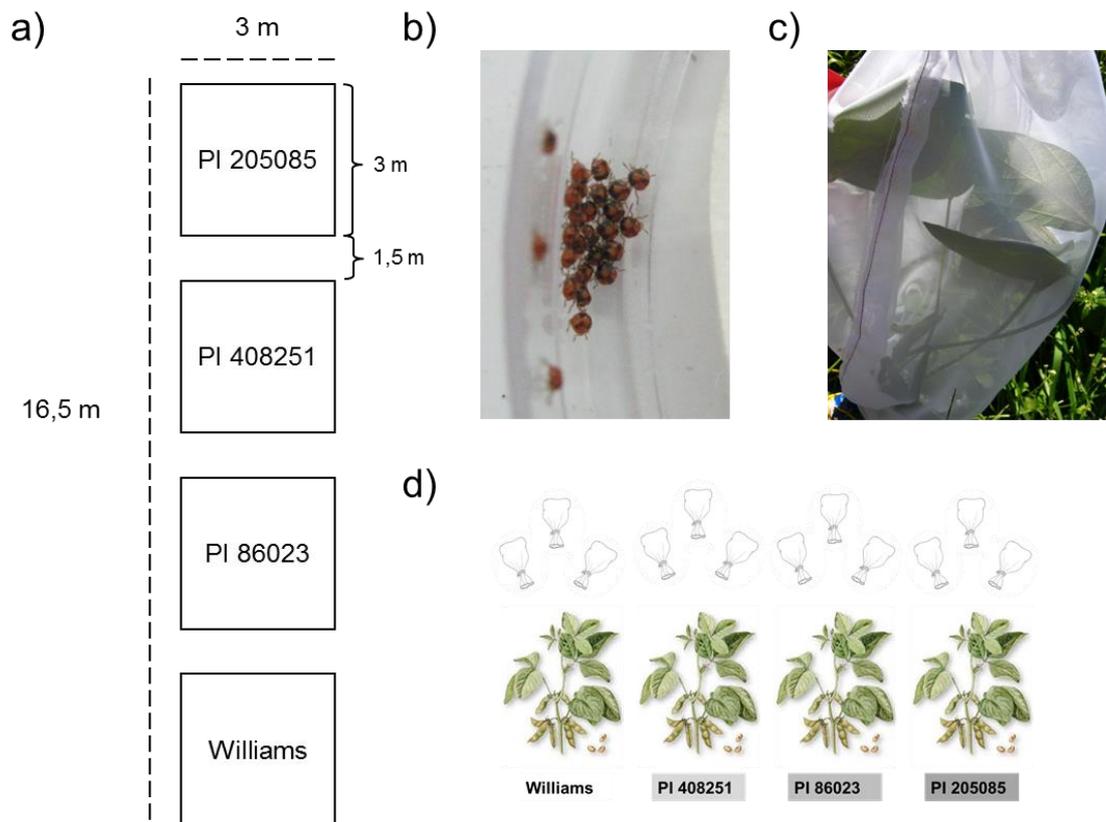
se obtuvieron 4 o 5 réplicas independientes. Las muestras extraídas fueron conservadas a -80°C para su posterior análisis (Esquema 5-2).



Esquema 5-2: Diseño experimental del experimento 3. Las parcelas grandes corresponden a cada genotipo (a modo de esquema representativo se utilizaron las etiquetas A, B, C y D). Para realizar los tratamientos se seleccionaron plantas al azar. Referencias: C: sin daño, control; DM: daño mecánico; SA: aplicación de ácido salicílico; JA: aplicación de ácido jasmónico; CH: daño por chinche durante 30 minutos a partir de la alimentación efectiva.

Experimento 4:

Para determinar los efectos de las defensas reguladas por el JA sobre el crecimiento y supervivencia de los insectos se realizó otro experimento en el cual se utilizaron plantas de los 4 genotipos que se cultivaron hasta alcanzar el estado R6. Se sembraron semillas de cada genotipo en parcelas de 3 m x 3 m (una parcela por genotipo) con las mismas condiciones de distanciamiento que los experimentos descriptos anteriormente (200 pl/parcela). Al llegar a R6 se seleccionaron 6 ramas/genotipo que fueron aisladas con bolsas de tul de 30 cm x 70 cm. En la mitad de dichas bolsas se colocaron 60 ninfas de *Nezara viridula* de 2do estadio que fueron observadas diariamente durante 4 días registrando individuos muertos y vivos (supervivencia), mientras que la otra mitad de bolsas fue reservada como control, sin ninfas. Por otro lado, al culminar con el período de observación, se cosecharon las vainas presentes en las ramas aisladas para la determinación de compuestos de defensas (inhibidores de proteasas e isoflavonoides) (Esquema 5-3).



Esquema 5-3: Experimento de supervivencia de ninfas de *Nezara viridula*. Dentro de cada parcela se sembrarán distintos genotipos (Williams y mutantes PI86023 (mutante *lox2*), PI205085 (mutante *lox3*) y PI408251 (mutante *lox1*). Se colocaron bolsas de tul para aislar las ramas y colocar dentro 60 individuos juveniles y así poder estimar la supervivencia.

Para evaluar la supervivencia de los insectos en los diferentes genotipos se realizó el Test de Supervivencia (Log-rank test) utilizando el programa PRISM 5, haciéndose un análisis global (todos contra todos). Las curvas de supervivencia se analizaron con el test Gehan-Breslow-Wilcoxon que otorga más peso a los resultados obtenidos durante los primeros días del experimento. Se eligió este análisis estadístico teniendo en cuenta que los insectos demuestran mayor sensibilidad a los agentes externos durante los primeros estadios (Zavala y Baldwin, 2004; Zavala et al., 2008b).

5.6.3. Determinación isoflavonoides

La extracción de isoflavonoides consistió de 2 etapas:

- 1) Extracción de la fase lipídica: para ello se utilizaron 0.2 g de semilla y 5 ml de ciclo hexano (100%).
- 2) Extracción de la fracción de isoflavonoides: al sobrenadante de la extracción anterior se le agregó en 2 etapas sucesivas 5 ml de metanol + rutina (estándar interno).

El solvente se evaporó en Rotavap a 40 °C. Posteriormente, el extracto se diluyó en 0.5 ml de metanol (100%) y se centrifugó durante 5 min a 10000 rpm. El sobrenadante se colocó en un vial y se realizó la cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en un equipo HPLC Agilent 1100 A series con detector UV de longitud de onda múltiple. La separación se realizó en una columna analítica Eclipse XDB-C18 4,6 x 150 mm. La fase móvil consistió en un gradiente de 15– 60% de acetonitrilo en 0.1% ácido acético durante 60 min con un flujo de 1 mL/ min y el volumen sembrado fue de 5 µl. Los compuestos fueron medidos con el detector a λ 270 nm. Los tiempos de retención y la cuantificación para rutina, genistina, daidzina, genisteína y daidzeína se obtuvieron por comparación con estándares conocidos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

5.6.4. Determinación de la expresión de genes

La metodología utilizada para estudiar la expresión de genes fue la misma que la descrita en el capítulo 4, ya que se utilizó la misma técnica PCR en tiempo real (qPCR) y los mismos métodos de cálculo. En este caso se utilizó como control de tratamiento a la expresión del genotipo Williams sin daño, es decir, los niveles de transcritos de todos los tratamientos (generados por la combinación genotipo x herbivoría) fueron relativizados a la situación control del genotipo normal, para poder comparar entre genotipos los niveles de expresión.

5.6.5. Determinación de hormonas

Para determinar el efecto de la herbivoría sobre la síntesis de hormonas en los diferentes genotipos, muestras de semillas que habían sido reservadas a -80°C fueron pulverizadas con nitrógeno líquido y liofilizadas. 10 mg de material (peso seco) fue agitado a temperatura ambiente durante 30 min en el agitador Starlab, con 1 mL de una solución de metanol:agua (7:3) que contenía 20 µg de d4-SA y d5-IAA, y 10 µg de d6-JA y d6 -ABA, como estándares internos. Las muestras fueron centrifugadas a 16.000 g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a un balón de 50 mL y evaporado en un programa de vacío rápido a 45 °C durante 2,5 h. Los extractos fueron disueltos en 100 µL de solución metanol:agua (1:1) con ácido fórmico al 0,05% , vortexeados y centrifugados a 16.000 g a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a viales de HPLC y reservado a -20 °C. Se utilizaron 5 réplicas biológicas por tratamiento. La cuantificación de fitohormonas se realizó por HPLC-MS/MS según Trapp et al. (2014) en un sistema HPLC Agilent 1100 acoplado a espectrómetro de masas (Thermo Scientific, Bremen, Alemania).

5.7. Resultados

5.7.1. Efecto de la herbivoría sobre de la expresión y actividad de lipoxigenasas en genotipos mutantes *lox*

Para saber si la presencia de lipoxigenasas en semillas de soja es crucial para la regulación de las defensas antiherbívoro, se analizaron los niveles de transcritos y actividad de LOX1, LOX2 y LOX3 en cada uno de los genotipos descriptos anteriormente, bajo la hipótesis planteada en la cual se establece que al menos una de las tres enzimas LOX participa en la regulación de defensas en semillas de soja.

Respuesta de LOX 1: En Williams se encontró la misma respuesta descrita en los capítulos anteriores, en donde los niveles de expresión aumentaron luego de 24 hs de daño de chinche. Lo mismo ocurrió con los genotipos mutantes PI86023 (mutante *lox2*) y PI205085 (mutante *lox3*), cuyos niveles constitutivos e inducidos (chinche 24 hs) fueron mayores que en Williams. En cambio, en el genotipo PI408251 (mutante *lox1*) se observó que los niveles de transcripto fueron muy bajos (Figura 5-1, a). Estos resultados coincidieron con actividad de LOX1 (Figura 5-1, b) donde se pudo observar que en el genotipo PI408251 la actividad de LOX1 fue menor que en los demás genotipos y no fue alterada luego de la herbivoría.

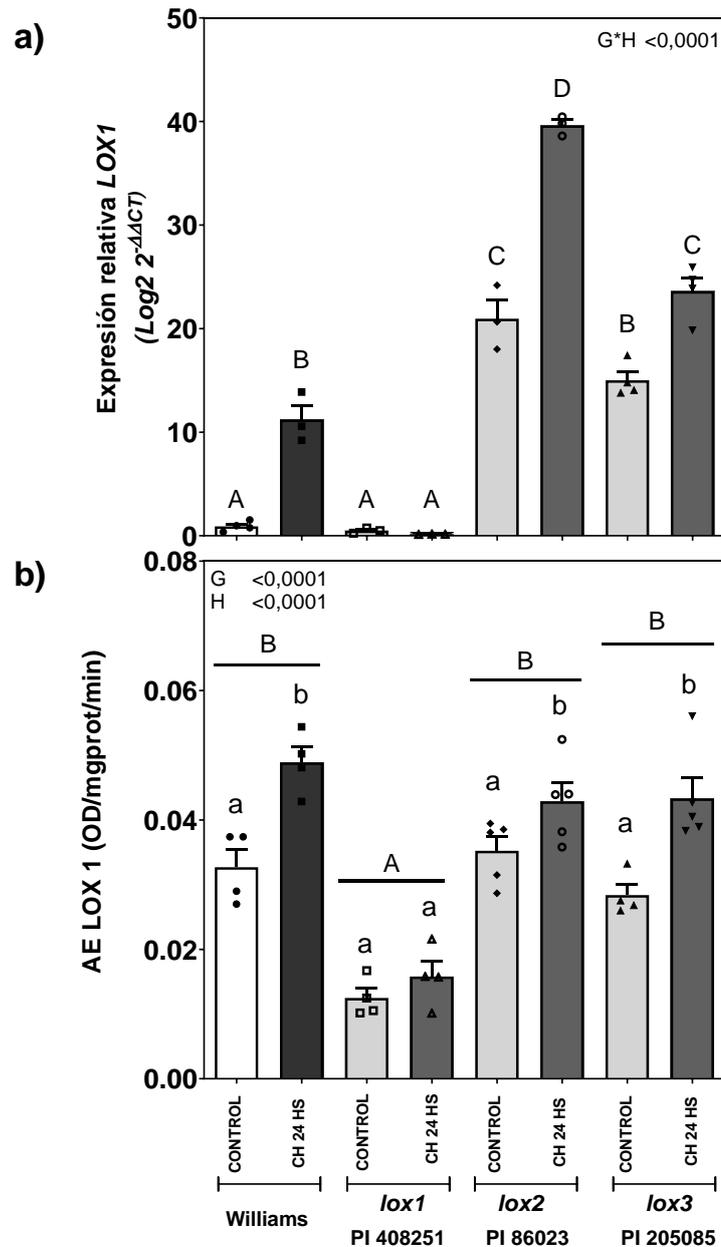


Figura 5-1: a) Expresión transcripcional del gen *LOX1* y b) actividad enzimática de *LOX1* luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI408251, PI86023, PI205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Respuesta de *LOX 2*: La expresión basal de *LOX2* en los genotipos mutantes fue mayor que en Williams, sin embargo, no se encontraron inducciones significativas luego del daño de chinche (solo se observó una tendencia a un aumento ($p_{G*H} 0.0102$)). También se observó que la expresión de *LOX2* se encuentra alterada en el genotipo PI 408251

(mutante *lox1*) (Figura 5-2, a). No se encontraron diferencias en la actividad de LOX2 entre los 4 genotipos.

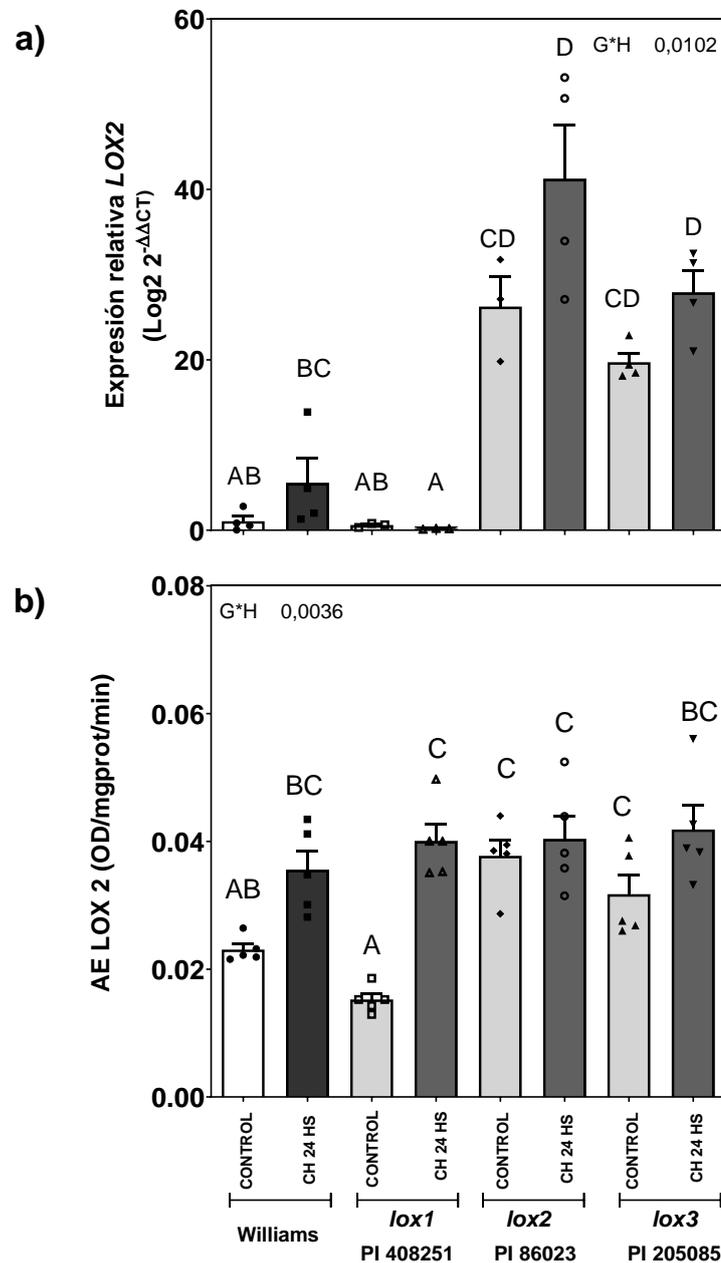


Figura 5-2: a) Expresión transcripcional del gen *LOX2* y b) actividad enzimática de *LOX2* luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Respuesta de LOX 3: Los niveles constitutivos de expresión de *LOX3* fueron mayores en los 3 genotipos mutantes, comparando con Williams. Sin embargo, no se

encontró un aumento de la expresión luego de la herbivoría (Figura 5-3, a). Por otro lado, el daño de chinche provocó un aumento en la actividad de LOX3 sólo en Williams (p_{G*H} 0.0029). La actividad de esta enzima fue mucho menor en los genotipos mutantes (Figura 5-3, b)

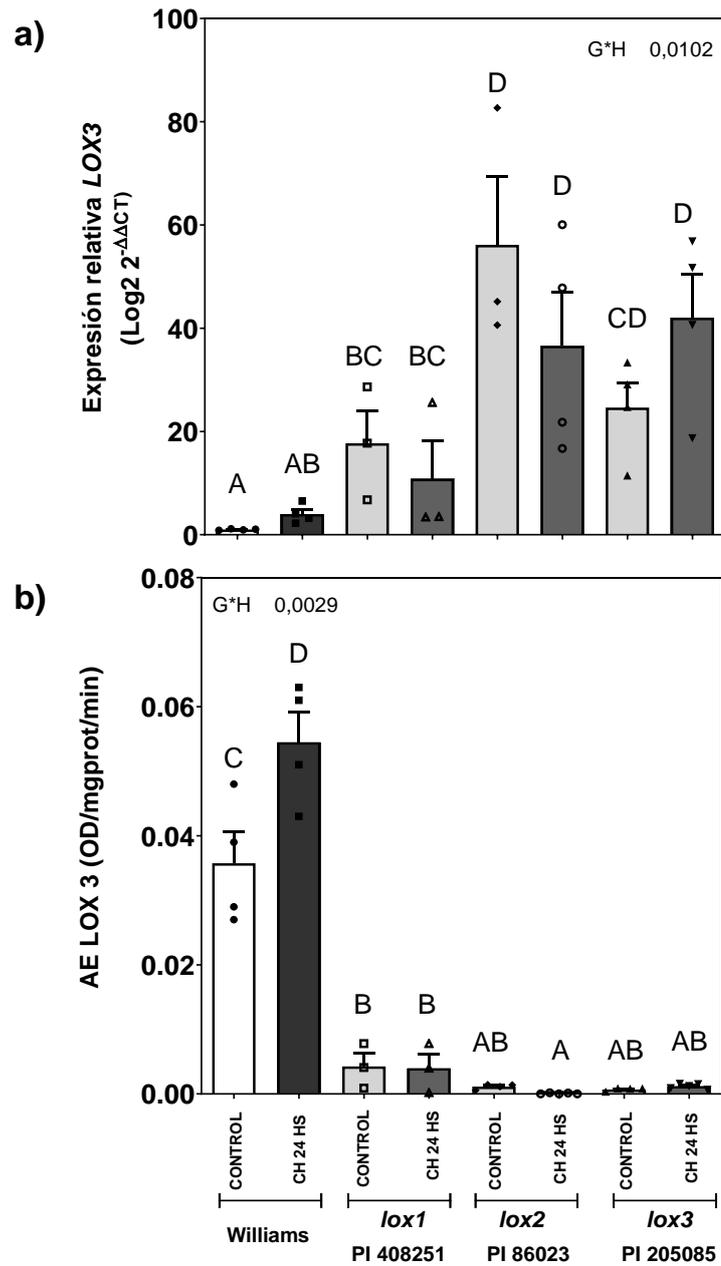


Figura 5-3: a) Expresión transcripcional del gen *LOX3* y b) actividad enzimática de *LOX3* luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.7.2. Respuesta defensiva frente al daño de chinches

- Inhibidores de cisteín proteasas (CPI)

Dentro del estudio de la expresión de genes de CPI (*N2*, *R1* y *L1*) se encontró que la expresión *L1* y *R1* aumentó luego de la herbivoría sólo en Williams (p_{G*H} 0,0113), mientras que en el resto de los genotipos no se halló respuesta (Figura 5-4, a y b respectivamente). *R1* disminuyó la expresión luego del daño de chinche en el genotipo mutante *lox1*, PI 408251, mientras que en el resto de los mutantes la expresión fue más baja comparado con Williams y no se vio afectada por la herbivoría (Figura 5-4, b). Por último, el gen *L1* no fue inducido por la herbivoría en ninguno de los genotipos estudiados pero sus niveles fueron mayores en el genotipo de referencia ($p_G < 0,0001$) (Figura 5-4, c).

La actividad de CPI fue inducida por la herbivoría sólo en Williams comparado con la situación control mientras que en el genotipo mutante *lox1* (PI 408251) el daño de chinche provocó la disminución de la actividad de este tipo de inhibidores. Los otros dos genotipos no se vieron afectados por la herbivoría y los niveles constitutivos de CPI fueron menores que la situación control en el genotipo normal, correspondiéndose con lo encontrado en el análisis de expresión (Figura 5-5).

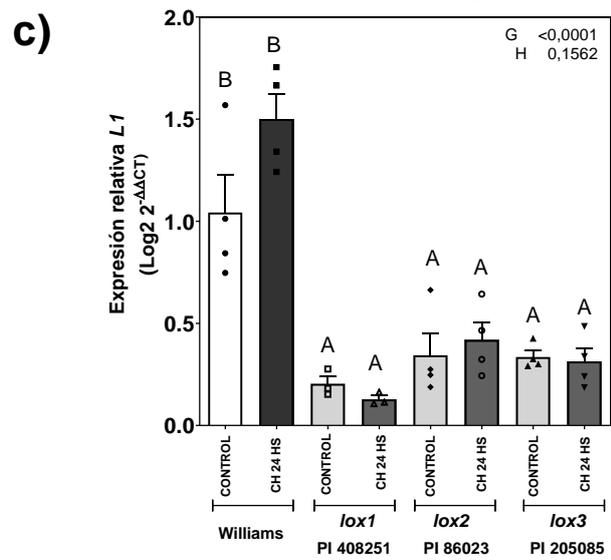
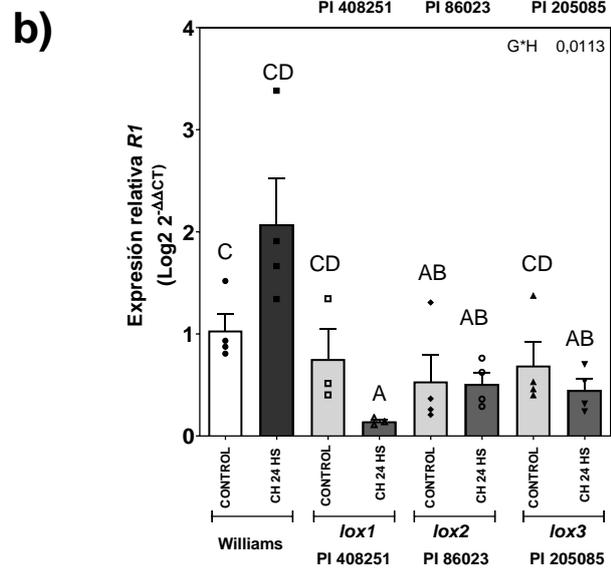
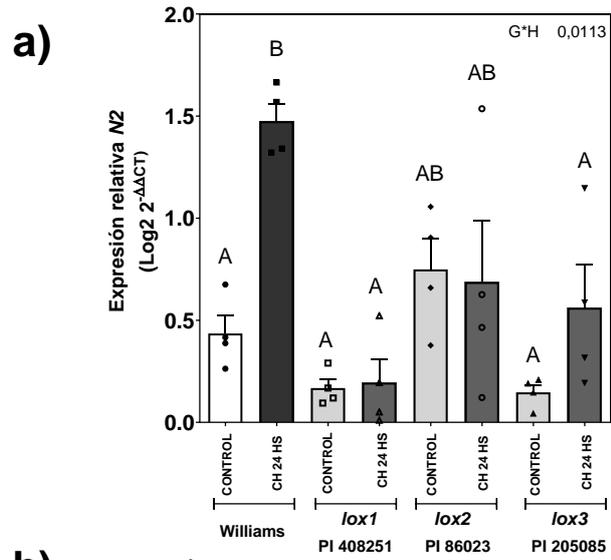


Figura 5-4: Expresión transcripcional de CPI: *N2* (a), *RI* (b) y *LI* (c) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

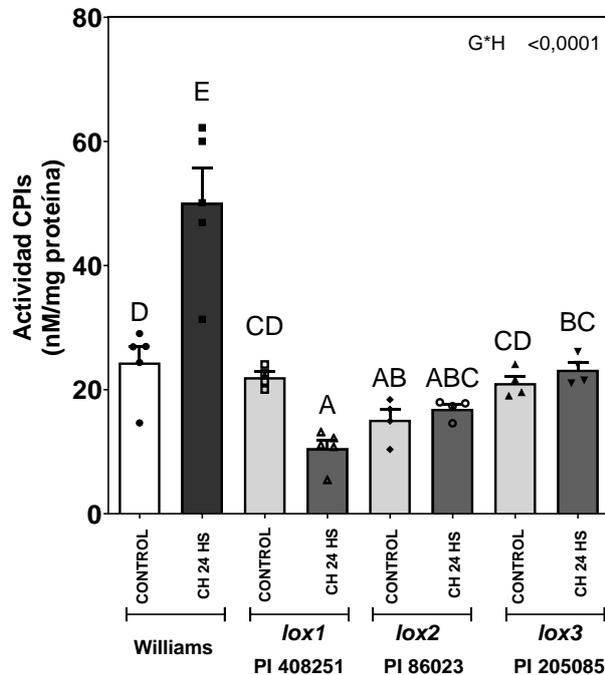


Figura 5-5: Actividad de CPI luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

- Inhibidores de tripsín proteasas (TPI)

La expresión del TPI del tipo Kunitz (*PI Kz*) se vio afectada diferencialmente según el genotipo y la herbivoría. En el genotipo Williams se encontraron los mayores niveles de expresión y un aumento en la expresión luego de la herbivoría. Los genotipos mutantes *lox2* (PI 86023) y *lox3* (PI 205085), presentaron menor nivel de expresión basal comparado con Williams, sin embargo, el daño de chinche provocó una inducción significativa de la expresión ($p_H 0,0026$). Los niveles más bajos de expresión de *PI Kz* se hallaron en el genotipo mutante *lox1* (PI 408251), que se diferenció de todos los genotipos y en el cual la herbivoría no provocó ningún efecto (Figura 5-6, a).

Respecto a la expresión del otro tipo de TPIs, el tipo Bowman-Birk (PI BBCII), si bien no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los genotipos estudiados, se pueden observar fuertes tendencias en el genotipo normal, en el cual la expresión parece aumentar en respuesta a la herbivoría, mientras que en el genotipo PI 408251 la herbivoría parece afectar negativamente la expresión del gen comparando con su situación control (Figura 5-6, b).

Por último, la herbivoría solo provocó un aumento en la actividad de TPI en los genotipos mutantes *lox2* (PI 86023) y *lox3* (PI 205085), mientras que en Williams y el mutante *lox1* (PI 405251) se mantuvieron como en las situaciones control, sin diferencias significativas (Figura 5-7).

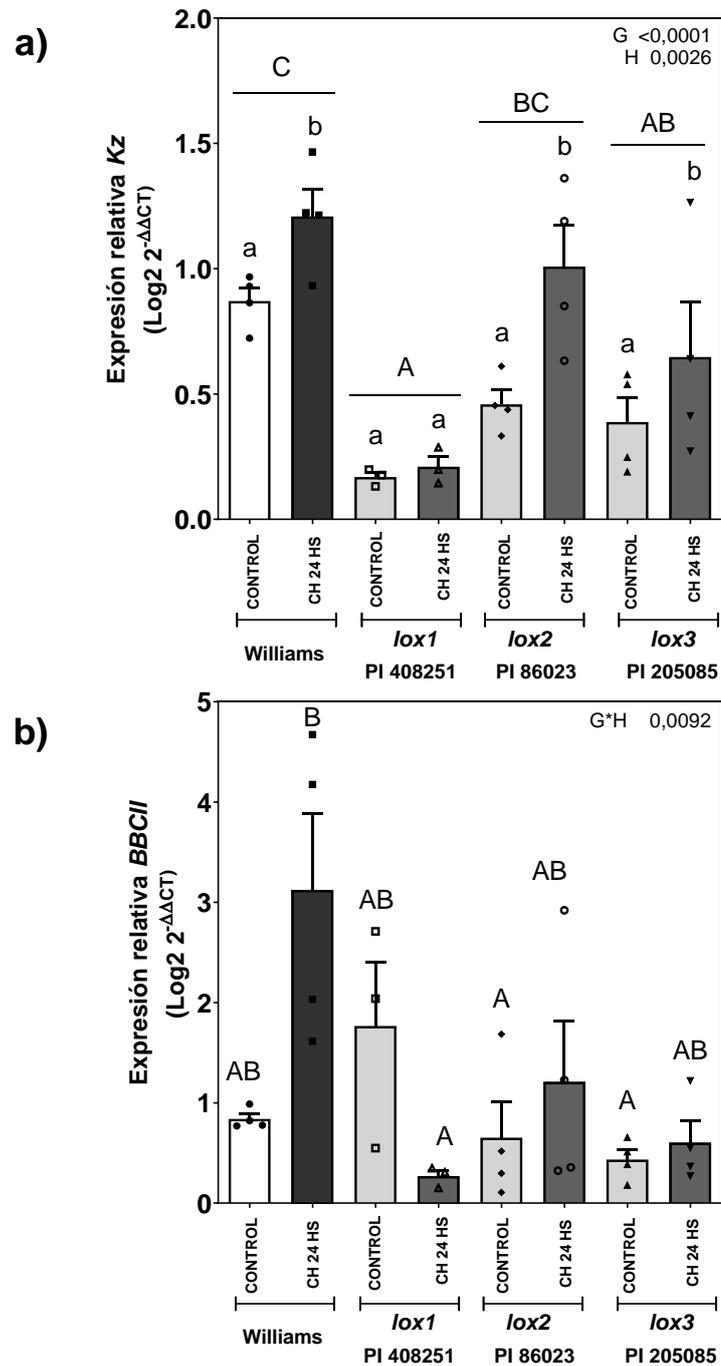


Figura 5-6: Expresión transcripcional de inhibidores de tripsin proteasas: *PI Kz* (a) y *PI BBCII* (b) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

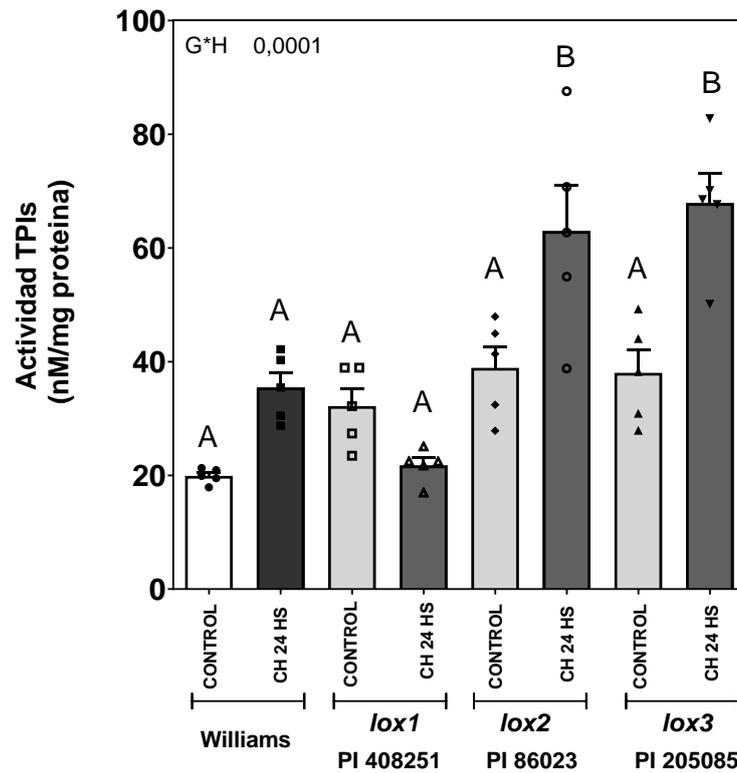


Figura 5-7: Actividad de TPI luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.7.3. Efecto de la herbivoría sobre las vías de síntesis de las hormonas ET y SA

La expresión de *ACC* y *PRI*, vinculados con las vías de señalización del etileno y ácido salicílico, respectivamente, fue inducida por la herbivoría sólo en Williams mientras que en los genotipos mutantes los niveles de transcritos fueron significativamente menores comparado con el genotipo normal (Figura 5-8)

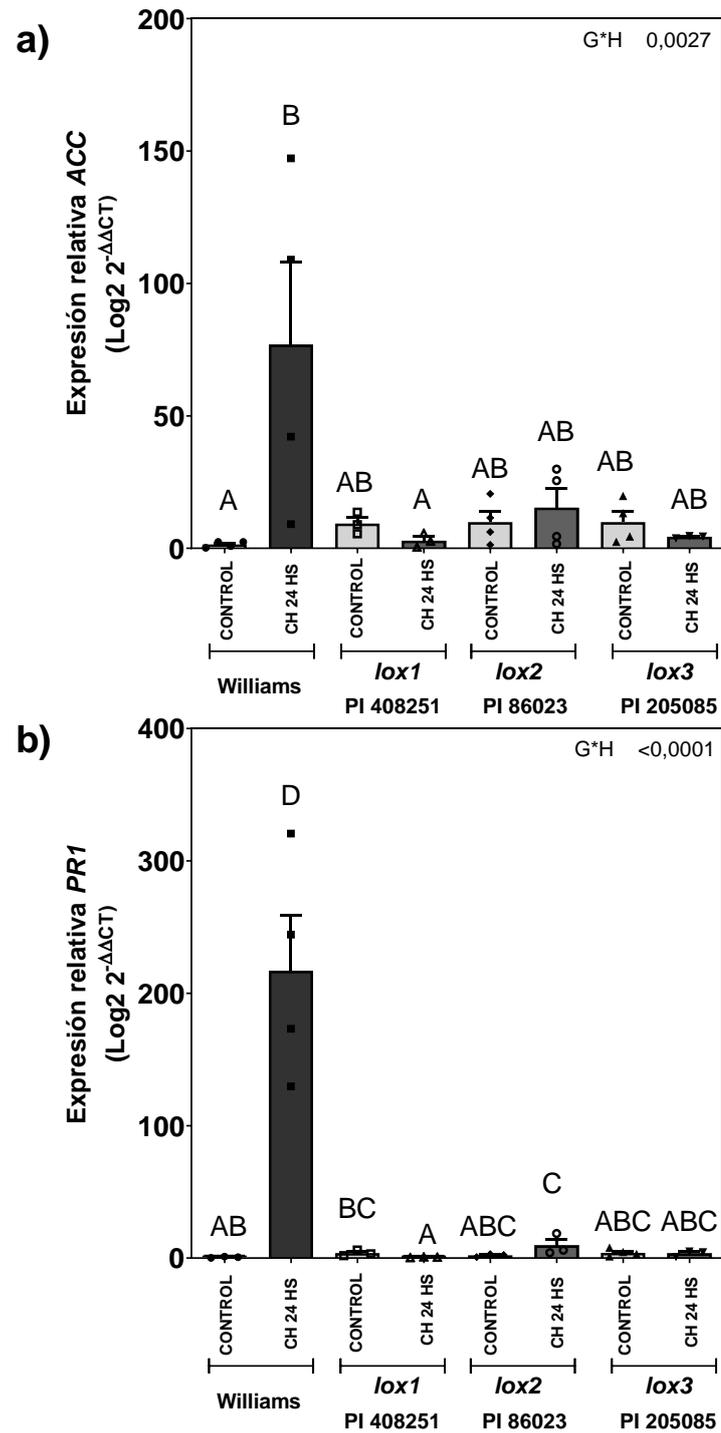


Figura 5-8: Expresión transcripcional de *ACC* (a) y *PR1* (b) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.7.1. Efecto de la exposición a MeJA sobre la actividad de lipoxigenasas y la generación de compuestos de defensa

La exposición a MeJA sólo provocó un aumento en la actividad de LOX3, mientras que en los demás genotipos la actividad de esta enzima se mantuvo en los niveles mínimos. Respecto a LOX1 y LOX2 no se observaron diferencias significativas por efecto del tratamiento hormonal (Figura 5-9).

Estos resultados fueron completados con la determinación de los niveles de defensas (inhibidores de proteasas), con el fin de conocer si la aplicación exógena de MeJA era capaz de restablecer la señal regulada por las LOX en los genotipos mutantes. Según los resultados que arrojó el análisis de los CPI, el MeJA provocó un aumento de la actividad de inhibidores en Williams, mientras que no provocó cambios en los demás genotipos (Figura 5-10, a). Por otro lado, el MeJA provocó un aumento significativo en la actividad de los TPI en dos genotipos mutantes (PI 86023 y PI 205085), mientras que en Williams y PI 408251 la aplicación exógena de la hormona no tuvo efecto sobre estas defensas (Figura 5-10, b).

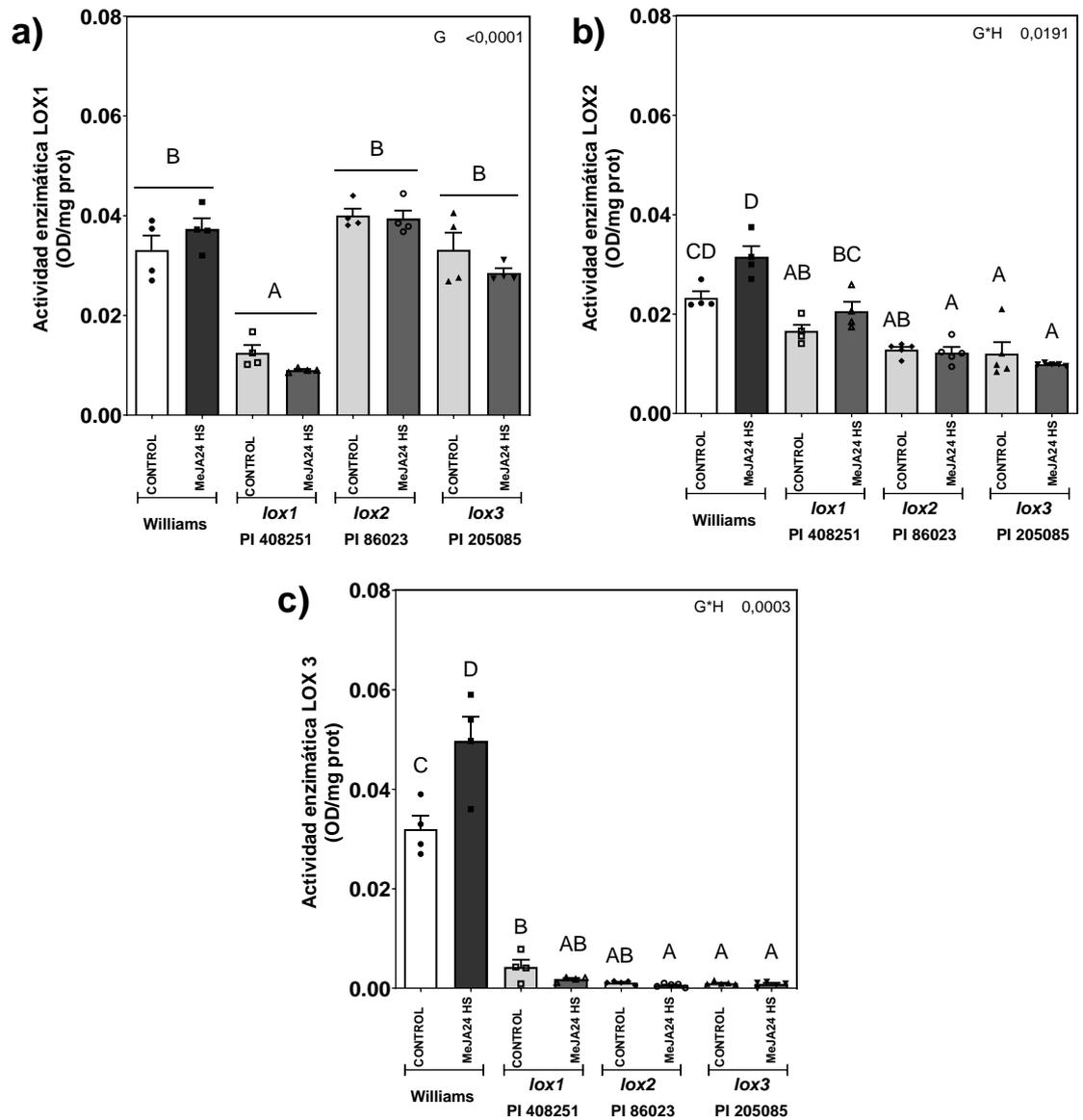


Figura 5-9: Actividad de LOX1 (a), LOX2 (b) y LOX3 (c) luego de aplicados los tratamientos de hormona (H: control, MeJa) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

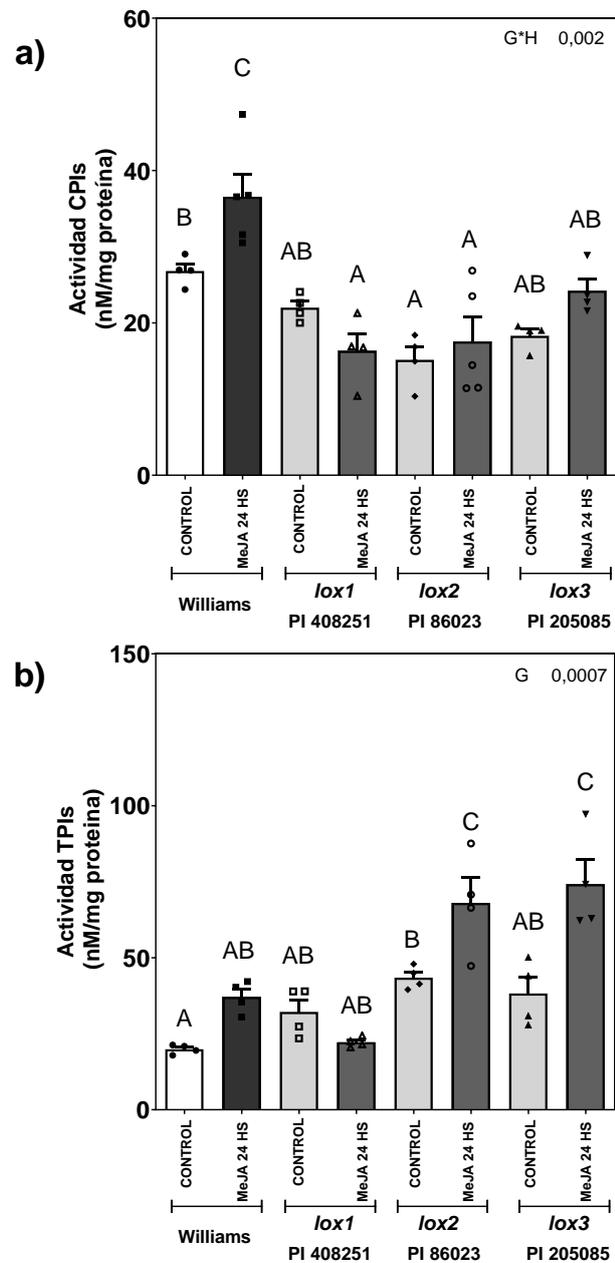


Figura 5-10: Actividad de CPI (a) y TPI (b) luego de aplicados los tratamientos de hormona (H: control, MeJa) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023, PI 205085). Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.7.2. Supervivencia de ninfas frente a los distintos genotipos

- Supervivencia de *Nezara viridula*

Para evaluar el efecto de la respuesta defensiva de las plantas de soja sobre la supervivencia de insectos y así poder determinar la influencia de la actividad específica de cada enzima LOX se analizó la supervivencia (% de individuos vivos) de ninfas de 2do estadio. La supervivencia de neonatos fue mayor en los genotipos mutantes *lox1* y *lox2* comparado con Williams y menor en aquellos individuos colocados sobre el genotipo mutante *lox3* (Cuadro 5-1). Las chinches colocadas en Williams presentaron niveles de supervivencia intermedios entre esto 3 genotipos mutantes, siendo menor la supervivencia comparada con los genotipos PI408251 y PI86023 (valor *p* 0,0341 y 0,0005, respectivamente) y mayor comparando con el genotipo PI205085 (valor *p* 0,0406) (Figura 5-11).

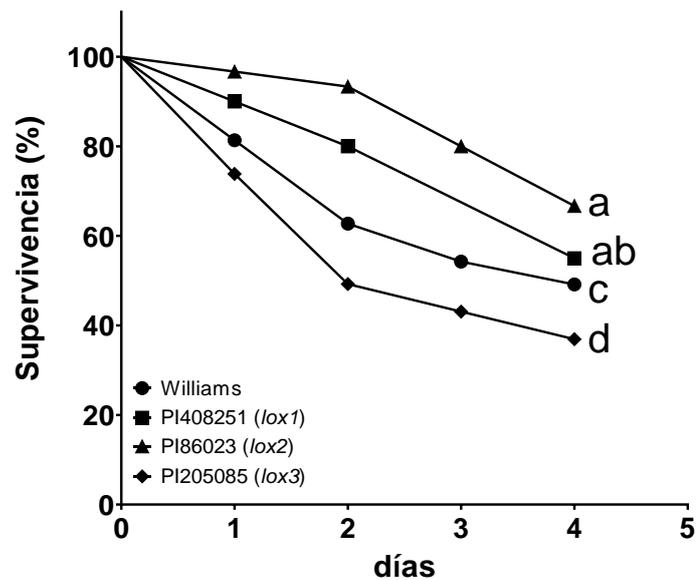


Figura 5-11: Porcentaje de supervivencia de ninfas de *Nezara viridula* alimentadas sobre plantas de soja en R6 de los genotipos Williams, PI 408251 (mutante *lox1*), PI 86023 (mutante *lox2*) y PI 205085 (mutante *lox3*).

Cuadro 5-1: χ^2 y valor *p* de un log-rank test para hipótesis globales de supervivencia de ninfas de *Nezara viridula* y de comparaciones simples entre genotipos.

Comparación	χ^2	g.l.	<i>p</i> -valor	Sig.
Global	35,66	3	< 0,0001	****
Williams vs. PI408251 (<i>lox1</i>)	4,487	1	0,0341	*
Williams vs. PI86023 (<i>lox2</i>)	12,22	1	0,0005	***

Williams vs. PI205085 (<i>lox3</i>)	4,193	1	0,0406	*
PI408251 (<i>lox1</i>) vs. PI86023 (<i>lox2</i>)	3,129	1	0,0769	ns
PI408251 (<i>lox1</i>) vs. PI205085 (<i>lox3</i>)	15,33	1	< 0,0001	****
PI205085 (<i>lox3</i>) vs. PI86023 (<i>lox2</i>)	32,1	1	< 0,0001	****

- Efecto de la presencia de ninfas sobre la producción de inhibidores de proteasas

Luego de los 4 días en los cuales se registró la supervivencia de ninfas en el experimento 4, se recolectaron las vainas de las ramas que se aislaron para esta finalidad y se reservaron en ultrafreezer -80°C para la posterior cuantificación de compuestos de defensas.

La actividad de CPI fue afectada por el genotipo ($G < 0.0001$), diferenciándose PI 408251 (mutante *lox1*) de los demás genotipos. A su vez la herbivoría indujo la actividad de los CPI en Williams y PI 205085 (mutante *lox3*) ($H < 0,0001$) (Figura 5-12). La actividad de TPI fue mayor en los genotipos Williams y PI 205085 ($p < 0.0001$), en los cuales, además, la herbivoría provocó un aumento en la actividad, comparado con la situación control (plantas sin daño) ($p 0,0037$). En los genotipos mutantes *lox1* y *lox2*, en cambio, se observó que los TPI no respondieron a la herbivoría (Figura 5-13).

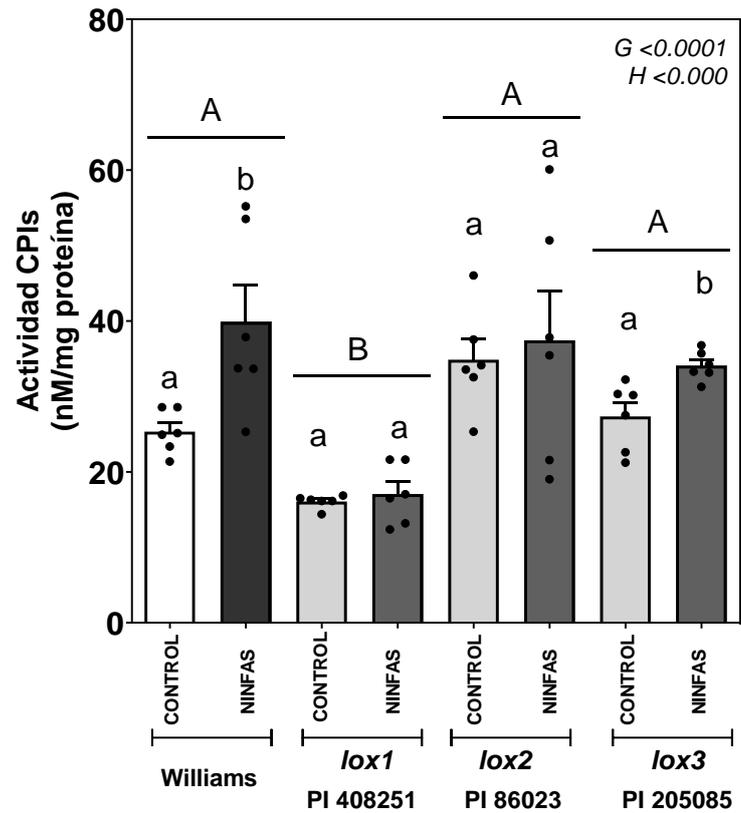


Figura 5-12: Actividad de inhibidores de cisteín proteasas (CPI). Los tratamientos Control representan las bolsas de tul que se colocaron en las ramas sin ninfas de *Nezara viridula* y Ninfas representas las bolsas en las que se colocaron 60 ninfas. Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

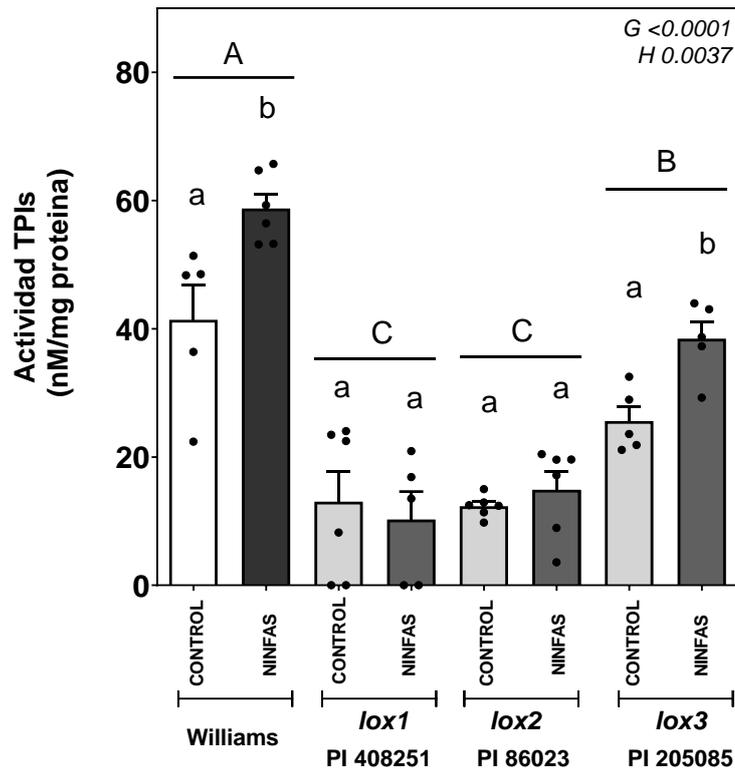


Figura 5-13: Actividad de inhibidores de tripsin proteasas (TPI). Los tratamientos Control representan las bolsas de tul que se colocaron en las ramas sin ninfas de *Nezara viridula* y Ninfas representas las bolsas en las que se colocaron 60 ninfas. Se realizó un ANOVA bifactorial, seguido del Test de comparaciones múltiples Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

- Efecto de la presencia de ninfas sobre la síntesis de isoflavonoides

Los niveles de isoflavonoides daidzína, genistína, daidzeína y genisteína se vieron afectados por la interacción del genotipo con la herbivoría. En términos generales, los compuestos se indujeron luego del daño de chinches, y solo para el caso de la daidzeína se encontraron diferencia en los niveles constitutivos en los genotipos PI 408251 (*lox1*) y PI 86023 (*lox2*). En el caso de la daidzeína y genistína los niveles constitutivos fueron menores en PI 86023 y PI 408251, respectivamente (Figura 5-14).

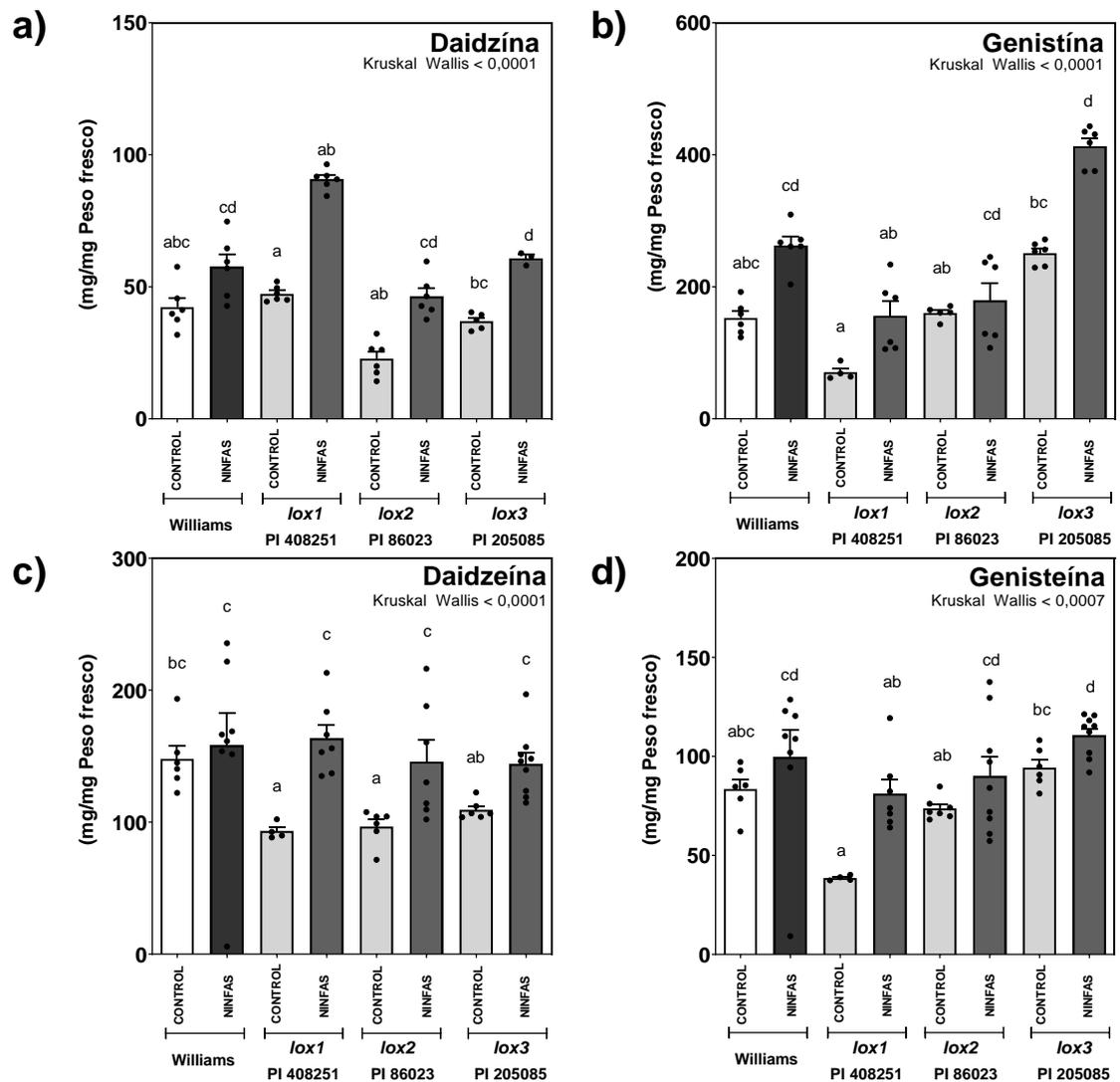


Figura 5-14: Contenido de isoflavonoides (mg/mg peso fresco): Daidzina (a), Genisteína (b), Daidzeína (c) y Genisteína (d). Los tratamientos Control representan las bolsas de tul que se colocaron en las ramas sin ninfas de *Nezara viridula* y Ninfas representas las bolsas en las que se colocaron 60 ninfas. Se realizó un análisis no paramétrico Test de comparaciones múltiples Kruskal Wallis. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.7.3. Caracterización del perfil hormonal en cada uno de los genotipos

Muestras del experimento 3 fueron utilizadas también para la detección de los niveles hormonales tanto en los controles de tratamiento como luego de la herbivoría. El daño de adultos de *N. viridula* provocó un cambio en el perfil hormonal de cada genotipo estudiado. A las 24 hs de iniciado el daño de chinches en el genotipo de referencia

Williams se indujo el JA (p 0,0159), el ET (p 0,0079), el SA (p 0,0043), y el ABA (p 0,0079) (Figura 5-15).

Ahora bien, respecto a la respuesta a chinches de los otros genotipos estudiados, la producción de JA se indujo tanto en PI408251 (mutante *lox1*) como en PI83023 (mutante *lox2*) mientras que PI205025 (mutante *lox3*) no evidenció cambios en el contenido de JA, sin embargo, los niveles constitutivos fueron significativamente mayores a los de Williams (p 0.0159) (Figura 5-15, a). De manera contraria a lo encontrado en Williams, los niveles de jasmonil-isoleucina (JA-Ille) aumentaron con la herbivoría en los tres genotipos (Figura 5-15, b). Por otro lado, la producción de ET aumentó en todos los genotipos excepto en PI83023, encontrándose las mayores inducciones en Williams y PI205025 (Figura 5-15, c). Por último, la producción de SA se vio afectada por el genotipo, ya que los tres genotipos mutantes mostraron una respuesta opuesta al comportamiento observado en Williams. Mientras en Williams la producción de SA aumentó luego de la herbivoría, en los mutantes disminuyó de manera significativa el contenido de esta hormona (Figura 5-15, d).

Otros dos compuestos hormonales cuantificados fueron el ácido abscísico (ABA) y el ácido indolacético (IAA). Sólo se detectó una disminución de ABA en PI408251 (p 0,0317) mientras que en los demás genotipos no se detectaron diferencias entre control y herbivoría (Figura 5-15, e). Por otro lado, el contenido de IAA disminuyó con el daño de chinches en PI 408251 (p 0,0159) y PI83023 (p 0,0159), mientras que en PI205085 el contenido aumentó de manera significativa (p 0,0079) (Figura 5-15, f).

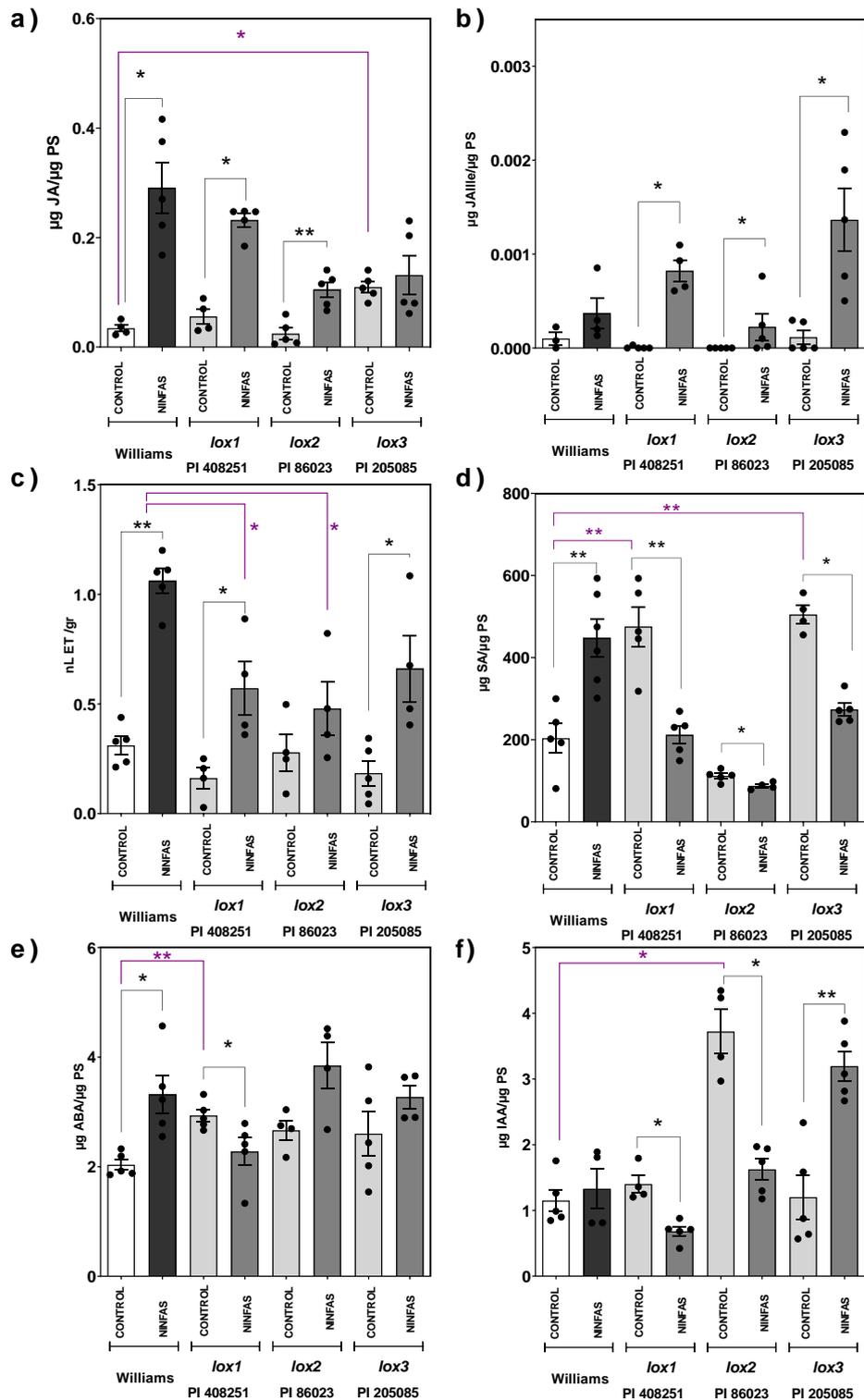


Figura 5-15: Contenido de hormonas JA (a), JAIIe (b), ET (c), SA (d), ABA (e) y IAA (f) luego de aplicados los tratamientos de herbivoría (H: control, chinche 24 hs) en cada genotipo (Williams, PI 408251, PI 86023 y PI 205085). Se realizó un análisis prueba t de student - Mann Whitney Test. Los asteriscos indican diferencias significativas de los valores p entre comparaciones de a pares.

5.8. Discusión

La importancia de la participación de las LOX en la producción de defensas frente a insectos ha sido estudiada en numerosas especies. Por ejemplo, en hojas de papa se han identificado los genes *LOX-H1* y *LOX-H3* que son inducidos luego de la herbivoría. La acumulación de ARN mensajero de *LOX-H1* alcanzó un pico a los 30 min mientras que *LOX-H3* alcanzó su máximo nivel 24 hs después (Royo et al., 1999). En hojas de tomate, sólo el gen *TomLOXD* se acumuló de manera concomitante a la acumulación de JA luego del daño (Heitz et al., 1997). En *Arabidopsis* de seis genes solo *AtLOX2* ha sido vinculado a la síntesis de JA en respuesta al daño (Bell et al., 1995).

Las modificaciones genéticas que se han utilizado para interferir la producción de enzimas LOX ha permitido entender el mecanismo de las respuestas antiherbívoro en especies modelo (Royo et al., 1999; Kessler et al., 2004; Van Poecke y Dicke, 2004). De esta manera, se ha encontrado que la supresión de la expresión de genes *LOX* se traduce en una disminución en la emisión de compuestos volátiles y en la inducción de inhibidores de proteasas (Ferrie et al., 1994; Griffiths et al., 1999; León et al., 2002; Chen et al., 2004). Por ejemplo, la expresión antisentido de genes *LOX* en *Nicotiana attenuata* redujo la producción de nicotina y de inhibidores de tripsín proteasas, así como también la síntesis de compuestos volátiles, disminuyendo la resistencia frente a *Manduca sexta* (Halitschke y Baldwin, 2003). En el caso de monocotiledóneas, como arroz, el silenciamiento de genes *13-LOX* redujo la producción de JA e inhibidores de tripsin proteasas y a su vez mejoro la performance de las larvas de *Chilo suppressalis* (Zhou et al., 2009). En coincidencia con lo descrito anteriormente, el uso de mutantes para cada isoenzima en la presente tesis, en el caso de estudio de interacción soja-*chinche*, fue de gran utilidad para definir que la enzima LOX1 cumple un rol fundamental en la

respuesta antiherbívoro. El genotipo PI 408.251 (mutante *lox1*) no fue capaz de inducir la expresión de los genes de defensas y dicho efecto se vio reflejado en la menor producción de inhibidores de proteasas (del tipo TPI y CPI) comparado con el genotipo de referencia Williams. Por otro lado, esta respuesta no pudo ser restaurada con la aplicación exógena de hormonas (MeJA y SA). El genotipo PI 205.085 (mutante *lox3*) se comportó de manera similar a la respuesta observada en Williams, los niveles de transcritos de los tres genes *LOX* se indujeron luego de la herbivoría, pero la actividad de LOX3 fue despreciable. Este escenario no afectó a la síntesis de defensas, ya que tanto la expresión como la actividad de TPI y CPI no se vio perjudicada, aportando nueva información al conocimiento de los roles de cada isoenzima en la respuesta antiherbívoro.

En estudios previos del grupo de trabajo, se ha caracterizado la supervivencia de larvas de lepidópteros alimentados sobre distintos cultivares de soja. Tejedor (2017) demostró que la supervivencia de larvas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas con dietas libres de TPI fue mayor que aquellas alimentadas con dietas artificiales enriquecidas con TPI. Dentro del mismo trabajo, se encontró que la supervivencia de orugas alimentadas con plantas del cultivar Williams fue menor que aquellas alimentadas con un cultivar libre de TPI Kunitz demostrado que estos compuestos funcionan como efectivas defensas directas (Bhattacharyya et al., 2007; Tejedor, 2017). Por otro lado, Sardoy et al., (2021) encontraron que la actividad de las enzimas digestivas de chinches (catepsinas) disminuyó significativamente cuando los insectos eran alimentados con granos de soja cruda. Lo novedoso de dicho trabajo radicó en que se encontraron catepsinas resistentes a los CPI, lo cual podría ser una estrategia de las chinches para poder superar la barrera defensiva. En este trabajo de tesis, la supervivencia de neonatos de *N. viridula* se vio afectada según el genotipo sobre el cuál se alimentaron, encontrándose mayor

supervivencia en aquellas expuestas a los mutantes *lox1* y *lox2* (13-LOX) mientras que la menor supervivencia se encontró en el genotipo mutante *lox3* (9-LOX). Lenis et al. (2010) caracterizaron a estos genotipos mutantes encontrando que PI 408.251 y PI 86.023 tienen afectada la producción de LOX1, por dicha razón y en función de estos resultados, se infiere que, de las tres isoenzimas, LOX1 es la vinculada a la respuesta frente a chinches.

Respecto a la producción de isoflavonoides, existen trabajos que postulan a los isoflavonoides como metabolitos de defensa frente a herbívoros (Magarelli et al., 2014; da Silva et al., 2021; Souza et al., 2021). Dentro del sistema de interacción soja-chinche Zavala et al. (2015) encontraron una correlación positiva entre el porcentaje de semillas sanas y el contenido de daidzeína y genistina en vainas de soja. Por otro lado, se hallaron diferencias en los niveles de daidzeína entre un genotipo resistente (IAC-100) y uno susceptible al daño de chinche verde (Sabljic et al., 2020). En concordancia con estos hallazgos, en este trabajo se encontró que en los genotipos mutantes para genes *lox1* y *lox2*, los niveles constitutivos de estos dos compuestos fueron menor que en el genotipo de referencia y a su vez los niveles de genistina fueron mayores en el genotipo *lox3*.

Con respecto a las hormonas de defensa, el JA y su forma activa JA-Ille juegan un rol fundamental en la inducción de la respuesta frente al ataque de insectos (Fonseca et al., 2009; Koo et al., 2009). Los jasmonatos también juegan un rol importante en la respuesta a patógenos necrotrofos e insectos masticadores (Glazebrook, 2005; Laluk y Mengiste, 2010) mientras que el SA está principalmente vinculado a la respuesta frente a patógenos biotrofos e insectos fitosuccivros (Pieterse et al., 2012; Lazebnik et al., 2014). Mientras SA actúa generalmente de manera antagónica al JA (Spoel et al., 2003), el ET y el ABA actúan como co-reguladores (Adie et al., 2007; Kazan y Manners, 2008).

En esta tesis se encontró que los niveles de ABA disminuyeron y los niveles de ET aumentaron luego de la herbivoría en el caso de los tres genotipos mutantes. Respecto a la producción de SA, la respuesta en cambio fue destacada por diferenciarse del genotipo normal, en el cual luego del daño de chinche los niveles aumentaron significativamente. En los genotipos mutantes la producción de SA disminuyó luego del daño de chinches. En el capítulo 3 de esta tesis se encontró que el daño de chinches activa la vía del ET y del SA y que la exposición a SA tuvo un efecto positivo sobre la producción de inhibidores de proteasas, regulados también por el JA. Es decir, contrario a lo que se esperaba, el SA no actuó de manera antagónica con los genes regulados por el JA. Estos resultados podrían dar un indicio estrategia vinculada a los insectos fitosuccívoros para evadir las defensas reguladas por el JA (Lazebnik et al., 2014). Por otro lado, los niveles de JA y JA-Ille aumentaron luego de la herbivoría al igual que los hallazgos de Giacometti et al. (2016) y Dillon (2017).

5.9. Conclusiones

La primera hipótesis asociada a los objetivos de este capítulo establecía que las enzimas LOX1 y LOX 3 serían las enzimas reguladoras de la respuesta antiherbívoro frente a chinches. Las diferencias encontradas en las respuestas de los diferentes genotipos estuvieron asociadas a la menor producción de defensas en genotipos mutantes *lox1*, pudiendo alcanzar el objetivo de dilucidar cuál de las isoenzimas es la vinculada a dicha respuesta.

Asimismo, un segundo objetivo planteado fue caracterizar la respuesta de cada uno de los genotipos al daño de *N. viridula*, asumiendo que aquellos mutantes *lox1* y *lox3* presentarían dificultades al momento de producir defensas. En este caso, se pudo alcanzar el objetivo de caracterización de las respuestas, pero la hipótesis quedó parcialmente

aceptada, debido a que solo el genotipo mutante *lox1* mostró un fenotipo incapaz de defenderse. Para evaluar el efecto de la respuesta defensiva sobre los insectos se analizaron los niveles de supervivencia y se encontró que la supervivencia fue mayor en los mutantes para *lox1* y *lox2*, pudiéndose aceptar parcialmente la hipótesis asociada a este objetivo.

Capítulo 6: Discusión y conclusiones.

Perspectivas futuras.

6. Discusión general

En el presente trabajo de tesis se pudo estudiar la respuesta inducida en semillas de soja en R6 cuando son picadas por adultos de chinche verde (*Nezara viridula*). Los objetivos planteados en esta tesis fueron cumplidos en su totalidad y los logros obtenidos se detallan a continuación.

6.1. Cumplimiento de objetivos

Objetivo 1 y 2: Conocer cómo es la respuesta de las lipoxigenasas de plantas de soja frente al daño de chinche verde. Establecer el vínculo que existe entre la inducción hormonal exógena, la producción de lipoxigenasas y el efecto sobre la producción de las defensas.

El daño que realizan las chinches sobre los granos de soja en crecimiento es reconocido por la planta, quien activa una respuesta defensiva en cuestión de minutos mediante la regulación de MAPK quinasas que fosforilan y activan a varios intermediarios de la respuesta defensiva (Giacometti et al., 2016). En el capítulo 3 de esta tesis se probó que las lipoxigenasas se ven inducidas luego del daño, la exposición a hormonas y herbivoría pero que dicha inducción sólo se traduce a una mayor actividad enzimática en el caso de la herbivoría e inducción con MeJA. Por otro lado, de manera novedosa, se encontró que la exposición a SA promovió la expresión de *LOX1* y *LOX2*, aunque en ambos casos esto no se tradujo en una mayor actividad enzimática.

Respecto a la segunda parte del Objetivo 1, en el capítulo 5 se encontró que la enzima *LOX1* es la enzima más importante para la regulación de las defensas frente a chinche ya que el genotipo mutante *lox1* no fue capaz de regular la producción de defensas (inhibidores de proteasas). Esto permitió alcanzar el primer objetivo y aceptar las primeras dos hipótesis planteadas.

Objetivo 3: Conocer cómo es la respuesta de las lipoxigenasas al daño de las chinches durante el llenado de los granos y si esta relación afecta a la producción de las defensas directas.

Para cumplir con este objetivo se analizaron los niveles de expresión y actividad de cada una de las enzimas LOX en tres momentos distintos durante el llenado de los granos (R5, R5.5 y R6). En este trabajo se encontró que el daño de chinches induce la expresión de las tres enzimas LOX a partir de R5.5, complementando los resultados del capítulo 3. El cambio de técnica de cuantificación relativa de la expresión de genes hacia una técnica de mayor sensibilidad (qPCR) permitió visualizar los cambios en la expresión que ocurren sobre los tres genes *LOX*. Entonces, a medida que avanza el llenado la expresión de *LOX* es inducida por el daño de chinches, es decir, una sola picadura es suficiente para desencadenar la respuesta inmune. Lo mismo se observó en cuanto a la actividad de cada enzima, a excepción de LOX1 que no parece acumularse en el grano, ya que sus niveles constitutivos se mantienen durante todo el período de estudio (R5 → R6).

Con estos resultados, se acepta parcialmente la hipótesis 4 que establecía que “*Existe una variación de la respuesta a la herbivoría a lo largo del llenado de los granos.*” pero se rechaza la segunda parte que postulaba “*...siendo mayor dicha respuesta al comienzo del llenado comparado con el final del llenado...*” ya que lo que se observó luego de realizar este trabajo es que la respuesta a la herbivoría aumenta conforme el avance del llenado.

Por otro lado, respecto a la producción de defensas, se acepta parcialmente la hipótesis 4, ya que el resultado final de contenido de inhibidores de cisteín proteasas (CPI) aumenta luego de la herbivoría desde el comienzo del llenado en adelante. Con los

experimentos realizados se demostró que la expresión de los genes que codifican para inhibidores de proteasas aumenta a medida que progresa el llenado pero que la actividad de estos va disminuyendo, por lo que se propone un efecto de dilución debido al aumento del contenido de proteína soluble hacia el fin del llenado. Es decir, contrariamente a lo que se planteó al inicio de esta tesis, la respuesta a la herbivoría es mayor al final del llenado que al principio.

Objetivo 4: Determinar si la ausencia de lipoxigenasas aumenta la susceptibilidad de la soja al ataque de chinches.

Para poder determinar si los metabolitos regulados por el JA funcionaban como defensas, se utilizaron genotipos mutantes *lox* para poner a prueba la hipótesis 5 que establecía que *“Aquellas plantas de soja que no produzcan lipoxigenasas no serán capaces de producir defensas directas cuando sean dañadas por chinches y, su vez, los insectos se verán beneficiados al encontrarse con un alimento libre de compuestos antinutritivos.”* bajo la predicción siguiente: *la supervivencia de N. viridula será mayor en un genotipo que no expresa al menos uno de los genes LOX comparado con genotipo normal.* Luego de realizar esta tesis se acepta parcialmente esta hipótesis ya que solo el genotipo *lox1* no fue capaz de regular la producción de LOX ni de las defensas y que este escenario se correlacionó con una mayor supervivencia de las ninfas de *N. viridula*. Por otro lado, el genotipo *lox3* presentó una respuesta similar a Williams con la salvedad que las chinches alimentadas con este material presentaron los niveles más bajos de supervivencia. Estos resultados sugieren que LOX3 no estaría afectando los procesos de regulación de defensas, apoyando la propuesta de LOX1 como la enzima vinculada a la producción de defensas frente a chinches, ya que este genotipo solo posee activas a LOX1 y LOX2 (13-LOX y 9/13-LOX, respectivamente).

Objetivo 5: Estudiar la relación de esta respuesta de las lipoxigenasas luego del ataque de chinches con la producción de defensas directas inducidas, más específicamente, de inhibidores de cisteín proteasas.

La utilización de mutantes *lox* para dilucidar la participación de estas enzimas en la regulación de las respuestas antiherbívoro ha sido una herramienta muy utilizada por diferentes grupos de investigación. Dichos trabajos han logrado identificar aquellas enzimas cuya presencia les otorga a las plantas la posibilidad de defenderse. Es este trabajo se realizaron experimentos para poner a prueba la hipótesis 6 que establecía que *“las lipoxigenasas regulan la expresión de genes que codifican para inhibidores de proteasas induciendo la síntesis tras el daño de chinches”* teniendo como predicción que *“genotipos que presentan una mutación para la expresión de LOX evidenciarán menor inducción de inhibidores de proteasas comparado con genotipos no mutantes”*. Con los resultados alcanzados se acepta parcialmente la hipótesis ya que solo en el mutante *lox1* no se indujo un aumento en la producción de inhibidores de proteasas (CPI y TPI).

6.2. Contexto teórico y avances

La soja es uno de los cultivos oleaginosos más importantes del mundo. Las semillas son procesadas para obtener aceites, que son utilizados para consumo humano, y harinas, que constituyen un ingrediente básico en la formulación de los compuestos con los que se alimenta a la ganadería industrializada del mundo desarrollado debido al elevado contenido de proteínas de alto valor biológico, en comparación a otras proteínas vegetales. Por otro lado, la producción de biodiesel también forma parte de los usos industriales que derivan de la producción (Ali y Singh, 2010; Koc et al., 2011). En Argentina, la cadena de soja reviste una importancia estratégica y se configura como una de las más competitivas en términos tecnológicos, productivos y de generación de

divisas. Presenta un fuerte perfil exportador ya que el principal destino de los subproductos de la industrialización del grano es el mercado externo. El 67% de la producción local del aceite se exporta y en el caso de la harina la proporción es aún mayor, llegando al 91% (Paolilli et al., 2019). Este escenario se ve amenazado por el aumento de las plagas, enfermedades y malezas asociados a los cambios en el uso de la superficie agrícola, los sistemas de manejo, aparición de tolerancia y resistencia a productos fitosanitarios (insecticidas, herbicidas), entre otros procesos. Dentro de este contexto, el complejo de chinches forma parte de las plagas claves que afectan al rendimiento del cultivo de soja, provocando grandes pérdidas económicas. Hasta el día de hoy, la única herramienta de control utilizada es mediante insecticidas compuestos principalmente por piretroides más neonicotinoides (Gamundi et al., 2007). Este trabajo de tesis presenta las bases de la respuesta inmune de las plantas de soja frente al daño de chinche verde durante el llenado de los granos. De esta manera se pudo demostrar que el cultivo de soja es capaz de responder a la herbivoría generando diferentes compuestos químicos, como son los inhibidores de proteasas que disminuyen el crecimiento, desarrollo y supervivencia de los insectos (Zavala et al., 2004; Dillon, 2017; Sardoy et al., 2021). Esto es de suma importancia, ya que los cultivos son sistemas de organismos seleccionados y mejorados genéticamente durante años a favor de la producción de biomasa, condición que ofrece alimento con mayor contenido de nitrógeno, bajo contenido de lignina y mayor digestibilidad para los insectos plaga (Schoonhoven et al., 2005).

Las enzimas LOX son oxidoreductasas extensamente distribuidas en plantas, animales, hongos, bacterias, levaduras y algas (Beneytout et al. 1989; Joo and Oh, 2012; Vick y Zimmerman, 1980) significando que son enzimas cruciales en los sistemas

biológicos. Muchas moléculas señalizadoras, conocidas como oxilipinas, son sintetizadas en la vía de las lipoxigenasas en plantas. Las más importantes son el ácido jasmónico, y sus derivados, y los compuestos volátiles, ya que participan de diferentes procesos a lo largo del ciclo de vida de las plantas. Respecto a la interacción planta-insecto, la respuesta de las LOX ha sido caracterizada en tejido foliar principalmente en especies modelo como *arabidopsis*, tabaco, tomate, papa. Sin embargo, en cultivos es poca la información disponible. Si bien, en los últimos años se han llevado a cabo estudios para descubrir las respuestas de semillas de soja al ataque de chinches (Giacometti et al., 2016; Dillon et al., 2020), ningún estudio se ha centrado en los mecanismos que regulan la acumulación de JA en las semillas de soja cultivada en el campo como respuesta a la herbivoría.

Luego del ataque de chinches sobre semillas en pleno llenado (R6), se desencadena una serie de reacciones de señalización liderada por MAPK (Giacometti et al., 2016) que encienden la maquinaria antiherbívoro provocando la activación de genes y enzimas encargadas de sintetizar metabolitos de defensa (Turner et al., 2002a; Browse y Howe, 2008). Dentro de dichos genes, los genes que codifican para *lox1* y *lox2* fueron inducidos luego del daño de *Nezara viridula*, del daño mecánico (Figura 3-2) y luego de la exposición a hormonas de defensa (Figura 3-3), sin embargo existe una diferencia entre la señal originada por la herbivoría comparado con los demás tratamientos, ya que sólo en las semillas dañadas por chinches aumentaron los niveles de actividad de LOX 1, dando un primer indicio de que esta enzima es la vinculada a la respuesta a chinches. De manera sorprendente, la actividad de LOX3 también aumentó luego del daño de chinche, a pesar de que los niveles de transcritos no se modificaron. Estos resultados fueron contrastados en el segundo experimento (4.6.2), que tuvo como

objetivo determinar el efecto del momento del llenado de los granos sobre la respuesta defensiva de las semillas, pero que en parte completó este primer indicio. En dicho experimento, tanto la expresión como la actividad de las tres enzimas LOX, aumentó significativamente luego del daño con chinche (Figura 4-11, Figura 4-12 y Figura 4-13), siendo mayor estas diferencias en R6, momento de máximo tamaño de los granos. A diferencia del capítulo 3, en el capítulo 4 se utilizó una técnica más sensible para medir expresión relativa de genes, es decir, en vez de cuantificar con PCR de punto final, la expresión se cuantificó con PCR en tiempo real (qPCR). Por último, en el experimento 3, donde se puso a prueba la hipótesis que afirmaba que las enzimas LOX regulan la respuesta antiherbívoro contra chinche, se encontró que sólo el genotipo mutante *lox1* se encuentra afectada la expresión del gen y la actividad de LOX1 (Figura 5-1) y esto se relacionó con una menor producción de defensas (Figura 5-4, Figura 5-10, Figura 5-12). La eliminación genética de LOX fue un camino para resolver esta problemática, sin afectar los rasgos asociados al rendimiento (Martins et al., 2002; Wang et al., 2020). Respecto a la calidad de los subproductos de soja, harina y aceites, existen numerosos trabajos que reportaron que el silenciamiento de los genes *lox*, y la disminución de la actividad de estas enzimas, permite una mejor conservación post-cosecha de la calidad organoléptica de la materia prima y sus derivados (Start et al., 1986; Song et al., 1990; Brash, 1999; Liavonchanka y Feussner, 2006). Los hallazgos de esta tesis refuerzan la idea sobre la importancia de conservar a los genes *LOX* en granos ya que, si bien su presencia puede afectar a la calidad del aceite y los subproductos de soja, su eliminación genera individuos sin la capacidad de respuesta frente a daño de chinches.

El aumento de LOX luego del daño de chinche fue acompañado por un aumento de la expresión de genes de defensas directas inducidas, los inhibidores de proteasas

(Figura 3-5, Figura 3-7). Dichas defensas fueron inducidas por la herbivoría desde el comienzo del llenado de los granos hasta alcanzar el tamaño máximo. Al comienzo del llenado, R5, la producción de defensas fue mayor que hacia el final (R6). Sin embargo, la expresión de los genes que codifican tanto para CPI como para TPI fue significativamente mayor en R6 que en R5 (Figura 4-16, Figura 4-17). El tipo de alimento con el que se encuentran las chinches al colonizar el cultivo de soja sería peor que con el que se encuentran las generaciones siguientes dentro de la misma campaña, ya que al principio del llenado los niveles de CPI son mayores mientras que hacia fin del llenado los niveles de CPI son menores, Esta razón podría estar explicando por qué a pesar de la inducción de la respuesta defensiva, las chinches logran alimentarse exitosamente de los granos de soja. Una explicación podría ser que al comienzo del llenado el metabolismo principal en los granos es el metabolismo primario (metabolismo del nitrógeno y del carbono), por lo que hay disponibilidad de metabolitos para síntesis de defensas. A medida que los granos crecen y maduran, el metabolismo primario va disminuyendo en proporción y aumenta el metabolismo secundario. Esto se debe a los cambios a nivel de señalización que involucra el proceso de madurez fisiológica (Dardanelli et al., 2006; Angelovici et al., 2010; Kambhampati et al., 2021). De esta manera, la producción de hormonas, como el JA que también está vinculado con la maduración de los frutos, como el etileno, y los procesos que se desencadenan podrían estar utilizando los recursos para la desecación y maduración fisiológica (Collakova et al., 2013).

En este trabajo de tesis se estudió la interacción soja – *Nezara viridula* con el objeto de dilucidar los mecanismos que le permiten a la chinche alimentarse de soja sin afectar su supervivencia. Mediante el uso de un genotipo de referencia se pudo dilucidar

que, cuando un insecto se alimenta por única vez de un grano de soja en pleno llenado, se desencadena una serie de reacciones que provocan un aumento de las enzimas lipoxigenasas y, a su vez, un aumento en la producción de las defensas más importantes en soja, los inhibidores de proteasas. De esta manera se pudo completar el esquema de transducción de señales frente al daño de un herbívoro teórico (Ver sección 1.5, Figura 1-6) con la información específica de la respuesta de soja al daño de chinches (Figura 6-1).

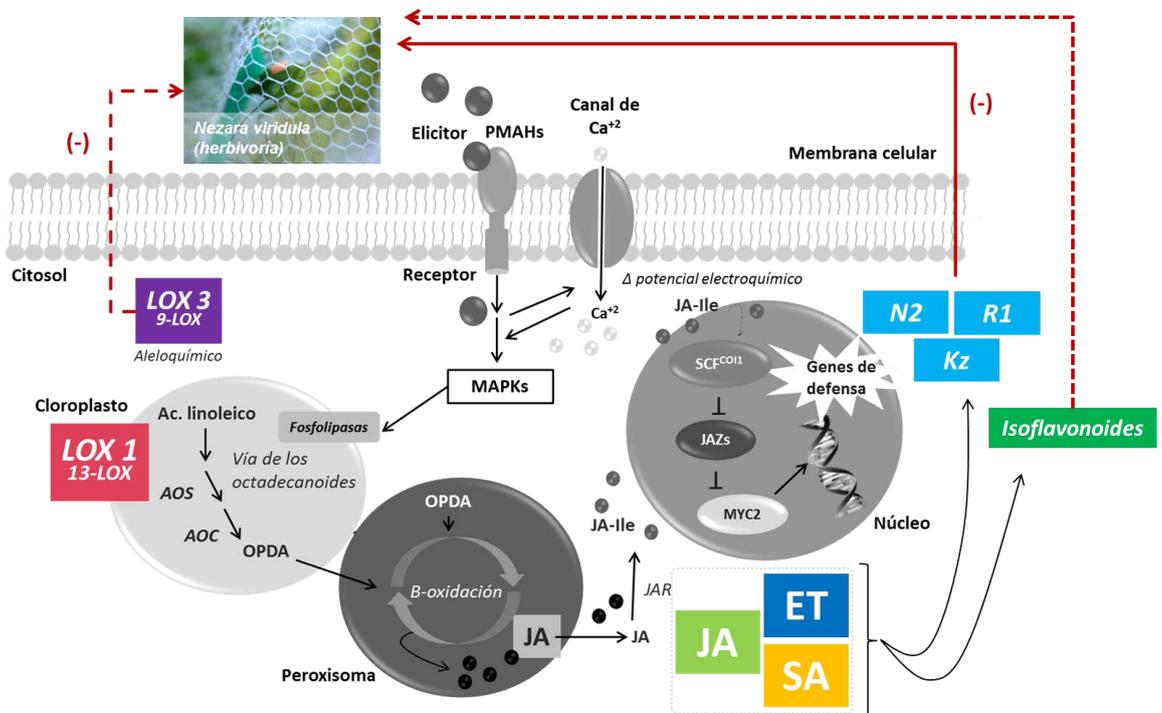


Figura 6-1: Esquema de la transducción de señales: vía de las lipoxigenasas, síntesis de hormonas y compuestos de defensas en granos de soja en pleno llenado atacados por *Nezara viridula*.

6.1. Conclusiones finales y perspectivas futuras

En el transcurso de los capítulos de esta tesis se abordaron diferentes aspectos de la respuesta del cultivo de soja al daño de chinche verde. La hipótesis principal evaluada fue que el daño de las chinches ocasiona una respuesta defensiva liderada por las LOX y JA y que, a su vez, esta respuesta desencadena la producción de defensas directas inducidas, más específicamente, de CPI pero no TPI. Esta hipótesis es parcialmente

aceptada pues el daño de chinches provocó un aumento de las LOX, principalmente de LOX1 y a su vez, produjo el aumento de ambos tipos de inhibidores de proteasas. Por otro lado, se encontró que el SA y el JA operan de manera conjunta en esta respuesta, junto al ET. Por otro lado, la respuesta antiherbívoro se mantiene a lo largo del llenado del grano, sin embargo, la producción neta de defensas es mayor al principio.

Frente a un escenario productivo donde la composición de los granos es de vital importancia para la definición de la calidad química y organoléptica y donde la calidad se ve afectada por enzimas lipoxigenasas, orientar el mejoramiento hacia la eliminación de las LOX ha sido una solución factible, sin embargo, la eliminación de la LOX1 da como resultado plantas que no son capaces de regular la producción de sus defensas frente a chinches, contribuyendo a un sistema productivo más dependiente de insecticidas.

Por otro lado, el uso de nuevos materiales mutantes para LOX, como por ejemplo las semillas con triple mutación de LOX (*lox1lox2lox3*) y doble mutantes (*lox1lox2*) generada por Wang et al. (2020) mediante Crispr-Cas9, permitiría continuar la caracterización de las vías 13-LOX y 9-LOX en semillas de soja, ya que los genotipos mutantes utilizados aquí no resultaron materiales 100% discriminantes para los objetivos de esta tesis, ya que todos presentaron niveles bajos de actividad de LOX3. Además, permitiría dilucidar qué otras vías, independiente de LOX regulan la producción de inhibidores de proteasas, por ejemplo, la vía del SA.

A su vez se encontró que la producción de lipoxigenasas varía a lo largo del llenado de los granos, entonces una propuesta a futuro podría ser evaluar el efecto en la supervivencia y ganancia de peso de ninfas de *N. viridula* que puede provocar los diferentes escenarios que provocan las diferencias en la síntesis de defensas reguladas por

LOX durante el llenado, ya que se encontró que la producción de defensas es mayor al comienzo del llenado que al final.

Por otro lado, se propone continuar el estudio relacionado a la vía 9-LOX (enzima LOX3 en semillas de soja) y la producción de compuestos volátiles, también regulados por JA. En este trabajo de tesis se encontró que la actividad de LOX3 aumenta luego de la herbivoría, sin embargo, con los experimentos realizados no se logró ponderar la importancia de la participación de esta enzima respecto a la respuesta antiherbívoro. Los compuestos volátiles (VOCs: compuestos volátiles, del inglés volatile organic compounds) podrían funcionar como claves para el reconocimiento ya que su emisión está regulada por diferentes vías que les permiten a las plantas percibir el ataque de los herbívoros a través del daño mecánico y los elicitores presentes en las secreciones orales u ovopositoras (Felton y Tumlinson, 2008; Giacometti et al., 2016, 2020). Acompañando a esta línea de estudio se propone también realizar experimentos de preferencia de insectos comparando entre el genotipo de referencia y los mutantes para los genes *lox1* y *lox3*.

Este estudio muestra que el daño por chinches induce la producción de inhibidores de proteasas, que están correlacionados con las vías JA, ET y SA y la regulación positiva de LOX. El hallazgo de características que producen una resistencia al estrés por herbívoros posibilita el desarrollo de mecanismos de control más amigables con el ambiente, por ejemplo, el desarrollo de marcadores moleculares para identificación de variedades más tolerantes al daño por chinche.

Bibliografía

- Adams, A., Fjerstad, M. C., y Rinno, R. W. (1983). Characteristics of Soybean Seed Maturation: Necessity for Slow Dehydration. *Crop Science* 23, 2-4.
- Adie, B., Chico, J. M., Rubio-Somoza, I., y Solano, R. (2007). Modulation of Plant Defenses by Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* 26, 160-177. doi: 10.1007/s00344-007-0012-6.
- Ali, N., y Singh, G. (2010). «Soybean processing and utilization», en *The soybean: botany, production and uses*, 345-374.
- Alves, D. T., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., Farias, L. R., Dias, S. C., Chiarello, M. D., et al. (2009). Identification of four novel members of Kunitz-like α -amylase inhibitors family from *Delonix regia* with activity toward Coleopteran insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95, 166-172. doi: 10.1016/J.PESTBP.2009.08.011.
- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A. R., y Fait, A. (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* 15, 211-218. doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.003.
- Arimura, G. I., Matsui, K., y Takabayashi, J. (2009). Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: Proximate factors and their ultimate functions. *Plant and Cell Physiology* 50, 911-923. doi: 10.1093/pcp/pcp030.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., y Laakso, S. (1981). Lipoxygenase from Soybeans. *METHODS IN ENZYMOLOGY* 71, 441-451. doi: 10.1016/0076-6879(81)71055-3.
- Baldwin, I. T., y Schmelz, E. A. (1996). Immunological «Memory» in the Induced Accumulation of Nicotine in Wild Tobacco. *Ecology* 77, 236-246. doi:

10.2307/2265673.

- Balestrazzi, A., Confalonieri, M., Odoardi, M., Ressegotti, V., Allegro, G., Tava, A., et al. (2004). A trypsin inhibitor cDNA from a novel source , snail medic (*Medicago scutellata* L .): cloning and functional expression in response to wounding , herbivore , jasmonic and salicylic acid. *Plant Science* 167, 337-346. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.04.002.
- Balusa, F., & Vivanco, J. M. (2009). *Signaling and Communication in Plants*. doi: 10.3233/978-1-60750-972-1-205.
- Barton, K. E., y Koricheva, J. (2010). The ontogeny of plant defense and herbivory: Characterizing general patterns using meta-analysis. *American Naturalist* 175, 481-493. doi: 10.1086/650722.
- Bell, E., Creelman, R. A., y Mullet, J. E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8675-8679. doi: 10.1073/pnas.92.19.8675.
- Beneytout, J., Andrianarison, R., Rakotoarisoa, Z., Tixier, M., Biochimie, L. De, y Marcland, D. (1989). Properties of a Lipoxygenase in Green Algae. *Plant Physiology* 91, 367-372.
- Bhattacharyya, A., Mazumdar Leighton, S., y Babu, C. . (2007). Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 145, 669–677. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.03.003.
- Bi, J. L., y Felton, G. W. (1995). Foliar oxidative stress and insect herbivory : Primary compounds , secondary metabolites , and Reactive oxygen species as components of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology* 21. doi: 10.1007/BF02035149.

- Birk, Y., Gertler, A., y Khalef, S. (1963). A pure Trypsin Inhibitor from Soya Beans. *The Biochemical journal* 87, 281-284. doi: 10.1042/bj0870281.
- Bodenhause, N., y Reymond, P. (2007). Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in Arabidopsis. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 20, 1406-1420. doi: 10.1094/MPMI-20-11-1406.
- Bodrero, M., Gamundi, J. C., Lenzi, L., Craviotto, R., Arango, M., y Martignone, R. (2002). «Retención foliar, pérdidas de rendimiento y calidad de granos en lotes de soja del centro-norte de Santa Fe», en *Para mejorar la producción. Soja Campaña 2001/2002* (INTA EEA Oliveros), 115-120.
- Boethel, D. J., Russin, J. S., Wier, A. T., Layton, M. B., Mink, J. S., y Boyd, M. L. (2009). Delayed Maturity Associated with Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) Injury at Various Soybean Phenological Stages. *Journal of Economic Entomology* 93, 707-712. doi: 10.1603/0022-0493-93.3.707.
- Bolter, C. J., y Jongsma, M. a. (1995). Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *Journal of Insect Physiology* 41, 1071-1078. doi: 10.1016/0022-1910(95)00073-4.
- Bonaventure, G. (2012). Perception of insect feeding by plants. *Plant Biology* 14, 872-880. doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00650.x.
- Bowman, D. E. (1947). Differentiation of Soy Bean Antitryptic Factors. *Experimental Biology and Medicine* 63, 547-550.
- Brash, A. R. (1999). Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 274, 23679-23682. doi: 10.1074/jbc.274.34.23679.
- Browse, J. (2009). The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and

- signaling. *Phytochemistry* 70, 1539-1546. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.08.004.
- Browse, J., y Howe, G. a (2008). New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant physiology* 146, 832-838. doi: 10.1104/pp.107.115683.
- Bunker, T. W., Koetje, D. S., Stephenson, L. C., Creelman, R. A., Mullet, J. E., y Grimes, H. D. (1995). Sink limitation induces the expression of multiple soybean vegetative lipoxygenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant Cell* 7, 1319-1331. doi: 10.2307/3870105.
- Caapeleti, I., Ferrarese, M. L. L., Krzyzanowski, F. C., y Ferrarese-Filho, O. (2005). A new procedure for quantification of lignin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed coat and their relationship with the resistance to mechanical damage. *Seed Science and Technology* 33, 511-515. doi: 10.15258/sst.2005.33.2.25.
- Cerrudo, I., Keller, M. M., Cargnel, M. D., Demkura, P. V., Wit, M. de, Patitucci, M. S., et al. (2012). Low Red / Far-Red Ratios Reduce Arabidopsis Resistance to Botrytis cinerea and Jasmonate Responses via a. *Plant physiology* 158, 2042-2052. doi: 10.1104/pp.112.193359.
- Chaudhary, B. (2013). Plant Domestication and Resistance to Herbivory. *International Journal of Plant Genomics*. doi: dx.doi.org/10.1155/2013/572784.
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z., y Grierson, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology* 136, 2641-2651. doi: 10.1104/pp.104.041608.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J. M., Fernández-Calvo, P., y Solano, R. (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *Plant Journal* 59, 77-87. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03852.x.
- Christensen, S. A., Huffaker, A., Kaplan, F., Sims, J., Ziemann, S., Doehlemann, G.,

- et al. (2015). Maize death acids, 9-lipoxygenase-derived cyclopent(a)nonenes, display activity as cytotoxic phytoalexins and transcriptional mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 11407-11412. doi: 10.1073/pnas.1511131112.
- Clemente, T. E., y Cahoon, E. B. (2009). Soybean oil: Genetic approaches for modification of functionality and total content. *Plant Physiology* 151, 1030-1040. doi: 10.1104/pp.109.146282.
- Collakova, E., Aghamirzaie, D., Fang, Y., Klumas, C., Tabataba, F., Kakumanu, A., et al. (2013). Metabolic and transcriptional reprogramming in developing soybean (*Glycine max*) embryos. *Metabolites* 3, 347-372. doi: 10.3390/metabo3020347.
- Creelman, R. a., y Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 355-381. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.355.
- Curzi, M. J., Zavala, J. A., Spencer, J. L., y Seufferheld, M. J. (2012). Abnormally high digestive enzyme activity and gene expression explain the contemporary evolution of a diabrotica biotype able to feed on soybeans. *Ecology and Evolution* 2, 2005-2017. doi: 10.1002/ece3.331.
- da Silva, J. G., Magarelli, G., Pedroza, T. M., Cavalcante, R. S., de Souza, J. R., da Silva, J. P., et al. (2021). Determination of total isoflavones and rutin in seeds, roots, and leaves of Brazilian soybean cultivars by using voltammetric methods. *Journal of Agriculture and Food Research* 3. doi: 10.1016/j.jafr.2021.100113.
- Dardanelli, J. L., Jose, M., Cuniberti, M., Resnik, S., Ramunda, S. F., Herrero, R., et al. (2006). Soybean Maturity Groups, Environments, and Their Interaction Define Mega- environments for Seed Composition in Argentina. doi: 10.2135/cropsci2005.12-0480.

- Davies, C. S., Nielsen, S. S., y Nielsen, N. C. (1987). Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase-2. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 64, 1428-1433. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02636994>.
- Dillon, F. M. (2017). Efecto de la radiación solar UV-B y del daño de orugas (*Anticarsia gemmatalis*) trips (*Caliothrips phaseoli*) chinches (*Nezara viridula* y *Piezodorus guildinii*) sobre el perfil de compuestos fenólicos y la actividad de inhibidores de proteasas: rol del etile.
- Dillon, F. M., Chludil, H. D., Mithöfer, A., y Zavala, J. A. (2020). Solar UVB-inducible ethylene alone induced isoflavonoids in pods of field-grown soybean, an important defense against stink bugs. *Environmental and Experimental Botany* 178. doi: [10.1016/j.envexpbot.2020.104167](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104167).
- Dillon, F. M., Chludil, H. D., Reichelt, M., Mithöfer, A., y Zavala, J. A. (2018a). Field-grown soybean induces jasmonates and defensive compounds in response to thrips feeding and solar UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany* 156, 1-7. doi: [10.1016/j.envexpbot.2018.08.022](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.022).
- Dillon, F. M., Chludil, H. D., y Zavala, J. A. (2017). Solar UV-B radiation modulates chemical defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in leaves of field-grown soybean. *Phytochemistry* 141, 27-36. doi: [10.1016/j.phytochem.2017.05.006](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.05.006).
- Dillon, F. M., Tejedor, M. D., Ilina, N., Chludil, H. D., Mithöfer, A., Pagano, E. A., et al. (2018b). Solar UV-B radiation and ethylene play a key role in modulating effective defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in field-grown soybean. *Plant Cell and Environment* 41, 383-394. doi: [10.1111/pce.13104](https://doi.org/10.1111/pce.13104).
- Dominy, N. J., Lucas, P. W., y Wright, S. J. (2003). Mechanics and chemistry of rain forest leaves: canopy and understory compared. *Journal of exper* 54, 2007-2014. doi: [10.1093/jxb/erg224](https://doi.org/10.1093/jxb/erg224).

- Douillard, R., y Bergeron, E. (1981). Chloroplastic localization of soluble lipoxygenase activity in young leaves. *Plant Science Letters* 22, 263-268.
- Duffey, S. S., y Stout, M. J. (1996). Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives Of Insect Biochemistry And Physiology* 32, 3-37. doi: 10.1002/(SICI)1520-6327(1996)32:1<3::AID-ARCH2>3.0.CO;2-1.
- Farmer, E. E., y Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129-134. doi: 10.2307/3869566.
- Farnsworth, E. (2004). Hormones and Shifting Ecology throughout Plant Development. *Ecology* 85, 5-15.
- Fehr, W. R., y Caviness, C. E. (1977). Stages of Soybean Development. *Special report IOWA State University of Science and Technology Ames* 80, 11 p.
- Felton, G. W. (2005). Indigestion is a plant's best defense. *PNAS* 102, 18771-18772. doi: 10.1073/pnas.0509895102.
- Felton, G. W., Bi, J. L., Summers, C. B., Mueller, A. J., y Duffey, S. S. (1994). Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory. *Journal of Chemical Ecology* 20, 651-666. doi: 10.1007/BF02059605.
- Felton, G. W., y Tumlinson, J. H. (2008). Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 457-463. doi: 10.1016/j.pbi.2008.07.001.
- Ferrie, B. J., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher, C. G., y Rothstein, S. J. (1994). The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiology* 106, 109-118. doi: 10.1104/pp.106.1.109.
- Feussner, I., y Kühn, H. (1995). The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. *Federation of European Biochemical Societies*

367, 12-14.

- Feussner, I., y Wasternack, C. (2002). The Lipoxygenase Pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53, 275-297. doi: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248.
- Flores, F. (2009). Hacia dónde vamos en el manejo de plagas. *Informe de actualización técnica. EEA Marcos Juárez* 14, 21-29.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., et al. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-iso-leucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* 5, 344-350. doi: 10.1038/nchembio.161.
- França Neto, J., Pádua, G., Carvalho, M., Costa, O., Brumatti, P., Krzyzanowski, F., et al. (2005). Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica. *Circular Técnica - EMBRAPA Soja (Brazil)*. ISSN 1516-, 8.
- Franceschi, V. R., y Giaquinta, R. T. (1983). The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. *Planta* 157, 422-431.
- Fürstenberg-hägg, J., Zagrobelny, M., y Bak, S. (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10242-10297. doi: 10.3390/ijms140510242.
- Gamundi, J. C., Perotti, E., y Molinari, A. (2007). «Evaluación de insecticidas para el control de chinches en cultivos de soja», en *Soja, Manejo integrado de plagas y enfermedades*, ed. INTA EEA Oliveros, 112-114.
- Gamundi, J. C., Perotti, E. R., y Lago, M. E. (2010). Evaluación del daño conjunto de tres adversidades biológicas de la soja: *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), *Piezodorus guildinii* (Westwood) y *Cercospora sojina* Hara según estrategia de manejo del cultivo. *INTA EEA OLIVEROS*.
- Gamundi, J. C., y Sosa A., M. (2007). Caracterización de daños de chinches en soja y criterios para la toma de decisiones de manejo. *Ediciones INTA, Manfredi*, 1-19.
- Gamundi, J. C., y Sosa, M. A. (2008). «Caracterización de daños de chinches en soja y

- criterios para la toma de decisiones de manejo», en *Chinches fitófagas en soja. Revisión y avances en el estudio de su ecología y manejo* (Ediciones INTA, Manfredi), 129-148.
- Gardner, H. W. (1979). Lipid Hydroperoxide Reactivity with Proteins and Amino Acids: A Review. *J. Agric. Food Chem* 27.
- Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1084, 221-239.
- Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. *New Phytologist* 156, 145-169. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x.
- Giacometti, R., Barneto, J., Barriga, L. G., Sardoy, P. M., Balestrasse, K., Andrade, A. M., et al. (2016a). Early perception of stink bug damage in developing seeds of field-grown soybean induces chemical defences and reduces bug attack. *Pest management science* 72, 1585-1594. doi: 10.1002/ps.4192.
- Giacometti, R., Jacobi, V., Kronberg, F., Panagos, C., Edison, A. S., y Zavala, J. A. (2020). Digestive activity and organic compounds of *Nezara viridula* watery saliva induce defensive soybean seed responses. *Scientific Reports Nature* 10, 1-12. doi: 10.1038/s41598-020-72540-3.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms Of Defense Against Biotrophic And Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205-227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.
- Gordon, M. H., y Barimalaa, I. S. (1989). Co-oxidation of Fat-Soluble Vitamins by Soybean Lipoxygenase. *Food Chemistry* 32, 31-37.
- Gregorio, A. D. E., Dug, G., Arena, N., Organica, C., y Cnr, O. (2000). Lipoxygenase activities in ripening olive fruit. *Journal of Food Biochemishy* 24, 417-426. doi: doi.org/10.1111/j.1745-4514.2000.tb00710.x.

- Griffiths, A., Prestage, S., Linfoth, R., Zhang, J., Taylor, A., y Grierson, D. (1999). Fruit-specific lipoxygenase suppression in antisense-transgenic tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 17, 163-173.
- Grossman, S., y Leshem, Y. Y. (1978). Lowering of Endogenous Lipoxygenase Activity in *Pisum sativum* Foliage by cytokinin as related to senescence. *Physiologia Plantarum* 43, 359-362.
- Halitschke, R., y Baldwin, I. T. (2003). Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal* 36, 794-807. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01921.x.
- Halitschke, R., y Baldwin, I. T. (2004). Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 23, 238-245. doi: 10.1007/s00344-004-0037-z.
- Han, C., Yin, X., He, D., y Yang, P. (2013). Analysis of Proteome Profile in Germinating Soybean Seed, and Its Comparison with Rice Showing the Styles of Reserves Mobilization in Different Crops. *PLoS ONE* 8. doi: 10.1371/journal.pone.0056947.
- Heitz, T., Bergey, D. R., y Ryan, C. A. (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* 114, 1085-1093. doi: 10.1104/pp.114.3.1085.
- Herms, D. A., y Mattson, W. J. (1992). The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* 67, 283-335. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hildebrand, D. F. (1989). Lipoxygenases. *Physiologia plantarum* 76, 249-253.
- Hildebrand, D. F., y Kito, M. (1984). Role of Lipoxygenases in Soybean Seed Protein Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 815-819. doi: 10.1021/jf00124a029.

- Howe, G. a. (2004). Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of Plant Growth Regulation* 23, 223-237. doi: 10.1007/s00344-004-0030-6.
- Howe, G. A., y Jander, G. (2008). Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59, 41-66. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825.
- Howe, G. A., y Schilmiller, A. L. (2002). Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 230-236. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00250-9.
- Huang, J., Cai, M., Long, Q., Liu, L., Lin, Q., Jiang, L., et al. (2014). OsLOX2, a rice type I lipoxygenase, confers opposite effects on seed germination and longevity. *Transgenic Research* 23, 643-655. doi: 10.1007/s11248-014-9803-2.
- Jongsma, M. A., Bakker, P. L., Visser, B., y Stiekema, W. J. (1994). Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack , wounding and virus infection. *Planta* 195, 29-35.
- Jongsma, M., y Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plants protease inhibitors. *J. Insect Physiol* 43, 885-895.
- Joo, Y., y Oh, D. (2012). Lipoxygenases : Potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. *Biotechnology Advances* 30, 1524-1532. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.04.004.
- Kaloshian, I., y Walling, L. L. (2005). Hemipterans as Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 491-521. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135944.
- Kambhampati, S., Aznar-moreno, J. A., Bailey, S. R., Arp, J. J., Chu, K. L., Bilyeu, K. D., et al. (2021). Temporal changes in metabolism late in seed development affect biomass composition. *Plant physiology* 186, 874-890. doi: 10.1093/plphys/kiab116.
- Kato, T., Ohta, H., Tanaka, K., y Shibata, D. (1992). Appearance of new lipoxygenases in soybean cotyledons after germination and evidence for expression of a major new

- lipoxygenase gene. *Plant Physiology* 98, 324-330. doi: 10.1104/pp.98.1.324.
- Katsir, L., Chung, H. S., Koo, A. J., y Howe, G. a. (2008). Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 428-435. doi: 10.1016/j.pbi.2008.05.004.
- Kawazu, K., Mochizuki, A., y Sato, Y. (2012). Different expression profiles of jasmonic acid and salicylic acid inducible genes in the tomato plant against herbivores with various feeding modes. *Arthropod-Plant Interactions* 6, 221-230. doi: 10.1007/s11829-011-9174-z.
- Kazan, K., y Manners, J. M. (2008). Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. *Plant Physiology* 146, 1459-1468. doi: 10.1104/pp.107.115717.
- Kessler, A., Halitschke, R., y Baldwin, I. T. (2004). Silencing the Jasmonate cascade: Induced plant defenses and insect populations. *Science* 305, 665-668. doi: 10.1126/science.1096931.
- Kitamura, K. (1984). Biochemical Characterization of Lipoxygenase Lacking Mutants, L-1-less, L-2-less, and L-3-less Soybeans. *Agricultural and Biological Chemistry* 48, 2339-2346. doi: 10.1271/bbb1961.48.2339.
- Klauer, S. F., y Franceschi, V. R. (1997). Mechanism of transport of vegetative storage proteins to the vacuole of the paraveinal mesophyll of soybean leaf. *Protoplasma* 200, 174-185. doi: 10.1007/BF01283293.
- Koc, A. B., Abdullah, M., y Fereidouni, M. (2011). «Soybeans Processing for Biodiesel Production», en *Soybean*, ed. Tzi-Bun Ng (IntechOpen), 19-36. doi: 10.5772/14216.
- Kombrink, E. (2012). Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* 236, 1351-1366. doi: 10.1007/s00425-012-1705-z.
- Koo, A. J. K., Gao, X., Daniel Jones, A., y Howe, G. A. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. *Plant*

- Journal* 59, 974-986. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03924.x.
- Kunitz M. (1946). Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. *The Journal of general physiology* 101, 149-154. doi: 10.1126/science.65.1678.208-a.
- Ladizinsky, G. (1998). How many tough-rachis mutants gave rise to domesticated barley *Genetic Resources and Crop Evolution* 45, 411-414. doi: 10.1023/A:1008697524133.
- Laluk, K., y Mengiste, T. (2010). «Necrotroph Attacks on Plants : Wanton Destruction or Covert Extortion?», en *The Arabidopsis Book* (The American Society of Plant Biologists), 34.
- Lazebnik, J., Frago, E., y Dicke, M. (2014). Phytohormone Mediation of Interactions Between Herbivores and Plant Pathogens. *J Chem Ecol* 40, 730-741. doi: 10.1007/s10886-014-0480-7.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., y Genschik, P. (2006). F-box proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 631-638. doi: 10.1016/j.pbi.2006.09.003.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E., et al. (2006). Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties. *European Journal of Agronomy* 25, 170-176. doi: 10.1016/j.eja.2006.04.010.
- Lenis, J. M., Gillman, J. D., Lee, J. D., Shannon, G. G., y Bilyeu, K. D. (2010). Soybean seed lipoxygenase genes: Molecular characterization and development of molecular marker assays. *Theoretical and Applied Genetics* 120, 1139-1149. doi: 10.1007/s00122-009-1241-9.
- Leon-reyes, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Körbes, A. P., Memelink, J., et al. (2010). Ethylene Signaling Renders the Jasmonate Response of Arabidopsis

- Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid. *Mol Plant Microbe Interact.* 23, 187-197. doi: 10.1094/MPMI-23-2-0187.
- Leon-reyes, A., Spoel, S. H., Lange, E. S. De, Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S., et al. (2009). Ethylene Modulates the Role of Nonexpressor Of Pathogenesis-Related Genes in Cross Talk between Salicylate and Jasmonate Signaling. *Plant physiology* 149, 1797-1809. doi: 10.1104/pp.108.133926.
- León, J., Royo, J., Vancanneyt, G., Sanz, C., Silkowski, H., Griffiths, G., et al. (2002). Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production. *Journal of Biological Chemistry* 277, 416-423. doi: 10.1074/jbc.M107763200.
- Li, L., Hur, M., Lee, J., Zhou, W., Song, Z., Ransom, N., et al. (2015). A systems biology approach toward understanding seed composition in soybean. *BMC Genomics* 16, 1-18.
- Liavonchan, A., y Feussner, I. (2006). Lipoxygenases : Occurrence , functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* 163 163, 348-357. doi: 10.1016/j.jplph.2005.11.006.
- Liavonchanka, A., y Feussner, I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology* 163, 348-357. doi: 10.1016/j.jplph.2005.11.006.
- Lima, W. A. A., Borém, A., Dias, D. C. F. S., Moreira, M. A., y Dias, L. A. S. (2010). Lipoxygenase and physiological quality of soybean seeds during storage. *Seed Science and Technology* 38, 767-771. doi: 10.15258/sst.2010.38.3.23.
- Liu, L., Sonbol, F., Huot, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., et al. (2016). Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat. Commun.* 7, 1-10. doi:

10.1038/ncomms13099.

MacLeod, G., y Ames, J. (1988). Soy flavor and its improvement. *Critical reviews in food science and nutrition* 27, 219–400. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398809527487>.

Macri, F., Braidot, E., Petrusa, E., y Vianello, A. (1994). Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. 1215, 109-114.

Magarelli, G., Lima, L. H. C., da Silva, J. G., SouzaDe, J. R., y de Castro, C. S. P. (2014). Rutin and total isoflavone determination in soybean at different growth stages by using voltammetric methods. *Microchemical Journal* 117, 149-155. doi: 10.1016/j.microc.2014.06.019.

Mandal, S., y Dahuja, A. (2013). Lipoxygenase activity in soybean is modulated by enzyme-substrate ratio. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23, 217-220. doi: 10.1007/s13562-013-0203-0.

Marcos, R., Izquierdo, Y., Velloso, T., Kulasekaran, S., Cascón, T., Hamberg, M., et al. (2015). 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins Activate Brassinosteroid Signaling to Promote Cell Wall-Based Defense and Limit Pathogen Infection. *Plant physiology* 169, 2324-2334. doi: 10.1104/pp.15.00992.

Martins, C. A. O., Sedyama, C. S., Moreira, M. A., Reis, M. S., Oliveira, V. S. R., y Almeida, M. G. de (2002). Efeito da eliminação genética das lipoxigenases das sementes sobre as características agronômicas da soja. *Pesq. agropec. bras.* 37, 1389-1398.

McPherson, J. E., y McPherson, R. M. (2002). *Stink Bugs of Economic Importance in America North of Mexico.* , ed. John Edwin Boca Raton, Florida: CRC Press LLC doi: [http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0297:SBOEII\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0297:SBOEII]2.0.CO;2).

Melan, M. A., Enriquez, A. L. D., y Peterman, T. K. (1994). The LOX1 gene of

- Arabidopsis Is temporally and spatially regulated in germinating seedlings. *Plant Physiology* 105, 385-393. doi: 10.1104/pp.105.1.385.
- Milla, R., Osborne, C. P., Turcotte, M. M., y Violle, C. (2015). Plant domestication through an ecological lens. *Trends in Ecology & Evolution* 30, 1-7. doi: 10.1016/j.tree.2015.06.006.
- Ministerio de Agricultura, G. y P. (2020). Estimaciones Agrícolas. *Tableros*. Available at: <https://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>.
- Ministerio de Hacienda (2019). Informes de cadenas de valor. Oleaginosas: Soja-septiembre 2019.
- Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., y Karley, A. J. (2016). Plant Defense against Herbivorous Pests : Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01132.
- Molina, G. A. R., y Trumper, E. V. (2012). Selection of Soybean Pods by the Stink Bugs, *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* . *Journal of Insect Science* 12, 1-16. doi: 10.1673/031.012.10401.
- Moreira, M. A., Tavares, S. R., Ramos, V., y De Barros, E. G. (1993). Hexanal production and TBA number are reduced in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds lacking lipoxygenase isozymes 2 and 3. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 103-106. doi: 10.1021/jf00025a022.
- Mosblech, A., Feussner, I., y Heilmann, I. (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 511-517. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.12.011.
- Nishiba, Y., Hajika, M., Igita, K., National, K., Experiment, A., y Sta-, E. (1995). Hexanal Accumulation and DETBA Value in Homogenate of Soybean Seeds Lacking Two or Three Lipoxygenase Isozymes. *J. Agric. Food Chem* 43, 738-741.

- Onkokesung, N., Gális, I., von Dahl, C. C., Matsuoka, K., Saluz, H. P., y Baldwin, I. T. (2010). Jasmonic acid and ethylene modulate local responses to wounding and simulated herbivory in nicotiana attenuata leaves. *Plant Physiology* 153, 785-798. doi: 10.1104/pp.110.156232.
- Panizzi, A., Galileo, M., Gastau, H., Toledo, J., y Wild, C. H. (1980). Dispersal of *Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii* Nymphs in Soybeans. *Entomological Society of America* 9, 293-297.
- Panizzi, A. R., Lucini, T., y Possebom, T. (2018). Development of *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) reared on spring cereals versus soybean. *Journal of Insect Science* 18. doi: 10.1093/jisesa/iey102.
- Paolilli, M. C., Cabrini, S. M., Pagliaricci, L. O., Fillat, F. A., y Bitar, M. V. (2019). Importancia de la cadena de soja en Argentina. *Revista de Tecnología Agropecuaria* 10, 42-46.
- Park, T. K., Holland, M. A., Laskey, J. G., y Polacco, J. C. (1994). Germination-associated lipoxygenase transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. *Plant Science* 96, 109-117. doi: 10.1016/0168-9452(94)90227-5.
- Parkhey, S., Naithani, S. C., y Keshavkant, S. (2012). ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during aging. *Plant Physiology and Biochemistry* 57, 261-267. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.06.008.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, E45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pieterse, M. J., Does, D. Van Der, Zamioudis, C., Leon-reyes, A., y Wees, S. C. M. Van (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. 1-33. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.

- Pilkay, G. L., Reay-Jones, F. P. F., Toews, M. D., Greene, J. K., y Bridges, W. C. (2014). Spatial and temporal dynamics of stink bugs in southeastern farmscapes. *Journal of Insect Science* 15, 1-13. doi: 10.1093/jisesa/iev006.
- Porta, H., y Rocha-sosa, M. (2002). Update on Plant Lipoxygenases Plant Lipoxygenases . Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology* 130, 15-21. doi: 10.1104/pp.010787.
- Porta, H., Rueda-Benítez, P., Campos, F., Colmenero-Flores, J. M., Colorado, J. M., Carmona, M. J., et al. (1999). Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant and Cell Physiology* 40, 850-858. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029614.
- Powell, K. S., Gatehouse, A. M. R., Hilder, V. A., y Gatehouse, J. A. (1995). Antifeedant effects of plant lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 75, 51-59.
- Rancé, I., Fournier, J., y Esquerré-Tugayé, M.-T. (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Plant Biology* 95, 6554-6559.
- Rane, A. S., Venkatesh, V., Joshi, R. S., y Giri, A. P. (2020). Molecular investigation of Coleopteran specific α -Amylase inhibitors from Amaranthaceae members. *International Journal of Biological Macromolecules* 163, 1444-1450. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.219.
- Rawal, R., Kumar, V., Rani, A., y Gokhale, S. M. (2020). Genetic Elimination of Off-Flavour Generating Lipoxygenase- Gene of Soybean through Marker Assisted

- Backcrossing and Its Effect on Seed Longevity. *Plant Breed. Biotech.* 8, 163-173.
doi: <https://doi.org/10.9787/PBB.2020.8.2.163>.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., y Farmer, E. E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell* 12, 707-719. doi: 10.1105/tpc.12.5.707.
- Romero, B., Dillon, F. M., y Zavala, J. A. (2020). Different soybean cultivars respond differentially to damage in a herbivore-specific manner and decrease herbivore performance. *Arthropod-Plant Interactions* 14, 89-99. doi: 10.1007/s11829-019-09730-y.
- Royo, J., León, J., Vancanneyt, G., Albar, J. P., Rosahl, S., Ortego, F., et al. (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weightgain of insect pests. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 96, 1146-1151.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A. G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S., et al. (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry* 271, 21012-21019. doi: 10.1074/jbc.271.35.21012.
- Rustérucci, C., Montillet, J., Agnel, J., Battesti, C., Béatrice, A., Knoll, A., et al. (1999). Involvement of Lipoxygenase-dependent Production of Fatty Acid Hydroperoxides in the Development of the Hypersensitive Cell Death induced by Cryptogein on Tobacco Leaves. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 36446-36455.
- Sabljić, I., Barneto, J. A., Balestrasse, K. B., Zavala, J. A., y Pagano, E. A. (2020). Role of reactive oxygen species and isoflavonoids in soybean resistance to the attack of the southern green stink bug. *PeerJ* 8, 1-18. doi: 10.7717/peerj.9956.
- Saravitz, D. M., y Siedow, J. N. (1995). The lipoxygenase isozymes in soybean [Glyche

- max (L.) Merr.] leaves. *Plant Physiol* 107, 535-543.
- Saravitz, D. M., y Siedow, J. N. (1996a). The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. *Plant physiology* 110, 287-299. doi: 10.1104/pp.110.1.287.
- Saravitz, D. M., y Siedow, J. N. (1996b). The Differential Expression of Wound-Inducible Lipoxygenase Genes in Soybean Leaves. 287-299.
- Sardoy, P., Ilina, N., Borniego, L., Traverso, L., Pagano, E. A., Ons, S., et al. (2021). Proteases inhibitors-insensitive cysteine proteases allow *Nezara viridula* to feed on growing seeds of field-grown soybean. *Journal of Insect Physiology* 132, 104250. doi: 10.1016/j.jinsphys.2021.104250.
- Schaller, F., Pflanzenphysiologie, È., Bochum, È., y Bochum, D.- (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. 52.
- Schmelz, E. A., Alborn, H. T., y Tumlinson, J. H. (2003). Synergistic interactions between volicitin, jasmonic acid and ethylene mediate insect-induced volatile emission in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 117, 403-412. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00054.x.
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A., y Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*.
- Schweiger, R., Heise, a. M., Persicke, M., y Müller, C. (2014). Interactions between the jasmonic and salicylic acid pathway modulate the plant metabolome and affect herbivores of different feeding types. *Plant, Cell and Environment* 37, 1574-1585. doi: 10.1111/pce.12257.
- Siedow, J. N. (1991). Plant Lipoxygenase: Structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 145-188.
- Song, Y., Love, M. H., y Murphy, P. (1990). Subcellular Localization of Lipoxygenase-1 and -2 in Germinating Soybean Seeds and Seedlings. *J. Am. Oil Chem. Soc* 67, 961-

965.

- Souza, B. H. S., Costa, E. N., Ribeiro, Z. A., Perlatti, B., Cruz, M. C. P., Forim, M. R., et al. (2021). Soybean leaf age and plant stage influence expression of resistance to velvetbean caterpillar and fall armyworm. *Chemoecology*. doi: 10.1007/s00049-021-00360-6.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. a, Mueller, M. J., et al. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant cell* 15, 760-770. doi: 10.1105/tpc.009159.
- Stadler, T., Buteler, M., Y Ferrero, A. A. (2006). Susceptibilidad a endosulfan y monitoreo de resistencia en poblaciones de *Piezodorus guildinii* (Insecta, Heteroptera: Pentatomidae), en cultivos de soja de Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 65, 109-119.
- Start, W. G., Ma, Y., Polacco, J. C., Hildebrand, D. F., Freyer, G. A., y Altschuler, M. (1986). Two soybean seed lipoxygenase nulls accumulate reduced levels of lipoxygenase transcripts. *Plant molecular biology* 7, 11-23. doi: 10.1007/BF00020127.
- Staswick, P. E., y Tiriyaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *The Plant cell* 16, 2117-2127. doi: 10.1105/tpc.104.023549.
- Stout, M. J. (2013). Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. *Insect Science* 20, 263-272. doi: 10.1111/1744-7917.12011.
- Tabashnik, B. E., Van Rensburg, J. B. J., y Carrière, Y. (2009). Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops : Definition , Theory , and Data Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops : Definition , Theory and Data. *Entomological Society of*

America 102, 2011-2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/029.102.0601>.

Tanteeratarm, K., Wei, L. S., y Steinberg, M. P. (1989). Effect of Soybean Maturity on Storage Stability and Process Quality. *Journal of food science* 54, 593-597.

Tejedor, M. D. (2017). Participación de las Tiorredoxinas en la digestión de proteínas vegetales : relación Soja (*Glycine max*) - *Anticarsia gemmatalis*. Available at: http://repositorioubasibbi.uba.ar/gsd/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=posgraafa&cl=CL1&d=HWA_1975%3E.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., et al. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOII complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661-666. doi: 10.1038/nature05960.

Thompson, J. E., Legge, R. L., y Barber, R. F. (1987). The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist* 105, 317-344.

Tobias, Z., y Agrawal, A. A. (2017). Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory : An Emerging Mechanistic Synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 34.

Todd, J. (1989). Ecology And Behavior Of *Nezara Viridula*. *Annual Review of Entomology* 34, 273-292. doi: 10.1146/annurev.ento.34.1.273.

Todd, J. W., y Womack, H. (1973). Secondary Infestations of Cigarette Beetle in Soybean Seed Damaged by Southern Green Stink Bug. *Environmental Entomology* 2, 720-720. doi: 10.1093/ee/2.4.720.

Tranbarger, T. J., Franceschi, V. R., Hildebrand, D. F., y Grimes, H. D. (1991). The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell* 3, 973-987. doi: 10.1105/tpc.3.9.973.

Trapp, M. A., Souza, G. D. De, Rodrigues-filho, E., Boland, W., y Mithöfer, A. (2014).

- Validated method for phytohormone quantification in plants. *Front. Plant Sci.* 5, 1-11. doi: 10.3389/fpls.2014.00417.
- Turner, J. G., Ellis, C., y Devoto, A. (2002a). The jasmonate signal pathway. *The Plant cell* 14, 153-164. doi: 10.1105/tpc.000679.
- Uchida, K., y Stadtman, E. R. (1992). Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. 89, 4544-4548.
- Van Dam, N. M., Horn, M., Mareš, M., y Baldwin, I. T. (2001). Ontogeny constrains systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Chemical Ecology* 27, 547-568. doi: 10.1023/A:1010341022761.
- Van Poecke, R. M. P., y Dicke, M. (2004). Indirect defence of plants against herbivores: Using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biology* 6, 387-401. doi: 10.1055/s-2004-820887.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., et al. (2007). Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in *Arabidopsis* Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade. *The Plant cell* 19, 831-846. doi: 10.1105/tpc.106.046052.
- Vick, B. A., y Zimmerman, D. O. N. C. (1980). *Oxidative Systems for Modification of Fatty Acids: The Lipoxygenase Pathway*. ACADEMIC PRESS, INC. doi: 10.1016/B978-0-12-675409-4.50009-5.
- Viswanath, K. K., Varakumar, P., Reddy, R., Shiak, P., y Basha, J. (2020). Plant Lipoxygenases and Their Role in Plant Physiology. *Journal of Plant Biology* 63, 83-95. doi: 10.1007/s12374-020-09241-x.
- Walling, L. L. (2000). The Myriad Plant Responses to Herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 17, 195-216. doi: 10.1007/s003440000026.
- Wang, C., Croft, K. P. C., Järlfors, U., y Hildebrand, D. F. (1999). Subcellular

- localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in lipid mobilization during soybean germination. *Plant Physiology* 120, 227-235. doi: 10.1104/pp.120.1.227.
- Wang, J., Kuang, H., Zhang, Z., Yang, Y., Yan, L., Zhang, M., et al. (2020). Generation of seed lipoxygenase-free soybean using CRISPR-Cas9. *Crop Journal* 8, 432-439. doi: 10.1016/j.cj.2019.08.008.
- Wang, W. H., Takano, T., Shibata, D., Kitamura, K., y Takeda, G. (1994). Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxygenase 2: Substitution of glutamine for an iron-ligand histidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5828-5832. doi: 10.1073/pnas.91.13.5828.
- Wasternack, C., Forner, S., Strnad, M., y Hause, B. (2013). Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie* 95, 79-85. doi: 10.1016/j.biochi.2012.06.005.
- Wasternack, C., y Song, S. (2017). Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany* 68, 1303-1321. doi: 10.1093/jxb/erw443.
- Weber, H., Chételat, A., Caldelari, D., y Farmer, E. E. (1999). Divinyl Ether Fatty Acid Synthesis in Late Blight – Diseased Potato Leaves. *The Plant cell* 11, 485-493. doi: 10.1105/tpc.11.3.485.
- Weiner, J. (2004). Allocation , plasticity and allometry in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 6, 207-215.
- Weselake, R. J., Taylor, D. C., Rahman, M. H., Shah, S., Laroche, A., McVetty, P. B. E., et al. (2009). Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnology Advances* 27, 866-878. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.07.001.
- Wolfson, J. L., y Murdock, L. L. (1990). Growth of *Manduca sexta* on wounded tomato plants: role of induced proteinase inhibitors. *Entomologia Experimentalis et*

Applicata 54, 257-264.

- Wu, J., Hettenhausen, C., Meldau, S., y Baldwin, I. T. (2007). Herbivory Rapidly Activates MAPK Signaling in Attacked and Unattacked Leaf Regions but Not between Leaves of *Nicotiana attenuata*. *The Plant cell* 19, 1096-1122. doi: 10.1105/tpc.106.049353.
- Zavala, J. A., y Baldwin, I. T. (2004). Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in *Nicotiana attenuata* are greater than their costs when plants are attacked. *BMC Ecology* 4, 1-15. doi: 10.1186/1472-6785-4-11.
- Zavala, J. A., Casteel, C. L., DeLucia, E. H., y Berenbaum, M. R. (2008a). Anthropogenic increase in carbon dioxide compromises plant defense against invasive insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5129-5133. doi: 10.1073/pnas.0800568105.
- Zavala, J. a., Giri, A. P., Jongsma, M. a., y Baldwin, I. T. (2008b). Digestive duet: Midgut digestive proteinases of *Manduca sexta* ingesting *Nicotiana attenuata* with manipulated trypsin proteinase inhibitor expression. *PLoS ONE* 3, 29-31. doi: 10.1371/journal.pone.0002008.
- Zavala, J. A., Mazza, C. A., Dillon, F. M., Chludil, H. D., y Ballaré, C. L. (2015). Soybean resistance to stink bugs (*Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii*) increases with exposure to solar UV-B radiation and correlates with isoflavonoid content in pods under field conditions. *Plant, Cell and Environment* 38, 920-928. doi: 10.1111/pce.12368.
- Zavala, J. A, Patankar, A. G., Gase, K., y Baldwin, I. T. (2004). Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1607-12. doi: 10.1073/pnas.0305096101.

- Zhai, Q., Yan, C., Li, L., Xie, D., y Li, C. (2017). «Jasmonates», en *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (Elsevier Ltd), 243-272. doi: 10.1016/B978-0-12-811562-6.00007-4.
- Zhang, P. J., Li, W. Di, Huang, F., Zhang, J. M., Xu, F. C., y Lu, Y. Bin (2013). Feeding by Whiteflies Suppresses Downstream Jasmonic Acid Signaling by Eliciting Salicylic Acid Signaling. *Journal of Chemical Ecology* 39, 612-619. doi: 10.1007/s10886-013-0283-2.
- Zhang, Y., Gao, Z., Hu, M., Pan, Y., Xu, X., y Zhang, Z. (2022). Delay of ripening and senescence in mango fruit by 6-benzylaminopurine is associated with inhibition of ethylene biosynthesis and membrane lipid catabolism. *Postharvest Biology and Technology* 185. doi: doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111797.
- Zhao, Y., Botella, M. A., Subramanian, L., Niu, X., Nielsen, S. S., Bressan, R. A., et al. (1996). Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiology* 111, 1299-1306. doi: 10.1104/pp.111.4.1299.
- Zhou, G., Qi, J., Ren, N., Cheng, J., Erb, M., Mao, B., et al. (2009). Silencing OsHI-LOX makes rice more susceptible to chewing herbivores , but enhances resistance to a phloem feeder. *The Plant Journal* 60, 638-648. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03988.x.
- Zhu-salzman, K., y Zeng, R. (2015). Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. *Annu. Rev. Entomol*, 1-20. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020816.