



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Ciencias Naturales

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO Y
PATÓGENOS FÚNGICOS DE PLANTAS DE MANÍ: EFECTO DE SU
CO-INOCULACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE PROMOCIÓN DEL
CRECIMIENTO VEGETAL Y LA PATOGÉNESIS**

Mic. María Soledad Figueredo

Directora: Dra. Adriana Fabra

Codirector: Dr. Fernando Ibáñez

Río Cuarto, Marzo 2018

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dra. Melina Andrea Talano

Universidad Nacional de Río Cuarto

Firma:..... Aclaración:.....

Dra. María Rosa Marano

Universidad Nacional de Rosario

Firma:..... Aclaración:.....

Dr. Fernando Piekenstain

Universidad Nacional de General San Martín

Firma:..... Aclaración:.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: Universidad Nacional de Río Cuarto, 22 de Marzo de 2018

Calificación:

A mi familia

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca que me permitió realizar este Doctorado.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) por darme lugar, una vez más, para llevar a cabo mis estudios.

A la Dra. Adriana Fabra por darme un lugar en su laboratorio y aceptar dirigir este Doctorado, por formarme y acompañarme en todos estos años, y por su excelente predisposición para ayudarme en todo lo que necesité.

Al Dr. Fernando Ibáñez por sus valiosos aportes que han contribuido en mi formación profesional.

A la Dra. Laura Tonelli por su contribución a esta tesis y su compañerismo. Siempre dispuesta a ayudar, gracias!

A la Comisión Asesora de esta Tesis, Dra. Melina Talano, Dra. María Rosa Marano y Dr. Fernando Pieckenstain. Por acompañarme durante estos 5 años, por los aportes realizados a este trabajo y llevar a cabo su rol con muchísima dedicación.

A mis compañeros y amigos del laboratorio. Bibi, Sole, Vani, Johan, Lau, Eli, Ana, Cyn M., Tania, Jorge, Lucio, Stella y Manu. Estos 5 años no hubiesen sido lo mismo sin ellos. Gracias por crear el ambiente de trabajo ideal, por las charlas, risas, mates y ensayos compartidos. Gracias por aceptarme tal cual soy, eso es un montooooon!

A los Doctores Georgina Hernández y Javier Palatnik por su excelente predisposición para ayudarme y contribuir significativamente a esta Tesis.

A mi familia por el apoyo incondicional, por guiarme, aconsejarme, cuidarme y estar presentes en cada paso de mi vida. Gracias por ser parte de mí, siempre juntos... los amo!

A Enio, mi gran compañero de vida... Gracias por estar en cada momento, por apoyar mis decisiones, por compartir mis sueños y acompañarme a realizarlos.

A mis hermanas del corazón. Cynthia, Tamara, Valeria y Eugenia, a pesar de la distancia siempre estamos juntas caminando a la par este hermoso camino, la vida.

A Romi, Orne, Nati, Chris, Lu, Emi y Mauri. Gracias por la amistad de siempre, por los momentos compartidos y los recuerdos hermosos de nuestro paso por la universidad. Que la vida nos mantenga siempre así, juntos.

A la gente hermosa que conocí durante mi estancia en México. Damien, Juliana, José, Mario, Martha, Víctor, Noemí, Enrique, Marlene, Alex y Luis Pedro, gracias por hacer que me sintiera como en casa, por enseñarme su cultura, por su transparencia, humildad y alegría. Por tantos taquitos compartidos, los extraño!

A Isabel, Chochi y Nilda por ser parte de mi vida, por su amor. Porque llegar al pueblo y no verlas, no es llegar al pueblo. Las quiero!

A las estrellas que guían mi camino desde el cielo, abuela Rosa y Olmo. Si pudiera volver a verlos...

¡Gracias!

Resumen

Las plantas en su ambiente natural interactúan con una amplia diversidad de microorganismos, entre ellos benéficos y patógenos, que pueden afectar su crecimiento y sanidad. En un primer contacto, ocurre un intercambio molecular que le permite a la planta reconocer el tipo de microorganismo con el que se encuentra y, en consecuencia, responder activando o reprimiendo vías de señalización que regulan tales interacciones. Si bien las respuestas que se activan frente a una única especie de microorganismos han sido profundamente estudiadas, es relevante analizar cómo responde la planta cuando establece simultáneamente interacciones benéficas y perjudiciales con diversos grupos de microorganismos. El objetivo de esta tesis fue evaluar en maní los efectos de la inoculación simultánea de su microsimbionte *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, la bacteria biocontroladora *Bacillus* sp. CHEP5 y el fitopatógeno fúngico *S. rolf sii*, sobre las actividades bacterianas promotoras de crecimiento vegetal y la acción patogénica del hongo, así como sobre moléculas de las plantas involucradas en la interacción con cada uno de estos microorganismos. La co-inoculación de microorganismos redujo la acción patogénica de *S. rolf sii*, alcanzando valores similares a los de plantas inoculadas sólo con *Bacillus* sp. CHEP5, lo que indica que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 no afecta la capacidad de esta bacteria de inducir resistencia sistémica (ISR) contra el patógeno en plantas de maní. Este fenotipo se correlacionó con la inducción de la actividad peroxidasa. Por otra parte, se evidenció que en plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *S. rolf sii* prevalece la vía de respuesta defensiva (mayor resistencia a *S. rolf sii* e incremento de compuestos fenólicos) sobre la simbiótica (disminución de los parámetros simbióticos y represión del gen *Ahsymrk*). Sin embargo, la presencia de *Bacillus* sp. CHEP5, revierte dicho efecto negativo sobre la simbiosis, retornando a la normalidad la mayoría de los parámetros simbióticos así como los niveles de expresión del gen *Ahsymrk*. Finalmente, en esta tesis también se demostró que la co-inoculación a campo de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5 incrementó el crecimiento, rendimiento y calidad de maní, así como también disminuyó la incidencia y severidad del Carbón de maní. Ello abre una perspectiva para la formulación de un inoculante mixto para su utilización como biofertilizante y biopesticida. Además, la información obtenida en esta tesis representa un aporte al conocimiento de los efectos fenotípicos y moleculares de la inoculación simultánea de maní con microorganismos benéficos y patógenos.

Summary

Plants growing in natural environment interact with a wide diversity of microorganisms including beneficial and pathogenic, which can affect their growth and health. In a first contact, molecular interactions occur that enable plant to identify and to respond appropriately to microorganisms by activating or repressing signaling pathway that regulate such interactions. While responses that are activated against a single species of microorganisms have been deeply studied, few is known about these responses in plants interacting simultaneously not only with beneficial but also with pathogenic microorganisms. The aim of this thesis was to evaluate in peanuts the effects of simultaneous inoculation of the nitrogen-fixing *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and the fungal phytopathogen *S. rolf sii*, on the bacterial plant growth promoting activities and the fungal pathogenic action, as well as on plant molecules involved in these interactions. The co-inoculation of microorganisms reduced *S. rolf sii* pathogenic effect, reaching levels similar to those of plant inoculated only with *Bacillus* sp. CHEP5, indicating that the ability of this bacterium to induce systemic resistance (ISR) against the pathogen is not affected by *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Phenotype of these plants was correlated with the induction of peroxidase activity. On the other hand, it was shown that in plants inoculated with *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 and *S. rolf sii*, defensive response pathway prevails (greater resistance to *S. rolf sii* and increase of phenolic compounds) over the symbiotic one (decrease of the symbiotic parameters and repression of the *Ah symrk* transcription). However, in plants that also interact with *Bacillus* sp. CHEP5, these adverse effects on the symbiosis were reversed. Finally, this thesis also showed that co-inoculation of *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 and *Bacillus* sp. CHEP5 increased the growth, yield and quality of plants growing under field conditions, as well as decreased peanut smut incidence and severity. This opens a new perspective for the formulation of mixed inoculants for using as biofertilizer and biopesticide. Furthermore, the information obtained in this thesis represents a contribution to the understanding of phenotypic and molecular changes in peanut plants interacting simultaneously with beneficial and pathogenic microorganisms.

ÍNDICE

	Página
Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	1-24
1. La rizósfera como hábitat para los microorganismos	1
2. Microorganismos patógenos y el sistema inmune de las plantas	2
3. Microorganismos benéficos y sus mecanismos de acción	5
3.1 Control biológico de enfermedades	6
3.1.1 Inducción de resistencia sistémica (ISR) como mecanismo de control biológico	6
3.2 Fijación biológica del nitrógeno	10
3.2.1 Diálogo molecular leguminosa-rizobio: inicio del proceso simbiótico	11
3.2.2 Modo de entrada de los rizobios a las raíces de las leguminosas	12
3.2.3 Procesa de FBN	14
3.2.4 Los microARNs (miARNs) y su participación en la simbiosis rizobio-leguminosa	15
4. Comunidades microbianas en la rizósfera de las leguminosas	17
5. Plantas de maní (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	18
5.1 Características de la planta de maní	18
5.2 Producción nacional e importancia económica del maní	19
5.3 Enfermedades de la planta de maní	20
6. Hipótesis	24
7. Objetivos	24
7.1 Objetivo general	24

7.2 Objetivos específicos	24
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	25-41
1. Crecimiento y mantenimiento de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	25
2. Crecimiento y mantenimiento del fitopatógeno fúngico utilizado en este trabajo	25
3. Técnicas microbiológicas	26
3.1 Obtención de los inóculos bacterianos	26
3.2 Obtención de los inóculos de <i>S. rolf sii</i>	26
3.3 Aislamiento de bacterias endófitas y epífitas de raíz	26
3.4 Aislamiento de bacterias del interior de nódulos	27
3.5 Ensayos de antibiosis	27
3.6 Evaluación cualitativa de la capacidad de <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 de fijar N ₂	28
3.7 Determinación cualitativa de la capacidad de <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 de solubilizar fosfatos	28
4. Condiciones generales de trabajo con plantas de maní (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	28
4.1 Desinfección superficial y germinación de semillas de maní	28
4.2 Sistema de cultivo de plantas	29
4.3 Selección de las condiciones óptimas para el desarrollo del marchitamiento causado por <i>S. rolf sii</i> en plantas de maní	29
4.4 Inoculación de plantas de maní	30
4.5 Determinación de la incidencia y severidad del marchitamiento causado por <i>S. rolf sii</i>	30
4.6 Evaluación de los parámetros del crecimiento vegetal	30
4.7 Parámetros simbióticos	30
4.8 Microscopía óptica de nódulos	31

4.9	Determinación del contenido de nitrógeno	31
5.	Técnicas bioquímicas	31
5.1	Determinación del contenido de clorofila total	31
5.2	Extracción de proteínas	32
5.3	Cuantificación de proteínas	32
5.4	Determinación de la actividad de PXs totales	32
5.5	Determinación cualitativa de compuestos fenólicos totales	32
5.6	Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos solubles	33
5.7	Determinación cuantitativa de los niveles de P soluble	33
6.	Análisis bioinformáticos	33
6.1	Identificación de precursores de miRNAs y otros genes implicados en la nodulación de plantas de maní	33
6.2	Identificación de genes blanco de miARNs potencialmente implicados en la nodulación de maní	34
7.	Técnicas de biología molecular	34
7.1	Obtención de ADN genómico bacteriano	34
7.2	BOX-PCR	34
7.3	Análisis del perfil genético de aislamientos bacterianos	35
7.4	Condiciones de PCR para la amplificación del gen <i>nifH</i> de <i>Bacillus</i> sp. CHEP5	35
7.5	Electroforesis en geles de agarosa	36
7.6	Condiciones generales de extracción de ARN	36
7.7	Control de la integridad del ARN	36
7.8	Síntesis de ADN copia (ADNc)	36
7.8.1	Estrategia de elongación empleando stem-loop	36
7.8.2	Estrategia de elongación empleando poliadenilación	37

7.9 Amplificación de ADNc mediante qPCR	37
7.10 Curva estándar de la reacción de qRT-PCR	38
7.11 Cuantificación relativa de la expresión génica	38
7.12 Obtención y análisis de la secuencia de <i>Ahsymrk</i> , EF-1 γ y lacasa-4 de maní, y el gen <i>nifH</i> de <i>Bacillus</i> sp. CHEP5	39
8. Ensayo a campo	39
8.1 Preparación de inoculantes para su evaluación en ensayos a campo	39
8.2 Condiciones de siembra	39
8.3 Determinación de la incidencia y severidad del Carbón de maní	41
9. Análisis estadístico	41
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN “Efecto de la inoculación simultánea de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144, <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>S. rolf sii</i> sobre las actividades promotoras del crecimiento vegetal de dichas bacterias y la actividad patogénica del hongo”	42-71
1. Selección de las condiciones óptimas de cultivo de plantas	43
2. Efecto de la co-inoculación de maní con <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre la patogenicidad de <i>S. rolf sii</i> en ensayos <i>in vitro</i>	44
3. Efecto de la inoculación de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre la inducción de resistencia sistémica mediada por <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 contra <i>S. rolf sii</i> en ensayos <i>in vitro</i>	46
3.1 Evaluación de la presencia de bacterias antagonistas de <i>S. rolf sii</i> en la microbiota rizosférica de plantas inoculadas con <i>Bacillus</i> sp. CHEP5	50
3.2 Los FN producidos por <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 como moléculas elicitoras de la respuesta defensiva de maní contra <i>S. rolf sii</i>	53
4. Efecto de la inoculación de maní con <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>S. rolf sii</i> sobre el fenotipo simbiótico de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 en ensayos <i>in vitro</i>	55
4.1 Estudio de los posibles factores involucrados en el efecto benéfico de <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 sobre el fenotipo simbiótico de	59

Bradyrhizobium sp. SEMIA6144

5. Efecto de la co-inoculación de plantas de maní con <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre la simbiosis, la protección frente a patógenos y el rendimiento del cultivo en condiciones de campo	64
5.1 Efecto de la co-inoculación de plantas de maní con <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre el fenotipo simbiótico y el crecimiento vegetal	65
5.2 Efecto de la co-inoculación de plantas de maní con <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre la incidencia de enfermedades fúngicas	66
5.3 Efecto de la co-inoculación de plantas de maní con <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre el rendimiento del cultivo de maní	69
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN “Identificación de moléculas involucradas en la interacción de plantas de maní con <i>S. rolf sii</i>, <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144”	72-103
1. Participación de enzimas PXs durante la interacción patogénica maní- <i>S. rolf sii</i>	73
2. Acumulación de compuestos fenólicos durante la inducción de resistencia sistémica mediada por <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 en plantas de maní contra <i>S. rolf sii</i>	76
3. Participación de miARNs y ARNm en la interacción simbiótica maní- <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	80
3.1 Estudio de la expresión de miARNs en etapas tempranas de la simbiosis	81
3.2 Participación del <i>AhSymrk</i> en la simbiosis maní- <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 a los 9 días post-inoculación del microsimbionte	85
3.3 Estudio de la expresión génica de miARNs y ARNm en etapas tardías de la simbiosis	88
3.3.1 Análisis bioinformático de la expresión de precursores de miARNs y ARNm totales en nódulos de maní	88
3.3.2 Análisis de la expresión de miARNs y ARNm a los 40 días post-inoculación de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	94

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN “Efecto de la inoculación simultánea de maní con <i>S. rolf sii</i> , <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre las moléculas vegetales marcadoras de la patogénesis, la ISR y la simbiosis rizobiana”	104-113
1. Efecto de la inoculación simultánea de maní con <i>S. rolf sii</i> , <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre la actividad PX vinculada a la patogénesis	105
2. Efecto de la inoculación simultánea de maní con <i>S. rolf sii</i> , <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre la acumulación de compuestos fenólicos asociada a la ISR	107
3. Efecto de la inoculación simultánea de <i>S. rolf sii</i> , <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 sobre la expresión de genes marcadores de la simbiosis rizobiana	109
3.1 Expresión del gen <i>Ahsymrk</i> en las etapas tempranas de la interacción maní- <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	110
3.2 Expresión de genes marcadores de las etapas tardías de la simbiosis (funcionamiento de nódulos)	112
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	114-118
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119-132
ANEXO I	133-137
ANEXO II	138-147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Cepas bacterianas utilizadas	25
2	Cebadores empleados para la síntesis de ADNc y para su posterior amplificación	37
3	Propiedades físico-químicas del suelo de los campos ensayados	40
4	Parámetros de crecimiento vegetal y contenido de clorofila total en plantas de maní	45
5	Parámetros de crecimiento vegetal y contenido de clorofila total en plantas de maní	47
6	Características morfológicas y tintoriales de aislamientos bacterianos epífitos y endófitos	52
7	Inhibición del crecimiento de <i>S. rolf sii</i> en medio sólido	52
8	Peso seco aéreo y radical de plantas de maní	54
9	Parámetros simbióticos de plantas de maní	56
10	Tamaño de nódulos de plantas de maní	57
11	Colonización de <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 en el interior de nódulos de plantas de maní	61
12	Parámetros simbióticos y crecimiento vegetal de plantas de maní	66
13	Efecto de la co-inoculación sobre el rendimiento de frutos y semillas, y sobre la producción de granos calidad confitería	70
14	Solubilización de fosfatos en medio NBRIP-BPB sólido y líquido	71
15	Genes regulados negativamente en nódulos con respecto a raíces de plantas de maní	89
16	Genes regulados positivamente en nódulos con respecto a raíces de plantas de maní	90
17	Precusores de miARNs expresados diferencialmente en	92

nódulos respecto a raíces y sus genes blanco predichos

18	Valores promedios de los Cts obtenidos a partir de los ensayos de qRT-PCR	110
-----------	---	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

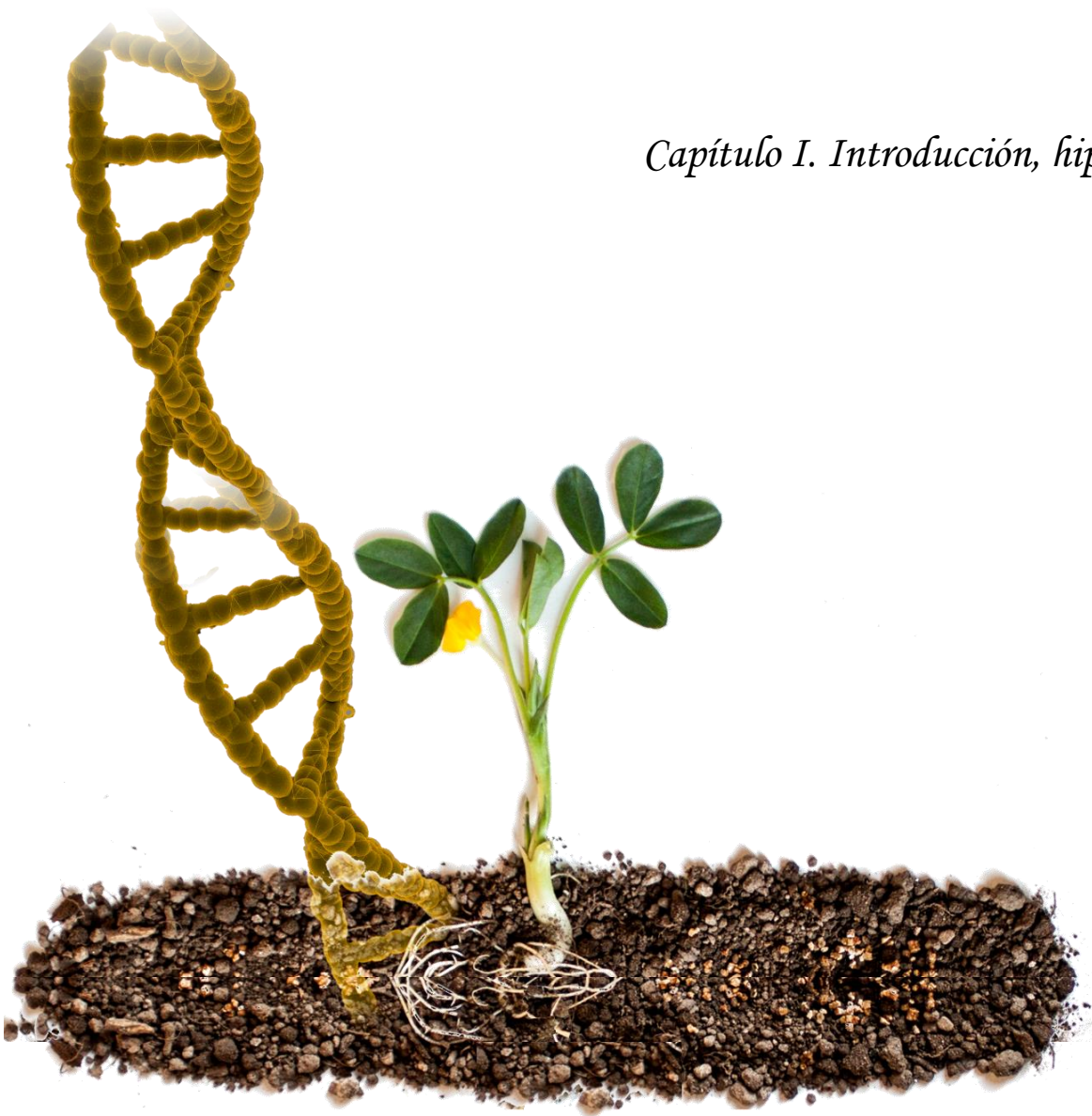
Figura		Página
1	Modelo en zig zag que ilustra la respuesta defensiva de la planta de manera cuantitativa	3
2	Representación esquemática de SAR e ISR	7
3	Esquema general de la inducción de resistencia sistémica	8
4	Nódulos en la raíz de una planta de maní	10
5	Esquema de la planta de maní (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	18
6	Cultivo en placa de <i>S. rolfsii</i>	21
7	Marchitamiento por hongo blanco en plantas de maní causado por <i>S. rolfsii</i>	22
8	Sintomatología de Carbón de maní	23
9	Sistema de cultivo de plantas	29
10	Escala del nivel de enfermedad	41
11	Incidencia de la enfermedad (% de plantas enfermas) causada por <i>S. rolfsii</i> en plantas de maní	44
12	Incidencia de la enfermedad (% de plantas enfermas) causada por <i>S. rolfsii</i> en plantas de maní	47
13	Dendrograma UPGMA (Dice similarity coefficient) derivado del análisis de los genomas de los aislamientos epífitos de raíces de plantas de maní obtenidos mediante BOX-PCR	52
14	Incidencia de la enfermedad (% de plantas enfermas) causada por <i>S. rolfsii</i> en plantas de maní	53
15	Análisis microscópico de cortes de nódulos de plantas de maní	57
16	Contenido de nitrógeno en plantas de maní	58
17	Perfil genético obtenido mediante BOX-PCR de aislamientos bacterianos del interior de nódulos de plantas	60

de maní co-inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5

18	Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 en medio Nfb	61
19	Colonización radical de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 en presencia o ausencia de <i>Bacillus</i> sp. CHEP5	63
20	Incidencia de carbón de maní expresado como % de vainas afectadas	68
21	Cuantificación de la actividad de PXs totales en tallos de plantas de maní a diferentes tiempos post-inoculación con <i>S. rolf sii</i>	75
22	Evolución de la colonización de <i>S. rolf sii</i>	75
23	Autofluorescencia de compuestos fenólicos en tallos de plantas de maní	78
24	Cuantificación de compuestos fenólicos en tallos de plantas de maní	79
25	Expresión de miARNs en raíces de plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	82
26	Curva de disociación del producto de amplificación mediante qRT-PCR	85
27	Producto de amplificación obtenido mediante qRT-PCR	86
28	Curva estándar de la reacción qRT-PCR para la amplificación del <i>Ahsymrk</i>	87
29	Expresión del gen <i>Ahsymrk</i> en raíces de plantas de maní a los 9 días post-inoculación de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	87
30	Expresión génica de miARNs en raíces y nódulos de plantas de maní a los 40 dpi de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	95
31	Curva de disociación	96
32	Productos de amplificación obtenidos mediante qRT-PCR	96
33	Curva estándar de la reacción qRT-PCR para la amplificación de EF-1 γ y Lacasa-4	98

34	Expresión génica en nódulos y raíces de plantas de maní 40 dpi de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	99
35	Expresión génica en raíces y nódulos de plantas de maní a los 40 dpi de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	102
36	Cuantificación de la actividad de Pxs totales en tallos de plantas de maní inoculados con <i>S. rolfsii</i> a las 24 y 48 horas post-inoculación	106
37	Cuantificación de compuestos fenólicos en plantas inoculadas con <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 y/o <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 48 horas post-inoculación de <i>S. rolfsii</i>	109
38	Expresión del gen <i>Ahsymrk</i> en raíces de plantas de maní 9 días post-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	111
39	Expresión génica en nódulos de plantas de maní a los 40 días post-inoculación	113

Capítulo I. Introducción, hipótesis y objetivos



1. La rizósfera como hábitat para los microorganismos

La rizósfera es la porción del suelo que se encuentra en íntimo contacto con las raíces de las plantas y es influenciada química, física y biológicamente por éstas (Sorensen, 1997; Bakker y col., 2013). Más del 50% de los fotoasimilados de las plantas son secretados a través de las raíces, dependiendo de su genotipo, edad, estado fisiológico y la exposición a factores estresantes. Los principales componentes de los exudados radicales son azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos, esteroides, enzimas, compuestos fenólicos, vitaminas, factores de crecimiento, entre otros, que atraen o repelen determinados (micro) organismos, seleccionando así la microflora y microfauna rizosférica (van Dam y Bouwmeester, 2016).

Diversos microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoos, oomicetes y algas habitan la rizósfera. De éstos, las bacterias son las más comúnmente encontradas, representando el 95% de los microorganismos del suelo (10^4 especies de bacterias y 10^9 bacterias por gramo de suelo) (Poole, 2017). La comunidad microbiana del suelo y los factores edáficos, junto con los exudados radicales, son los determinantes más importantes en la conformación de la microbiota asociada a las raíces de las plantas (Lareen y col., 2016). Edwards y col. (2015) propusieron un modelo de selección de la microbiota radical que consta de tres etapas. En primer lugar, los exudados radicales promueven un cambio en la comunidad del suelo rizosférico, estimulando el reclutamiento de determinados microorganismos hacia la superficie radical. Luego, parte de estos microorganismos se asocian al rizoplano (superficie radical). Esta selección puede ser influenciada por la planta y/o favorecida por la capacidad de los microorganismos de formar biofilm y competir nutricionalmente con otros. Finalmente, parte de la microbiota que se encuentra en íntimo contacto con la planta penetra en la raíz (endósfera). Esta interacción depende de la capacidad de las bacterias para evadir o modificar la respuesta defensiva de la planta.

En la rizósfera habitan tanto microorganismos benéficos como patógenos que pueden afectar el crecimiento y la sanidad de las plantas. Su número y diversidad están relacionados con la composición cuanti- y cualitativa de los exudados radicales, y por las interacciones microbianas que ocurren en la rizósfera (Raaijmakers y col., 2009; Venturi y Fuqua, 2013; Pieterse y col., 2016). Ésta es considerada un “campo de batalla” donde microorganismos benéficos interactúan con fitopatógenos pudiendo afectar el establecimiento de la infección patogénica (Raaijmakers y col., 2009). Para una interacción planta-microorganismo exitosa (sea ésta benéfica o patogénica), la competencia por el sitio de colonización en la planta es de suma importancia. El proceso de colonización incluye el

reconocimiento, adherencia, invasión de los tejidos (en el caso de microorganismos endófitos) y crecimiento del microorganismo. Se ha demostrado que, a pesar de la habilidad de un microorganismo rizosférico para colonizar el sistema radical, la interacción microorganismo-planta está influenciada por la conformación de la población microbiana circundante (Berg, 2009).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, es actualmente aceptado que las plantas no deben considerarse como entidades independientes, y que es necesario un enfoque holístico para referirse a ellas. En conjunto, las plantas *per se* y su microbiota son consideradas un holobionte. El concepto de holobionte requiere una mirada colectiva de las funciones e interacciones que existen entre un macroorganismo (planta) y sus (micro) organismos asociados (Vandenkoornhuyse y col., 2015).

2. Microorganismos patógenos y el sistema inmune de las plantas

Las plantas están expuestas continuamente al ataque de microorganismos patógenos, de los cuales solo unos pocos causan enfermedades en determinadas especies o cultivares vegetales, mientras que muchos otros son reconocidos por las plantas induciendo en ellas una respuesta defensiva efectiva. Las plantas poseen barreras físicas (tales como cutícula, ceras y pared celular) y numerosos mecanismos moleculares y bioquímicos para contrarrestar el ataque de un fitopatógeno. A diferencia de los animales, las plantas no cuentan con células inmunológicas especializadas. Sin embargo, tienen un sistema inmune innato que comprende dos sistemas de percepción. En primer lugar, a través de receptores de transmembrana (PRR, de su sigla en inglés “*pattern recognition receptors*”), identifican patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), patógenos (PAMPs) o daño (DAMPs). Los MAMPs/PAMPs son epitopes específicos ubicados en moléculas esenciales para la vida microbiana, ampliamente distribuidas entre los microorganismos y ausentes en la planta huésped, como flagelina, lipopolisacáridos, peptidoglicano, quitina, entre otros. En cambio, los DAMPs son moléculas vegetales originadas por la acción de enzimas líticas producidas por patógenos (monómeros de cutina, fragmentos de pared celular, entre otros). El reconocimiento de MAMPs/PAMPs/DAMPs resulta en una respuesta defensiva (PTI, de su sigla en inglés “*Pattern-triggered immunity*”) que puede detener la infección del microorganismo. La interacción dinámica entre patógenos y plantas es producto de millones de años de coevolución y, como resultado de ello, algunos fitopatógenos han desarrollado la capacidad de suprimir la PTI liberando efectores dentro de la célula huésped a través del

sistema de secreción tipo III, lo que contribuye a su virulencia. Por otro lado, un determinado efector puede ser reconocido por el segundo sistema de percepción de la planta huésped mediante proteínas NB-LRR (NB-LRR, de su sigla en inglés “*nucleotide binding Leucine-rich repeat*”) o proteínas de avirulencia (avr-R) producto de genes R, y desencadenar una segunda respuesta defensiva (ETI, de su sigla en inglés “*effector-triggered immunity*”), más rápida y fuerte que la PTI. Ello contribuye a la resistencia y usualmente origina una respuesta hipersensible (RH) que causa la muerte celular en el sitio de infección. La selección natural impulsa a los patógenos a evadir la ETI diversificando o adquiriendo nuevos efectores que supriman el sistema inmune vegetal para lograr una exitosa interacción planta-patógeno (**Figura 1**) (Jones y Dangl, 2006; Walters, 2015).

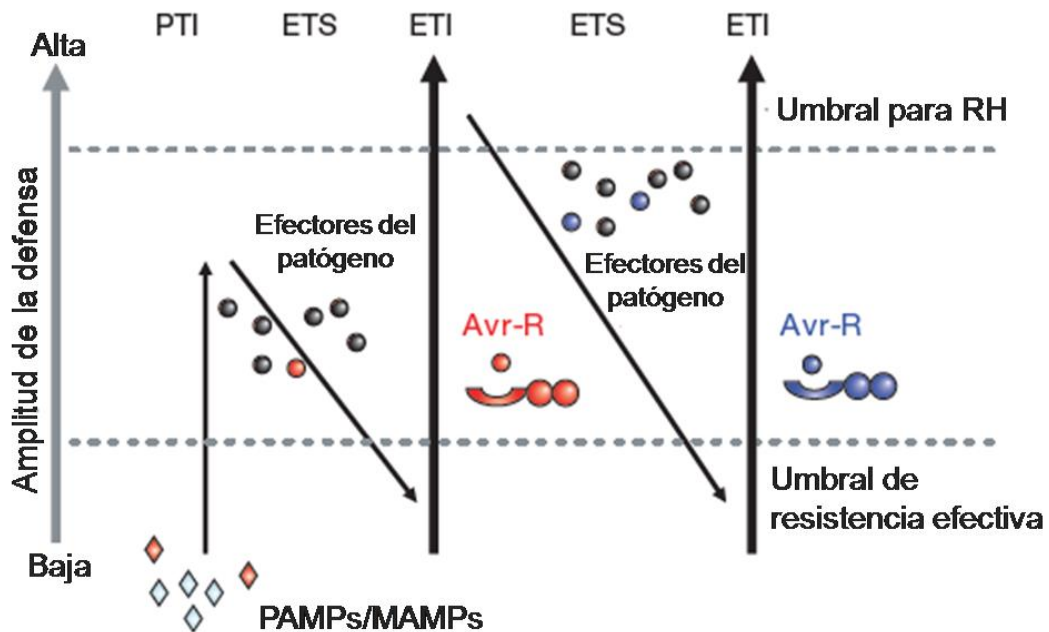


Figura 1. Modelo en zigzag que ilustra la respuesta defensiva de la planta de manera cuantitativa. Adaptado de Jones y Dangl, 2006.

Tanto durante la PTI como en la ETI, inmediatamente luego del reconocimiento de MAMPs/PAMPs/DAMPs o efectores, respectivamente, se desencadena una cascada de señalización que generalmente involucra la fosforilación de proteínas, flujo iónico (incremento del Ca^{2+} citosólico) y producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) como H_2O_2 , O_2^- y HO^- , entre otros eventos de señalización (Walters, 2015). Muchas son las funciones atribuidas al H_2O_2 producido en respuesta a patógenos. Algunos trabajos indican que esta molécula actúa directamente sobre el fitopatógeno impidiendo su

colonización aunque otros le atribuyen un rol más amplio como molécula señal, interviniendo en múltiples procesos fisiológicos (Mittler, 2017). De este modo, se ha vinculado al H_2O_2 con el refuerzo de la pared celular vegetal en el sitio de entrada del patógeno, con la regulación de diferentes vías de señalización de hormonas y con la activación de factores de transcripción dependientes del estado redox celular y de la expresión de genes relacionados con la defensa vegetal. El H_2O_2 participa además en la modificación post-traduccional de proteínas a través de la sulfenilación y oxidación de residuos de metionina (Torres, 2010; O'Brien y col., 2012; Lehmann y col., 2014), y en la muerte celular programada (MCP), proceso que implica la degradación de proteínas, membranas plasmáticas, ADN, entre otras moléculas. De esta forma, la MCP limita la colonización de microorganismos patógenos biotrofos o hemibiotrofos ya que, a diferencia de los necrotrofos, éstos se alimentan de tejido vegetal vivo (Glazebrook, 2005).

La cascada de señalización que se induce luego de la percepción de un patógeno culmina con la activación transcripcional y/o post-traduccional de factores de transcripción que lleva a la inducción de genes y metabolitos relacionados a la defensa de la planta como glutatión *S*-transferasas, peroxidasas, enzimas hidrolíticas (quitinasas, β -1,3-glucanasas, entre otras), proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), enzimas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas, etc (Walters, 2015). Entre éstas, las enzimas antioxidantes y los metabolitos redox actúan de forma conjunta para la detoxificación de EROs. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del O_2^- a H_2O_2 , las catalasas (CAT) dismutan el H_2O_2 a O_2 y H_2O y las peroxidasas (PX) reducen el H_2O_2 a H_2O utilizando moléculas donadoras de electrones (como el ascorbato, guaiacol, flavonoides y fenilpropanoides). Estas enzimas están presentes con diferentes formas isoenzimáticas en distintos compartimentos de las células, y su expresión es genéticamente controlada y regulada por estímulos ambientales y del desarrollo vegetal, según se requiera para la remoción de las EROs producidas. Las PX puede producir H_2O_2 o utilizarlo como sustrato oxidante para catalizar el entrecruzamiento intra- e intermolecular entre componentes estructurales de la pared celular y la polimerización de lignina y suberina (Lehmann y col., 2014; Colodete y col., 2015). El subsecuente incremento de la barrera mecánica que afecta la penetración de patógenos, le permite a las plantas organizar las respuestas defensivas que requieren más tiempo para su activación (Gara y col., 2003; Sharma y col., 2012; Walters, 2015).

Una diferencia clave entre plantas susceptibles y resistentes es el reconocimiento oportuno de un fitopatógeno y la activación rápida y efectiva de la defensa. Una planta

resistente es capaz de desarrollar rápidamente una amplia variedad de respuestas defensivas que previenen la colonización de patógenos. Por el contrario, una planta susceptible manifiesta respuestas mucho más débiles y lentas que no impiden la entrada y diseminación de patógenos (Yang y col., 1997).

3. Microorganismos benéficos y sus mecanismos de acción

Los microorganismos del suelo juegan un rol muy importante en los ciclos biogeoquímicos y han sido utilizadas para incrementar la producción de cultivos durante décadas. En muchos casos, las interacciones planta-microorganismo son determinantes de la sanidad de las plantas y de la fertilidad de los suelos. Aquellas bacterias que se desarrollan en el ecosistema rizosférico y que estimulan el crecimiento de las plantas son denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, de su sigla en inglés "*Plant-Growth Promoting Rhizobacteria*") (Kloepper y Schroth, 1978). Para ejercer su efecto promotor, las PGPR deben competir con otros microorganismos, colonizar el sistema radical, multiplicarse en un microhábitat asociado a la superficie o al interior de la raíz y permanecer el tiempo necesario para promover el crecimiento de las plantas (Barea y col., 2005). Los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento han sido clasificados en directos e indirectos.

- La promoción directa del crecimiento puede ocurrir por: a) fijación biológica del N_2 (reducción de N_2 a NH_4^+), b) producción de fitohormonas, c) producción de sideróforos, d) solubilización de fosfatos, e) síntesis de enzimas que alteran los niveles de fitohormonas, f) producción de compuestos volátiles, g) degradación de compuestos contaminantes, entre otros (Odoh, 2017).

- La promoción indirecta del crecimiento es atribuida a la capacidad de ciertas bacterias para impedir la colonización de la planta por patógenos. Los mecanismos por los que es posible este tipo de promoción son: a) competencia por nutrientes, b) producción de sideróforos, c) liberación de antibióticos, d) liberación de moléculas antifúngicas, e) producción de enzimas líticas, f) parasitismo, g) competencia por sitio de colonización y h) inducción de resistencia sistémica en la planta huésped (Odoh, 2017).

Una cepa bacteriana es capaz de ejercer su acción promotora mediante uno o más de estos mecanismos, pudiendo utilizarlos en momentos diferentes durante el ciclo de vida de la planta (Saharan y Nehra, 2011).

3.1 Control biológico de enfermedades

La utilización de seres vivos y/o de las sustancias que éstos producen para el control de patógenos se denomina biocontrol o control biológico (Baker y Cook, 1985). Este término es utilizado en referencia al control de enfermedades en plantas y también en frutos o granos en almacenamiento (control postcosecha) (Lugtenberg y Kamilova, 2009). El efecto antagónico de un microorganismo biocontrolador puede ser indirecto, mediante la inducción de la respuesta de defensa en la planta, o directo, ya sea por competencia por nutrientes y nicho, antibiosis, degradación de factores de virulencia, inactivación de factores de germinación de patógenos, producción de enzimas hidrolíticas o producción de sideróforos. Un agente de biocontrol efectivo a menudo actúa a través de una combinación de estos mecanismos (Whipps, 2001; Compant y col., 2005; Francis y col., 2010; Gupta y col., 2015).

Los grupos de microorganismos con propiedades antagónicas frente a fitopatógenos son diversos e incluyen un amplio rango de microorganismos procariotas (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, entre otros) y eucariotas (en su mayoría hongos) (Barea y col., 2005).

3.1.1 Inducción de resistencia sistémica (ISR) como mecanismo de control biológico

La resistencia inducida se define como el estado fisiológico de las plantas en el cual se encuentra incrementada su capacidad defensiva contra un amplio espectro de patógenos (bacterias, hongos, virus, nematodos e insectos) y condiciones ambientales adversas (sequía, altas temperaturas, entre otras), cuando son estimuladas apropiadamente por elicitores específicos de origen biológico o químico (van Loon y col., 1998; Pieterse y col., 2014). Los dos tipos claramente definidos de resistencia inducida son: a) la resistencia sistémica inducida (ISR), elicitada por PGPR o por bacterias del filoplano que no causan síntomas visibles de enfermedad en el huésped, y b) la resistencia sistémica adquirida (SAR), inducida por organismos patógenos virulentos o avirulentos (**Figura 2**) (Vallad y Goodman, 2004; Pieterse y col., 2014; Kumar y col., 2016).

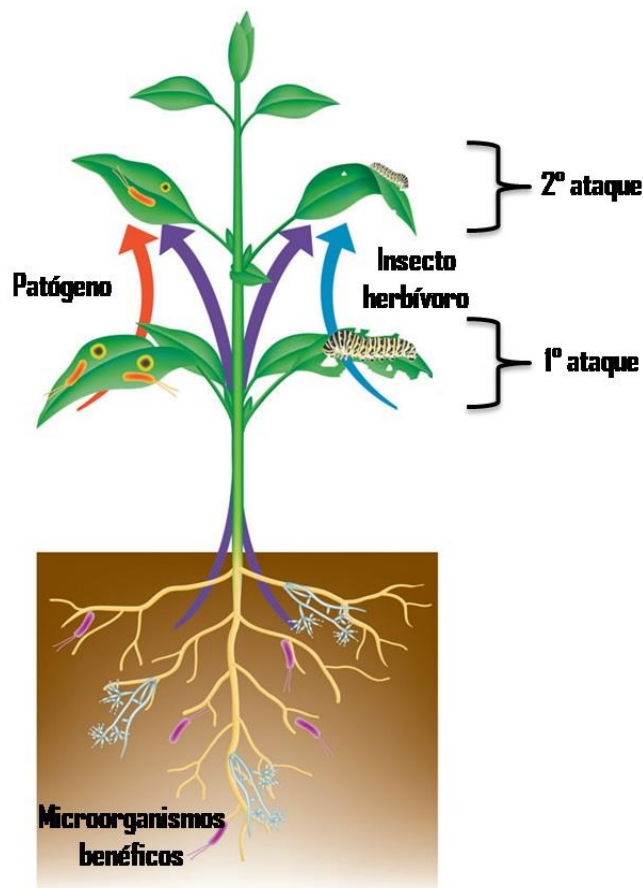


Figura 2. Representación esquemática de SAR (flechas roja y celeste) e ISR (flechas violetas). La resistencia inducida involucra señales que se transportan a grandes distancias por el sistema vascular o por el aire, propagando sistémicamente la capacidad para incrementar la respuesta defensiva de las plantas. Adaptado de Pieterse y col., 2014.

El fenómeno de ISR puede ser resumido globalmente en un proceso de tres pasos. El primero es la percepción de elicitores de ISR. Varios determinantes bacterianos son capaces de elicitar ISR, siendo los más importantes lipopolisacáridos, antibióticos, sideróforos y ácido salicílico (van Loon y col., 1998; Pieterse y col., 2014). En segundo lugar, un sistema interconectado de vías de señalización regula la defensa inducida en las plantas contra patógenos. Los componentes primarios de este sistema son fundamentalmente las fitohormonas ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) (van Loon y col., 1998; Conrath y col., 2002; Choudhary y Johri, 2008). Sorprendentemente, las plantas no incrementan la síntesis de estas hormonas ni la expresión de genes inducibles por JA/ET, lo que sugiere que la ISR se basa en un incremento de la sensibilidad a dichas hormonas en lugar de un aumento en su biosíntesis (Mauch-Mani y col., 2017). Otro componente clave del establecimiento de la ISR es el factor de transcripción NPR1 (de su sigla en inglés “*Non-expressor of Pathogenesis-Related genes 1*”). Aún no hay evidencia acerca de la

función del NPR1 durante la ISR, aunque algunas investigaciones sugieren que este factor de transcripción no actuaría en el núcleo celular, sino a nivel citosólico (Pieterse y col., 2014). Dado que no se han determinado cambios relevantes a nivel transcriptómico previo al ataque de un fitopatógeno, es actualmente aceptado que los microorganismos benéficos establecen un estado de “priming” en el cual se aumenta la capacidad de la planta de movilizar la respuesta celular defensiva. De este modo, frente al ataque de un patógeno y/o estrés abiótico, responden más rápida y/o efectivamente lo que resulta en una inmunidad local y sistémica (Conrath, 2011). Por último, la ISR se manifiesta a través de la expresión de genes relacionados a la defensa de la planta (**Figura 3**) (Pieterse y col., 2014).

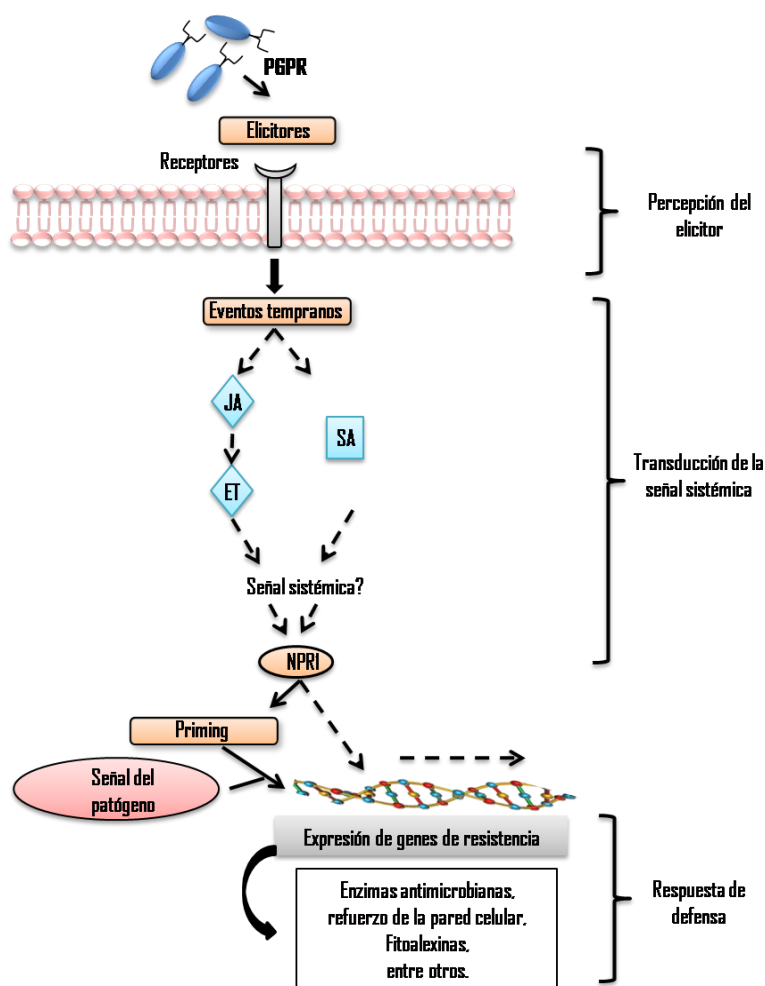


Figura 3. Esquema general de la inducción de resistencia sistémica. Adaptado de Ongena y Jacques, 2007.

La ISR se manifiesta a través del incremento de la resistencia física y mecánica de la pared celular vegetal, así como también en cambios bioquímicos en la planta huésped que conducen a la síntesis de compuestos de defensa contra patógenos (Benhamou y col.,

1996; Ramamoorthy y col., 2001; Pieterse y col., 2014). Los cambios estructurales que ocurren en la pared de células epidérmicas y corticales están asociados con la lignificación, deposición de calosa y acumulación de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se acumulan además en los espacios intercelulares y en la superficie de entrada del patógeno (Benhamou y col., 1996). Estos compuestos están constituidos por fenilpropanoides que derivan del ácido cinámico, el cual es sintetizado a partir de fenilalanina por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). La expresión del gen que codifica a PAL es activada por la vía de inducción sistémica señalizada por JA y ET, por lo cual está directamente vinculada con la ISR elicitada por PGPR (Shoresh y col., 2004; Distéfano y col., 2008). Además de PAL, otras enzimas vegetales han sido asociadas con ISR incluyendo PX, lipoxigenasas, chalcona sintasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa (Alves Silva y col., 2004; Ramos Solano y col., 2008; Dutta y col., 2008; Tonelli y col., 2011). La actividad de las PX contribuye a limitar la propagación de la infección celular por medio del establecimiento de barreras estructurales, como la deposición de lignina y suberina, o la generación de ambientes altamente tóxicos por la producción masiva de EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) (Jain y col., 2016).

Se ha demostrado que el costo energético requerido para que la planta mantenga el estado de “priming” es menor que el de activar constitutivamente su defensa. Ello sustenta la hipótesis que el “priming” representa una adaptación ecológica de la planta que permite reducir el daño que un ambiente hostil puede producirle (Pieterse y col., 2014; Martínez-Medina y col., 2016).

Si bien inicialmente la elicitación de ISR por PGPR fue demostrada y ampliamente estudiada utilizando bacterias del género *Pseudomonas* y otras Gram-negativas, algunas bacterias Gram-positivas, entre ellas las del género *Bacillus*, son de gran importancia en la activación de ISR en diferentes especies vegetales. La diversidad de mecanismos inductores de ISR así como de otras actividades de promoción del crecimiento vegetal que poseen las bacterias de este género, sumado a su capacidad de formar estructuras de resistencia (esporas) frente a condiciones ambientales desfavorables, las convierten en potenciales componentes de inoculantes para el control de enfermedades en plantas (Choudhary y Johri, 2008).

3.2 Fijación biológica del nitrógeno

Las interacciones entre las plantas y el microbioma rizosférico constituyen un aspecto relevante para la agricultura mundial, dado que son consideradas fundamentales en el funcionamiento y mantenimiento de muchos ecosistemas. Aquellas interacciones que proporcionan nitrógeno al ecosistema en el que se encuentran son de vital importancia ya que aseguran el aporte de este elemento que es constituyente de moléculas esenciales para la vida como las proteínas y los ácidos nucleicos (Rees y col., 2005). En la biósfera, la mayor parte del nitrógeno se encuentra en forma inorgánica. El reservorio más importante es la atmósfera que contiene 4×10^{21} g nitrógeno (lo que representa el 79,1% de su composición), principalmente en forma de dinitrógeno atmosférico (N_2). También se encuentra en menor proporción en la litósfera, formando parte de compuestos estables en las rocas (Zahran, 1999; Rees y col., 2005). Sin embargo, el nitrógeno que se encuentra en estos reservorios no puede ser utilizado por las plantas, por lo que su disponibilidad constituye uno de los factores limitantes de la producción agrícola mundial. La conversión del N_2 atmosférico a formas fácilmente asimilables por las plantas (amonio, nitrato o nitrito) es un proceso denominado "fijación del nitrógeno", y se lleva a cabo mediante métodos industriales, y procesos naturales y biológicos (Perez y Torralba, 1997). La fijación biológica del nitrógeno (FBN) aporta el 65% del total de nitrógeno fijado (3×10^{14} g de nitrógeno fijado anualmente), el 25% es aportado por la industria de fertilizantes y el 10% restante proviene principalmente de las descargas eléctricas (Baca y col., 2000; Rees y col., 2005). En la FBN participan microorganismos procariotas, referidos como diazotróficos (Diazo: nitrógeno, trofo: nutrición).

Dichos microorganismos constituyen un grupo taxonómicamente heterogéneo, cuya principal característica es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehr y Paerl, 1998). Algunos de éstos son capaces de fijar el nitrógeno en vida libre (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, entre otros), mientras que otros lo hacen luego del establecimiento de una asociación simbiótica con plantas. La asociación simbiótica más estudiada es la que se establece entre las leguminosas (macrosimbiontes) y



Figura 4. Nódulos en la raíz de una planta de maní.

bacterias del suelo denominadas rizobios (microsimbiontes), la que culmina con la formación de un nuevo órgano vegetal: el *nódulo* (Figura 4).

El desarrollo de nódulos implica la inducción de divisiones celulares corticales y del periciclo, y su posterior diferenciación en un órgano vascularizado. La formación de los nódulos responde a dos patrones principales, que determinan la aparición de dos grandes grupos: *indeterminados* (como en *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Vicia*), con forma cilíndrica que contienen un meristema apical persistente, y *determinados* (como en *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine*, *Arachis*), los cuales carecen de un meristema persistente y tienen forma esférica. En su interior las bacterias se transforman en bacteroides y adquieren la capacidad de fijar N₂, el que es proporcionado a la planta hospedadora, a la vez que ésta le brinda carbohidratos, en un ambiente protegido (el nódulo).

3.2.1 Diálogo molecular leguminosa-rizobio: inicio del proceso simbiótico

El diálogo molecular entre una leguminosa y el rizobio es fundamental para el reconocimiento de ambos socios simbióticos. Las plantas secretan una gran cantidad y variedad de compuestos a través de sus raíces, los que constituyen la primera señal molecular para la interacción simbiótica. Moléculas como betaínas, ácidos aldónicos, vainillina y, principalmente, (iso) flavonoides cumplen un rol destacado en la simbiosis leguminosa-rizobio (Badri y col., 2009). Los flavonoides pertenecen a una diversa familia de compuestos aromáticos derivados del metabolismo secundario de las plantas, más precisamente de la vía de los fenilpropanoides. Dichas moléculas son reconocidas por los rizobios mediante las proteínas NodD asociadas a la membrana plasmática donde se acumulan los flavonoides inductores. Las proteínas NodD constituyen reguladores transcripcionales que se unen a motivos de ADN conservados, denominados “cajas de nodulación”, localizados en las regiones promotoras de los *loci* de nodulación, promoviendo así la transcripción de los genes de nodulación (*nod*, *nol* y *noe*). De este modo, el reconocimiento de los flavonoides por los rizobios representa la primera etapa que contribuye a la especificidad de la interacción simbiótica (Perret y col., 2000; Spaink, 2000). Los genes *nod* codifican para la maquinaria biosintética de las moléculas señal bacterianas, los factores Nod (FN). Las proteínas codificadas por los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* están involucradas en la síntesis del esqueleto de los FN, un oligómero de *N*-acetilglucosamina unido por enlaces β -1,4 con una sustitución *N*-acil en el extremo no reductor. A dicho esqueleto pueden adicionarse grupos acetato, sulfato, carbamilo o azúcares a los extremos reductor y no reductor de la molécula. La incorporación de la mayoría de estas sustituciones en los FN está catalizada por rutas metabólicas específicas de especie, sugiriendo que cada rizobio produce un perfil diferente de moléculas. Además

de las diferentes sustituciones, la longitud del oligosacárido y el grado de saturación de la cadena acil son importantes para determinar el rango de huésped (Oldroyd, 2001). Los FN son reconocidos por las células epidérmicas de las leguminosas mediante receptores de membrana treonina/serina quinasas que poseen dominios extracelulares ricos en lisina. Ello desencadena dos programas genéticos que ocurren en paralelo. Por un lado se reinicia la división de las células de la corteza radical que consecuentemente lleva a la formación del primordio nodular, y en simultáneo tiene lugar el proceso de infección bacteriana. Actualmente se conoce que las proteínas receptoras de los FN con dominios ricos en lisina (LysM), actúan en conjunto con otra proteína quinasa que posee dominios extracelulares ricos en leucina (LRR). Juntos inducen, a través de un segundo mensajero aún no identificado, oscilaciones de Ca^{+2} en la zona del núcleo que son percibidas por una proteína quinasa dependiente de Ca^{+2} /calmodulina. Esta proteína, en conjunto con diferentes factores de transcripción, activan la expresión de genes vinculados a la nodulación (Oldroyd, 2013).

3.2.2 Modos de entrada de los rizobios a las raíces de las leguminosas

El modo por el cual los rizobios ingresan al tejido radical de una leguminosa está determinado por el genoma de la planta. Se han descrito diferentes mecanismos de invasión rizobiana que pueden clasificarse en dos grupos (Ibáñez y col., 2016):

- a. Intercelular
- b. Intracelular

La interacción simbiótica en leguminosas que son invadidas intercelularmente ha sido muy poco estudiada. En cambio, aquella en donde los rizobios ingresan de forma intracelular se conoce con más detalle. El modelo funcional descrito en el apartado anterior sobre el *diálogo molecular en la interacción leguminosa-rizobio*, fue estudiado en leguminosas invadidas mediante este último modo de infección, y puede que no refleje lo que ocurre en las demás leguminosas.

a. *Infección intercelular*

Existen diferentes mecanismos de infección intercelular que comparten muchas características pero que se diferencian en el sitio de ingreso del rizobio a la raíz y en el modo en que éste se disemina a nivel de la corteza para alcanzar e infectar una célula susceptible (Ibáñez y col., 2016). Uno de los mecanismos de infección intercelular más

simple es el que ocurre en la leguminosa *Mimosa scabrella*. La infección rizobiana en esta leguminosa comienza con la digestión de la capa mucilaginoso que recubre gran parte de la superficie radical, dejando en contacto a los rizobios con la pared celular vegetal. Las bacterias entran al tejido radical a través de la degradación de la pared celular que separa dos células epidérmicas, y avanzan hacia el tejido cortical a través de las paredes celulares primarias. Allí, las bacterias se multiplican, presionando las paredes celulares y ocasionalmente penetran en el interior de las células corticales, siempre rodeadas de pared celular. Una vez dentro de la célula, las bacterias se multiplican repetidamente llegando a ocupar gran parte del volumen celular. Desde allí se originan estructuras tubulares similares a hilos de infección que permiten la invasión de células adyacentes. Por otro lado, la proliferación de las bacterias dentro del hilo de infección puede resultar en la degradación de la pared celular vegetal y el ingreso de los rizobios a las células corticales. Posteriormente las células corticales infectadas comienzan a dividirse y dan origen al nódulo (De Farias y col., 1988).

Por otro lado, el proceso intercelular de infección bacteriana también puede ocurrir vía “entrada por fisuras” o “crack entry” en los sitios de emergencia de las raíces laterales o de las raíces adventicias (Boogerd y van Rossum, 1997). Sin embargo, existen algunas diferencias entre estas leguminosas durante el desarrollo del proceso de infección. Por ejemplo, en *Sesbania rostrata* y *Neptunia* spp, luego de la colonización bacteriana de la epidermis a través de los espacios generados por la emergencia de raíces laterales, los rizobios inducen la muerte celular localizada en la corteza radical dando origen a un bolsillo de infección cuyo diámetro se reduce formando un hilo de infección inter- e intracelular que penetra en el primordio nodular. En cambio, en *Arachis hypogaea* (maní), los rizobios ingresan a través de la laminilla media entre dos células de pelo radical adyacentes. Una vez que los rizobios ingresan se diseminan intercelularmente a través de la laminilla media hasta alcanzar una célula basal localizada en la base del pelo radical, la cual es invadida a través de la pared celular sin la formación de hilos de infección (Uheda y col., 2001). Luego ocurren divisiones reiteradas de esta célula vegetal infectada, dando como resultado un nódulo determinado de tipo aeschynomenoide. Éste se caracteriza por la ausencia, en la zona de infección, de células intersticiales no infectadas (Boogerd y van Rossum, 1997).

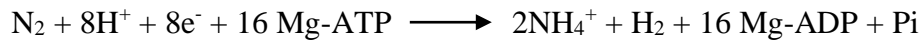
b. Infección intracelular

Este es el modo de infección más estudiado dado que se presenta en muchas de las leguminosas más importantes desde el punto de vista agronómico. Los rizobios adheridos a los pelos radicales secretan FN, los que son percibidos por la planta, produciéndose en consecuencia una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que conducen a la formación de nódulo. De este modo se inhibe el crecimiento apical del pelo radical, el cual está asociado con el aumento en el diámetro del ápice. Luego de algunas horas, se reinicia su crecimiento pero en una dirección diferente y ocurre la deformación y curvado del pelo radical (Brewin, 2004). De este modo, los rizobios quedan atrapados en el pelo radical curvado, y la producción localizada de los FN desencadena una nueva serie de respuestas en las plantas como la inducción del inicio de las divisiones de las células corticales para formar el primordio nodular. Paralelamente, la pared celular primaria de la célula del pelo radical se invagina formando una estructura tubular, el hilo de infección, cuyo crecimiento se orienta hacia el interior radical. A través de éste los rizobios atraviesan repetidas capas de células corticales hasta alcanzar el primordio nodular. En este punto, la síntesis de nueva pared se detiene y el extremo del hilo queda rodeado por membrana plasmática. La membrana continúa su crecimiento debido al aporte continuo de vesículas provenientes del Aparato de Golgi. Las bacterias son envueltas por la membrana vegetal y posteriormente esta estructura se independiza, dentro del citoplasma de las células corticales (Verma y Hong, 1996). Allí los rizobios se diferencian en bacteroides, estado fisiológico capaz de fijar nitrógeno. El bacteroide o conjunto de ellos rodeados por una membrana peribacteroidal derivada de la célula hospedadora se denomina simbiosoma (Sen y col., 1986; Bal y col., 1989; Boogerd y van Rossum, 1997). Entre las leguminosas que presentan este mecanismo de entrada de rizobios se pueden mencionar a *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Glycine max*, entre otras.

3.2.3 Proceso de FBN

La FBN requiere fundamentalmente del complejo enzimático Nitrogenasa. Éste está formado por dos componentes, a) una proteína tetramérica, la dinitrogenasa, compuesta por una subunidad α y una subunidad β , y b) una proteína homodimérica, denominada dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa contiene un co-factor Fe-Mo, el cual participa en la reducción del nitrógeno. La dinitrogenasa reductasa es la encargada de la hidrólisis del ATP y de la transferencia de electrones a la dinitrogenasa para su funcionamiento. En la naturaleza existen nitrogenasas alternativas, las cuales presentan el elemento vanadio en

lugar de molibdeno o solamente tienen hierro (Merrick, 2005; Rees y col., 2005). La reacción global catalizada por la nitrogenasa es:



La planta provee al bacteroide de compuestos carbonados oxidables, entre ellos intermediarios del ciclo del ácido cítrico como succinato, malato y fumarato. Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP y, tras su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N_2 .

Los electrones producidos en la oxidación del piruvato a acetyl-CoA y CO_2 por la piruvato flavodoxina oxidoreductasa, reducen a la flavodoxina, y ésta los transfiere a la dinitrogenasa reductasa. Luego, los electrones son transportados desde la dinitrogenasa reductasa a la enzima dinitrogenasa, y por cada electrón transferido, se hidrolizan 2-3 ATPs. Posteriormente, y una vez reducida la dinitrogenasa, ésta transfiere los electrones al nitrógeno para generar amoníaco (NH_3), que es el primer producto de la reacción de fijación. Este compuesto es rápidamente protonado, formándose amonio (NH_4^+) (Sprent y Sprent, 1990; Rees y col., 2005). Éste último es luego metabolizado en las células del nódulo a amidas o ureidos, que luego son exportados vía xilema al resto de la planta para su utilización (Mayz, 1997).

3.2.4 Los microARNs (miARNs) y su participación en la simbiosis rizobio-leguminosa

Los ARN pequeños son importantes riboreguladores en bacterias, hongos, plantas y animales, regulando negativamente la expresión de genes “blanco” por complementariedad de secuencia. En la última década, el rol de los ARN pequeños ha sido extensamente estudiado en plantas, no solamente durante su desarrollo sino también en respuesta a las interacciones bióticas (Bustos-Sanmamed y col., 2013; Formey y col., 2014). Los miARNs son moléculas de ARN pequeños no codificantes, de entre 20-24 nucleótidos de longitud. La mayoría de las plantas poseen más de 100 genes de miARNs (*MIR*) ubicados principalmente en regiones intergénicas (Reinhart y col., 2002). Los miARNs se transcriben como transcritos primarios (pri-miARNs, del inglés “*primary transcripts*”) los que poseen una doble cadena en forma de tallo y bucle que contiene la secuencia del miARN y su secuencia complementaria denominada miARN*. El pri-miARN es procesado por miembros de la familia de enzimas tipo Dicer (DLC) con dominios RNasa III

(generalmente DLC1) en otro intermediario también de doble cadena denominado precursor de miARN (pre-miARNs). Este es nuevamente clivado por enzimas DLC dando origen al dúplex miARN/miARN*, el cual es exportado al citoplasma. La hebra del miARN funcional es cargada a un Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC, de su sigla en inglés “*RNA-induced silencing complex*”), que contiene la proteína ARGONAUTE. Por otro lado, su hebra complementaria, miARN*, es generalmente degradada (Rogers y Chen, 2013) o, en algunos casos podría también ser funcional (Guo y Lu, 2010). Los miARNs se unen a un ARN mensajero (ARNm) “blanco” por complementariedad de bases, produciendo su clivaje (mediado por la proteína ARGONAUTE con función RNasa H) o inhibiendo su traducción a proteína (Bartel, 2004). Se han identificado diversos miARNs asociados a la nodulación en diferentes plantas leguminosas, algunos vinculados a las etapas de iniciación y diferenciación del nódulo, y otros implicados en su funcionamiento. La mayoría de ellos regulan la expresión de factores de transcripción (Bazin y col., 2012; Subramanian, 2012; Bustos-Sanmamed y col., 2013).

Glycine max (soja) es la leguminosa en la que se ha identificado el mayor número de miARNs asociados al proceso de nodulación. En los últimos años se ha reportado que la sobreexpresión de miR167c, miR172c, miR482, miR1512, miR1515 y miR2606b incrementa el número de nódulos en soja, mientras que la sobreexpresión de miR156, miR160 y miR4416 tiene un efecto opuesto (Couzigou y Combier, 2016). Uno de los miARNs que ha sido ampliamente estudiado en la interacción simbiótica rizobio-leguminosa es el miR172 cuyo ARNm “blanco” es el factor de transcripción AP-2 (Yan y col., 2013; Nova-Franco y col., 2015; Holt y col., 2015). La expresión de este miARN se encuentra inducida (y en consecuencia la de su ARNm blanco disminuída) en etapas tempranas y tardías del desarrollo del nódulo, permaneciendo en abundancia en nódulos maduros activos. Por otro lado, en nódulos inefectivos o senescentes la expresión del miR172 se encuentra disminuida y la del factor de transcripción AP-2 inducida. Análisis transcriptómicos revelaron 114 genes co-expresados junto con AP-2, muchos de ellos relacionados a la senescencia del nódulo, por lo que se ha propuesto que estos genes deben estar silenciados en nódulos maduros activos a través del nodo regulatorio miR172/AP-2 (Nova-Franco y col., 2015).

Por otro lado, estudios recientes han revelado que los miARNs estarían implicados en la regulación de la respuesta defensiva de leguminosas durante la interacción simbiótica. Sin embargo, aún no está claro cómo el sistema de regulación basado en

miARNs modula no sólo las respuestas específicas sino también las comunes de las interacciones simbióticas y patogénicas (Wang and Chua, 2014). En este sentido, Formey y col. (2014) identificaron algunos miARNs específicos de leguminosas en general o de *Medicago truncatula* en particular, que están implicados en la regulación de la respuesta frente a la interacción simbiótica, y otros que lo están frente a la interacción patogénica. Sin embargo, los miARNs más conservados y ampliamente distribuidos entre las angiospermas participarían en la respuesta vegetal a ambas interacciones.

4. Comunidades microbianas en la rizósfera de las leguminosas

Tanto los microorganismos patógenos como la escasez de nutrientes en los suelos causan severos daños en los sistemas agrícolas y, en consecuencia, afectan negativamente la producción de alimentos para consumo humano o animal. Para contrarrestar estos factores limitantes del crecimiento de plantas se utilizan agroquímicos, pero su uso indiscriminado puede producir un impacto ecológico negativo como consecuencia de la contaminación ambiental, el desarrollo de resistencia en patógenos y los efectos adversos sobre poblaciones de microorganismos no patógenos (Glick, 2012; Tariq y col., 2017). La inoculación de microorganismos benéficos, promotores del crecimiento de las plantas constituye una estrategia alternativa o complementaria que contribuye a disminuir los niveles de contaminación ambiental generados por el uso inadecuado de xenobióticos (Gerhardson, 2002; Kumar y col., 2016; Tariq y col., 2017). Dichos microorganismos son habitualmente aislados de la microbiota asociada a las plantas de interés (desde la rizósfera, endósfera y/o filósfera) y se seleccionan teniendo en cuenta su/s mecanismo/s de promoción del crecimiento vegetal, de acuerdo a la condición de estrés (nutricional, biótico, entre otros) que se desea mitigar. Numerosos estudios han sido realizados considerando las respuestas que se obtienen a partir de la interacción en medios axénicos entre una única especie microbiana inoculada y la planta de interés. Sin embargo, en la última década se ha comenzado a analizar el uso de mezclas de diferentes bacterias benéficas que promueven el crecimiento de las plantas mediante distintos mecanismos. En este sentido, la co-inoculación de PGPR no rizobianas y rizobios ha sido estudiada y, entre los beneficios reportados se encuentran: a) mayor ocupancia del nódulo por parte del rizobio; b) eliminación de patógenos competentes; c) cambios en la arquitectura radical que conducen a la formación de potenciales sitios de infección para los rizobios; d) estimulación de la producción de moléculas señal por parte de la planta, entre otras (Verma y col., 2010; Saharan y Nehra, 2011; Zhang y col., 2016).

Desafortunadamente, la interacción entre PGPR y plantas no siempre es estable y, en muchos casos, los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio no se reproducen a campo. Esto puede deberse a factores ambientales como el clima, las características del suelo o la composición de la microbiota nativa (Jha y col., 2013). Una posible estrategia para minimizar la probabilidad de ausencia de resultados esperables, es la selección de microorganismos nativos y/o consorcios microbianos adaptados a las condiciones ambientales particulares del área en que se inocularán (Saharan y Nehra, 2011).

5. Plantas de maní (*Arachis hypogaea* L.)

5.1 Características de la planta de maní

El maní cultivado (*Arachis hypogaea* L.) se originó en el sudeste de Bolivia, en cercanías del norte argentino. Los primeros registros del cultivo de maní en Argentina corresponden a la época colonial, en la que se sembraban pequeñas superficies en provincias del NE y NO del territorio nacional. En la provincia de Córdoba, las primeras referencias corresponden a fines del siglo XIX; aunque la etapa de expansión de este cultivo no se inició hasta el siglo XX. A partir de 1930 comienza a sembrarse en el NE y sur de la provincia, incluyendo los departamentos Río Cuarto, Juárez Celman, Unión, General Roca, Presidente Roque Saenz Peña, Santa María, Río Segundo, Tercero Arriba y San Martín. En este territorio la superficie cultivada fue aumentando en forma progresiva, mientras que en las otras regiones del país fue disminuyendo paulatinamente (Giayetto, 2017).



Figura 5. Esquema de la planta de maní, (*Arachis hypogaea* L.).

Arachis hypogaea L. pertenece al orden Fabales, familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae, tribu Aeschynomeneae, subtribu Stylosanthinae, género *Arachis* (Stalker, 1997). En base al patrón de ramificación y distribución de los ejes vegetativos y reproductivos, esta especie ha sido dividida en dos subespecies, *Arachis hypogaea* subesp. *hypogaea* y *Arachis hypogaea* subesp. *fastigata* (Krapovickas y Gregory, 1994). Morfológicamente, esta es una planta que alcanza un crecimiento de 15 a 60 cm de altura y posee un sistema radical pivotante (**Figura 5**) (Gregory y col., 1973). Según la variedad, el

desarrollo de los brotes laterales puede ser recto, extendido o rastrero. Es una planta geocárpica, y por lo tanto, la infrutescencia (carpóforo) se introduce en el suelo después de la floración y luego el fruto madura dentro de la tierra. Las vainas pueden contener entre 1 a 4 semillas con testa de color rojo claro u oscuro (Moss y Ramanatha Rao, 1995).

La planta de maní tiene requerimientos específicos en cuanto al tipo de suelo en el que crece, el cual debe ser de estructura suelta, bien drenado, liviano, de textura franco arenosa, libre de sales, con alto contenido de calcio, fósforo y potasio lo que le permite un buen desarrollo del sistema radicular produciendo vainas de buen tamaño. Los valores de pH óptimo se encuentran entre 6 y 6,5, requiere de un régimen de precipitaciones de 600 a 1200 mm anuales y la temperatura debe ser superior a 20°C. En cuanto a los requerimientos nutricionales, los elementos más importantes son el nitrógeno, potasio, fósforo y calcio (Giandana, 1997). El principal destino del nitrógeno absorbido es la constitución de proteínas, las que representan entre un 18-25 % del peso del grano de maní. Parte de este nitrógeno proviene de la fijación efectuada por *Bradyrhizobium* spp., bacteria que se encuentra naturalizada en los suelos y que establece una asociación simbiótica con este cultivo (Pedelini, 2008). Como se mencionó anteriormente, la interacción simbiótica maní-*Bradyrhizobium* spp. está mediada por un mecanismo de infección rizobiana particular que involucra la invasión intercelular del tejido radical sin formación de hilos de infección. A pesar de su importancia agronómica, los estudios sobre la simbiosis rizobiana en maní son relativamente escasos, y poco es conocido sobre las bases moleculares implicadas en su regulación.

5.2 Producción nacional e importancia económica del cultivo de maní

La industria manisera argentina constituye una actividad importante para una de las llamadas economías regionales, dedicada casi exclusivamente a la exportación. Su importancia como economía regional para Córdoba queda evidenciada en su participación en las exportaciones provinciales, a las que el complejo manisero aporta el 13%. Más aún, el maní, después de los cítricos, es la economía regional en Argentina que genera los mayores ingresos de dólares. La excelencia de sus productos le permiten a nuestro país posicionarse como el primer exportador mundial de maní (Diario La Nación, Noviembre de 2017). Además, desde el año 2012 el maní producido en la provincia de Córdoba fue lanzado al mercado internacional con el sello “*Maní de Córdoba*” (Ley provincial 10.094/12) que garantiza la calidad premium del producto según los más rigurosos estándares internacionales (Cámara Argentina del Maní).

La producción de maní es una de las actividades agrícolas más importantes de la provincia de Córdoba, con gran impacto en la generación de empleo y efectos multiplicadores sobre el resto de la economía tanto regional como nacional. Entre el 90-95% de la producción nacional de maní, así como la industria vinculada a su procesamiento, se concentra en la región centro-suroeste de esta provincia, principalmente en los departamentos General Roca, Río Cuarto y Juárez Celman. Otras provincias como La Pampa y San Luis le siguen a Córdoba con una producción que cubre el 5-10% restante (Bolsa de cereales de Córdoba, 2017).

La superficie sembrada en Córdoba durante la campaña 2016/17 fue de 328.600 hectáreas, un 4,8% superior a la campaña 2015/2016. La producción en caja fue de 1.179.300 tn, y el rendimiento en caja de 39,6 qq/ha, un 37,7% y 24,5% superior al ciclo anterior, respectivamente. Este incremento en el rendimiento del cultivo convierte a esta campaña en la más importante de los últimos 9 años según la información publicada por la Bolsa de cereales de Córdoba en Noviembre de 2017.

El cultivo de maní constituye entonces un componente clave del desarrollo de un complejo agroalimentario con marcado perfil regional, que articula las distintas etapas del proceso productivo primario, la industrialización de la materia prima, así como su comercialización y exportación (Cámara Argentina del Maní, 2017). Además, como planta leguminosa cumple un rol importante en la rotación de cultivos, contribuyendo a mantener un balance nutricional equilibrado cuando se alterna con especies como maíz y sorgo. Por el contrario, el monocultivo de maní produce un gradual deterioro del suelo por pérdida de estructura y favorece la incidencia de enfermedades (Pedelini, 1997).

5.3 Enfermedades de la planta de maní

Las enfermedades causadas por hongos representan una importante limitación en la producción de maní en la provincia de Córdoba. Las pérdidas en el cultivo de esta leguminosa, causadas por enfermedades de origen fúngico, superan el 10% de sus exportaciones lo que, en términos económicos, significa alrededor de 300 millones de dólares (March, 2001). En la campaña 2013/2014 se registró una alta incidencia de enfermedades fúngicas, lo que afectó el rendimiento de cajas, según informó la Bolsa de cereales de Córdoba en Mayo de 2014. Es posible clasificar a la enfermedades de maní en dos grande grupos según el hábitat natural del microorganismos patógeno: 1) enfermedades del filoplano, aquellas que afecta el follaje de la planta, y 2) enfermedades del rizoplano, aquellas que afectan a los órganos subterráneos en contacto con el suelo

(Marinelli y col., 2017). Las “viruelas”, ampliamente difundidas en el área manisera de Córdoba, son producidas por *Cercospora arachidicola* y *Cercosporidium personatum*, dos hongos del filoplano de enorme potencial patógeno, los cuales en la actualidad son parcialmente controlados con la aplicación de fungicidas, aunque en la última campaña se reportó mayor incidencia de esta enfermedad respecto a campañas anteriores (Bolsa de cereales de Córdoba, 2017). Por otro lado, los “marchitamientos”, “tizones” y “podredumbres”, debidas a hongos del rizoplano, constituyen otro problema complejo (March y Marinelli, 2005). La mayoría de los hongos fitopatógenos de rizoplano son necrotróficos y poseen un amplio rango de hospedadores. Por lo tanto, generalmente no existen razas diferentes dentro de las poblaciones de patógenos necrotróficos ni genes de resistencia específicos en la planta (Raaijmakers y col., 2009). Uno de los principales patógenos del rizoplano que causa efectos adversos tanto en la sanidad como en la productividad de la planta de maní es *Sclerotium rolfsii* (Marinelli y col., 2017).

Este microorganismo es el agente causal del marchitamiento por hongo blanco en el maní y afecta a más de 500 especies vegetales cultivadas o silvestres (pertenecientes a por lo menos 100 familias) (March y Marinelli, 2005). El micelio de *S. rolfsii* es chato y blanco, formado por hifas hialinas y septadas (**Figura 6**). En él se diferencian los esclerocios, que son la forma de resistencia y propagación del hongo (**Figura 7**). Es un hongo necrotrófico que utiliza los residuos vegetales presentes en los primeros centímetros del suelo y puede formar esclerocios, incrementando el potencial inóculo. Estas estructuras, pueden sobrevivir de 3 a 4 años a temperaturas de hasta -10 °C. Es aeróbico, por lo que su presencia es posible en suelos livianos. *S. rolfsii* es capaz de sobrevivir dentro de un amplio rango de condiciones ambientales. El crecimiento del micelio y la germinación de esclerocios requieren de valores de pH de 3 a 5 y de 2 a 5, respectivamente. El máximo crecimiento micelial ocurre entre 25°C y 35°C, con altos porcentajes de humedad (March y Marinelli, 2005).

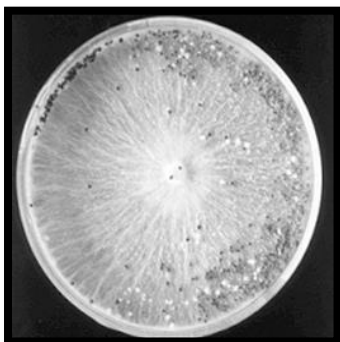


Figura 6. Cultivo en placa de *S. rolfsii*.



Figura 7. Marchitamiento por hongo blanco en plantas de maní causado por *S. rolfsii*. **A.** Micelio creciendo en la corona y ramas de la planta. **B.** Micelio y esclerocios (inóculo) en el suelo y ramas.

El micelio de *S. rolfsii* coloniza el tejido vegetal susceptible (corona, ramas en contacto con el suelo, clavos y frutos) y produce ácido oxálico que precipita el calcio de la laminilla media de la pared de la célula vegetal formando oxalato de calcio. Así, los materiales pécticos de la pared se tornan más susceptibles a la degradación por la enzima endo-poligalacturonasa secretada por el hongo. El primer síntoma de enfermedad se observa en ramas y follaje, los que adquieren aspecto flácido y color verde-ceniciento. Posteriormente, las ramas afectadas o la planta completa adquieren un color bronce, que luego se torna marrón y finalmente se secan. La aparición de estos síntomas es relativamente rápida, produciendo la muerte de las ramas o plantas al término de 7 a 10 días. Cuando los clavos son afectados, los frutos se desprenden durante el arrancado y quedan en el suelo. Si sólo los frutos son invadidos se produce la podredumbre de los mismos, no presentando esas plantas síntomas en el follaje. El desarrollo de la enfermedad es favorecido por la alternancia de períodos húmedos y secos en coincidencia con temperaturas altas. El estrés hídrico predispone al cultivo a las infecciones, y un posterior ciclo de lluvias favorece la aparición de epidemias. El marchitamiento causado por *S. rolfsii* es una enfermedad monocíclica, ya que los esclerocios formados un año pueden producir infección en la siguiente campaña (Marinelli y col., 2017).

Otro de los patógenos del rizoplasma importantes para el cultivo de maní está representado por el hongo *Thecaphora frezii* (Marinelli y col., 2017). Este microorganismo es el agente causal del Carbón de maní, enfermedad que ha cobrado importancia en los últimos años debido a su significativo incremento en intensidad y prevalencia. La enfermedad se inicia cuando los clavos penetran en el suelo. En este momento las esporas

de *T. frezii* germinan dando origen a un promicelio en el que se forman basidiosporas que darán lugar a un micelio infectivo. Este micelio infecta los clavos atravesando las paredes del fruto para luego colonizar las semillas, donde se incrementa significativamente su crecimiento y se produce la esporulación. Las esporas de *T. frezii* permanecen viables en el suelo durante años. El Carbón del maní produce a través de infecciones locales, hipertrofia en cajas y granos, cuyas células son reemplazadas por una masa carbonosa formada por las teliosporas del patógeno (**Figura 8**), lo que causa grandes pérdidas económicas (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2014).

El manejo sanitario de esta enfermedad mediante el uso de fungicidas es una alternativa que produce resultados variables según la campaña agrícola, los momentos de aplicación y los ingredientes activos utilizados (Paredes y col., 2015). Por lo tanto, el desarrollo de estrategias para disminuir la incidencia y severidad de esta enfermedad constituye un desafío.



Figura 8. Sintomatología de Carbón de maní. Vainas afectadas donde pueden distinguirse las esporas fúngicas de *T. frezii*. Extraído de March y Marinelli, 2005.

6. Hipótesis

Las respuestas inducidas en la planta de maní cuando interacciona individualmente con rizobios, con bacterias biocontroladoras o con patógenos fúngicos, se modifican cuando dichas interacciones se establecen en simultáneo con miembros de estos grupos microbianos.

7. Objetivos

7.1 **Objetivo general**

Evaluar en maní los efectos de la inoculación simultánea de microorganismos benéficos y patógenos sobre las actividades promotoras del crecimiento vegetal de bacterias benéficas y la acción patogénica de hongos, así como sobre moléculas de las plantas involucradas en la interacción con cada uno de estos microorganismos.

7.2 **Objetivos específicos**

a. Estudiar *in vitro* y a campo el efecto de la inoculación simultánea del microsimbionte de maní *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, la bacteria biocontroladora *Bacillus* sp. CHEP5 y el fitopatógeno fúngico *Sclerotium rolfsii* sobre las actividades promotoras del crecimiento vegetal de dichas bacterias (fijación biológica de nitrógeno y protección frente a patógenos) y sobre la actividad patogénica del hongo.

b. Determinar la participación de moléculas de miRNA y ARNm en el establecimiento de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144-maní, de compuestos fenólicos en la inducción de resistencia sistémica mediada por *Bacillus* sp. CHEP5 y de la actividad de enzimas peroxidasas en la patogénesis de *S. rolfsii*.

c. Evaluar si los efectos sobre las actividades promotoras del crecimiento vegetal y la patogénesis que resultan de la inoculación simultánea de los microorganismos benéficos y el fitopatógeno, están asociados con alteraciones en las moléculas involucradas en dichos procesos.

Capítulo II. Materiales y métodos



1. Crecimiento y mantenimiento de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se listan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas

Cepas	Características relevantes	Fuente
<i>Bacillus</i> sp. CHEP5	Cepa aislada de plantas de maní, con capacidad biocontroladora	Tonelli y col. 2010
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144	Recomendada como inoculante para <i>Arachis</i> , Amp ^r	MIRCEN, Brasil
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144 V2	Derivada de <i>Bradyrhizobium</i> sp. 6144 incapaz de producir factores Nod, Amp ^r Km ^r	Ibáñez y Fabra, 2011

Bacillus sp. CHEP5 fue cultivada en medio líquido TSB (Trypticase Soya Broth, Britania) o sólido TSA (Trypticase Soya Agar, Britania). *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 V2 fueron cultivadas en medio YEM (Extracto de levadura, Manitol) (Vincent, 1970). Para el cultivo de esta última, el medio fue suplementado con Kanamicina 100 µg ml⁻¹. Para la obtención del medio sólido (YEMA), se agregaron 15 g l⁻¹ de agar y se adicionaron 10 ml l⁻¹ de una solución de Rojo Congo (2,5 g l⁻¹).

Todas las cepas bacterianas se cultivaron a 28°C y, para su conservación a corto plazo, se mantuvieron en placas de medio YEMA o TSA a 4°C. Para su conservación a largo plazo, se tomaron alícuotas de cultivos en fase logarítmica tardía que fueron suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final del 40%. Las suspensiones así preparadas se conservaron a -20°C.

2. Crecimiento y mantenimiento del fitopatógeno fúngico utilizado en este trabajo

El fitopatógeno fúngico utilizado fue *S. rolfsii*, gentilmente cedido por la Dra. A. Marinelli (UNRC). La cepa fúngica fue crecida y mantenida a temperatura ambiente en

placas de Petri conteniendo medio APG (agar papa glucosado) (Kong y col., 2010) suplementado con sulfato de estreptomicina (100 mg l^{-1}).

El fitopatógeno fue conservado en glicerol al 15% a -20°C y sus esclerocios se mantuvieron a temperatura ambiente.

3. Técnicas microbiológicas

3.1 Obtención de los inóculos bacterianos

Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de una colonia aislada de cada una de las cepas bacterianas, que fue transferida al correspondiente medio de cultivo líquido e incubada a 28°C en agitación. *Bacillus* sp. CHEP5 fue cultivado durante 24 horas, mientras que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 V2 se cultivaron durante 10 días, hasta alcanzar aproximadamente una $\text{DO}_{620\text{nm}} = 1$ (10^8 UFC ml^{-1}). Luego, los cultivos fueron centrifugados a 2500 rpm por 5 min a 16°C . Las células fueron resuspendidas en solución estéril de NaCl al 0,85%.

El número de células viables se determinó utilizando la técnica de recuento por microgota descrita por Somasegaran y Hoben (1994).

3.2 Obtención de los inóculos de *S. rolf sii*

Semillas de trigo húmedas contenidas en un Erlenmeyer de 50 ml fueron esterilizadas en autoclave (121°C -15 min). Posteriormente, fueron infectadas con tacos de micelio (5 mm de diámetro) de *S. rolf sii*. Los Erlenmeyer se mantuvieron a temperatura ambiente hasta observar abundante desarrollo de micelio (7-10 días aproximadamente) (Grupta y col., 2002).

3.3 Aislamiento de bacterias endófitas y epífitas de raíz

Para el aislamiento de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y de *Bacillus* sp. CHEP5 de la superficie (epífitos) o del interior (endófitos) del tejido radical, se siguió la metodología descrita por Kuklinsky-Sobral y col. (2004) con algunas modificaciones. Brevemente, las bacterias epífitas fueron aisladas colocando la raíz de plantas de maní en tubos de 50 ml conteniendo 10 ml de solución salina bufferada (PBS), los que fueron agitados a 150 rpm y 28°C durante 1 hora. La solución pura y sus diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) fueron sembradas en placas conteniendo medio YEMA (suplementadas con Gentamicina $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, Ampicilina $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, Cloranfenicol $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ y Diclorán 50

$\mu\text{g ml}^{-1}$) y TSA (suplementadas con Diclorán $50 \mu\text{g ml}^{-1}$) para el aislamiento de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 1-10 días. Para la obtención de bacterias endófitas, las epífitas fueron removidas por desinfección superficial sumergiendo las raíces en etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sodio 2% durante 3 minutos, etanol 70% por 30 segundos y 6 lavados con agua destilada estéril. La desinfección superficial de las raíces se confirmó sembrando alícuotas del agua destilada estéril usada en el lavado final en placas de YEMA y TSA. Las raíces así tratadas, se cortaron y trituraron en 10 ml de PBS y se mantuvieron en Erlenmeyer a 28°C durante 1 hora con agitación. Diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) fueron sembradas en placas conteniendo medio YEMA (suplementadas con Gentamicina $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, Ampicilina $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, Cloranfenicol $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ y Diclorán $50 \mu\text{g ml}^{-1}$) y TSA (suplementadas con Diclorán $50 \mu\text{g ml}^{-1}$) para el aislamiento de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5, respectivamente. Las mismas fueron incubadas a 28°C durante 1-10 días.

3.4 Aislamiento de bacterias del interior de nódulos

Se siguió la metodología descrita por Somasegaran y Hoben (1994) con algunas modificaciones. Se extrajo el 20% de los nódulos formados en cada planta y se desinfectaron sumergiéndolos en etanol 96% por 30 segundos, peróxido de hidrógeno 10% durante 10 minutos y 6 lavados con agua destilada estéril. La desinfección superficial de los nódulos se confirmó sembrando alícuotas del agua destilada estéril usada en el lavado final y, además, realizando una impronta de los nódulos haciéndolos rodar sobre placas de YEMA y TSA. En ambos casos, las placas fueron incubadas a 28°C durante 1-10 días. Los nódulos desinfectados se trituraron individualmente en $200 \mu\text{l}$ de PBS, se homogeneizaron y las suspensiones puras o diluidas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) fueron sembradas en placas conteniendo medio YEMA (suplementadas con Gentamicina $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, Ampicilina $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, Cloranfenicol $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ y Diclorán $50 \mu\text{g ml}^{-1}$) y TSA (suplementadas con Diclorán $50 \mu\text{g ml}^{-1}$) para el aislamiento de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 1-10 días.

3.5 Ensayos de antibiosis

La capacidad de los aislamientos bacterianos de inhibir el crecimiento de *S. rolfsii* se evaluó de acuerdo a Tonelli y col. (2010). Brevemente, un taco del micelio fúngico (5 mm de diámetro) fue colocado en el centro de las placas conteniendo medio APG y,

aproximadamente a 3,5 cm, se sembró una ansada del cultivo en TSA del aislamiento bacteriano a ensayar. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 8 días y se midió el porcentaje de inhibición del desarrollo del micelio. Se consideró inhibición del crecimiento fúngico cuando el diámetro de las colonias de *S. rolfsii* disminuyó al menos en un 50% con respecto a un control de crecimiento fúngico en ausencia de las bacterias.

3.6 Evaluación cualitativa de la capacidad de *Bacillus* sp. CHEP5 de fijar N₂

Una colonia de *Bacillus* sp. CHEP5 crecida en medio TSA fue sembrada en placas conteniendo medio malato semisólido libre de nitrógeno (Nfb). Las placas fueron incubadas durante 3 días a 28 °C. Se realizó un seguimiento del crecimiento de *Bacillus* sp. CHEP5 durante ese tiempo. A partir de estas colonias se realizaron tres repiques sucesivos en placas y se sembró también por picadura en tubos conteniendo medio Nfb. La capacidad de fijar N₂ fue evaluada por la formación de una biopelícula blanquecina subsuperficial de crecimiento característico de bacterias fijadoras de nitrógeno (Peña y Reyes, 2007).

3.7 Determinación cualitativa de la capacidad de *Bacillus* sp. CHEP5 de solubilizar fosfatos

La capacidad de solubilizar fosfato *in vitro* fue determinada en medio sólido NBRIIP-BPB (Mehta y Nautiyal, 2001). Se colocaron 10 µl de cultivo bacteriano (10⁸ UFC ml⁻¹) en el centro de una placa de Petri. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 7 días, tiempo al cual se midió el diámetro de halo transparente formado alrededor de la colonia bacteriana.

4. Condiciones generales de trabajo con plantas de maní (*A. hypogaea* L.)

4.1 Desinfección superficial y germinación de semillas de maní

Semillas de maní (*A. hypogaea* L.) var. Runner cultivar Granoleico fueron desinfectadas superficialmente siguiendo la metodología descrita por Vincent (1970). Brevemente, las semillas fueron sumergidas en alcohol 96° durante 30 segundos y, luego de un lavado con agua destilada estéril, se sumergieron en agua oxigenada de 100 vol. al 30%. Luego de 20 minutos se realizaron 7 lavados con agua destilada estéril para eliminar restos de agua oxigenada. Las semillas fueron colocadas en placas de Petri estériles que contenían algodón y papel secante humedecido y se incubaron en estufa durante 3 días a 28°C en oscuridad.

4.2 Sistema de cultivo de plantas

Para el cultivo de plantas se utilizó un sistema que permite evaluar el efecto de la inoculación del microsimbionte, del agente de biocontrol y del patógeno fúngico sobre las actividades promotoras del crecimiento de cada una de las bacterias (ISR y simbiosis), y la enfermedad ocasionada por el fitopatógeno. Para ello, se utilizaron dos macetas conteniendo vermiculita estéril, colocadas una encima de la otra y comunicadas por un orificio realizado en la base de la maceta superior. En esta última se colocó una semilla de maní pregerminada, de manera tal que su radícula se introduzca en la maceta inferior (de mayor diámetro), a través del orificio comunicante (**Figura 9**).



Figura 9. Sistema de cultivo de plantas

4.3 Selección de las condiciones óptimas para el desarrollo del marchitamiento causado por *S. rolfsii* en plantas de maní

Con el fin de seleccionar la concentración infectiva de *S. rolfsii*, el momento de inoculación y la condición de cultivo de las plantas inoculadas, se realizaron diferentes ensayos:

- a. Plantas de maní de 16 días de edad se inocularon con 1 semilla de trigo infectada con *S. rolfsii* (0,02 g de micelio/semilla de trigo).
- b. Plantas de maní de 9 días de edad se inocularon con 1 semilla de trigo infectada con *S. rolfsii* (0,02 g de micelio/semilla de trigo).
- c. Plantas de maní de 9 días de edad se inocularon con 1, 2 ó 3 semillas de trigo infectada con *S. rolfsii* (0,02 g de micelio/semilla de trigo) y se cubrieron con una bolsa de nylon por 72 horas.

La inoculación del fitopatógeno se realizó en todos los casos en la corona de la planta (maceta superior). Plantas sin inocular fueron usadas como controles. Se analizó visualmente la aparición y el desarrollo de la sintomatología típica de la enfermedad examinando diariamente 5 plantas por cada tratamiento.

4.4 Inoculación de plantas de maní

Dos días después del traspaso de semillas de maní pregerminadas a macetas, la radícula (en la maceta inferior) fue inoculada con 4 ml (10^8 UFC ml⁻¹) de las suspensiones bacterianas obtenidas como se mencionó anteriormente. Luego de 7 días se inoculó el fitopatógeno en la corona de la planta, y se cubrió con una bolsa de nylon por 72 horas, para generar el ambiente requerido para el desarrollo de la enfermedad. Además, se utilizaron plántulas sin inocular como controles negativos, y un grupo de ellas se regó una vez por semana con KNO₃ 5 mM y se utilizaron como controles de fertilización nitrogenada.

Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo con condiciones controladas (16 horas luz y 28°C/8 horas oscuridad y 22°C, 50% humedad relativa), se regaron cada 48 horas con agua estéril y una vez por semana con solución Hoagland (Hoagland y Arnold, 1950) con o sin nitrógeno dependiendo del tratamiento bacteriano.

4.5 Determinación de la incidencia y severidad del marchitamiento causado por *S. rolfsii*

Se determinó la incidencia de la enfermedad causada por *S. rolfsii* en maní, como el porcentaje de plantas enfermas. Se consideraron plantas enfermas aquellas que mostraron síntomas de marchitamiento.

4.6 Evaluación de los parámetros del crecimiento vegetal

Para evaluar el crecimiento de las plantas se determinaron los pesos secos aéreo y radical. En ambos casos, las muestras fueron secadas en estufa a 60 °C durante aproximadamente 2 semanas, hasta alcanzar peso constante.

4.7 Parámetros simbióticos

Para evaluar el comportamiento simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 se determinaron, a los 40 días post-inoculación, el número y peso seco de los nódulos, porcentaje de nódulos rojos y de plantas noduladas. El color rojo de los nódulos es

consecuencia de la presencia en su interior de la leghemoglobina, y es considerado como un parámetro que indica que se está llevando a cabo la FBN (Virtanen y col., 1947).

4.8 Microscopía óptica de nódulos

Los nódulos fueron sumergidos en FAA (95% etanol:ácido acético glacial: 37-40% formaldehído: agua; 50:5:10:35, v/v) y se deshidrataron con etanol y xileno (Johansen, 1940). Posteriormente, los tejidos fueron embebidos en la resina parafínica de alta pureza HistowaxTM. Se obtuvieron secciones transversales de 6 µm de espesor a partir de los bloques de muestra utilizando un micrótopo Minot. Luego, las secciones fueron teñidas con hematoxilina, safranina O y fast green FCF de acuerdo a Johansen (1940). Las preparaciones fueron observadas mediante un microscopio Zeiss AxioPhot provisto de un dispositivo de captura de imágenes AxioVision 4.3, con una cámara AxioCam HRc. De los cortes seriados de cada nódulo se seleccionaron aquellos que mostraron un mayor diámetro, midiéndose también el diámetro de la zona de infección. El experimento se realizó dos veces con 5 repeticiones por tratamiento.

4.9 Determinación del contenido de nitrógeno

El contenido de nitrógeno se determinó a partir de la materia seca de la parte aérea de plantas de maní cosechadas a los 40 días post-inoculación con las cepas bacterianas, siguiendo la metodología propuesta por Kjeldahl (1883).

5. Técnicas bioquímicas

5.1 Determinación del contenido de clorofila total

El contenido de clorofila total se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Arnon (1949). Brevemente, 100 mg de tejido foliar fueron homogeneizados en mortero luego del agregado de acetona al 80% (v/v). La suspensión obtenida fue filtrada y llevada a un volumen final de 10 ml con acetona al 80%. Se midió la absorbancia a 650 nm y a 665 nm en un espectrofotómetro. La cantidad de clorofila por gramo de peso fresco de hojas fue determinada de acuerdo a la siguiente ecuación (Mc Kinney, 1939):

$$\text{Clorofila Total} = 6,45 (\text{Abs } 665) + 17,72 (\text{Abs } 650)$$

5.2 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas a partir de tallos de plantas de maní o micelio de *S. rolfsii*, las muestras congeladas fueron homogeneizadas en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se le añadió buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,4) conteniendo EDTA (1mM) y 1 % (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVP). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue trasvasado a un tubo Eppendorf estéril y utilizado para las posteriores determinaciones de actividad enzimática.

5.3 Cuantificación de proteínas

El contenido proteico fue determinado por el método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina bovina (1 mg ml⁻¹) como estándar.

5.4 Determinación de la actividad de PXs totales

La actividad PX se determinó según el método propuesto por Sosa Alderete y col. (2009). La mezcla de reacción consistió en buffer acetato de sodio 0,1 M (pH 5,5), H₂O₂ 0,5 mM, orto-dianisidina 0,63 mM (sustrato reductor) y un volumen de extracto proteico de tallo o micelio conteniendo aproximadamente 50 µg proteínas ml⁻¹ en un volumen final de reacción de 1000 µl. Se determinó el incremento en la absorbancia a una longitud de onda de 470 nm como resultado de la aparición de un producto coloreado [bis(3,3'-dimetoxi-4-amino)azobifenilo] originado por la oxidación de la orto-dianisidina por las peroxidasas en un medio ácido y en presencia de H₂O₂ como sustrato oxidante. La actividad se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer utilizando el coeficiente de extinción molar 11,3 mM⁻¹ cm⁻¹. Una unidad (U) de PX se definió como la cantidad que cataliza la formación de 1 µmol de producto en 1 minuto de reacción. La actividad PX se expresó en U mg proteínas⁻¹.

5.5 Determinación cualitativa de compuestos fenólicos totales

Para analizar la acumulación de compuestos fenólicos en tallos de plantas de maní se realizaron cortes a mano alzada de este tejido en contacto con micelio de *S. rolfsii*. Los mismos fueron visualizados en un microscopio Nikon equipado con filtros de luz fluorescente (450-490 nm) y ultravioleta (365 nm).

5.6 Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos solubles

Para ello, se siguió la metodología descrita por Ainsworth y Gillespie (2007). Se tomaron 100 mg de material vegetal (tallo) y se homogeneizaron con 1 ml de metanol al 95% frío. La suspensión obtenida se incubó durante 48 horas en oscuridad a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf. La mezcla de reacción consistió en 100 μ l del extracto vegetal, 200 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10%, y 800 μ l de Na_2CO_3 700 mM. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se determinó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro. La cantidad de compuestos fenólicos totales se calculó a partir de la ecuación de regresión lineal obtenida con diferentes concentraciones de ácido gálico, y se expresó como equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco.

5.7 Determinación cuantitativa de los niveles de P soluble

Se utilizó la técnica colorimétrica de Fiske y Subbarow (1925) modificada. Se tomó una alícuota de un preinóculo bacteriano fresco que permitiera obtener una densidad óptica de 0,14 en Erlenmeyer con 15 ml de medio NBRIP-BPB. El volumen del cultivo inoculado fue previamente lavado con solución fisiológica y resuspendido en el medio de cultivo de destino. Los Erlenmeyer así inoculados fueron incubados a 28 °C en agitación. A las 24 y 48 horas de crecimiento se tomaron, asépticamente, 1,5 ml del cultivo y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 12 minutos. Se determinó el contenido de ortofosfato soluble en el sobrenadante midiendo la absorbancia a 660 nm.

6. Análisis bioinformáticos

6.1 Identificación de precursores de miRNAs y otros genes implicados en la nodulación de plantas de maní

Se utilizaron datos obtenidos mediante RNA-seq de tejido radical y de nódulos de *A. hypogaea* L. disponibles en la base de datos NCBI (números de acceso SRX1125177, SRX1125179, SRX1125205, SRX1125208, SRX1125213, SRX1125215; www.ncbi.nlm.nih.gov). Brevemente, se realizó un ensamblaje *de novo* empleando el programa Trinity 2.4 (Grabherr y col., 2011) para lo cual se consideraron los contigs de una longitud mayor o igual a 110 pb. Se calculó la expresión de cada contig empleando el programa RSEM 1.3 (Li y Dewey, 2011) y, a partir de estos resultados, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante DESeq2 (Love y col., 2014) ajustando a un valor $p < 0.05$ para

identificar los transcritos diferencialmente expresados. Los transcritos de ARNm de interés fueron identificados realizando un análisis comparativo de secuencias mediante el programa Blast2GO. Para la identificación de precursores de miARNs se llevó a cabo un análisis comparativo (BLAST) con la base de datos de miARNs, miRbase (<http://www.mirbase.org/>), seleccionando aquellos que mostraron más del 80% de identidad.

6.2 Identificación de genes blanco de miARNs potencialmente implicados en la nodulación de maní

Se llevó a cabo un análisis *in silico* empleando el programa psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>; Dai y Zhao, 2011) con el fin de predecir los genes blanco de los miARNs potencialmente implicados en la nodulación de maní. Se seleccionaron aquellos ARNm cuyo valor de puntuación de expectativa fue ≤ 3 . Este valor es un indicador de la probabilidad de complementariedad entre un miARN y su potencial transcripto blanco. Mientras menor es este valor, mayor es dicha probabilidad.

7. Técnicas de biología molecular

7.1 Obtención de ADN genómico bacteriano

Para la obtención de templados de ADN a partir de los aislamientos se siguió el método descrito por Walsh y col. (1991). Una ansada de colonias bacterianas crecidas en medio TSA fue resuspendida en 300 μ l de NaCl 1 M, se agitó durante 1-2 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 4 minutos. El sobrenadante se descartó, se agregaron 300 μ l de agua bidestilada estéril, y se agitó y centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego de adicionar al pellet 200 μ l de resina (Chelex® 100) al 6%, la suspensión se calentó 20 minutos a 56°C y 8 minutos a 99°C. El templado obtenido fue conservado a -20 °C hasta el momento de utilizarlo. En aquellos casos en los que esta metodología no permitió la obtención de ADN, se utilizó el kit Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin KitA (GE Healthcare Life Sciences, UK) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante.

7.2 BOX-PCR

Las reacciones de amplificación por PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l conteniendo los siguientes reactivos: Buffer de reacción 1X, 2,5 mM de Cl_2Mg , 200

μM de cada dNTP, $1 \mu\text{M}$ del cebador, 0,5U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y ADN molde. Se utilizó el cebador BOX-AR1 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG- 3' (Versalovic y col., 1994). Las condiciones generales de amplificación fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
95°C	7 minutos	} 35 ciclos
94°C	1 minuto	
53°C	1 minuto	
65°C	8 minutos	
68°C	16 minutos	

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf *Mastercycler gradient*.

7.3 Análisis del perfil genético de aislamientos bacterianos

Los perfiles de bandas de amplificación obtenidos mediante BOX-PCR fueron analizados utilizando el software Cross Checker V.2.9 (Buntjer, 1999), y los dendrogramas correspondientes se construyeron mediante el software FAMD (Schlüter y Harris, 2006).

7.4 Condiciones de PCR para la amplificación del gen *nifH* de *Bacillus* sp. CHEP5

Las reacciones de amplificación por PCR del gen *nifH* de *Bacillus* sp. CHEP5 fueron realizadas en un volumen final de 25 μl conteniendo los siguientes reactivos: Buffer de reacción 1X, 1 mM de Cl_2Mg , 200 μM de cada dNTP, $1 \mu\text{M}$ de cada cebador (**Tabla 2**), 0,5U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y ADN molde. Las condiciones generales de amplificación fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
94°C	2 minutos	} 35 ciclos
94°C	45 segundos	
57,8°C	45 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf *Mastercycler gradient*.

7.5 Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron separados mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,5%. Para la electroforesis se utilizó buffer TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2).

7.6 Condiciones generales de extracción de ARN

Para la extracción de ARN de raíces de plantas de maní se utilizó el Kit mirVana™ (Ambion) de acuerdo a las condiciones sugeridas por el fabricante. Se utilizaron 100 mg de un pool de raíces provenientes de 4 plantas. Los ARNs extraídos se cuantificaron midiendo la absorbancia en un equipo NanoDrop 3300. Las muestras se mantuvieron a -80°C.

7.7 Control de la integridad del ARN

Se preparó una mezcla de 10 µl de ARN con 2 µl de buffer de siembra y 3 µl de formamida, la que se calentó a 65°C por 5 minutos y se llevó inmediatamente a hielo durante 1 minuto. Posteriormente se sembró en un gel de agarosa al 0,8% con el agregado de bromuro de etidio.

7.8 Síntesis de ADN copia (ADNc)

7.8.1 Estrategia de elongación empleando stem-loop

Para la obtención de ADNc mediante esta estrategia se realizó una RT-PCR utilizando el Kit TaqMan® MicroRNA Assays de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, el cebador específico, el ARN total y los dNTPs se incubaron a 65°C durante 5 minutos y luego se enfriaron en hielo por 1 minuto. Posteriormente, se incorporaron los demás reactivos. Los cebadores empleados en esta técnica se listan en la **Tabla 2**. Las condiciones para la síntesis del ADNc fueron:

Temperatura	Tiempo	
16°C	30 minutos	} 60 ciclos
30°C	30 segundos	
42°C	30 segundos	
50°C	1 minuto	
85°C	5 minutos	

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Eppendorf *Mastercycler gradient*.

7.8.2 Estrategia de elongación empleando poliadenilación

Para la obtención de ADNc se realizó una RT-PCR utilizando el Kit NCode™ miRRNA First-Straind cDNA síntesis (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones sugeridas por el fabricante con algunas modificaciones.

7.9 Amplificación de ADNc mediante qPCR

Se utilizó el Kit *Power SYBR Green QPCR Master Mix* (Applied biosystems). El volumen final de reacción por tubo fue de 10 µl conteniendo los siguientes reactivos: Master Mix 1X, 500 nM de cada cebador y ADNc molde 4 µl (diluído 1:40). Los cebadores empleados se listan en la **Tabla 2**. Las condiciones generales de amplificación fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
50°C	2 minutos	
95°C	10 minutos	
95°C	15 segundos	} 40 ciclos
57°C	60 segundos	

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador *Eco Illumina Real-Time PCR System* (Illumina). Luego de finalizada la reacción de amplificación, se realizó la curva de disociación del producto amplificado mediante el calentamiento de la muestra.

Tabla 2. Cebadores empleados para la síntesis de ADNc y para su posterior amplificación.

Cebadores	Secuencia
Nodulina21F	TTGGAGGAAGGTGATGATGA
Nodulina21R	TTGGTGCCAGATTCTCTGC
Proteína canal F	GCAGGAAAATCCCACCTTTCT
Proteína canal R	TTCATCACATTCAGCGCAAG
U6 [▲]	GTGCAGGGTCCGAGGTTTTGGACCATTTCTCGAT
miR160 [▲]	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGGCAT
miR159 [▲]	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACWAGAGC
miR164 [▲]	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACYGCACG
miR172 [▲]	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACMTGCAG
miR396 [▲]	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACMAGTTC
Reverso universal	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6 F [◆]	GGAACGATACAGAGAAGATTAGCA

miR160 F ♦	TCGCTTGCCTGGCTCCCTGT
miR159 F ♦	CGGCGGTTTGGATTGAAGGGA
miR164 F ♦	GGCGGTGGAGAAGCAGGGCA
miR172 F ♦	GGCGGAGAATCTTGATGATG
miR396 F ♦	GGCGGTTCCACAGCTTTCTT
miR156a ∞	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
miR159a ∞	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA
U6 ∞	CACAAATCGAGAAATGGTCCA
miR399 ∞	TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTG
miR3508 ∞	TAGAGGGTCCCATGTTCTCA
SymRK F	TGCTCTTACCCACTCTGA
SymRK R	ATCTGTAGTTGGACCCTC
LAC-4 F	GCTTGTGCTGCAAGATACCG
LAC-4 R	CCAGGTGGCAATGCATGAAC
EF-1γ F	ACTTTGGAATTTCCGGCCCA
EF-1γ R	CCCAAAGCCAAGAATCCCCT
Actina F	GAAATGTGCCCTTATCAGATATAC
Actina R	GTTTGAGAGCATAGCGTGCTGTGCTG
Ubiquitina F	TGGCAGACTACAACATCCAG
Ubiquitina R	CACATTATCGATTGTGTCAGAG
NifH F	CACCCGCCTGATCCTGAACTCGAAGGCGC
NifH F	GGCCGCGTACATCGCCATCATCTCGCCGG

▲ Cebadores empleados para la reacción de RT-PCR usando cebadores stem-loop. ♦ Cebadores empleados para la reacción de qPCR usando los ADNc provenientes de la RT-stem-loop. ∞ Cebadores empleados para la reacción de qPCR usando los ADNc provenientes de la RT usando la poliadenilación como estrategia de elongación de miARNs

7.10 Curva estándar de la reacción de qRT-PCR

Se obtuvo la curva estándar utilizando diluciones seriadas de ADNc molde (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}).

7.11 Cuantificación relativa de la expresión génica

La abundancia relativa de los miARNs y de los ARNm fue normalizada a la expresión de los genes U6 y *Ahactina*, respectivamente. Los valores de Ct obtenidos se determinaron por triplicado y los niveles relativos de transcripto se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

7.12 Obtención y análisis de la secuencia de *Ahsymrk*, EF-1V y lacasa-4 de maní, y el gen *nifH* de *Bacillus* sp. CHEP5

Los productos de amplificación obtenidos mediante PCR fueron secuenciados por el Laboratorio Macrogen (Corea). El análisis de la secuencia fue realizado mediante el uso del algoritmo BLASTN (Altschul y col., 1997). Las secuencias de referencia fueron obtenidas a partir de la base de datos Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank).

8. Ensayo a campo

8.1 Preparación de inoculantes para su evaluación en ensayos a campo

Los inoculantes se prepararon a partir de las cepas bacterianas *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5. Dichos microorganismos se sembraron en 25 ml de medio YEM y TSB, respectivamente y se incubaron a 28°C en agitador rotatorio (180 rpm). Cuando alcanzaron una $DO_{620nm} = 1$ (10^8 UFC ml^{-1}) se trasvasaron a un Erlenmeyer de 2 litros conteniendo 500 ml de medio y se incubaron en las mismas condiciones. Cuando los cultivos alcanzaron un recuento igual o superior a 10^8 UFC ml^{-1} , se trasvasaron a una vejiga esteril de 250 ml y se agregó goma arábica al 0,6 % como solución estabilizante en relación 1:1 con el inóculo. Los inoculantes así preparados se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

8.2 Condiciones de siembra

Con el propósito de estudiar el efecto de la inoculación simultánea de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5 a campo, se llevaron a cabo dos ensayos, uno en el campo Avex (zona rural de Río Cuarto, Córdoba; 33° 9'40.38"S; 64° 8'0.45"O) y otro en La Herli (zona rural de Las Vertientes, Córdoba; 33°18'58.14"S; 64°33'52.71"O) con la asistencia técnica del Ingeniero Agrónomo Guillermo Cerioni y el Dr. Federico Morla (Facultad de agronomía y Veterinaria, UNRC). El suelo de Avex es del tipo Haplustol údico (Taxonomía de suelos del USDA), de planos intermedios, bueno a algo excesivamente drenado, profundo (+100 cm), franco arenoso en superficie y franco en el subsuelo, moderadamente bien provisto de materia orgánica y con moderada capacidad de intercambio catiónico. En La Herli el suelo es del tipo Hapludol típico, con suaves ondulaciones, bien drenado, profundo (+100 cm), franco arenoso en superficie y franco en el subsuelo, bien provisto de materia orgánica y con moderada capacidad de intercambio

catiónico. En las **Tabla 3** se muestran las propiedades fisicoquímicas de los suelos ensayados.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas del suelo de los campos ensayados

Campo	Materia orgánica (%)	pH	P (ppm)	Textura
La Herli	2,42	6,78	10,1	Franco
Avex	1,84	6,44	37,3	Franco

El tamaño de las parcelas en La Herli fue de 8 surcos de 20 m de largo separados por 32 cm, y en Avex fue de 4 surcos de 50 m de largo separados por 32 cm. Se sembraron el 22 y 23 de Octubre de 2015 respectivamente. Al momento de la siembra los inóculos se ajustaron a una concentración de $1,5 \times 10^6$ UFC ml⁻¹. La siembra se realizó con una sembradora autopropulsada neumática monofila (Nova SIEMBRA) y la inoculación se llevó a cabo de forma manual en el surco abierto donde se había depositado la semilla de maní. Los tratamientos evaluados fueron:

- a. *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144
- b. *Bacillus* sp. CHEP5
- c. *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 + *Bacillus* sp. CHEP5

Una parcela sin inocular fue utilizada como control.

Para evaluar el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 se tomaron plantas (aproximadamente el 7%) a los 45 días post-siembra y se determinó el número de nódulos/planta, el peso seco de nódulos totales/planta, y el peso seco aéreo y radical. Las cosechas se realizaron los días 5 y 20 de Abril de 2016 en La Herli y Avex respectivamente. Se muestrearon 7 m lineales de cada tratamiento y se determinó el número y peso de cajas por hectárea, y el porcentaje de maní calidad confitería (semilla con diámetro mayor a 7,5 mm). Además, durante todo el ensayo se monitoreó periódicamente la ocurrencia de enfermedades fúngicas. En ambos campos, se realizaron controles de maleza en pre-emergencia (Acetoclor (HARNESS) 1 l ha⁻¹ y Diclosulam (SPIDER) 24 g ha⁻¹), y post-emergencia del cultivo (Imazapic (CADRE 70 DG) 70 g ha⁻¹ a los 45 días después de la siembra). Además se llevo a cabo un control de escapes de maleza de hoja ancha (2,4 DB, 1 l ha⁻¹) y gramíneas (Haloxifop R Metil (GALANT R) 0,5 l ha⁻¹). Para el control fitosanitario del cultivo se realizaron 3 aplicaciones de fungicidas (Pyraclostrobin y Epoxiconazole 0,75 l ha⁻¹ a intervalos de 28 días).

8.3 Determinación de la incidencia y severidad del Carbón de maní

Se determinó la incidencia como el porcentaje de vainas afectadas en 7 m lineales. El índice de severidad se evaluó según la fórmula que se muestra más abajo (**Ec. 1**), utilizando una escala de 0-4, que considera la proporción en que las vainas se encuentran afectadas: **0**: vainas sin carbón, **1**: vaina normal, una semilla con pequeño soro, **2**: vaina deformada o no, una semilla mitad afectada, **3**: vaina malformada y toda una semilla carbonosa, y **4**: vaina malformada y las dos semillas carbonosas (**Figura 10**).

$$\text{Ec. 1. IS} = (X_0 Y_0) + (X_1 Y_1) + (X_2 Y_2) + (X_3 Y_3) + (X_4 Y_4)$$

Donde X_0, X_1 etc., es el valor del grado de la afección e Y_0, Y_1 , etc., es la proporción de la muestra afectada.



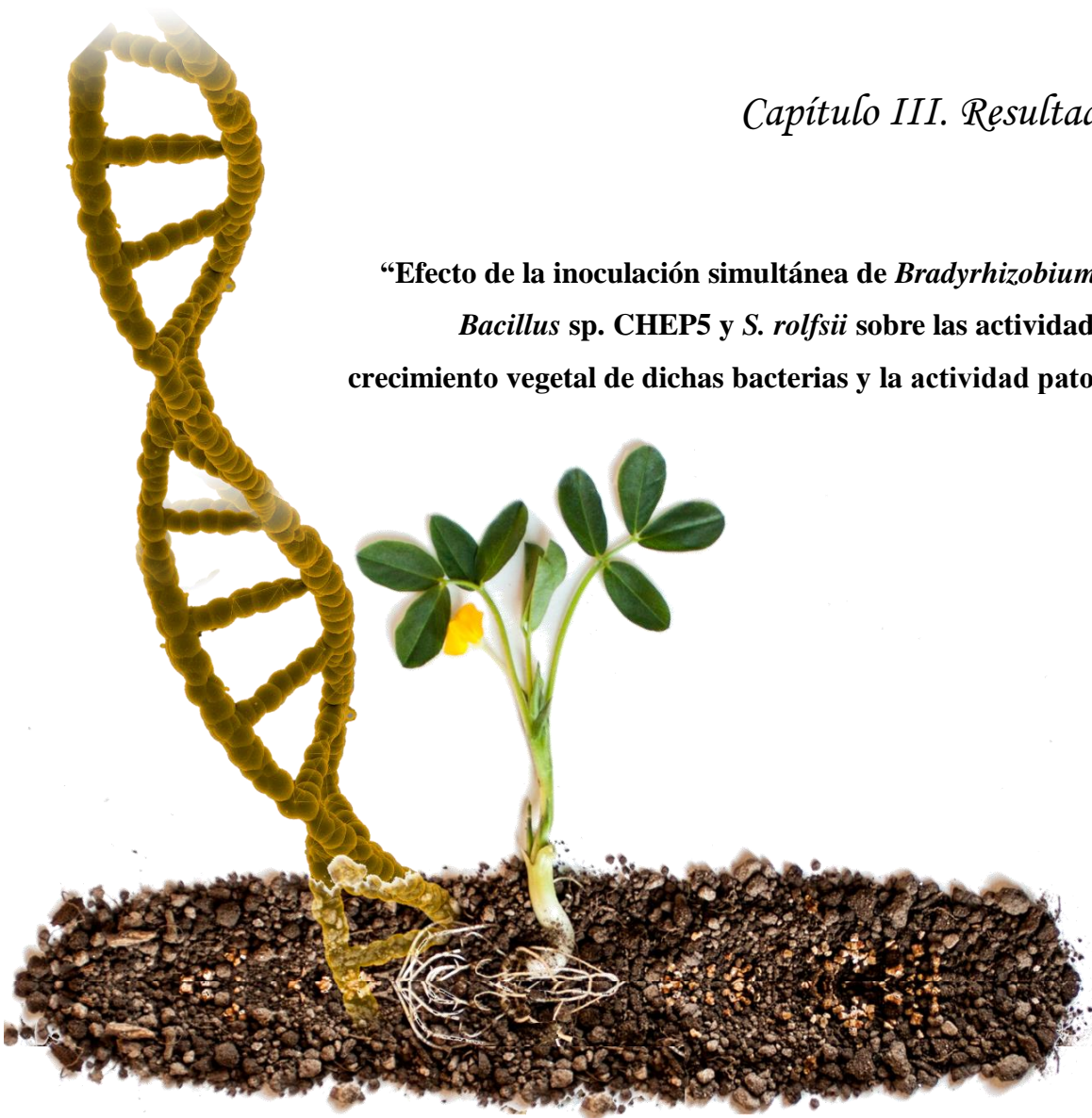
Figura 10. Escala del nivel de enfermedad

9. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA y las diferencias entre los tratamientos fueron detectadas por LSD Fisher. Se utilizó el software InfoStat (InfoStat versión 1.0, FCA, UNC, Argentina. Para comparaciones entre dos muestras, se aplicó el test-t de Student. En todos los casos las medias se compararon con un nivel de significancia del 5%.

Capítulo III. Resultados y discusión

“Efecto de la inoculación simultánea de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolfii* sobre las actividades promotoras del crecimiento vegetal de dichas bacterias y la actividad patogénica del hongo”



Efecto de la inoculación simultánea de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolf sii* sobre las actividades promotoras del crecimiento vegetal de dichas bacterias y la actividad patogénica del hongo

El rendimiento de los cultivos de interés agronómico se encuentra limitado por diversos factores estresantes tanto bióticos como abióticos. Entre éstos se puede citar la incidencia de enfermedades y las deficiencias nutricionales del suelo. Una de las prácticas agrícolas más ampliamente utilizadas para mitigar el efecto negativo de estos factores estresantes es el empleo de fertilizantes y pesticidas a base de sustancias químicas. A partir del conocimiento de las potenciales consecuencias negativas asociadas al uso indiscriminado de estos compuestos, en las últimas décadas, las investigaciones se han focalizado en diversos microorganismos beneficiosos que podrían actuar como biofertilizantes y/o biopesticidas. Los enfoques ecológicos consideran una amplia gama de PGPRs, endo y ectomicorrizas y otros hongos cuya inoculación contribuye a mejorar la absorción de nutrientes, el crecimiento vegetal y la tolerancia de las plantas al estrés biótico y abiótico, sin efectos deletéreos sobre el medio ambiente y la salud humana. Es por ello que la inoculación simple o combinada de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas se presenta como una alternativa o complemento a la utilización de fertilizantes y pesticidas químicos (Bhardwaj y col., 2014). El éxito de la inoculación a campo de PGPRs depende de las condiciones ambientales así como de las propiedades físico-químicas y de la comunidad microbiana del suelo, entre otros factores. Es ampliamente conocido que los microorganismos asociados a las raíces de las plantas no sólo interactúan con éstas, sino que también lo hacen con otros microorganismos que conforman el microbioma rizosférico (Venturi y Fuqua, 2013; Pieterse y col., 2016). Estas interacciones pueden ser neutras o pueden afectar la interacción planta-microorganismo de modo sinérgico o antagónico (Van der Putten y col., 2007). Conocer las interacciones que ocurren entre los microorganismos rizosféricos, y cómo éstas afectan a las plantas, permitirá desarrollar estrategias para el manejo integrado de cultivos e incrementar su productividad, con un menor requerimiento de insumos químicos (Pieterse y col., 2016).

Tonelli y col. (2011) demostraron que la bacteria *Bacillus* sp. CHEP5, aislada del filoplano de plantas de maní sanas, es capaz de inducir la resistencia sistémica en este cultivo protegiéndola de *S. rolf sii*, agente causal del marchitamiento por hongo blanco. Por otro lado, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, tiene la capacidad de establecer una asociación simbiótica con plantas de maní creciendo en suelos deficientes de nitrógeno, induciendo la formación de nódulos radicales en los que se lleva a cabo la FBN. De esta forma, la

bacteria le provee a la planta de fuentes de nitrógeno reducido, promoviendo así su crecimiento.

1. Selección de las condiciones óptimas de cultivo de plantas

Para evaluar en ensayos *in vitro* si un microorganismo protege a la planta de la acción de un patógeno mediante el mecanismo de ISR, es fundamental la separación física y temporal de ambos organismos (van Loon y col., 1998). La separación física brinda certeza acerca de que el efecto observado no es el resultado de un antagonismo directo entre la bacteria biocontroladora y el microorganismo fitopatógeno. La separación temporal permite que la bacteria biocontroladora sensibilice el sistema defensivo de la planta, previo al ataque del patógeno.

Para analizar el efecto de la inoculación simultánea de *Bacillus* sp. CHEP5, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y el fitopatógeno *S. rolfsii* sobre las actividades promotoras del crecimiento vegetal de dichas PGPBs (de su sigla en inglés, “*Plant-Growth Promoting Bacteria*”) y la patogénesis del hongo, se diseñó un sistema de cultivo de plantas compuesto por dos macetas, ubicadas una encima de la otra y comunicadas por un orificio realizado en la base de la maceta superior. En esta última maceta se colocó una semilla de maní pregerminada, de manera tal que su radícula se introduzca en la maceta inferior a través del orificio comunicante. Dicha radícula fue inoculada con las cepas bacterianas, y una semana después, la plántula fue desafiada con el fitopatógeno en la zona de la corona (maceta superior). Para corroborar la separación física de las cepas bacterianas y el fitopatógeno se aislaron bacterias desde la superficie y el interior de la raíz contenida en la maceta superior. Las colonias de los aislamientos bacterianos obtenidos no presentaron características morfológicas típicas de *Bacillus* sp. CHEP5 o *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Además, mediante un reconocimiento visual se confirmó la ausencia de micelio del fitopatógeno en la maceta inferior. Estos resultados permitieron concluir que el sistema de cultivo de plantas evaluado es adecuado para garantizar la separación física de las cepas bacterianas y el patógeno fúngico.

En cuanto a la enfermedad ocasionada por *S. rolfsii*, se determinó la concentración infectiva adecuada del fitopatógeno, además del momento de inoculación y la condición óptima de cultivo de las plantas inoculadas. Éstas presentaron síntomas de la enfermedad (entre los 6 y 10 días post-inoculación fúngica) sólo cuando se las inoculó a los 9 días de edad con 1, 2 ó 3 semillas de trigo infectadas con *S. rolfsii* (0,02 g de micelio/semilla de trigo) y se mantuvieron cubiertas con una bolsa de nylon durante las primeras 72 horas

post-inoculación del patógeno. Teniendo en cuenta estos resultados, dichas condiciones fueron seleccionadas, y se eligió la menor concentración infectiva (una semilla de trigo infectada) para realizar los experimentos.

2. Efecto de la co-inoculación de maní con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre la patogenicidad de *S. rolf sii* en ensayos *in vitro*

Con el fin de evaluar si la inoculación simultánea de plantas de maní con los microorganismos benéficos *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 afecta la patogénesis de *S. rolf sii*, se determinó la incidencia de la enfermedad causada por el fitopatógeno, la biomasa vegetal y el contenido de clorofila total en plantas tratadas sólo con *S. rolf sii* y/o co-inoculadas con las bacterias benéficas.

En plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, y desafiadas con *S. rolf sii* se observó una reducción estadísticamente significativa (49,9%) en la incidencia de la enfermedad respecto a las plantas tratadas sólo con el fitopatógeno (Figura 11).

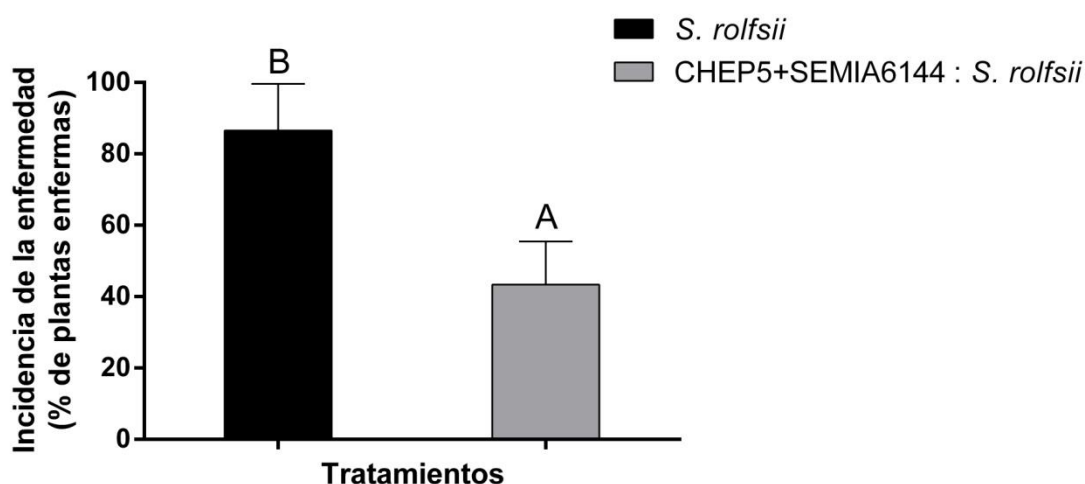


Figura 11. Incidencia de la enfermedad (% de plantas enfermas) causada por *S. rolf sii* en plantas de maní. Los datos representan la media \pm E.E de cuatro ensayos (n=5-10 cada uno). Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Test-t de Student ($p < 0,05$).

Para evaluar el estado fisiológico de las plantas y la severidad de la enfermedad, se determinó su biomasa (discriminando entre el peso seco aéreo y radical) y el contenido de clorofila total al momento de la cosecha (40 días post-inoculación bacteriana).

En aquellas plantas tratadas con ambas cepas bacterianas y desafiadas con *S. rolfsii*, se observó un incremento del 185% y 128% en el peso seco aéreo y radical, respectivamente, en comparación con plantas tratadas sólo con el fitopatógeno. Cabe destacar que aún cuando estos incrementos son marcadamente superiores a los de plantas desafiadas con *S. rolfsii*, no alcanzaron los valores obtenidos en plantas controles o inoculadas con las cepas bacterianas en ausencia de *S. rolfsii* (Tabla 4). Por otra parte, en cuanto al contenido de clorofila total, se determinó un incremento del 82,4% en plantas co-inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, y desafiadas con *S. rolfsii* con respecto a aquellas tratadas sólo con el fitopatógeno, alcanzando valores tan altos como los obtenidos en plantas controles o inoculadas con ambas cepas bacterianas en ausencia de *S. rolfsii* (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros de crecimiento vegetal y contenido de clorofila total en plantas de maní

Tratamientos	Peso seco aéreo (mg planta ⁻¹)	Peso seco radical (mg planta ⁻¹)	Contenido de clorofila total (µg g ⁻¹ tejido fresco)
Control (sin nitrógeno)	222 ± 15 ^C	113 ± 9 ^{CD}	111 ± 12 ^B
Control fertilizado con KNO ₃ (5 mM)	342 ± 18 ^{DE}	139 ± 11 ^D	159 ± 12 ^C
CHEP5+SEMIA6144	387 ± 20 ^E	106 ± 7 ^C	157 ± 11 ^C
<i>S. rolfsii</i>	64 ± 13 ^A	32 ± 6 ^A	74 ± 10 ^A
CHEP5+SEMIA6144 : <i>S. rolfsii</i>	183 ± 17 ^{BC}	73 ± 8 ^B	135 ± 11 ^{BC}

Los datos representan la media ± E.E de cuatro ensayos (n=5-10 cada uno). Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de LSD Fisher (p<0,05).

A partir de los resultados de la evaluación del porcentaje de plantas enfermas, la biomasa vegetal y el contenido de clorofila total, se concluye que la inoculación simultánea de plantas de maní con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 disminuye tanto la incidencia como la severidad causada por *S. rolfsii*. Además, considerando que el sistema experimental utilizado garantiza la separación física y temporal del patógeno y las bacterias benéficas, se sugiere que la protección mediada por la inoculación conjunta de *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 involucraría la inducción sistémica de la respuesta de defensa de la planta.

Los patógenos necrótrofos, como *S. rolfsii*, utilizan diversas enzimas líticas y toxinas que, junto con la inducción exacerbada de EROs, degradan la pared celular vegetal

e inducen la muerte celular, para luego asimilar el contenido celular de manera saprófita. Una de las enzimas líticas secretadas por hongos fitopatógenos es la poligalacturonasa, que hidroliza la pectina de la pared celular vegetal dando como producto oligogalacturónidos (OGs). Estos últimos, actúan como DAMPs elicitando la respuesta de defensa de la planta, que incluye la acumulación de fitoalexinas, quitinasa, glucanasas, deposición de calosa, producción de EROs, entre otros (Nafisi y col., 2015; Abdullah y Akhtar, 2016). La severidad de una enfermedad ocasionada por patógenos necrótrofos está íntimamente relacionada con la susceptibilidad de la pared celular al ataque de enzimas líticas y con la capacidad de la planta de modular la producción de EROs (Abdullah y Akhtar, 2016). Teniendo esto en consideración, es posible proponer que la fortificación de la pared celular y/o un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes constituirían parte de la inmunidad inducida en plantas de maní co-inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. En este sentido, Singh y col. (2013) demostraron que plantas de garbanzo co-inoculadas con *Rhizobium* RL091, *Pseudomonas* PHU094 y *Trichoderma* THU0816, y desafiadas con *S. rolfisii*, mostraron una respuesta de defensa más robusta en comparación con plantas tratadas sólo con el fitopatógeno. Dicha respuesta incluyó la acumulación de compuestos fenólicos, la lignificación de la pared celular y el incremento en la actividad de enzimas antioxidantes.

3. Efecto de la inoculación de maní con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre la inducción de resistencia sistémica mediada por *Bacillus* sp. CHEP5 contra *S. rolfisii* en ensayos *in vitro*

Para evaluar si *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 afecta la capacidad de *Bacillus* sp. CHEP5 de proteger a plantas de maní contra *S. rolfisii*, se determinó la incidencia de la enfermedad causada por el fitopatógeno, el peso seco aéreo y radical, así como también el contenido de clorofila total en plantas inoculadas con cada una de las cepas bacterianas individualmente y en las co-inoculadas.

Como era esperable, en las plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolfisii* se determinó una reducción del 52% en la incidencia de la enfermedad respecto a plantas tratadas sólo con el fitopatógeno. En aquellas plantas inoculadas con ambas cepas bacterianas o sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, la incidencia de la enfermedad no difirió con respecto a plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolfisii* (**Figura 12**).

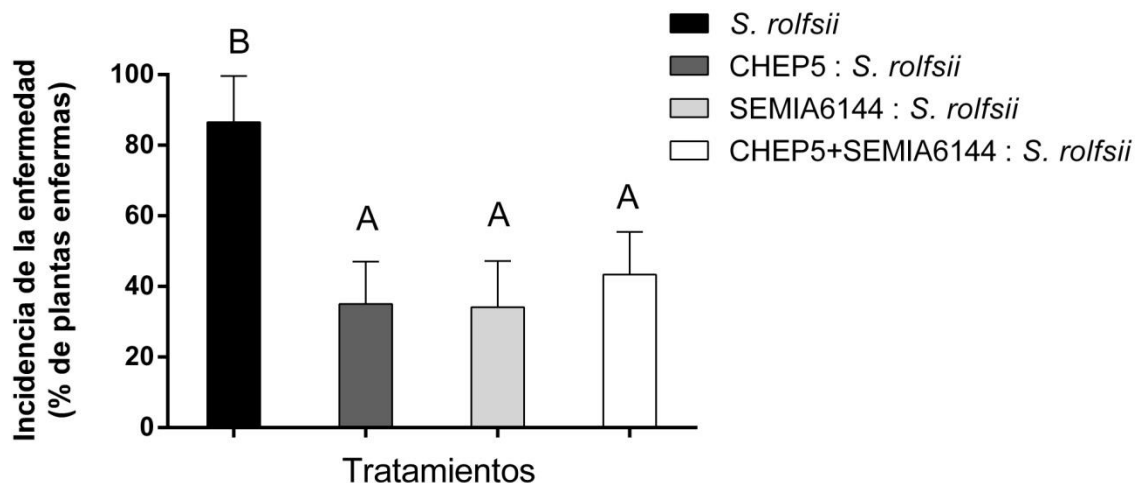


Figura 12. Incidencia de la enfermedad (% de plantas enfermas) causada por *S. rolfsii* en plantas de maní. Los datos representan la media \pm E.E de cuatro ensayos (n=5-10 cada uno). Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de LSD Fisher ($p < 0,05$).

Para evaluar el estado fisiológico y la severidad de la enfermedad de las plantas, se determinó el peso seco aéreo y radical, y el contenido de clorofila total al momento de la cosecha (40 días post-inoculación bacteriana). En plantas co-inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, y desafiadas con *S. rolfsii*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros evaluados con respecto a plantas inoculadas sólo con la cepa biocontroladora y desafiadas con *S. rolfsii* (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de crecimiento vegetal y contenido de clorofila total en plantas de maní

Tratamientos	Peso seco aéreo (mg planta ⁻¹)	Peso seco radical (mg planta ⁻¹)	Contenido de clorofila total (µg g ⁻¹ tejido fresco)
Control (sin nitrógeno)	222 ± 15 ^C	113 ± 9 ^{CD}	111 ± 12 ^B
Control fertilizado con KNO₃ (5 mM)	342 ± 18 ^{EF}	139 ± 11 ^D	159 ± 12 ^D
CHEP5	268 ± 17 ^D	119 ± 10 ^{CD}	160 ± 11 ^D
SEMIA6144	305 ± 17 ^{DE}	105 ± 9 ^C	147 ± 11 ^{CD}
CHEP5+SEMIA6144	387 ± 20 ^F	106 ± 7 ^C	157 ± 11 ^D
<i>S. rolfsii</i>	64 ± 13 ^A	32 ± 6 ^A	74 ± 10 ^A
CHEP5: <i>S. rolfsii</i>	144 ± 16 ^B	64 ± 6 ^B	109 ± 11 ^B
SEMIA6144 : <i>S. rolfsii</i>	195 ± 20 ^C	52 ± 8 ^B	122 ± 12 ^{BC}
CHEP5+SEMIA6144 : <i>S. rolfsii</i>	183 ± 17 ^{BC}	73 ± 8 ^B	135 ± 11 ^{BCD}

Los datos representan la media ± E.E de cuatro ensayos (n=5-10 cada uno). Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de LSD Fisher (p<0,05).

Las PGPBs poseen diferentes estrategias de colonización, comunicación y/o vías de señalización que permiten el establecimiento de la interacción planta-microorganismo. La co-inoculación de distintas PGPBs podría causar cambios en la interacción de la planta con cada una de las bacterias, afectando por lo tanto, su capacidad de promover el crecimiento vegetal (Felici y col., 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis indican que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 no afecta significativamente la capacidad de *Bacillus* sp. CHEP5 de proteger a plantas de maní contra *S. rolfsii*. Ello sugiere que tanto la colonización como la vía de señalización de la resistencia sistémica inducida por *Bacillus* sp. CHEP5 en maní, no serían afectadas por la interacción de esta leguminosa con su microsimbionte. Más aún, las plantas co-inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, y desafiadas con *S. rolfsii* muestran un mejor estado fisiológico que las tratadas sólo con la cepa biocontroladora en presencia del patógeno (el contenido de clorofila total incrementó en un 23%, el peso seco aéreo en un 27% y el peso seco radical en un 14%). Ello podría atribuirse a que, como consecuencia del aporte de nitrógeno fijado simbióticamente por *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, estas plantas se encuentran en un mejor estado nutricional para responder frente a un estrés. En relación con estos resultados, se ha informado que, tanto en plantas de poroto (Dutta y col., 2008) como de lentejas (Akhtar y col., 2010), la protección contra fitopatógenos fúngicos cuando son inoculadas no sólo con bacterias inductoras de resistencia sistémica de los géneros

Bacillus y *Pseudomonas*, sino también con su microsimbionte es más eficiente que cuando se inocula sólo con una de las cepas bacterianas. En contraposición con estos reportes, Felici y col. (2008) informaron que la co-inoculación de plantas de tomate con la bacteria biocontroladora *Bacillus subtilis* 101 y la bacteria fijadora de nitrógeno *Azospirillum brasilense* Sp245, afectó negativamente el crecimiento vegetal en comparación con plantas inoculadas con cada una de las cepas bacterianas individualmente.

Por otra parte, se observó que, aún en ausencia de *Bacillus* sp. CHEP5, la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 disminuyó (en un 52%) el porcentaje de incidencia de la enfermedad (**Figura 12**), así como su severidad ya que los valores de peso seco aéreo y radical, y el contenido de clorofila total se vieron incrementados significativamente con respecto a plantas tratadas sólo con *S. rolfsii* (**Tablas 5**). Estos resultados sugieren que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 también protege a las plantas de maní contra *S. rolfsii* mediante un mecanismo que, de acuerdo al sistema experimental empleado en esta tesis, involucraría la respuesta de defensa sistémica de las plantas dado que ambos microorganismos se encuentran separados en el tiempo y en el espacio.

Ha sido ampliamente estudiado que, en un primer contacto, los rizobios inducen en la planta hospedadora una respuesta defensiva, aunque más débil y transitoria que la desencadenada frente al ataque de fitopatógenos (El Yahyaoui y col., 2004; Saeki, 2011). Muñoz y col. (2015) informaron que durante las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 (10 minutos post-inoculación) se produce un estallido oxidativo evidenciado por un incremento de los niveles de H₂O₂. El aumento de dichas moléculas constituye una respuesta común de las plantas frente a microorganismos benéficos y patógenos. En esta última, las EROs poseen una doble función en los mecanismos de defensa vegetal ya que pueden actuar directamente como antimicrobianos o indirectamente regulando la señalización de la respuesta inmune de la planta (Quan y col., 2008). Por otro lado, y para algunas interacciones entre leguminosas y rizobios, se demostró que la planta hospedadora activa un mecanismo sistémico de autoregulación de la nodulación (AON, de su sigla en inglés “*autoregulation of nodulation*”) que contribuye a mantener un equilibrio entre la formación de nódulos, con la subsecuente obtención de nitrógeno, y los requerimientos energéticos para el desarrollo de la propia planta. Se ha propuesto que el sistema AON limita el número de nódulos formados, reduciendo la velocidad de división de las células corticales en etapas tempranas de la interacción simbiótica, mediante la inducción en la parte aérea de la síntesis de citocininas (Sasaki y col., 2014) y ácido jasmónico (Nakagawa y Kawaguchi, 2006). Esta última fitohormona

también está involucrada en la respuesta inmune innata de la planta frente al ataque de fitopatógenos, y en la ISR elicitada por PGPBs. Es por lo tanto posible suponer que podría existir una interconexión entre las vías de señalización implicadas en la ISR y AON (Nakagawa y Kawaguchi, 2006). En este contexto, se propone que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sensibiliza el sistema defensivo de maní y, frente al ataque del fitopatógeno, las plantas responden más rápida y/o eficientemente que las no inoculadas con el rizobio. Existen antecedentes que refuerzan esta hipótesis. Azpilicueta y col. (2004) informaron que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 induce en maní la síntesis sistémica de fitoalexinas con propiedades inhibitorias del crecimiento de los fitopatógenos *Aspergillus niger* y *Cladosporium cucumerinum*. Más aún, los autores sugieren que la interacción simbiótica *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144-maní desencadena cambios bioquímicos que refuerzan la respuesta defensiva de maní contra patógenos fúngicos. Por su parte, Elbadry y col. (2006) describieron la capacidad de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* FBG05 de proteger a plantas de poroto contra el virus del mosaico amarillo mediante la inducción de resistencia sistémica.

Si bien los resultados presentados más arriba demuestran que tanto *Bacillus* sp. CHEP5 como *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 protegen a las plantas de maní contra *S. rolf sii*, la co-inoculación de dichas bacterias no produce un efecto sinérgico, posiblemente como consecuencia de que se alcanzó el máximo nivel de protección mediada por ISR.

3.1 Evaluación de la presencia de bacterias antagonistas de *S. rolf sii* en la microbiota rizosférica de plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5

Aún cuando los ensayos “*in vitro*”, cuyos resultados se presentaron anteriormente, fueron realizados a partir de semillas desinfectadas superficialmente que originaron plantas creciendo en un soporte estéril, es factible que éstas se encuentren colonizadas por otros microorganismos, además de los que fueron inoculados, que podrían provenir del endosperma o del medio ambiente. Con el propósito de confirmar que la protección sistémica contra *S. rolf sii* está mediada por *Bacillus* sp. CHEP5, y no es el resultado de la acción de bacterias antagonistas del fitopatógeno que pudieran colonizar la raíz de plantas inoculadas con dicho agente biocontrolador, se analizó la composición bacteriana de la microbiota radical de plantas desafiadas con el fitopatógeno en presencia o ausencia de *Bacillus* sp. CHEP5. Para ello, de las raíces de estas plantas se aislaron bacterias endófitas y epífitas a los 8 días post-inoculación fúngica, tiempo al cual se observaron los primeros síntomas de marchitamiento en plantas controles (inoculadas sólo con *S. rolf sii*). Las

plantas tratadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolf sii* que se seleccionaron no presentaban síntomas de marchitamiento al momento del muestreo. Los aislamientos obtenidos fueron evaluados en sus características morfológicas y tintoriales de acuerdo a la clasificación de Gram, se analizó su diversidad genotípica mediante BOX-PCR y se determinó la capacidad de afectar el crecimiento de *S. rolf sii* mediante un ensayo de antibiosis en medio sólido.

En ambos tratamientos se obtuvieron dos tipos diferentes de colonias a partir de los aislamientos epífitos. En plantas tratadas sólo con *S. rolf sii*, dichas colonias correspondieron a los aislamientos que se denominaron APEP1 y APEP2, mientras que en plantas tratadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolf sii* los aislamientos se denominaron ACEP1 y ACEP2 (**Tabla 6**). El análisis de su diversidad genotípica mediante BOX-PCR permitió concluir que los aislamientos APEP1 y ACEP2 son idénticos, mientras que APEP2 y ACEP1 corresponderían a aislamientos diferentes aunque relacionados genéticamente (**Figura 13**). En resumen, si se comparan los resultados obtenidos en cada tratamiento, en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y desafiadas con *S. rolf sii* se evidencia la presencia de un genotipo bacteriano exclusivo de este tratamiento (ACEP1), y la ausencia de otro (APEP2) en relación a plantas tratadas sólo con el fitopatógeno. Con el fin de determinar si ACEP1 es capaz de controlar el crecimiento de *S. rolf sii*, se realizó un ensayo de antibiosis en medio sólido. Los resultados demuestran que ACEP1 no inhibe el crecimiento de este fitopatógeno (**Tabla 7**).

En cuanto a las bacterias endófitas aisladas, su número fue superior al de las epífitas (**Tabla 6**). En plantas tratadas sólo con *S. rolf sii* se obtuvieron 4 tipos de colonias morfológicamente diferentes que correspondieron a los aislamientos denominados APED1, APED2, APED3 y APED4, mientras que en las tratadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolf sii* se obtuvieron 3 aislamientos que se denominaron ACED1, ACED2 y ACED3. Mediante BOX-PCR fue posible obtener el perfil genético de sólo 4 de los 7 aislamientos endófitos. No obstante, los resultados obtenidos de ensayos de antibiosis en medio sólido con los aislamientos provenientes de plantas tratadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolf sii* demuestran que el porcentaje de inhibición del crecimiento de este fitopatógeno para uno de los aislamientos (ACED1) fue sólo del 5% y que en los demás (ACED2 y ACED3) no se observó inhibición del crecimiento. Por lo tanto, es posible sugerir que ACED1, ACED2 y ACED3 no representan potenciales antagonistas del crecimiento de *S. rolf sii* (**Tabla 7**). Se concluye, por lo tanto, que la microbiota cultivable epífita o endófitas de raíces de plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 no contiene bacterias capaces de inhibir significativamente *in vitro* el crecimiento de *S. rolf sii*.

Tabla 6. Características morfológicas y tintoriales de aislamientos bacterianos epífitos y endófitos

Tratamiento	Tipo de aislamiento	Aislamientos	Gram	Morfología
<i>S. rolfsii</i>	Epífitas	APEP1	-	Coco-Bacilo
		APEP2	+	Bacilo
	Endófitas	APED1	+	Bacilo
		APED2	+	Bacilo
		APED3	+	Bacilo
		APED4	+	Bacilo
<i>Bacillus sp.</i> CHEP5 : <i>S. rolfsii</i>	Epífitas	ACEP1	+	Bacilo
		ACEP2	-	Coco-bacilo
	Endófitas	ACED1	+	Bacilo
		ACED2	+	Coco-bacilo
		ACED3	+	Bacilo

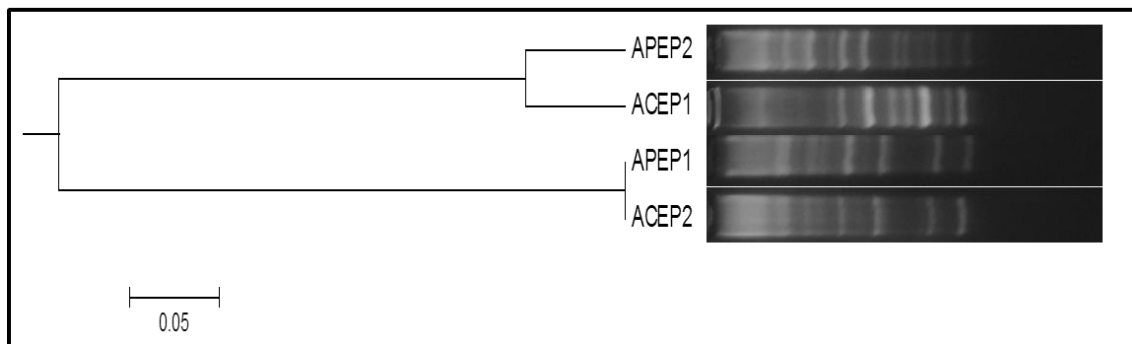


Figura 13. Dendrograma UPGMA (Dice similarity coefficient) derivado del análisis de los genomas de los aislamientos epífitos de raíces de plantas de maní obtenidos mediante BOX-PCR.

Tabla 7. Inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* en medio sólido

Aislamientos	% de inhibición del crecimiento de <i>S. rolfsii</i>
ACEP1	0
ACED1	5 ± 0
ACED2	0
ACED3	0

Los datos representan la media ± E.E de un ensayo n=3

3.2 Los FN producidos por *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 como moléculas elicitoras de la respuesta defensiva de maní contra *S. rolfsii*

Para evaluar si los FN participan en la protección inducida por *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 contra el fitopatógeno, se utilizó la mutante isogénica *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 V2, deficiente en la producción de dichas moléculas. Se determinó la incidencia de la enfermedad y el peso seco aéreo y radical de las plantas.

La incidencia de la enfermedad fue un 36,9% mayor en plantas inoculadas con la cepa mutante que en las tratadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, alcanzando valores que no difieren significativamente de aquellos obtenidos en plantas inoculadas sólo con el fitopatógeno (**Figura 14**).

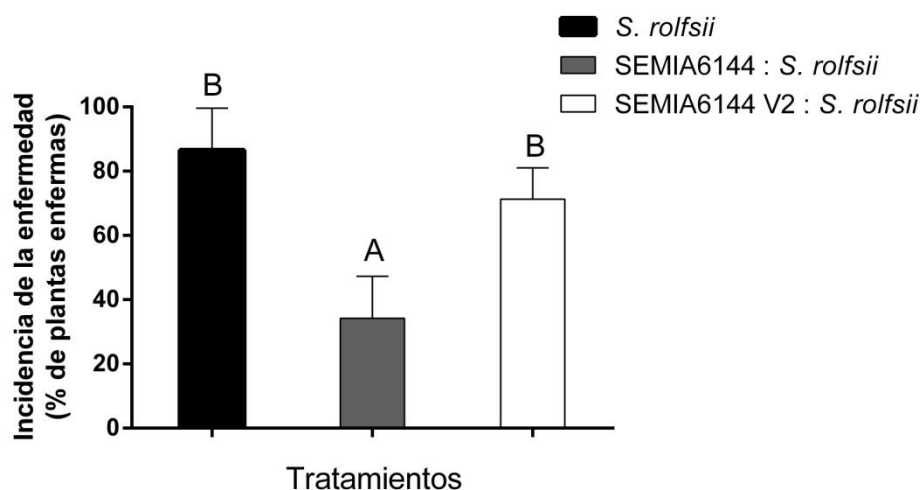


Figura 14. Incidencia de la enfermedad (% de plantas enfermas) causada por *S. rolfsii* en plantas de maní. Los datos representan la media \pm E.E de cuatro ensayos (n=5-10 cada uno). Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de LSD Fisher ($p < 0,05$).

Además, en presencia de *S. rolfsii* se observó una disminución del peso seco aéreo en las plantas inoculadas con la cepa mutante *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 V2 en relación a las plantas tratadas con la cepa salvaje. Sin embargo, estos valores no alcanzaron los obtenidos en las plantas tratadas sólo con *S. rolfsii*. En ausencia del fitopatógeno, como era de esperar, no se evidenciaron cambios significativos entre el peso seco aéreo y radical de las plantas inoculadas con la cepa salvaje o con la mutante ya que estas últimas fueron provistas de nitrógeno, lo que además permite desestimar que el incremento del efecto deletéreo producido por el fitopatógeno en estas plantas pueda ser consecuencia de un estado nutricional deprimido (**Tabla 8**).

Tabla 8. Peso seco aéreo y radical de plantas de maní

Tratamiento	Peso seco aéreo (mg planta ⁻¹)	Peso seco radical (mg planta ⁻¹)
Control (sin nitrógeno)	222 ± 15 ^C	113 ± 9 ^{CD}
Control fertilizado con KNO ₃ (5 mM)	342 ± 18 ^E	139 ± 11 ^D
SEMIA6144	305 ± 17 ^{DE}	105 ± 9 ^C
SEMIA6144 V2	293 ± 12 ^D	108 ± 5 ^C
<i>S. rolfsii</i>	64 ± 13 ^A	32 ± 6 ^A
SEMIA6144 : <i>S. rolfsii</i>	195 ± 20 ^C	52 ± 8 ^B
SEMIA6144 V2 : <i>S. rolfsii</i>	122 ± 11 ^B	51 ± 4 ^B

Los datos representan la media ± E.E de cuatro ensayos (n=5-10 cada uno). Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de LSD Fisher (p<0,05).

En conjunto, los resultados sugirieron que los FN de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 contribuyen a la protección de plantas de maní contra *S. rolfsii* mediada por dicho microsimbionte. Los FN y también la quitina de los hongos, presentan un esqueleto de β-(1-4)-N-acetil-D-glucosamina. En los FN este esqueleto posee además una cadena acil en el extremo no reductor y varias sustituciones, las que contribuirían a evadir o modular la inducción de la respuesta defensiva del huésped, característica del reconocimiento de moléculas de quitina, durante la infección (Gourion y col., 2015). No obstante, en una etapa temprana de la interacción, los FN inducen en las leguminosas una débil y/o transitoria respuesta inmune innata (Lopez-Gomez y col., 2011; Saeki, 2011; Muñoz y col., 2015). Teniendo esto en consideración, se propone que los FN de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 actúan como moléculas elicitoras de la respuesta defensiva sistémica en plantas de maní eficiente para contrarrestar el ataque de *S. rolfsii*. En concordancia con estos resultados, Rey y col. (2013) informaron que plantas de *M. truncatula* mutadas en el gen que codifica para el receptor de los FN (*nfp*) son más susceptibles a las enfermedades causadas por *Aphanomyces euteiches* y *Colletotrichum trifolii* que plantas salvajes, mientras que las que sobreexpresan dicho gen son más resistentes a dichas enfermedades. Sin embargo, no es posible descartar que moléculas de la superficie celular de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, además de los FN secretados, podrían estar asociadas a la ISR elicitada por esta bacteria. En este sentido, Reitz y col. (2000) indicaron que los lipopolisacáridos de *Rhizobium etli* también actúan como elicitores de la ISR en plantas de papa contra el nematodo *Globodera pallida*.

4. Efecto de la inoculación de maní con *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolf sii* sobre el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 en ensayos *in vitro*

Para evaluar si *Bacillus* sp. CHEP5 y *S. rolf sii* afectan el comportamiento simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 se determinó, a los 40 días post-inoculación bacteriana, el número y peso seco de los nódulos formados en plantas de maní, así como el porcentaje de nódulos efectivos y de plantas noduladas. No se observó la presencia de nódulos en plantas enfermas. Por lo tanto, los datos recogidos corresponden sólo a plantas sin síntomas de enfermedad.

En las plantas inoculadas con ambas cepas bacterianas (en ausencia de *S. rolf sii*) el número de nódulos, el porcentaje de nódulos efectivos y el porcentaje de plantas noduladas no se vieron afectados con respecto a las plantas controles inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Más aún, el peso seco de los nódulos formados en las plantas co-inoculadas fue significativamente mayor que el de las plantas controles (**Tabla 9**), sugiriendo que la presencia de *Bacillus* sp. CHEP5 incrementa el volumen de tejido nodular involucrado en la fijación biológica del nitrógeno. Ello se vio reflejado en un mayor peso seco aéreo de estas plantas (**Tabla 5**). Por otro lado, como era esperable, las plantas desafiadas con el fitopatógeno (aún cuando las analizadas no presentaron síntomas de la enfermedad), mostraron una drástica reducción en todos los parámetros simbióticos evaluados (**Tabla 9**), indicando que *S. rolf sii* afecta negativamente el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Sin embargo, en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5, el efecto adverso sobre el número y peso seco de los nódulos fue revertido, alcanzando valores que no difirieron significativamente de los obtenidos en plantas inoculadas sólo con el microsimbionte (**Tabla 9**).

Tabla 9. Parámetros simbióticos de plantas de maní

Tratamientos	Número de nódulos planta ⁻¹	Peso seco de nódulos (mg planta ⁻¹)	% nódulos rojos	% plantas noduladas
SEMIA6144	21 ± 2 ^{BC}	6,5 ± 0,5 ^B	100 ± 0 ^C	100 ± 0 ^C
SEMIA6144+CHEP5	25 ± 2 ^C	9,5 ± 0,5 ^C	100 ± 0 ^C	100 ± 0 ^C
SEMIA6144:<i>S. rolf sii</i>	5 ± 4 ^A	2,8 ± 1,2 ^A	13 ± 5 ^A	23 ± 3 ^A
SEMIA6144+CHEP5:<i>S. rolf sii</i>	17 ± 3 ^B	7,7 ± 0,8 ^{BC}	75 ± 5 ^B	42 ± 2 ^B

Los datos representan la media ± E.E de cuatro ensayos con n=5-10 cada uno. Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de LSD Fisher (p<0,05).

Con el propósito de evaluar si el incremento en el peso seco de los nódulos formados en plantas co-inoculadas con *Bacillus* CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, en presencia o ausencia de *S. rolf sii*, está relacionado con un aumento en el tamaño de su zona de infección, se analizaron cortes histológicos de nódulos de plantas tratadas con las diferentes combinaciones de microorganismos. En ausencia del fitopatógeno, el tamaño de los nódulos de plantas co-inoculadas y el de su zona de infección fueron mayores que los de las inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Por otro lado, como era esperable, se observó una reducción de los valores de estos parámetros en plantas desafiadas con *S. rolf sii* respecto a plantas controles. En presencia del fitopatógeno, el tamaño de los nódulos de plantas co-inoculadas y el de su zona de infección se incrementaron significativamente, alcanzando valores tan altos como los de nódulos de plantas controles. En cuanto a la relación entre el diámetro de la zona de infección y el diámetro total de los nódulos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, sugiriendo que el diámetro total de los nódulos incrementó en correspondencia con el de su zona de infección (**Tabla 10 y Figura 15**).

Tabla 10. Tamaño de nódulos de plantas de maní

Tratamiento	Diámetro del nódulo (DN) (μm)	Diámetro de la zona de infección (DZI) (μm)	DN/DZI
SEMIA6144	1131,03 \pm 58,03 ^B	823,32 \pm 49,45 ^B	0,82 \pm 0,03 ^A
SEMIA6144+CHEP5	1313,86 \pm 55,23 ^C	1075,22 \pm 42,34 ^C	0,78 \pm 0,03 ^A
SEMIA6144: <i>S. rolfsii</i>	866,59 \pm 64,88 ^A	648,72 \pm 47,20 ^A	0,80 \pm 0,04 ^A
SEMIA6144+CHEP5: <i>S. rolfsii</i>	1076,03 \pm 58,13 ^B	815,00 \pm 50,03 ^B	0,78 \pm 0,02 ^A

Los datos representan la media \pm E.E de dos ensayos con n=10 cada uno. Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de LSD Fisher ($p < 0,05$).

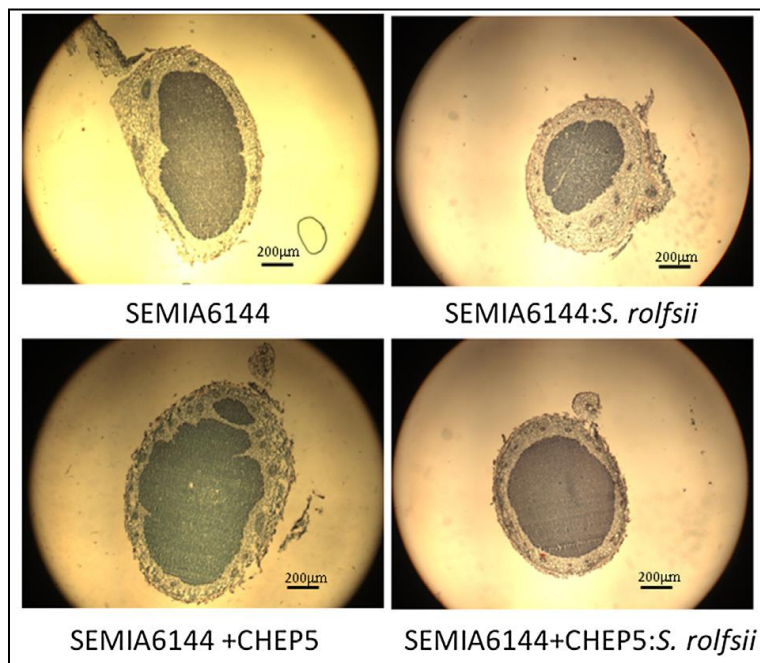


Figura 15. Análisis microscópico de cortes de nódulos de plantas de maní. El experimento fue repetido dos veces con un n=10 cada uno.

Bajo el supuesto que un cambio en el volumen del tejido fijador de los nódulos afecta el aporte de la FBN a la nutrición nitrogenada de la planta, se determinó el contenido de nitrógeno en la parte aérea de plantas tratadas con los microorganismos. Se observó que, en ausencia del fitopatógeno, el contenido de nitrógeno en las plantas co-inoculadas fue mayor que el de las controles inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. En presencia del fitopatógeno, en cambio, el contenido de nitrógeno de plantas inoculadas con el microsimbionte fue significativamente menor que en ausencia del

patógeno. Este efecto negativo de *S. rolfsii* fue revertido en plantas co-inoculadas, ya que el contenido de nitrógeno no difirió del de las inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 (**Figura 16**). Estos resultados son consistentes con la información obtenida de las determinaciones del peso seco y tamaño de los nódulos provenientes de los diferentes tratamientos (**Tabla 9 y 10**).

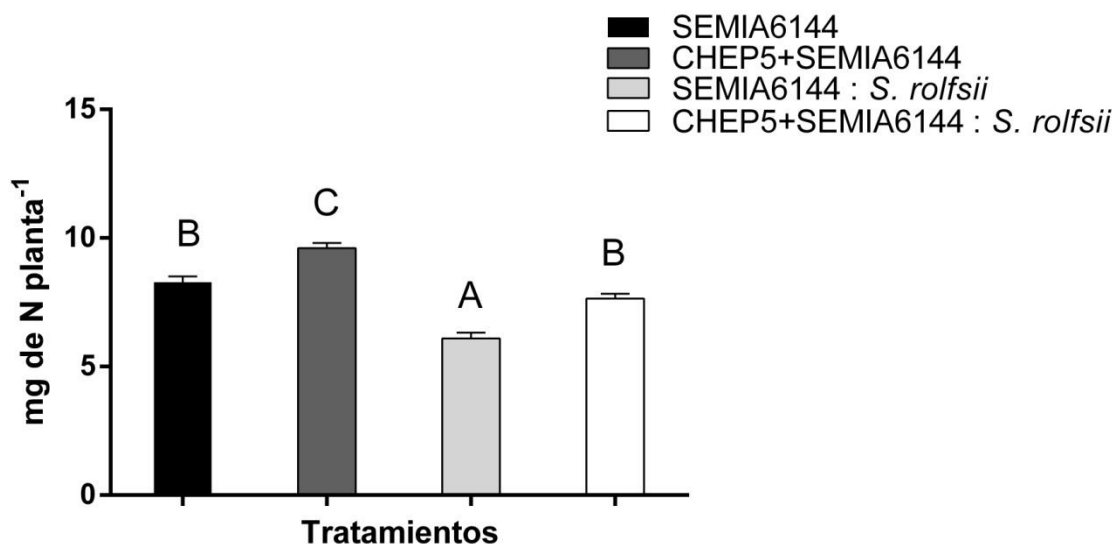


Figura 16. Contenido de nitrógeno en plantas de maní. Los datos representan la media \pm E.E de dos ensayos con $n=5$ cada uno. Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de LSD Fisher ($p<0,05$).

La información obtenida indica claramente que *S. rolfsii* afecta negativamente el establecimiento de la interacción simbiótica *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144-maní. En este sentido, Lopez-Gomez y col. (2011) reportaron que en plantas de *L. japonicus* inoculadas con su microsimbionte, *Mesorhizobium loti*, y tratadas con flg22 (molécula PAMP ampliamente conocida), la vía de señalización de defensa prevalece sobre la simbiótica, disminuyendo tanto la expresión de genes simbióticos como el número de nódulos. Por su parte, Chen y col. (2017) informaron que en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti*, la presencia de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* DC3000 reduce la expresión de genes marcadores de la simbiosis, y disminuye el número de hilos de infección y de nódulos formados, sugiriendo que la respuesta inmune de la planta frente a un microorganismo patógeno afectaría la vía de señalización simbiótica.

Por otro lado, el análisis de los resultados obtenidos en plantas co-inoculadas indica que *Bacillus* sp. CHEP5 mejora el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, y revierte parcialmente el efecto deletéreo de *S. rolfsii* sobre la interacción simbiótica. En relación con estos resultados, Badawi y col. (2011) también reportaron un efecto positivo de las cepas biocontroladoras *Serratia marcescens* y/o *Trichoderma harzianum*, sobre la interacción *Bradyrhizobium* sp.-maní, aumentando el número y biomasa de nódulos, y la actividad nitrogenasa, lo que se reflejó en un incremento en la biomasa vegetal. Resultados similares también han sido informados en plantas de garbanzo (Goel y col., 2002), de poroto (Tilak y col., 2006), de arveja (Mishra y col., 2009) y de lenteja (Sepúlveda-Caamaño y col., 2018), entre otras.

4.1 Estudio de posibles factores involucrados en el efecto benéfico de *Bacillus* sp. CHEP5 sobre el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144

En las últimas décadas se ha profundizado en el estudio de los mecanismos por los que cepas no rizobianas mejoran el comportamiento simbiótico de los rizobios. Entre ellos se encuentra la estimulación de la colonización rizobiana de la raíz y del nódulo, la inducción de la producción de moléculas señal vinculadas a la interacción rizobio-leguminosa, cambios en la arquitectura radical que conducen a la formación de potenciales sitios de infección, etc. (Saharan y Nehra, 2011; Zhang y col., 2016).

Por muchas décadas se consideró a los rizobios como las únicas bacterias que habitan en el interior de los nódulos de leguminosas. No obstante, bacterias no rizobianas son a menudo aisladas desde el interior de nódulos, revelando la existencia de un microbioma nodular que podría cumplir un rol en la FBN y afectar el estado fisiológico de la planta hospedadora. Muchas de estas bacterias, al igual que los rizobios, son fijadoras de nitrógeno en vida libre. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce con certeza si su presencia en los nódulos es relevante desde el punto de vista biológico (Martinez-Hidalgo y Hirsch, 2017). Con el propósito de evaluar si el efecto benéfico de *Bacillus* sp. CHEP5 sobre el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 está mediado por su condición de endófito de nódulos, se aislaron bacterias del interior de nódulos desinfectados superficialmente formados en plantas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 o co-inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5. Uno de los aislamientos obtenidos, presente en al menos el 50% de los nódulos de plantas co-inoculadas y ausente en las inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, desarrolló colonias con características morfológicas similares a las de *Bacillus* sp. CHEP5. Mediante BOX-PCR se

analizó el perfil genético del aislamiento y se confirmó que es idéntico al de *Bacillus* sp. CHEP5 (Figura 17), lo que indica que esta bacteria se encuentra colonizando el interior de los nódulos a los 40 días post-inoculación.

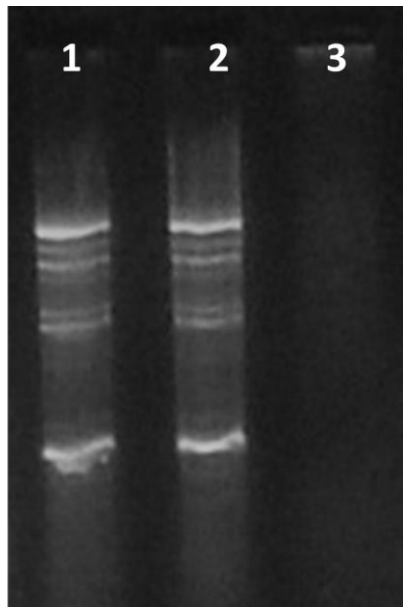


Figura 17. Perfil genético obtenido mediante BOX-PCR de aislamientos bacterianos del interior de nódulos de plantas de maní co-inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5. **1.** *Bacillus* sp. CHEP5, **2.** aislamiento bacteriano, **3.** control negativo.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de Gammaproteobacterias en el interior de nódulos de maní, y que estas bacterias mejoran el fenotipo simbiótico (Ibáñez y col., 2009), por lo que el hallazgo de *Bacillus* sp. CHEP5 como endófito de nódulos no fue inesperado. En relación con estos resultados, Subramanian y col. (2015) reportaron que cepas de *Bacillus* sp. fueron aisladas del interior de nódulos de plantas de soja, y que en presencia de dichas bacterias se incrementó la nodulación.

Teniendo en cuenta que *Bacillus* sp. CHEP5 se encontraría colonizando el interior de los nódulos de plantas de maní, y que en estas plantas el contenido de nitrógeno y el peso seco aéreo son mayores a los de las inoculadas sólo con el microsimbionte, se hipotetizó que esta cepa de *Bacillus* podría ser diazotrófica, fijar nitrógeno en el interior de los nódulos, y de este modo contribuir con la formación de biomasa vegetal. Para corroborar esta hipótesis, se evaluó la capacidad de esta bacteria de crecer en medio Nfb (medio libre de N). *Bacillus* sp. CHEP5 creció en dicho medio de cultivo, tanto en placas de Petri como en tubos, aún luego de tres repiques sucesivos. En los tubos sembrados por

picadura se observó además la formación de una biopelícula blanquecina subsuperficial de crecimiento característico de bacterias fijadoras de nitrógeno (**Figura 18**).

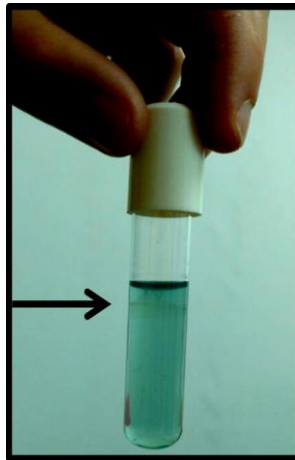


Figura 18. Crecimiento de *Bacillus* sp. CHEP5 en medio Nfb. La flecha indica la biopelícula blanquecina subsuperficial formada por el crecimiento del microorganismo.

Los resultados obtenidos sugieren que *Bacillus* sp. CHEP5 poseería la capacidad de fijar N y contribuiría mediante este proceso a incrementar el contenido de este macronutriente y la biomasa de la parte aérea de las plantas co-inoculadas. En este sentido, Muresu y col. (2008) reportaron actividad nitrogenasa en bacterias del género *Enterobacter* endófitas de nódulos, y sugieren que éstas encontrarían en el interior de estos órganos las condiciones óptimas para llevar a cabo la fijación de N.

Con el fin de conocer la abundancia en los nódulos de *Bacillus* sp. CHEP5 en relación a la del microsimbionte, se cuantificó en el interior de dichos órganos el número de UFC de ambas bacterias. Los resultados indican que la relación *Bacillus* sp. CHEP5:*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 es 1:22 (**Tabla 11**).

Tabla 11. Colonización de *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 en el interior de nódulos de plantas de maní

Cepa bacteriana	UFC nódulo ⁻¹
CHEP5	20 ± 10
SEMIA6144	443 ± 69

Los datos representan la media ± E.E de dos ensayos con n=5-15 cada uno.

A partir de este resultado se sugiere que la contribución de *Bacillus* sp. CHEP5 a la FBN en su condición de endófito sería escasa en relación a la del microsimbionte de maní que, como era esperable, se encuentra en mayor número en el interior de los nódulos. No obstante, el 15% de incremento en el contenido de N en la parte aérea determinado en plantas co-inoculadas con respecto a aquellas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 (**Figura 16**) podría atribuirse a la fijación biológica mediada por *Bacillus* sp. CHEP5 no sólo como endófito sino también en vida libre.

Por otro lado, con el propósito de corroborar la presencia de genes vinculados a la FBN en el genoma *Bacillus* sp. CHEP5 se llevó a cabo la amplificación mediante PCR del gen *nifH*. Se logró amplificar un producto del tamaño esperado (~300 pb). Lamentablemente, la comparación de la secuencia de este producto con otras de genes *nifH* de diferentes géneros bacterianos depositadas en la base de datos del NCBI, no reveló homología, por lo que sería necesario en un futuro la utilización de primers más específicos.

Por otra parte, la colonización de la superficie radical de los rizobios es un requisito previo para obtener una nodulación efectiva, independientemente de si la infección rizobiana se produce intra- o intercelularmente (Downie, 2010). Ha sido ampliamente reportado que, a pesar de la habilidad de un microorganismo para colonizar el sistema radical, su interacción con la planta podría ser afectada por la microbiota rizosférica asociada a las raíces de las mismas (Vandenkoornhuyse y col., 2015). La co-inoculación de microorganismos benéficos podría inducir cambios en los compuestos que las plantas o los microorganismos secretan cuando se llevan a cabo inoculaciones simples. Dichos cambios podrían ser beneficiosos, y promover la colonización de las PGPBs, o perjudiciales y causar un efecto negativo en la colonización de las mismas (Chebotar y col., 2001). Con el propósito de evaluar si la presencia de *Bacillus* sp. CHEP5 podría promover la colonización de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 en etapas tempranas de la interacción simbiótica, se cuantificó en raíces el número de UFC del microsimbionte a los 7 días post-inoculación en presencia o ausencia de la cepa biocontroladora. Se seleccionó este tiempo ya que es el momento en el cual se desafía con *S. rolf sii*. Se observó que el número de células de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 obtenidas de la superficie radical fue mayor en presencia de *Bacillus* sp. CHEP5 (**Figura 19**), indicando que la colonización del microsimbionte se encuentra estimulada en plantas co-inoculadas.

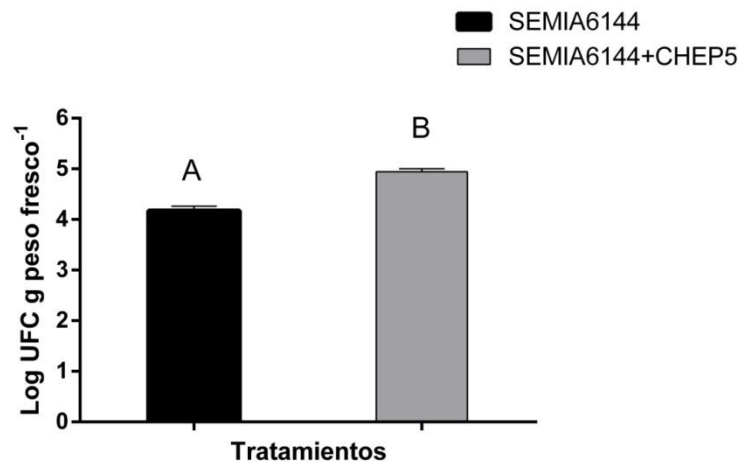


Figura 19. Colonización radical de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 en presencia o ausencia de *Bacillus* sp. CHEP5. Los datos representan la media \pm E.E de dos ensayos con $n=3$ cada uno. Las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de Test-t de Student ($p<0,05$).

De acuerdo a estos resultados, y teniendo en cuenta que la colonización radical de los microsimbiontes es un requisito fundamental para el establecimiento de la interacción simbiótica, es posible sugerir que el efecto positivo de *Bacillus* sp. CHEP5 sobre el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 podría estar relacionado con un incremento en la colonización radical del microsimbionte. Ello podría ser consecuencia de la estimulación de la secreción de moléculas vegetales quimioattractantes, del incremento en la producción de moléculas señal rizobianas, o de la inducción de la formación de biofilms, entre otras. Dichos cambios podrían redundar en una aceleración de la cinética de nodulación. De ser así, al momento de la interacción con el fitopatógeno (7 días post-inoculación con las cepas bacterianas), podría haber ocurrido un mayor número de eventos de infección y la organogénesis del nódulo podría encontrarse más avanzada en plantas co-inoculadas que en plantas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Ello podría explicar la formación de un número mayor de nódulos observada en dichas plantas (**Tabla 9**). En este sentido, Zhang y col. (2016) informaron que la co-inoculación de plantas de maní con *Bradyrhizobium* sp. y el hongo promotor del crecimiento vegetal *Phomopsis liquidambari*, incrementa la colonización del microsimbionte, y ello acelera la cinética de nodulación y el desarrollo de estos órganos, redundando en un mayor número y peso seco nodular. Los autores atribuyen este efecto a un incremento en la secreción de moléculas vegetales quimioattractantes, como flavonoides, azúcares, aminoácidos y ácidos

orgánicos, en plantas co-inoculadas en comparación con plantas inoculadas sólo con el microsimbionte. Por su parte, Chebotar y col. (2001) reportaron que la co-inoculación de plantas de soja con *Bradyrhizobium japonicum* y un aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* aumenta la colonización radical del microsimbionte, lo que conduce a un incremento en el número y peso seco de los nódulos, y en la actividad nitrogenasa. En este caso, los autores proponen que ello sería consecuencia de productos secretados por la cepa *P. fluorescens* que promueven el crecimiento de *B. japonicum*, ya que el sobrenadante de esta bacteria promueve *in vitro* el crecimiento del microsimbionte.

5. Efecto de la co-inoculación de plantas de maní con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre la simbiosis, la protección frente a patógenos y el rendimiento del cultivo en condiciones de campo

Las bacterias benéficas con potencial para incrementar el rendimiento de los cultivos han sido estudiadas desde el siglo XIX. Sin embargo, a pesar del conocimiento generado durante estos siglos, en muchos casos no se obtiene la efectividad deseada cuando las PGPBs son aplicadas a campo. La capacidad de estas bacterias de promover el crecimiento vegetal depende de muchos factores, como el tipo de suelo, las condiciones climáticas, las tecnologías de inoculación, entre otras. Con el fin de incrementar la eficacia de los inoculantes en base a PGPB en condiciones de campo, se han propuesto algunas estrategias como la inoculación de microorganismos nativos adaptados a los suelos y climas en donde serán utilizados, la producción de inoculantes mixtos con microorganismos que posean diferentes actividades promotoras del crecimiento vegetal, la elección de un soporte para la formulación del inoculante y un método de inoculación apropiado que les permita a las PGPBs sobrevivir y reproducirse en condiciones adversas, entre otros (Baez-Rogelio y col., 2017).

Con el objetivo de evaluar en condiciones de campo el efecto de la inoculación simultánea de *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre la nodulación, la protección frente a patógenos y el rendimiento, se llevaron a cabo ensayos en dos campos (Avex y La Herli), ubicados en la zona agrícola de la ciudad de Río Cuarto.

5.1 Efecto de la co-inoculación de plantas de maní con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre el fenotipo simbiótico y el crecimiento vegetal

El comportamiento simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 en condiciones de campo, fue analizado determinando el número y peso seco de nódulos como parámetros simbióticos, y la producción de biomasa aérea y radical de las plantas en el estado fenológico R2 (inicio de clavado).

En el campo “La Herli” si bien no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos en plantas provenientes de parcelas co-inoculadas en comparación con las de parcelas sin inocular, el peso seco de los nódulos totales fue significativamente superior (**Tabla 12**). Con respecto a la producción de biomasa, se encontró un incremento en el peso seco radical de plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 (sólo o en combinación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144) respecto a plantas sin inocular, mientras que valores de peso seco aéreo significativamente superiores se obtuvieron sólo en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 (**Tabla 12**).

En el campo “Avex” se observó un incremento significativo no sólo del peso seco de nódulos sino también de su número en todos los tratamientos inoculados con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 en comparación con el control sin inocular, indicando que esta cepa es más infectiva que los microsimbiontes nativos. En plantas inoculadas sólo con *Bacillus* sp. CHEP5 los valores de dichos parámetros fueron menores a los obtenidos en las co-inoculadas o inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, aunque significativamente mayores a los de plantas controles. Ello no sólo confirma que los microsimbiontes nativos serían menos infectivos que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, sino que además pone en evidencia un efecto positivo de *Bacillus* sp. CHEP5 sobre el fenotipo simbiótico de rizobios nativos. En cuanto a la producción de biomasa, se determinó un incremento del peso seco radical en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 (sólo o en combinación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144) en comparación con las controles (al igual que lo observado en el campo “La Herli”), pero el peso seco aéreo de plantas inoculadas sólo con *Bacillus* sp. CHEP5 fue significativamente inferior al de los restantes tratamientos inoculados, sin diferir significativamente del control (**Tabla 12**).

Tabla 12. Parámetros simbióticos y crecimiento vegetal de plantas de maní

Sitio	Tratamiento	Número de nódulos planta ⁻¹	Peso seco de nódulos planta ⁻¹ (mg)	Peso seco aéreo planta ⁻¹ (g)	Peso seco radical planta ⁻¹ (g)
La Herli	Control	75,3 ± 8,6 ^{AB}	53,2 ± 2,9 ^{AB}	4,6 ± 0,6 ^A	0,30 ± 0,03 ^A
	SEMIA6144	89,2 ± 9,9 ^B	68,3 ± 7,9 ^{BC}	5,8 ± 0,4 ^{AB}	0,35 ± 0,02 ^{AB}
	CHEP5	51,3 ± 8,4 ^A	36,9 ± 2,4 ^A	7,1 ± 0,6 ^B	0,40 ± 0,02 ^B
	SEMIA6144+	88,8 ± 10,3 ^B	81,7 ± 14,3 ^C	5,5 ± 0,5 ^A	0,40 ± 0,02 ^B
	CHEP5				
Avex	Control	66,4 ± 12,2 ^A	74,4 ± 10,4 ^A	9,2 ± 1,2 ^{AB}	0,49 ± 0,04 ^A
	SEMIA6144	258,6 ± 12,2 ^C	182,9 ± 11,5 ^{BC}	10,2 ± 0,6 ^B	0,54 ± 0,03 ^{AB}
	CHEP5	151,0 ± 11,6 ^B	156,8 ± 7,0 ^B	7,5 ± 0,5 ^A	0,59 ± 0,02 ^B
	SEMIA6144+	225,3 ± 13,6 ^C	191,6 ± 11,2 ^C	12,5 ± 0,7 ^{BC}	0,61 ± 0,03 ^B
	CHEP5				

Los datos representan la media ± E.E de 7 réplicas biológicas. Para cada sitio, las letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de LSD Fisher (p<0,05).

Si se comparan los resultados obtenidos en ambos campos, se advierte que la mayor respuesta a la inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 se obtuvo en “Avex”. Ello podría atribuirse a diferencias en la composición física, química y/o biológica entre ambos suelos ya que durante la campaña en la que se realizaron los ensayos no hubo eventos climatológicos que pudieran haber afectado al cultivo en ninguno de los campos ensayados.

En conjunto estos resultados demuestran que en condiciones de campo, *Bacillus* sp. CHEP5 no modifica el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y, además, incrementa la nodulación por bradirizobios nativos, aumentando el número y/o peso seco de nódulos, con el consecuente incremento en la producción de biomasa radical y/o aérea.

5.2 Efecto de la co-inoculación de plantas de maní con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre la incidencia de enfermedades fúngicas

Con el objetivo de evaluar si la inoculación con *Bacillus* sp. CHEP5 en presencia de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 le confiere protección al cultivo de maní contra el ataque de *S. rolf sii* en condiciones de campo, se propuso evaluar la incidencia del marchitamiento causado por este fitopatógeno en lotes co-inoculados.

Lamentablemente, en ninguno de los campos ensayados se observaron plantas con la sintomatología característica de esta enfermedad. En cambio, se detectaron vainas

afectadas por *T. frezii*, el agente causal del carbón de maní, una enfermedad frecuente en el cultivo y difícil de controlar (Marinelli y col., 2017). Ante estas condiciones, se decidió evaluar si *Bacillus* sp. CHEP5 y/o *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 poseen la capacidad de controlar a este fitopatógeno. El porcentaje de vainas afectadas por carbón de maní en plantas sin inocular fue muy bajo en el campo “La Herli” (menor al 1 %) mientras que en Avex fue superior (alrededor del 15%.) Por esta razón se decidió evaluar en este campo el efecto de la co-inoculación de las PGPBs sobre la incidencia y severidad de la enfermedad.

Se observó que las parcelas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5, o co-inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, presentaron menor incidencia y severidad del carbón de maní que las parcelas sin inocular. Por otra parte, dichos parámetros no variaron entre parcelas sin inocular y las inoculadas sólo con la cepa rizobiana, sugiriendo que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 no protege al cultivo de maní del ataque de *T. frezii* (Figura 20 Ay B).

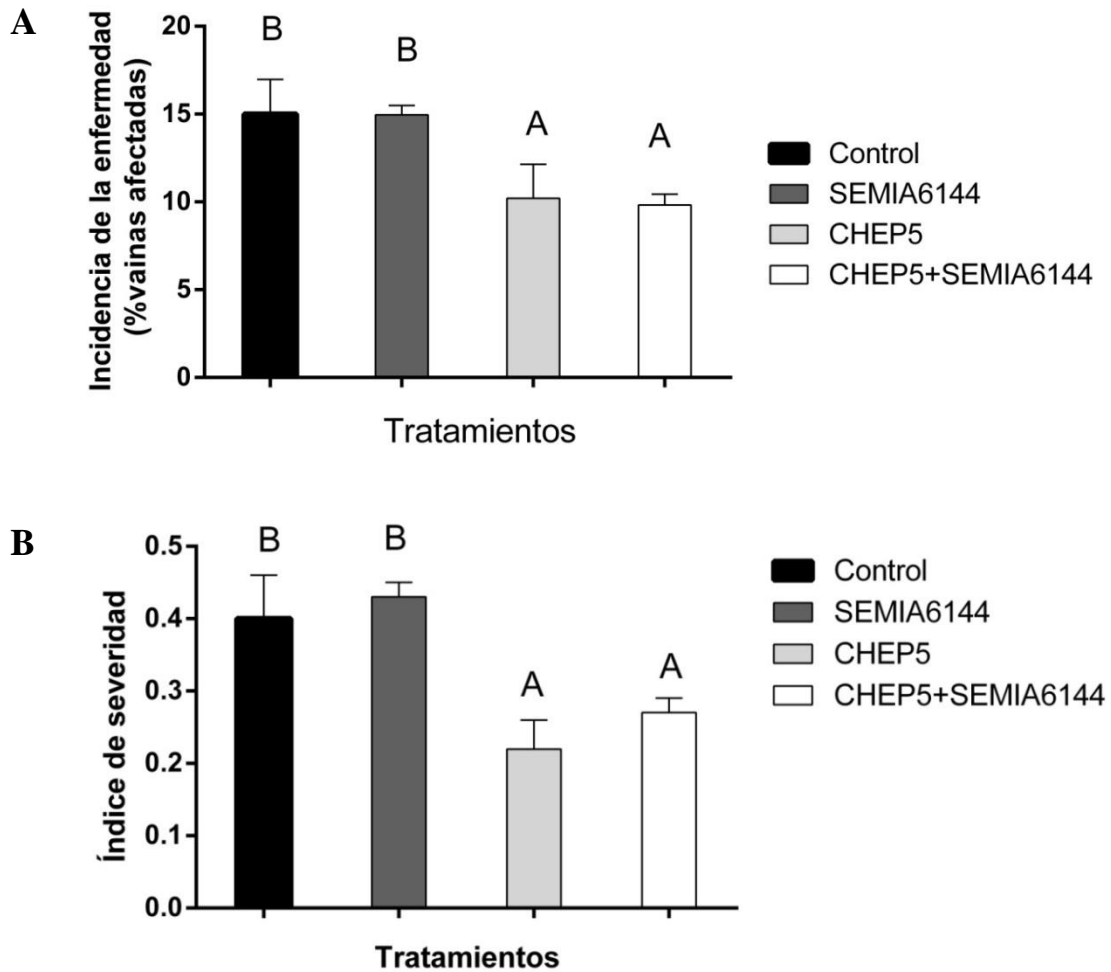


Figura 20. A. Incidencia de carbón de maní expresado como % de vainas afectadas. B. Índice de severidad. Los datos representan la media \pm E.E de 7 réplicas biológicas. Dentro de cada gráfico las letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de LSD Fisher ($p < 0,05$).

Se concluye entonces que la inoculación a campo con *Bacillus* sp. CHEP5 protege al cultivo de maní contra *T. frezii*, y que, tal como fue observado en ensayos *in vitro*, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 no afecta la capacidad de biocontrol de *Bacillus* sp. CHEP5. Dado que en estos ensayos *T. frezii* no fue experimentalmente inoculado, no es posible garantizar la separación física entre las PGPBs inoculadas y el fitopatógeno, y consecuentemente adjudicar la protección exclusivamente a la ISR. Se propone, por lo tanto, que *Bacillus* sp. CHEP5 es capaz de proteger a maní no sólo contra *S. rolfsii* mediante ISR (al igual que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144), sino que también protegería contra *T. frezii* elicitando dicha resistencia y/o mediante un mecanismo de antagonismo directo. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio refuerzan esta hipótesis dado que demostraron que *Bacillus* sp. CHEP5 inhibe *in vitro* el crecimiento de distintos patógenos

fúngicos (*Fusarium solani*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*) mediante antibiosis (Tonelli y col., 2010). Las diferentes estrategias de biocontrol que posee *Bacillus* sp. CHEP5 podrían explicar la mayor efectividad de esta PGPB en proteger al cultivo de maní con este fitopatógeno en comparación a *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144.

5.3 Efecto de la co-inoculación de plantas de maní con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre el rendimiento del cultivo de maní

La rentabilidad del cultivo de maní depende del rendimiento y de la calidad del producto cosechado. Estos determinantes están sujetos a numerosos factores propios de las plantas y del ambiente donde se cultivan (Pedellini, 2008). El maní posee características muy particulares de fructificación. Sus vainas crecen por debajo de la superficie del suelo pero no surgen de ninguna estructura reproductiva subterránea, por el contrario, éstas se desarrollan a partir de una flor aérea. El rendimiento de cultivos se calcula en base a la producción en relación a la superficie sembrada, y se expresa comúnmente en toneladas o kilogramos por hectárea. El rendimiento de maní puede calcularse tanto para los frutos como para las semillas o granos. Un fruto es una vaina que puede contener entre 1-4 semillas. En cuanto a la calidad de los granos de maní, uno de sus componentes es el tamaño de los mismos. Los granos que alcanzan un tamaño igual o superior a 7,5 mm (maní confitería) reciben mayores precios en los mercados ya que son preferidos por los consumidores (Boretto y col., 2011).

En los ensayos realizados a campo se determinó el rendimiento en frutos y semillas, así como también el porcentaje de maní confitería. En el campo “La Herli” se observó un incremento significativo en el rendimiento en fruto y en semilla en todas las parcelas inoculadas, obteniéndose los valores más altos en las parcelas tratadas con *Bacillus* sp. CHEP5. Además, la inoculación de este microorganismo así como su co-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, incrementó el porcentaje de maní confitería (**Tabla 13**).

En el campo “Avex” el porcentaje de maní confitería en parcelas tratadas sólo con *Bacillus* sp. CHEP5 incrementó con respecto a las parcelas controles, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento en semillas y frutos entre los diferentes tratamientos evaluados (**Tabla 13**).

Tabla 13. Efecto de la co-inoculación sobre el rendimiento de frutos y semillas, y sobre la producción de granos calidad confitería

Sítio	Tratamiento	Rendimiento en fruto (Kg ha ⁻¹)	Rendimiento en semilla (Kg ha ⁻¹)	% maní confitería
La	Control	5124,02 ± 224,79 ^A	3313,68 ± 272,76 ^A	49,84 ± 2,79 ^A
Herli	SEMIA6144	5818,21 ± 189,98 ^B	4312,02 ± 263,76 ^{BC}	51,12 ± 3,05 ^{AB}
	CHEP5	6595,63 ± 205,20 ^C	5021,46 ± 251,21 ^C	58,16 ± 2,58 ^{BC}
	SEMIA6144+ CHEP5	5837,10 ± 205,34 ^B	4162,61 ± 252,53 ^B	59,94 ± 2,59 ^C
Avex	Control	6527,45 ± 266,18 ^{AB}	5145,16 ± 278,80 ^A	93,73 ± 0,55 ^A
	SEMIA6144	5844,88 ± 291,59 ^{AB}	4760,81 ± 273,50 ^A	93,20 ± 0,51 ^A
	CHEP5	6713,58 ± 295,51 ^B	5441,76 ± 278,70 ^A	95,75 ± 0,60 ^B
	SEMIA6144+ CHEP5	5759,2 ± 259,90 ^A	4616,74 ± 329,89 ^A	93,35 ± 0,51 ^A

Los datos representan la media ± E.E de 7 réplicas biológicas. Para cada sitio, las letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de LSD Fisher (p<0,05).

Considerando que en el campo “La Herli” el mayor rendimiento del cultivo se obtuvo en parcelas inoculadas sólo con *Bacillus* sp. CHP5, y que este campo presentó un nivel crítico de fósforo (P) (10,1 µg g⁻¹), muy inferior al del campo “Avex” (37,3 µg g⁻¹) (Tabla 3) y que se aproxima a la concentración límite de este nutriente para el crecimiento de maní (10 µg g⁻¹, Cope y col., 1984), se propone que *Bacillus* sp. CHP5 podría también promover el crecimiento vegetal mediante la solubilización de P. El P, después del nitrógeno, es el segundo macronutriente requerido para el crecimiento de las plantas. Incluso en suelos ricos en P la mayor cantidad de este elemento se encuentra formando complejos insolubles y sólo un bajo porcentaje está disponible para las plantas (Stevenson, 1999). Existen microorganismos en la rizósfera capaces de solubilizar fosfatos liberando el P soluble fácilmente asimilable por la plantas, y promoviendo de este modo el crecimiento vegetal (Gupta y col., 2015). Para evaluar si *Bacillus* sp. CHP5 es capaz de solubilizar fosfatos se cultivó en medio NBRIP-BPB sólido, observándose un halo de solubilización de 1,25 mm de diámetro a los 7 días de inoculación. Además, se determinó en dicho medio líquido que la cantidad de P solubilizado a las 24 h de crecimiento fue de 23,62 µg ml⁻¹, incrementando a 27,02 µg ml⁻¹ a las 48 h de crecimiento (Tabla 14).

Tabla 14. Solubilización de fosfatos en medio NBRIP-BPB sólido y líquido.

Tratamiento	Diámetro del halo (mm) ¹	P soluble ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
		24 h	48h
<i>Bacillus sp. CHEP5</i>	1,25 \pm 0,3	23,62 \pm 1, 91	27,02 \pm 2,71

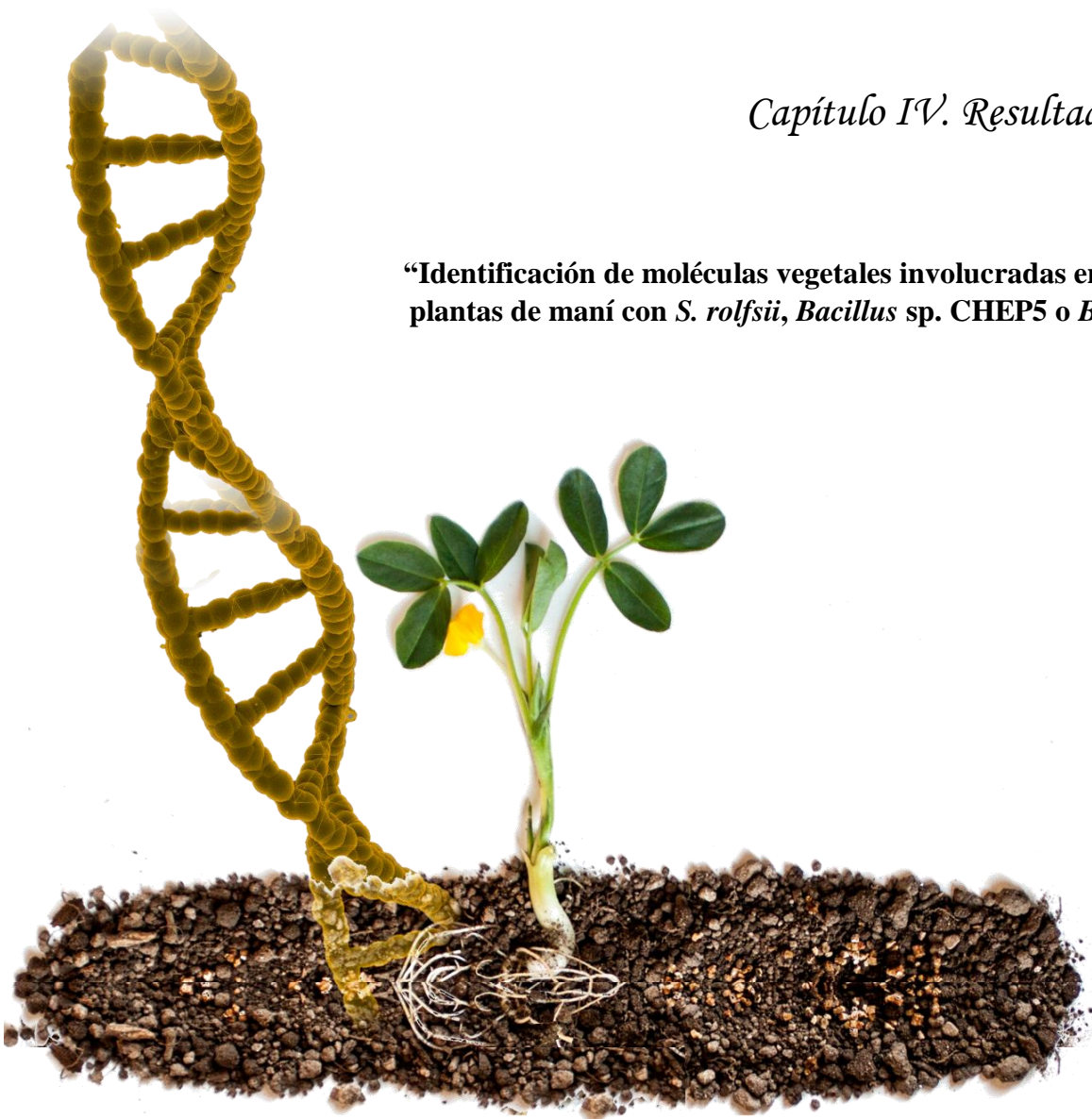
Los datos representan las medias \pm E.E de 2 réplicas biológicas.¹diámetro del halo de solubilización de fosfatos.

Los valores de P solubilizado por *Bacillus sp. CHEP5* concuerdan con los de otras cepas bacterianas del mismo género, pero son inferiores que los obtenidos con cepas bacterianas de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, entre otras (Anzuay y col., 2013). Sin embargo, Taurian y col. (2010) informaron que cepas bacterianas que muestran baja capacidad de solubilizar P *in vitro* (halos de 2-3 mm de diámetro) pueden no obstante promover el crecimiento vegetal cuando las plantas son cultivadas en suelos deficientes de P. Los resultados obtenidos permiten sugerir que la capacidad de *Bacillus sp. CHEP5* de solubilizar fosfatos constituye un mecanismo adicional por el cual podría promover el crecimiento vegetal.

Como se mencionó anteriormente son numerosos los factores que pueden afectar tanto el establecimiento como la efectividad de las interacciones benéficas plantas-microorganismos que ocurren en la rizósfera (Jha y col., 2013). Aun cuando con frecuencia los beneficios de la inoculación de PGPB en ensayos *in vitro* no se reproducen en condiciones a campo, los resultados obtenidos en esta tesis ponen en evidencia un efecto positivo de la co-inoculación de *Bradyrhizobium sp. SEMIA6144* y *Bacillus sp. CHEP5* sobre el crecimiento y rendimiento del cultivo de maní. Este análisis abre una nueva perspectiva para el uso de *Bacillus sp. CHEP5* como agente de biocontrol en la producción de maní.

Capítulo IV. Resultados y discusión

“Identificación de moléculas vegetales involucradas en la interacción de plantas de maní con *S. rolfsii*, *Bacillus* sp. CHEP5 o *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144”



Identificación de moléculas vegetales involucradas en la interacción de plantas de maní con *S. rolfsii*, *Bacillus* sp. CHEP5 o *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144

Las plantas interactúan con microorganismos durante todo su ciclo de vida. Éstos pueden ser patógenos, y generar enfermedades que pueden producir su muerte, o benéficos y promover el crecimiento vegetal. En un primer contacto con la planta hospedadora, ambos tipos de microorganismos son percibidos como intrusos y promueven respuestas similares. El éxito de la interacción dependerá de la capacidad de los microorganismos para bloquear o evadir la respuesta defensiva vegetal. Luego del reconocimiento de un fitopatógeno, se desencadena una cascada de señalización que culmina con la inducción de la respuesta defensiva de la planta. Sin embargo, los patógenos poseen diferentes estrategias que suprimen o modifican el sistema de defensa de la planta hospedadora y lo utilizan en su beneficio para establecerse en los tejidos vegetales. De modo similar, los microorganismos benéficos, particularmente los rizobios, producen moléculas señal que posibilitan su reconocimiento específico por la planta huésped y, además, modulan o evaden la respuesta defensiva permitiendo el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa (Soto y col., 2009).

Las plantas deben ser capaces de restringir las interacciones con patógenos y, al mismo tiempo, promover las asociaciones con microorganismos benéficos. Alcanzar este equilibrio es complejo y requiere de la percepción adecuada de posibles microorganismos invasores a través de las señales que producen, seguido de la activación de respuestas que promuevan la colonización de los benéficos (Zipfel y Oldroyd, 2017). El conocimiento de las respuestas que se desencadenan en la planta durante la interacción simultánea con microorganismos patógenos y benéficos permitirá por un lado, desarrollar estrategias para el manejo integrado de enfermedades, y por otro potenciar la asociación con microorganismos benéficos con el fin de mitigar factores estresantes que limitan la producción de los cultivos (Pieterse y col., 2016).

Con el objetivo de evaluar los posibles efectos en la producción de moléculas que participan en la respuesta de maní cuando interacciona simultáneamente con microorganismos benéficos y patógenos, en esta tesis se propuso analizar previamente la participación de posibles moléculas marcadoras en la respuesta de la planta frente a cada una de dichas interacciones. Con tal fin se seleccionaron, en base a antecedentes bibliográficos referidos a otras interacciones plantas-microorganismos, la actividad de enzimas PXs (Nandi y col., 2013; Doley y col., 2017) en la interacción patogénica maní-S.

rolfsii, la acumulación de compuestos fenólicos durante la inducción de resistencia sistémica (Dutta y col., 2008; Singh y col., 2013) mediada por *Bacillus* sp. CHEP5, y la expresión génica de miARNs y ARNm en la simbiosis (Subramanian y col., 2008; Sinharoy y col., 2009; Bustos-Sanmamed y col., 2013) maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144.

1. **Participación de enzimas PXs durante la interacción patogénica maní-*S. rolf sii***

El ataque de microorganismos fitopatógenos activa la respuesta inmune de la planta. Ésta involucra eventos celulares, histológicos, bioquímicos y moleculares complejos que limitan la proliferación de patógenos y la expresión de síntomas de la enfermedad. Las primeras etapas de la infección de las plantas con microorganismos patógenos necrótrofos, como *S. rolf sii*, están asociadas con la muerte de la célula huésped y la producción de diversos metabolitos secundarios, péptidos antimicrobianos y hormonas, así como también con la acumulación de EROs, calosa y otras moléculas que modifican la pared celular. La cinética de estas respuestas, la abundancia relativa de las moléculas asociadas y el tiempo de inducción pueden variar, pero son respuestas comunes a diferentes infecciones. Algunas respuestas inmunitarias, como la producción exacerbada de H₂O₂, benefician a los patógenos necrótrofos, ya que le permiten colonizar los tejidos vegetales (Mengiste, 2012; Lai y Mengiste, 2013).

La generación de un estallido oxidativo constituye una respuesta temprana caracterizada por la producción EROs (H₂O₂, O₂⁻ y HO[·], entre otros), que puede dar lugar a una RH y consecuentemente a la muerte celular (Lehman y col., 2015). La generación de EROs asociada a un incremento en la actividad del metabolismo oxidativo se relaciona frecuentemente con infecciones localizadas en tejidos vegetales por patógenos biótrofos o necrótrofos (Glazebrook, 2005). Sin embargo, mientras la RH inducida en el sitio de infección de patógenos biótrofos es un indicador clásico de resistencia, en la infección por patógenos necrótrofos es un indicador de infección exitosa y, por lo tanto, de susceptibilidad de la planta huésped (Mengiste, 2012). Para contrarrestar los efectos adversos que ocasiona la acumulación de EROs en los tejidos vegetales, las plantas poseen un sistema antioxidante compuesto por enzimas y metabolitos redox (Colodete y col., 2015). Entre las enzimas antioxidantes se encuentran las PXs. En las plantas existe una gran variedad de isoformas de esta enzima, lo que podría explicar la multiplicidad de funciones que éstas cumplen durante su ciclo de vida, desde la germinación hasta la senescencia, así como en la respuesta a estreses bióticos y abióticos. Además, las distintas

reacciones catalizadas por las PXs también dan cuenta de su implicancia en una amplia gama de procesos fisiológicos, como el catabolismo de auxinas, formación de lignina y suberina, entrecruzamiento de componentes de la pared celular, defensa contra patógenos y elongación celular. Durante el clásico ciclo peroxidativo, las PXs catalizan la reducción de H_2O_2 utilizando electrones de varias moléculas donantes, como compuestos fenólicos, precursores de lignina, auxinas o metabolitos secundarios. Por otra parte, paradójicamente, las PXs en un ciclo hidroxílico, participan en la formación de EROs (Passardi y col., 2004; Almagro y col., 2009). Algunos autores sostienen que el aporte de la actividad de PX en la producción de EROs es fundamental para crear un ambiente tóxico que le permite a la planta contrarrestar el ataque de fitopatógenos (Passardi y col., 2005; Bindschedler y col., 2006), mientras que otros argumentan que las PXs producen cantidades pequeñas y transitorias de EROs que serían insuficientes para desencadenar un estallido oxidativo (Zhao y col., 2005; Almagro y col., 2009).

Dentro de los patógenos necrótrophos se encuentran aquellos específicos de hospedador, que producen toxinas particulares esenciales para la patogenicidad y virulencia, y los que poseen amplio espectro de hospedadores (BHNs, de su sigla en inglés “*broad host-range necrotrophs*”), como *S. rolf sii*. Estos BHNs no producen toxinas específicas, sino toxinas y enzimas líticas comunes para todos los hospedadores, que atacan fundamentalmente la pared celular vegetal. El éxito de su colonización depende en gran medida de la susceptibilidad de la pared celular a la acción de estas moléculas. Las enzimas PXs son componentes clave de la resistencia vegetal frente a BHNs por su función en el entrecruzamiento intra- e intermolecular de componentes estructurales de la pared celular y en la polimerización de lignina y suberina (Bellincampi y col., 2014; Singh y col., 2016).

La evaluación de la actividad de enzimas PXs de maní frente a *S. rolf sii* se realizó en el sitio de inoculación del patógeno (el tallo) y a diferentes tiempos post-inoculación (1, 5, 10, 24, 48 y 72 horas). Simultáneamente, se evaluó cualitativamente la colonización del tejido vegetal y el desarrollo del patógeno, mediante la visualización macroscópica de sus hifas. Los resultados indicaron un aumento en la actividad PX a las 48 horas post-inoculación, el que se mantuvo hasta las 72 horas post-inoculación (**Figura 21**). Estos tiempos coincidieron con un incremento en la colonización del fitopatógeno en el tejido vegetal (**Figura 22**).

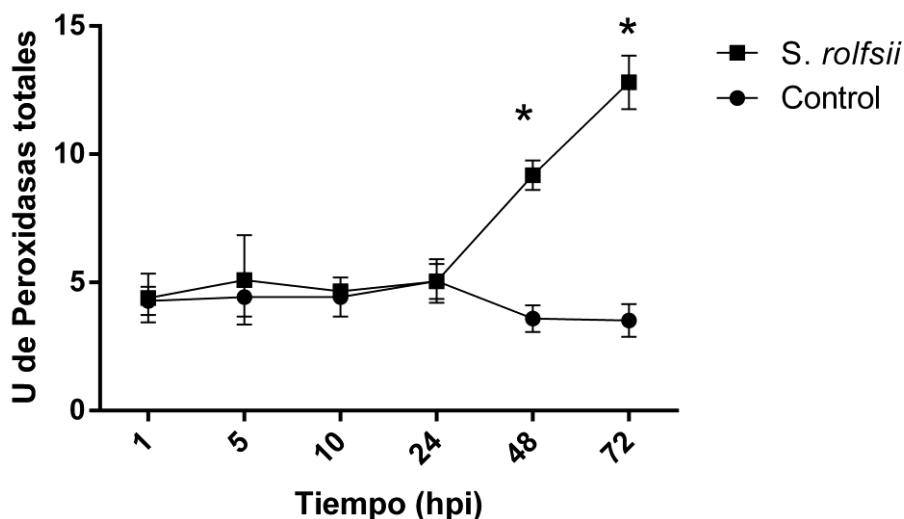


Figura 21. Cuantificación de la actividad de PXs totales en tallos de plantas de maní a diferentes tiempos post-inoculación con *S. rolfsii*. Los datos representan la media \pm E.E de tres ensayos con $n=10$ cada uno. Los asteriscos indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de LSD Fisher ($p<0,05$). **hpi**: horas post-inoculación. **U**: unidades.

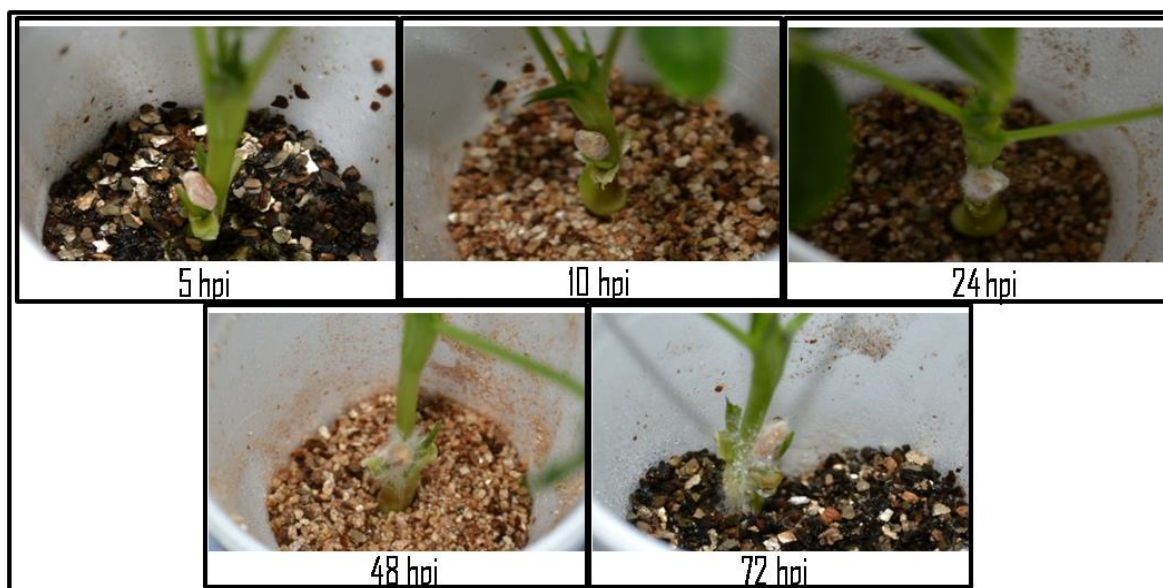


Figura 22. Evolución de la colonización de *S. rolfsii*. **hpi**: horas post-inoculación.

Estos resultados indican que, como era esperable, *S. rolfsii* induce la respuesta defensiva de plantas de maní, incrementándose la actividad PXs totales en el sitio de infección. Sin embargo, esta respuesta sería insuficiente para contrarrestar la enfermedad dado que la infección fúngica continúa y las plantas mueren entre los 6 y 10 días post-inoculación (resultados presentados en el *Capítulo III*). Asselbergh y col. (2007)

informaron que plantas de tomates susceptibles al patógeno necrótrofo *Botrytis cinerea* incrementan la actividad PX en el sitio de infección del fitopatógeno, lo que no previene el desarrollo de la enfermedad. Más aún, los autores reportaron que en plantas de tomates resistentes a *B. cinerea*, la actividad PX fue mayor y más tempranamente inducida que en plantas de tomate susceptibles. Es posible, por lo tanto, proponer que la susceptibilidad en plantas de maní inoculadas con *S. rolf sii* esté relacionada a una respuesta defensiva tardía y débil que le permita al patógeno colonizar el tejido vegetal, resultando en un marchitamiento generalizado de la planta.

Para descartar que en los valores de la actividad PX cuantificada a partir de tallos de maní inoculados con *S. rolf sii* no estén incluidos también los de la actividad PX fúngica, se llevaron a cabo dos experiencias. Por un lado, se determinó la actividad PX en el micelio de *S. rolf sii* extraído de la superficie de tallos de plantas de maní a las 48 horas post-inoculación. Debido al escaso desarrollo de micelio por planta bajo estas condiciones se trabajó con el proveniente de 8-15 plantas. Por otro lado, se cuantificó la actividad PX a partir de micelio desarrollado por el hongo cuando crece en medio APG. En las dos experiencias, el método de extracción de proteínas y de determinación de actividad PX fue el mismo que se utilizó en la evaluación de dicha actividad en tallos. En ninguno de los ensayos realizados se detectó actividad PX fúngica.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la actividad PX determinada en tallos de plantas de maní inoculados con *S. rolf sii* corresponde exclusivamente a las PX vegetales, y que la actividad de dichas enzimas se modifica en la interacción maní-*S. rolf sii*. Por lo tanto, este parámetro se seleccionó como marcador molecular de patogenicidad.

2. Acumulación de compuestos fenólicos durante la inducción de resistencia sistémica mediada por *Bacillus* sp. CHEP5 en plantas de maní contra *S. rolf sii*

Como se mencionó en el *Capítulo I*, la ISR se define como un estado fisiológico de las plantas en el que su sistema defensivo se encuentra exacerbado cuando son estimuladas apropiadamente por microorganismos benéficos que no causan síntomas visibles en el hospedador, y es efectivo contra diversos patógenos (van Loon y col., 1998; Pieterse y col., 2014). Luego del primer contacto con microorganismos benéficos, se establece en la planta un estado de “*priming*” que no se correlaciona con cambios transcriptómicos, bioquímicos ni estructurales significativos. Por el contrario, frente al posterior ataque de un

fitopatígeno, la ISR se manifiesta a través de la expresión de múltiples genes relacionados con la defensa de la planta, produciéndose cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales (Jain y col., 2016). Entre estos últimos, los más ampliamente reportados están asociados a la fortificación de la pared celular vegetal, como la lignificación, la suberificación, la deposición de calosa y la acumulación de compuestos fenólicos en el sitio de infección del fitopatígeno. El contenido de compuestos fenólicos totales, o de sus polímeros derivados, es uno de los parámetros más estudiados cuando se evalúa ISR (Jain y col., 2012; Singh y col., 2013; Mei y col., 2014; Schenk y col., 2014; Sharma y col., 2018). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios constituidos por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilos, y cuya estructura varía desde una molécula simple hasta un polímero complejo de alto peso molecular. Estos compuestos son importantes para el crecimiento, reproducción y defensa de las plantas. Algunos derivados de compuestos fenólicos como la lignina y la suberina poseen funciones estructurales, mientras que otros como los flavonoides, isoflavonoides y estilbenos actúan como antimicrobianos, antioxidantes, etc. (Balasundram y col., 2006). Los compuestos fenólicos también forman parte de la defensa vegetal constitutiva, se acumulan en células especializadas en distintos tejidos, como el xilema, y desde allí pueden ser liberados luego del ataque de un patógeno para la formación de una barrera estructural o para actuar como compuestos antimicrobianos (Beckman, 2000).

En nuestro laboratorio se demostró que durante la ISR elicitada por *Bacillus* sp. CHEP5 en plantas de maní se induce la actividad de la enzima PAL (24 horas y 13 días post-inoculación de *S. rolf sii*), que actúa catalizando el primer paso de la vía de síntesis de compuestos fenólicos (Figueredo y col., 2014; Tonelli y col., 2011). Con el objetivo de evaluar si los compuestos fenólicos podrían constituir marcadores de la ISR mediada por *Bacillus* sp. CHEP5 en plantas de maní contra *S. rolf sii*, se propuso en primer lugar determinar cualitativamente su acumulación en tallos de plantas de maní inoculados con el fitopatígeno.

Dado que los compuestos fenólicos muestran autofluorescencia, se observaron microscópicamente cortes transversales de tallos de plantas de maní a las 48 horas post-inoculación de *S. rolf sii*. Este tiempo se seleccionó ya que coincide con el comienzo de la detección del desarrollo de micelio fúngico en dichos órganos (**Figura 22**). En presencia del fitopatígeno, se observó un incremento en la acumulación de compuestos fenólicos tanto en plantas inoculadas como no inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5. Sin embargo, sólo se observaron síntomas de enfermedad en los tejidos de plantas que no habían sido

inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5. En ausencia del fitopatógeno, no se observaron cambios entre plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y sin inocular (**Figura 23**).

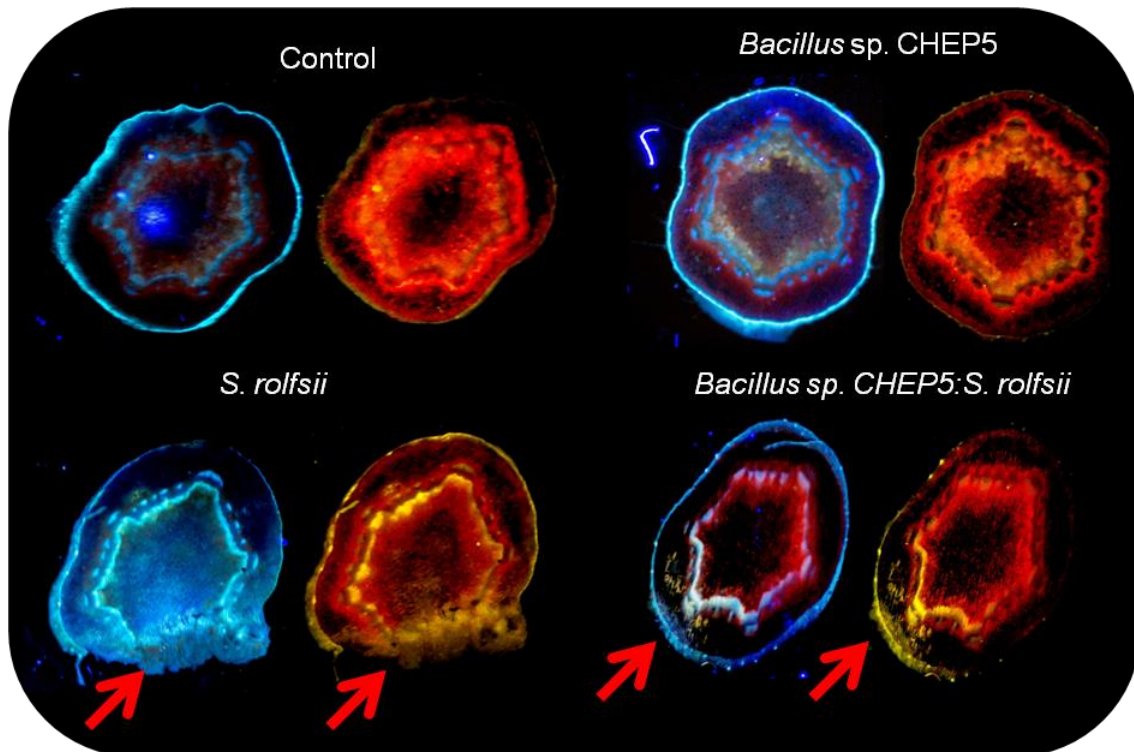


Figura 23. Autofluorescencia de compuestos fenólicos en tallos de plantas de maní. Las imágenes fueron tomadas bajo un microscopio equipado con un filtro de luz ultravioleta o fluorescente. Las flechas indican el sitio de inoculación de *S. rolfsii*. Aumento total de la imagen: 50X.

Considerando que la evaluación cualitativa de compuestos fenólicos no permitió visualizar diferencias evidentes en aquellas plantas inoculadas o no con *Bacillus* sp. CHEP5 en presencia del fitopatógeno, se planteó evaluar cuantitativamente dicha producción. Para ello, se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales en porciones de tallos que estaban en íntimo contacto con el fitopatógeno. Como era esperable, se encontró que en presencia del fitopatógeno, la acumulación de compuestos fenólicos totales fue mayor en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 que en las sin inocular. En cambio, en ausencia del fitopatógeno, el contenido de estos compuestos no difirió entre ambos grupos de plantas (**Figura 24**).

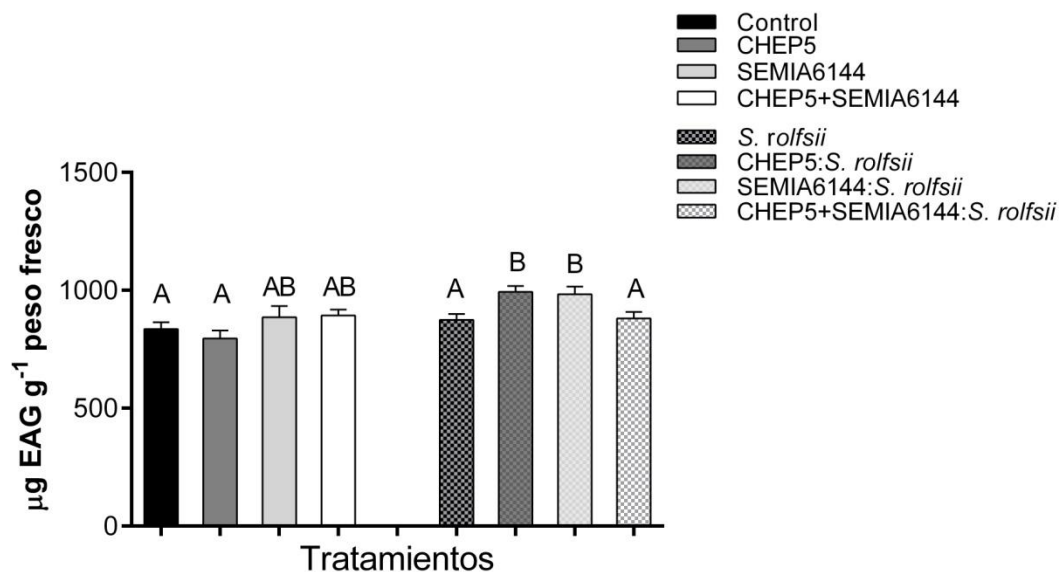


Figura 24. Cuantificación de compuestos fenólicos en tallos de plantas de maní. Los datos representan la media \pm E.E de tres ensayos con $n=5$ cada uno. Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de LSD Fisher ($p<0,05$). **EAG:** equivalentes de ácido gálico.

Considerando que *S. rolfsii* es un patógeno necrótrofo de amplio espectro de hospedadores y que, como se expuso anteriormente, el éxito de la colonización de este tipo de patógenos depende en gran medida de la susceptibilidad de la pared celular a la acción de toxinas y enzimas líticas, es posible sugerir que el incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales en plantas tratadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y desafiadas con este patógeno contribuya a la fortificación de la pared celular vegetal, lo que dificultaría el ingreso de *S. rolfsii* a los tejidos vegetales, mientras la planta activa otras respuestas defensivas. También es posible que, entre los compuestos fenólicos cuyo contenido se vio incrementado, se encuentren compuestos antimicrobianos como fitoalexinas que afectarían el desarrollo de *S. rolfsii* (Balasundram y col., 2006). Ambos eventos redundarían en una menor incidencia y severidad de la enfermedad producida por este fitopatógeno en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5, tal como se demostró en el *Capítulo III*. Resultados similares fueron reportados por Jain y col. (2012), quienes demostraron que la inoculación de plantas de arvejas con bacterias biocontroladoras de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* induce la acumulación de compuestos fenólicos en tejidos sistémicos de la planta, lo que le confiere resistencia contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Por su parte, Singh y col., (2014) informaron que la inoculación de un consorcio microbiano protege a las

plantas de garbanzo contra *S. rolf sii* mediante la acumulación diferencial de compuestos fenólicos.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que la acumulación de compuestos fenólicos es un fenómeno vinculado a la inducción de resistencia sistémica contra *S. rolf sii* elicitada por *Bacillus* sp. CHEP5 en plantas de maní, por lo que se seleccionó como marcador de dicha respuesta.

3. Participación de miARNs y ARNm en la interacción simbiótica maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144

El mecanismo de transducción de señales que se desencadena durante la simbiosis entre rizobios y leguminosas ha sido ampliamente estudiado en plantas modelo como *L. japonicus* y *M. truncatula*. En *L. japonicus*, los factores Nod rizobianos son reconocidos por receptores quinasas del tipo LysM (*LjNFR1/LjNFR5*) ubicados en la membrana plasmática de la planta hospedadora. El reconocimiento de la señal proveniente del microsimbionte desencadena la generación de oscilaciones de Ca^{2+} en el núcleo de las células epidérmicas, lo cual activaría una cascada de señalización que involucra genes vinculados a la organogénesis e infección del nódulo. Aún no se conoce cuál es la señal que conecta la percepción de los factores Nod en la membrana plasmática con las oscilaciones de Ca^{2+} en el núcleo, pero se ha propuesto que participarían proteínas receptores quinasas con repeticiones ricas en leucina (*LjSymRK*) ubicadas en la membrana plasmática. Estas proteínas formarían un complejo con el receptor de los factores Nod *LjNFR1* y/o *LjNFR5*, activando la cascada de señalización. Las oscilaciones de Ca^{2+} provocadas por la señal serían decodificadas por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina (*LjCCaMK*) que, mediante la fosforilación del factor de transcripción *LjCYCLOPS*, induciría la expresión de los genes simbióticos requeridos para la organogénesis e infección de los nódulos (Oldroyd, 2013). En la última década se han identificado diversos miARNs como riboreguladores vinculados al proceso de nodulación, desde las etapas tempranas de la interacción simbiótica hasta el funcionamiento del nódulo (Couzigou y Combier, 2016).

Como se mencionó en el *Capítulo I*, la asociación simbiótica que se desarrolla entre maní y *Bradyrhizobium* sp. presenta particularidades. La infección de las raíces de maní ocurre por invasión intercelular del tejido radical sin la formación de hilos de infección, y la organogénesis de nódulos resulta del desarrollo de un programa aeshynomenoide. Estos mecanismos han sido poco estudiados, especialmente en cuanto a los eventos moleculares

implicados en la vía de señalización que conducen al establecimiento y funcionamiento de una simbiosis efectiva. En esta tesis, se propuso estudiar los miARNs y ARNm potencialmente implicados en la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, con el objetivo de establecer si pueden constituir marcadores moleculares de esta interacción.

3.1 Estudio de la expresión de miARNs en etapas tempranas de la simbiosis

Diversos miARNs han sido implicados en las etapas tempranas de la nodulación en leguminosas modelo, controlando la infección rizobiana o la organogénesis del nódulo (Valdés-López y Hernández, 2015). Muchos de estos miARNs participan de la vía de señalización hormonal, como la de las auxinas que están vinculadas a diferentes etapas del desarrollo de nódulos (Lelandais-Briere y col., 2016). Sin embargo, no existen reportes acerca de la participación de miARNs en etapas tempranas de la interacción maní-bradirizobios. En esta tesis se propuso cuantificar, en raíces de maní, la expresión de algunos miARNs (miR160, miR159, miR164, miR172 y miR396) a las 16 horas post-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. La selección de tales miARNs se realizó considerando que han sido vinculados a etapas iniciales de la simbiosis en leguminosas modelo como *L. japonicus*, *M. truncatula* y *G. max*. En los ensayos realizados, y para la síntesis de ADNc de los miARNs, se utilizó la estrategia de elongación de la secuencia conocida como “stem-loop RT”. Esta estrategia se basa en la utilización de un cebador con una estructura de tallo y bucle que posee una región complementaria al extremo 3' del miARN maduro en la reacción de transcripción reversa.

Los resultados obtenidos indicaron que, a las 16 horas post-inoculación del microsimbionte, ninguno de los miARNs ensayados (*ahy*-miR160, *ahy*-miR159, *ahy*-miR164, *ahy*-miR172 y *ahy*-miR396) modificó su expresión en raíces inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 respecto a plantas controles sin inocular (**Figura 25**), lo que sugiere que no participarían en los eventos tempranos de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144.

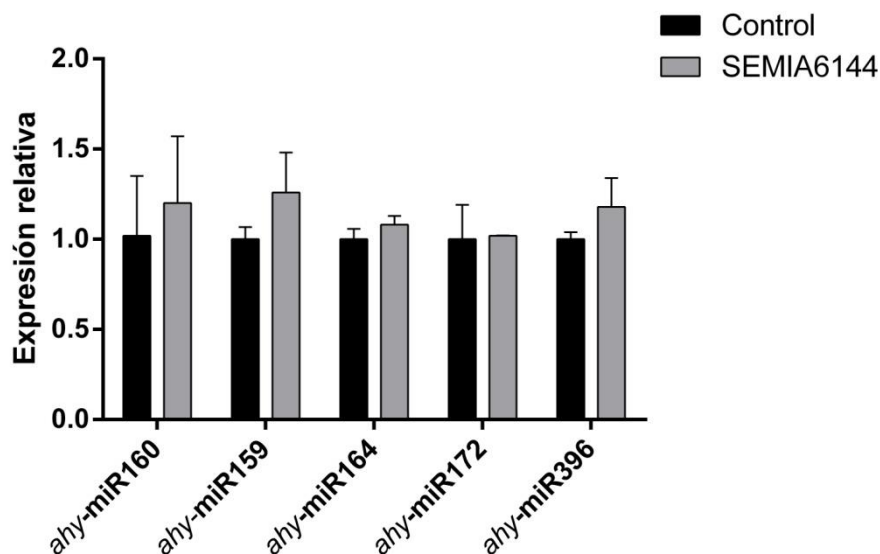


Figura 25. Expresión de miARNs en raíces de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Los datos representan la media \pm E.E. de tres ensayos con n=4.

Dos de estos miARNs, el miR160 y el miR164, participan en la vía de señalización de respuesta a auxina. Esta fitohormona, junto con la citoquinina, está vinculada a la iniciación de las divisiones corticales que dan lugar al primordio nodular (Oldroyd y col., 2011). El miR160 tiene como blanco a los factores de transcripción ARF10/16 y 17 (ARF, de su sigla en inglés: “Auxin Response Factor”), que reprimen la expresión de genes de respuesta a auxina (Liu y Chen, 2009). Se han reportado diferencias en la acumulación de miR160 al inicio de la nodulación en *M. truncatula* y *G. max*, leguminosas que forman nódulos indeterminados y determinados, respectivamente. Bustos-Sanmamed y col. (2013) informaron que, en *M. truncatula*, la expresión del miR160 se incrementa durante las primeras horas post-inoculación con el microsimbionte *S. meliloti*. Además, los autores reportaron que en plantas que sobreexpresan el miR160 se observó menor número de nódulos, aunque todos eficientes en la fijación del nitrógeno, sugiriendo que el nodo regulatorio miR160/ARF podría estar involucrado en el control del número de nódulos en esta leguminosa. El miR160 también ha sido implicado en el desarrollo de las etapas tempranas de la interacción *G. max*-*B. japonicum* (Subramanian y col., 2008). A diferencia de lo informado en *M. truncatula*, los autores indicaron que en *G. max* los niveles del miR160 disminuyen durante las primeras horas post-inoculación de *B. japonicum*. Por su parte, Turner y col. (2013) observaron que la sobreexpresión del miR160 en *G. max* no afectó la respuesta epidérmica durante la interacción simbiótica con *B. japonicum*, pero si

la respuesta cortical, alterando el crecimiento de hilos de infección, la formación de primordios nodulares y su subsecuente desarrollo. Considerando que el miR160 reprime la traducción de factores de transcripción que regulan negativamente la vía de señalización de auxinas, los autores sugieren que una señalización de auxina mínima o reducida es necesaria para el desarrollo de nódulos determinados. Por otro lado, el miR164 tiene como blanco al factor de transcripción NAC1 que, en *Arabidopsis*, participa de la vía de señalización de auxinas para el desarrollo de raíces laterales (Guo y col., 2005). Más recientemente, Mao y col. (2013) informaron que el miR164, además de participar en el desarrollo de raíces laterales, está vinculado sólo al desarrollo de nódulos indeterminados, ya que su expresión se modifica durante las primeras horas post-inoculación de *M. truncatula* con *S. meliloti* (desde 1 a 24 horas post-inoculación), y se mantiene constante en plantas de soja que interaccionan con *B. japonicum*. La ausencia de cambios en la expresión de *ahy-miR160* y *ahy-miR164* en plantas de maní a las 16 horas post-inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sugiere que durante las etapas tempranas de esta interacción no ocurrirían cambios sustanciales en la señalización de auxinas, probablemente debido a que maní, al igual que soja, forma nódulos determinados.

Uno de los miARNs que ha sido más ampliamente estudiado en la interacción simbiótica rizobio-leguminosa es el miR172, cuyo ARNm blanco es el factor de transcripción APETALA-2 (AP-2) (Yan y col., 2013; Wang y col., 2014; Nova-Franco y col., 2015; Holt y col., 2015). La expresión de este miARN se encuentra inducida en etapas tempranas y/o tardías del desarrollo del nódulo, permaneciendo en abundancia en nódulos maduros activos. Wang y col. (2014) informaron que el miR172 está vinculado con la infección del rizobio y la organogénesis del nódulo durante etapas tempranas (desde 1 a 24 horas post-inoculación) de la simbiosis soja-*B. japonicum*. El miR172 controla la expresión del factor de transcripción NNC1 (de su sigla en inglés, “*nodule number control 1*”), perteneciente a la familia AP-2. Este factor de transcripción reprime la expresión de una de las nodulinas más ampliamente conocidas, ENOD40, y regula negativamente la nodulación. Por lo tanto, los autores sugieren que el miR172 regula positivamente la nodulación mediante el control de la expresión de NNC1. Dado que en esta tesis no se evidenció que el *ahy-miR172* participe en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 (16 horas post-inoculación), se sugiere que la vía de señalización simbiótica en esta leguminosa es diferente a la de soja, o que el miR172 se activa en ambas leguminosas a diferentes tiempos post-inoculación. Otra posibilidad es que, dado que el miR172 estaría vinculado a la infección del rizobio, la diferencia en la

expresión de este miARN en soja y maní se relacione con las diferentes vías de infección rizobiana en ambas leguminosas (intracelular e intercelular, respectivamente).

El miR159 tiene como genes blanco a factores de transcripción MYB implicados en múltiples procesos biológicos. Ha sido reportado que la expresión de este miARN en *Arabidopsis* es controlada por la fitohormona ácido abscísico (ABA). Los factores de transcripción MYB son reguladores positivos de la respuesta a ABA, por lo que se sugiere que el miR159 participaría en la homeostasis de esta fitohormona (Reyes y Chua, 2007). En soja, este miARN fue vinculado a las primeras etapas del desarrollo de nódulos, ya que su expresión se incrementa desde las 3 hasta las 12 horas post-inoculación del microsimbionte (Subramanian y col., 2008). Ello sugiere que el ABA participaría en las etapas tempranas de la interacción soja-*B. japonicum*. Por el contrario, existen reportes que indican que, en *Trifolium repens*, *L. japonicus* (Suzuki y col., 2004) y *M. truncatula* (Ding y col., 2008), aún bajas concentraciones de ABA inhiben el desarrollo de nódulos. La ausencia de cambios en la expresión del *ahy*-miR159 sugiere que durante etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 (16 horas post-inoculación) no ocurrirían cambios vinculados a la señalización mediada por ABA.

El miR396 tiene como blanco a varios miembros de la familia de los factores de transcripción GRF (de su sigla en inglés: “*growth-regulating factor*”) que controlan el desarrollo y crecimiento de órganos vegetales (Kim y col., 2003; Bazin y col., 2013). Subramanian y col. (2008) reportaron un incremento en la acumulación del miR396 en soja durante la primera hora post-inoculación con *B. japonicum*, y luego una disminución. Sin embargo, no se conoce cuál sería la función y relevancia biológica de este miRNA (Bazin y col., 2013). Considerando los resultados obtenidos en esta tesis, se concluye que el *ahy*-miR396 no estaría implicado en etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144.

Considerando que el perfil de expresión de los miARNs evaluados en maní no se modificó en las etapas tempranas de su interacción con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, se propuso estudiar la expresión génica de miARNs y ARNm en etapas más avanzadas de dicha interacción (9 y 40 días post-inoculación), con el fin de encontrar marcadores moleculares del proceso que puedan ser evaluados en las co-inoculaciones.

3.2 Participación del *Ahsymrk* en la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 a los 9 días post-inoculación del microsimbionte

Como se mencionó anteriormente, el receptor simbiótico SymrK presente en leguminosas modelo es fundamental en la vía de señalización de los FN que conduce al establecimiento de la simbiosis rizobiana. Sinharoy y col., (2009) demostraron que *AhSymrK* también participa en las primeras etapas de la interacción simbiótica entre maní y *Bradyrhizobium* sp. En esta tesis, la expresión de dicho gen se evaluó a los 9 días post-inoculación, tiempo al cual se evidencia en maní la formación del primordio nodular (Ibáñez y Fabra, 2011). Para evaluar la expresión de *Ahsymrk*, en una primera etapa se verificó mediante qRT-PCR la especificidad de los cebadores seleccionados. Cuando se utilizó como molde ADNc, se observó sólo un pico en la curva de disociación, que se corresponde con un único producto de amplificación. En el control negativo de la reacción también se obtuvo un pico, cuyo nivel de fluorescencia y valor de Tm fueron inferiores al producto de interés, por lo que se infiere que correspondería a dímeros de cebadores (Figura 26).

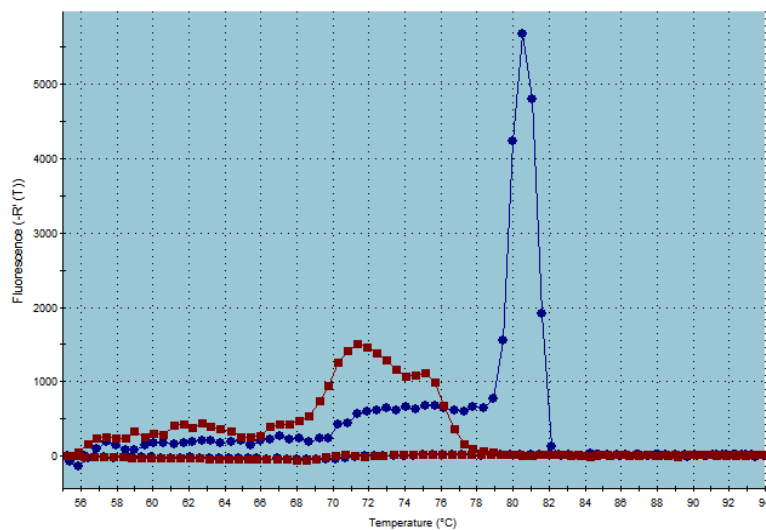


Figura 26. Curva de disociación del producto de amplificación mediante qRT-PCR. Línea Azul: ADNc como molde. Línea roja: control negativo de la reacción.

La electroforesis en gel de agarosa del producto obtenido mediante qRT-PCR reveló que, como era esperado, posee un tamaño de ~200 pb (Figura 27).

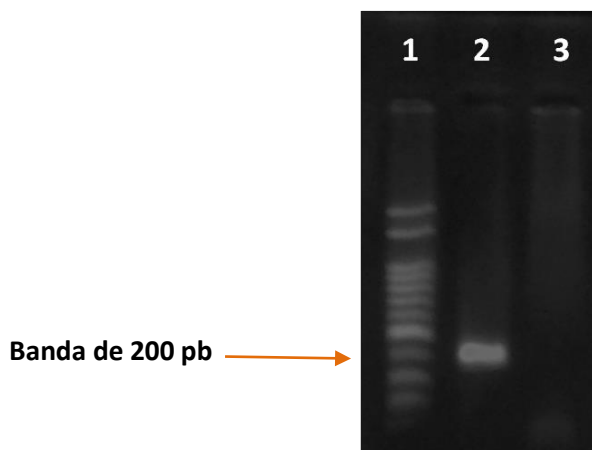


Figura 27. Producto de amplificación obtenido mediante qRT-PCR. **1.** Marcador de 50pb. **2.** producto amplificado a partir de ADNc utilizando los cebadores SymRK. **3.** Control negativo de la reacción de PCR empleando los cebadores SymRK.

El producto amplificado fue secuenciado. Dicha secuencia mostró un 96 % de identidad con el *Ahsymrk*, con un 97 % de cobertura, confirmando que el producto amplificado se corresponde con *Ahsymrk*.

Por otro lado, para verificar la eficiencia de la reacción de qRT-PCR, se realizó una curva estándar. La linealidad de esta gráfica está denotada por el valor de R^2 (o Coeficiente de correlación de Pearson) el que cuando se aproxima a 1 indica que la eficiencia de la amplificación es constante a medida que varía la concentración del molde. Para esta reacción el valor del R^2 fue 0,979. Por otro parte, el valor de la pendiente generada debe idealmente ubicarse entre -3,1 y -3,6, lo que indica que la eficiencia de la reacción es de 90% a 100%. Para esta reacción el valor de la pendiente de la curva fue -3,0, ligeramente inferior a los valores ideales (**Figura 28**).

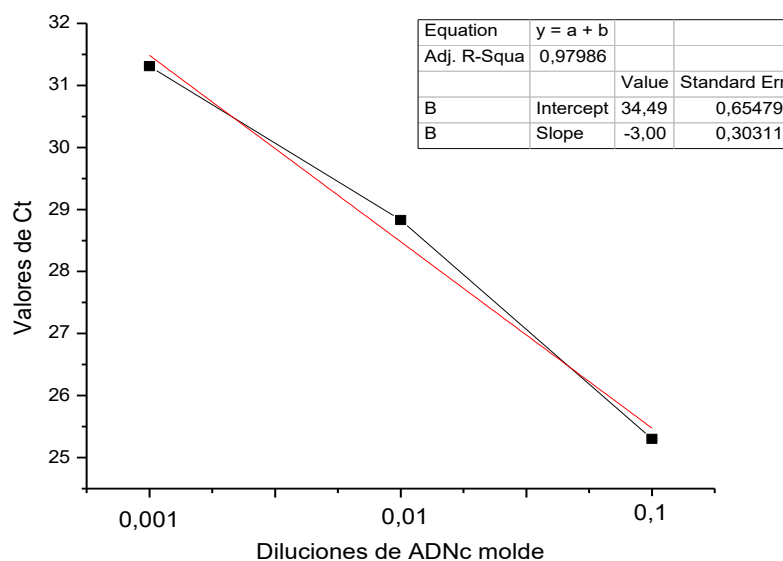


Figura 28. Curva estándar de la reacción qRT-PCR para la amplificación del *Ahsymrk*. Se muestran los valores de Ct vs. concentraciones crecientes de ADNc molde. Se incluye la ecuación de la recta y el valor del coeficiente de correlación.

Una vez optimizada la metodología, se procedió a la cuantificación de los transcritos del gen del *Ahsymrk* en raíces de plantas de maní a los 9 días post-inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Los resultados obtenidos indicaron que dicha expresión se incrementa aproximadamente 2,5 veces en estas plantas en relación a raíces de plantas sin inocular (**Figura 29**).

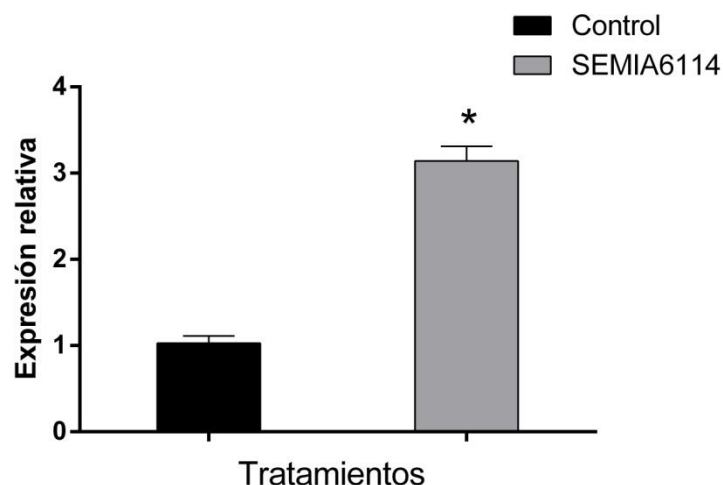


Figura 29. Expresión del gen *Ahsymrk* en raíces de plantas de maní a los 9 días post-inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Los datos representan la media \pm E.E de 2 réplicas biológicas con un n=4. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa según el Test-t de Student ($p < 0,05$).

Estos resultados confirman que el gen *Ahsymrk* está vinculado al establecimiento de la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y, por lo tanto, podría ser utilizado como un marcador molecular de dicha simbiosis. Recientemente, Xie y col. (2017) también informaron un incremento en la expresión de *Ahsymrk* en raíces de plantas de maní, pero en este caso a los 5 días post-inoculación del microsimbionte.

3.3 Estudio de la expresión génica de miARNs y ARNm en etapas tardías de la simbiosis

A pesar de la importancia del proceso de fijación de nitrógeno que ocurre en nódulos maduros, poco se conoce acerca del sistema regulatorio que participa en esta etapa de la interacción simbiótica. En la última década se han identificado miARNs diferencialmente expresados en nódulos respecto a los demás tejidos, sugiriendo su participación en la FBN, mantenimiento y/o senescencia de dicho órgano (Wang y col., 2009; Lelandais-Briere y col., 2009). Sólo para algunos miARNs se ha podido determinar su función. Nova-Franco y col. (2015) informaron que en nódulos inefectivos o senescentes de plantas de poroto la expresión del miR172 se encuentra disminuida y la del factor de transcripción AP-2 inducida. Análisis transcriptómicos revelaron 114 genes co-expresados junto con AP-2, muchos de ellos relacionados a la senescencia del nódulo, por lo que se ha propuesto que estos genes deben estar silenciados en nódulos maduros activos a través del nodo regulatorio miR172/AP-2. Por su parte, De Luis y col. (2012) reportaron que en *L. japonicus* el miR397 participaría en el mantenimiento de la homeostasis del Cu^{2+} para el funcionamiento óptimo de la FBN.

Con el propósito de conocer los miARNs y ARNm vinculados a las etapas tardías de la nodulación de maní, se llevó a cabo una análisis *in silico* a partir de librerías de expresión en nódulos y raíces de esta planta disponibles en la base de datos pública del NCBI. Posteriormente, los miARNs y ARNm seleccionados se validaron experimentalmente mediante qRT-PCR.

3.3.1 Análisis bioinformático de la expresión de precursores de miARNs y ARNm totales en nódulos de maní

A partir de los estudios *in silico* se ensamblaron 354.535 “*contigs*”. De éstos, 9.327 se encontraron sobreexpresados y 10.265 reprimidos en nódulos con respecto a las raíces de plantas de maní inoculadas, lo que se corresponde al 2.6% y 2.9% de los “*contigs*”

analizados, respectivamente. En las **Tablas 15 y 16** se listan 30 genes cuyos niveles de expresión mostraron diferencias entre nódulos y raíces. Entre los transcritos diferencialmente expresados se encuentran genes vinculados a la simbiosis rizobiana como los que codifican la nodulina 21, proteínas de unión a calcio y activadores de transcripción de unión a calmodulina conocidos en otras leguminosas.

Tabla 15. Genes regulados negativamente en nódulos con respecto a raíces de plantas de maní

Anotación	Nivel de transcritos (log ₂ u.r)
2-alquenal reductasa (NADP (+) - dependiente)	-11,09096897
Arabinogalactano tipo fasciclin 12	-10,55951138
Bifuncional epóxido hidrolasa tipo-2	-10,54058694
Inhibidor de la tirosina quinasa Bruton	-9,966610847
auxin-sensible tipo IAA9	-9,719187316
Aldehído deshidrogenasa tipo-22A1	-9,519097625
Galactinol sintasa 1	-9,501951393
Serina/treonina quinasa tipo-At5g01020	-9,412246762
Arabinogalactano tipo fasciclin 12	-9,292303671
Isoforma X1 asociada a CLIP	-9,28646088
Quitinasa 2	-9,103371236
NA	-9,062705096
Argonauta tipo 10	-8,985563385
Reducción férrica oxidasa mitochondrial	-8,984777608
Factor de procesamiento pre-mRNA 39	-8,963662933
Probable manitol deshidrogenasa	-8,959367083
SRG1	-8,896735803
Transferencia de lípidos no específica At2g13820	-8,822618549
Arabinogalactano tipo fasciclin 12	-8,763976303
Isoforma EPR1 de extensión extensa de prolina X2	-8,630607261
Probable regulador transcripcional SLK2	-8,538755571
tRNA dimetilaliltransferasa 2	-8,517484919
Fagocitos con señales de alteración	-8,26396139
Serina/treonina fosfatasa 7 homólogo de forma larga	-8,261602533
Factor de elongación 1-alfa	-8,233070638
Homólogo 51 asociado a la clasificación vacuolar	-8,225387921
Serina/treonina quinasa tipo receptor ALE2	-8,224724682

Serina treonina - fosfatasa 7 homólogo de forma larga	-8,201905697
Dominio de homología de calponina que contiene DDB_G0272472	-8,128173931
Tricomias birrefringencia-como 43	-8,107437395

u.r., unidades relativas

Tabla 16. Genes regulados positivamente en nódulos con respecto a raíces de plantas de maní

Anotación	Nivel de transcritos (\log_2 u.r)
Citocromo P450 71A1	12,5065483
Activador de la transcripción de unión a calmodulina	10,2864998
Segundo homólogo de transporte /organización de Golgi	9,88181623
Unión a calcio CML19	9,5872448
Prolina BAG6 isoforma - X1	9,3637906
Protoclorofilida reductasa Subunidad de unión a ATP	9,28235992
Lisina cetoglutarato reductasa trans-splicing	9,23640585
Brasinoesteroides insensible	9,10132621
BUD13 homólogo	9,09515681
Dominio Agenet	9,04936861
Canal de calcio de dos poros 1	8,93707958
Citocinina deshidrogenasa 3	8,82253722
Familia DUF936	8,76372497
Pol poli relacionado con el retrovirus TNT 1-94	8,70075826
Receptores ricos en leu de tipo ser-tre quinasa	8,62266089
Ácido graso de cadena larga - AMP Ligasa 28	8,61142155
Nodulina 21 Familia transportadora	8,57047582
Subunidad de protoclorofilida reductasa	8,45128892
CPR-5	8,27908253
NA	8,25215956
Gibberellin 20 oxidasa 1-B-like	8,21051174
PPR	7,97100972
Transportador oligopeptídico 1-like	7,96312979
Fosfato cloroplástico	7,95990168
NA	7,95176509
UDP - glicosiltransferasa 83A1	7,9485005

Miraculina	7,8977805
Zinc matrin-tipo 2	7,86827255
Ciclasa Policétido deshidratasa y transportador de lípidos	7,85532378
Expansina B1	7,83023482

u.r., unidades relativas

En cuanto a los precursores de miARNs, de los 354.535 “*contigs*” ensamblados, 203 se correspondieron con precursores de miARNs conocidos (**Anexo I**), los que dan origen a miARNs maduros pertenecientes a 52 familias. De las 14 familias de miARNs específicos de *A. hypogaea* descritos (miRBase 21) se identificaron 9 a partir del análisis *in silico* realizado en esta tesis, siendo *ahy*-miR3509 el que se encontró más representado (90 transcriptos de su precursor). A partir del análisis transcriptómico se describieron 103 nuevos genes blanco de estos miARNs maduros, un promedio de 5,4 por cada miARN maduro (**Anexo II**). Del total de los “*contigs*” generados, 20 precursores de miARNs se encontraron diferencialmente expresados en nódulos respecto a las raíces, 17 de los cuales corresponden miARNs identificados en otros organismos, y los 3 restantes son específicos de maní (**Tabla 17**). Para cada uno de estos miARNs se identificaron tres potenciales genes blanco. Para aquellos precursores de miARN donde se identificó tanto el miARN funcional como el miARN*, se identificaron los posibles genes blanco de ambos (**Tabla 17**). En algunos casos no se observó *in silico* un patrón de expresión génica compatible con el modo de regulación negativa de los miARNs sobre sus genes blanco. Por otro lado, para algunos miARNs conservados no se identificaron sus genes blanco comúnmente conocidos. Así, por ejemplo para el miR172c no fue posible identificar como potenciales genes blanco a los factores de transcripción AP-2 descritos en numerosos trabajos (Yan y col., 2013; Nova-Franco y col., 2015). Estas incongruencias entre los resultados pueden deberse a inconsistencias en las secuencias publicadas, su anotación o a que, en maní, no constituyen los genes blanco de los miARNs estudiados.

Tabla 17. Precusores de miARNs expresados diferencialmente en nódulos respecto a raíces y sus genes blanco predichos

Precusores de miARNs conservados	Genes blanco predichos
ahy-miR156c	Proteína de unión a promotores squamosa 13 ^a
	Proteína de unión a promotores squamosa 12
	Proteína hipotética JAU43434
gma-miR156c	Proteína de unión a promotores squamosa 13 ^a
	Proteína de unión a promotores squamosa 12
	Transportador catiónico de aminoácidos tipo 1
mtr-miR156b-3p	Proteína de unión a miosina tipo 3
	Superfamilia tipo chaperonas
	Superfamilia tipo chaperonas
mtr-miR156b-5p	Proteína de unión a promotores squamosa 13 ^a
	Proteína de unión a promotores squamosa 12
	NA
ptc-miR156e	Proteína de unión a promotores squamosa 13 ^a
	Proteína de unión a promotores squamosa 12
	Transportador catiónico de aminoácidos tipo 1
ahy-miR159	β -1,4-endo monosidasa 6 isoforma X1
	Superfamilia quinasa
	Factor de elongación 1 gama (EF-1 γ)
mtr-miR160	Factor de respuesta auxina 18 isoforma X1
	Factor de iniciación de la transcripción TFIID subunidad tipo 8
	At2g24240 con dominios BTB POZ
vun-miR162	Factor de transcripción tipo GAMYB
	NA
	f-box 8 tipo tubby
mtr-miR164b	At2g30600 con dominios BTB POZ isoforma X1
	At2g30600 con dominios BTB POZ isoforma X1
	At2g30600 con dominios BTB POZ isoforma X1
cln-miR166	Homebox-leucin zipper tipo REVOLUTA
	Homebox-leucin zipper REVOLUTA

	Homeobox-leucin zipper REVOLUTA
vvi-miR166c	NA
	Homeobox-leucin zipper tipo REVOLUTA
	Homeobox-leucin zipper REVOLUTA
sly-miR167-3p	Ribonucleasa
	Receptor serina/treonina quinasa
	Receptor serina/treonina quinasa
sly-miR167-5p	Fosfatasa específica PAP tipo HAL2
	Factor de respuesta a auxina 6 isoforma X2
	Isovalerina mitocondrial
gma-miR172c	Isoforma 2
	NA
	Familia ligasa sintetasa dependiente
gma-miR390f	NA
	Receptor serina/treonina quinasa ALE2
	NA
gma-miR396a-3p	Polimerasa IV y V subunidad 12
	NA
	Peptido conteniendo tirosina sulfatada 1
gma-miR396a-5p	Factor de regulación del crecimiento 7
	Factor de regulación del crecimiento 7
	NA
gma-miR398	Factor de procesamiento pre-rARN
	Factor de procesamiento pre-rARN
	Factor de transcripción de la familia MYB
pvu-miR399a	Proteína relacionada a la patogénesis tipo 1
	Lacasa tipo 4
	Lacasa tipo 4
ahy-miR408-3p	Peptido cadena relacionado a factor 1 isoforma X2
	Peptido cadena relacionado a factor 1 isoforma X2
	Peptido cadena relacionado a factor 1 isoforma X2
ahy-miR408-5p	Peptido cadena relacionado a factor 1 isoforma X2
	Peptido cadena relacionado a factor 1 isoforma X2
	Peptido cadena relacionado a factor 1 isoforma X2
Precusores de miARNs	

específicos de maní	
ahy-miR3508	Hidrolasa carboxi-teminal ubiquitina isoforma X1
	Pectinesterasa 31
	Factor C (DUF620)
ahy-miR3509-3p	Receptor quinasa rico en prolina isoforma X1
	Receptor quinasa rico en prolina isoforma X1
	Receptor quinasa con dominios lectina tipo L
ahy-miR3509-5p	PIN LIKE tipo 3
	Citocromo P450 71D10
	Citocromo P450 71D10
ahy-miR3516	Factor de transcripción WRKY
	NA
	NA

NA: no anotado. En rojo y en verde se resaltan los genes cuyos transcritos se encuentran en menor y mayor cantidad en nódulos en comparación a raíces, respectivamente.

De acuerdo a estos resultados se seleccionaron algunos miARN y ARNm que mostraron un perfil de expresión diferencial *in silico* en nódulos respecto a raíces de maní, y se diseñaron cebadores específicos con el fin de corroborar su expresión mediante qRT-PCR.

3.3.2 Análisis de la expresión de miARNs y ARNm a los 40 días post-inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144

Se evaluó la expresión de miARN y ARNm en raíces y en nódulos a los 40 días post-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. La poliadenilación fue la estrategia de elongación de la secuencia de miARNs en la síntesis de ADNc empleada en estos ensayos.

De los 4 miARNs seleccionados para su estudio, la expresión de *ahy*-miR159 y *ahy*-miR399 se encontró inducida en los nódulos respecto a las raíces (**Figura 30**), sugiriendo que estos genes están vinculados a la nodulación de maní.

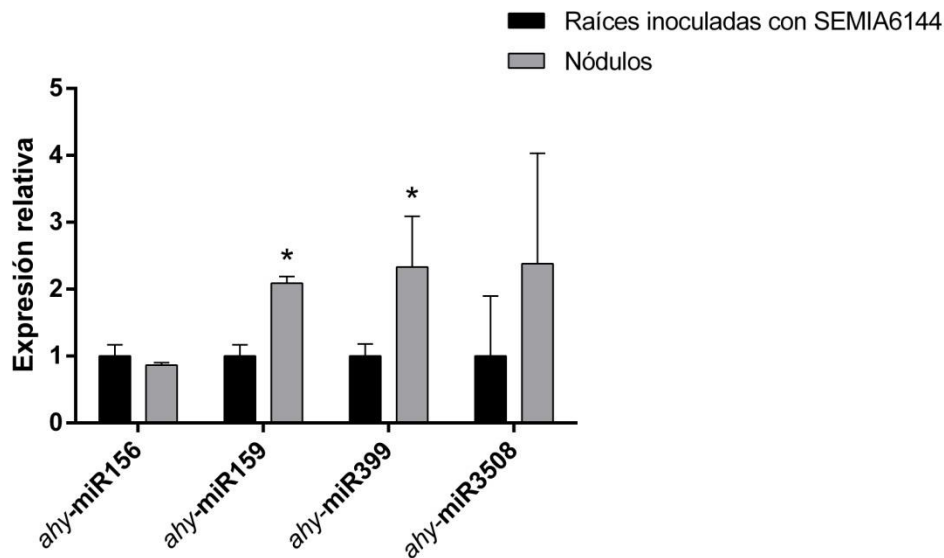


Figura 30. Expresión génica de miARNs en raíces y nódulos de plantas de maní a los 40 dpi de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Los datos representan la media \pm E.E de 3 réplicas biológicas con un n=4. Los asteriscos dentro de un gráfico indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de Test-t ($p < 0,05$).

Con el fin de corroborar la participación en la nodulación de maní de ambos miARNs expresados diferencialmente, se propuso cuantificar la expresión de sus potenciales genes blanco. Debido a la función que cumplen los miARNs, es de esperar que un incremento en la expresión del gen que los codifica esté acompañado por una disminución en la expresión de su gen blanco. Es por ello que como criterio para la selección del gen blanco a evaluar se estableció que su nivel de expresión predicha *in silico* en nódulos sea menor que en raíces. En consecuencia, para el *ahy-miR159* se seleccionó el EF-1 γ y para el *ahy-miR399* la lacasa-4, y su expresión fue cuantificada mediante qRT-PCR.

La curva de disociación de los productos de la reacción de qRT-PCR indicó la presencia de un único pico para cada uno de los transcritos estudiados (**Figura 32**). Además, en las gráficas de las curvas de disociación pudo apreciarse la presencia de un pico en el control negativo de la reacción que posee bajo nivel de fluorescencia y una temperatura de disociación menor a la del producto de interés, lo que permitió inferir que se corresponde a la formación de dímeros de cebadores (**Figura 31 A yB**).

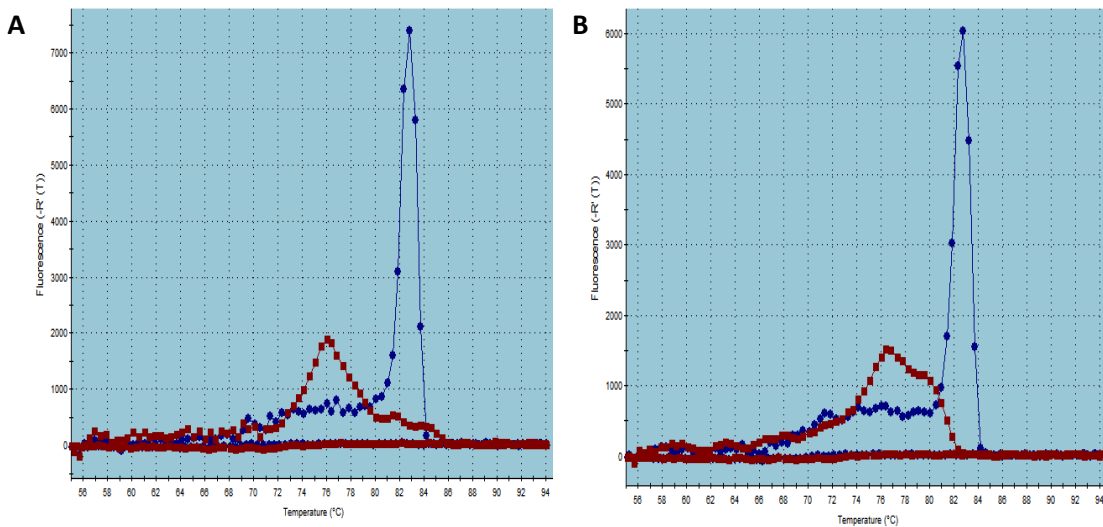


Figura 31. Curva de disociación. **A.** EF-1 γ , **B.** Lacasa-4. Línea azul: ADNc como molde. Línea roja: control negativo de la reacción.

Mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos a partir de las reacciones de qRT-PCR se comprobó la presencia de una banda única y del tamaño esperado para cada uno de ellos. Además se corroboró que los picos observados en los controles negativos de la curva de disociación corresponden a dímeros de cebadores (**Figura 32**).

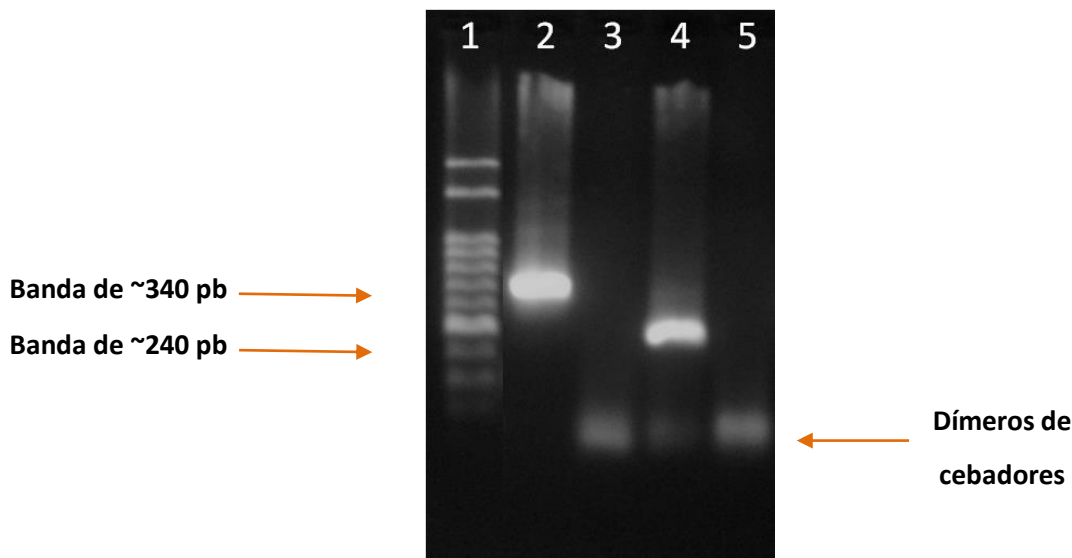


Figura 32: Productos de amplificación obtenidos mediante qRT-PCR. **1.** Marcador de 50pb. **2.** producto amplificado utilizando los cebadores EF-1 γ empleando ADNc como molde (~340 pb). **3.** Control negativo de la reacción de PCR empleando los cebadores EF-1 γ . **4.** Productos amplificados con los cebadores Lac-4 utilizando ADNc como molde (~240 pb). **5.** Control negativo de la reacción de PCR empleando los cebadores Lac-4.

Los productos amplificados fueron secuenciados y, utilizando el programa ClustalW y las secuencias de los genes del EF-1 γ del parental de maní (XM_016082025.2) (*A. duranensis*) y de la lacasa-4 del otro parental (XM_016328417.2) (*A. ipaensis*), se obtuvieron las secuencias consenso. El análisis de la secuencia del gen EF-1 γ reveló que posee un 99 y 98% de identidad con las del mismo gen presente en los genomas de *A. duranensis* y *A. ipaensis*, respectivamente (porcentaje de cobertura de la secuencia del 98% en ambos casos). Para el gen de la lacasa-4 se obtuvo un 98 y 99% de identidad con el homólogo de *A. duranensis* y *A. ipaensis*, respectivamente (porcentaje de cobertura de la secuencia del 100% en ambos casos). Por lo tanto, se concluye que los productos amplificados se corresponden con fragmentos de los genes EF-1 γ y lacasa-4.

Para verificar la eficiencia de la reacción de qRT-PCR se realizó una curva estándar para cada uno de los transcritos de interés evaluados. En todos los casos la linealidad de la curva, denotada por el valor de R^2 , fue cercana a 1, lo que indica que la eficiencia de la amplificación es constante a medida que varía la concentración de ADNc molde. Por otra parte, los valores de las pendientes de las rectas obtenidas para cada uno de los genes evaluados variaron entre -3,05 y -3,45, indicando que la eficiencia de la reacción es del 90-100 % (**Figura 33 A y B**).

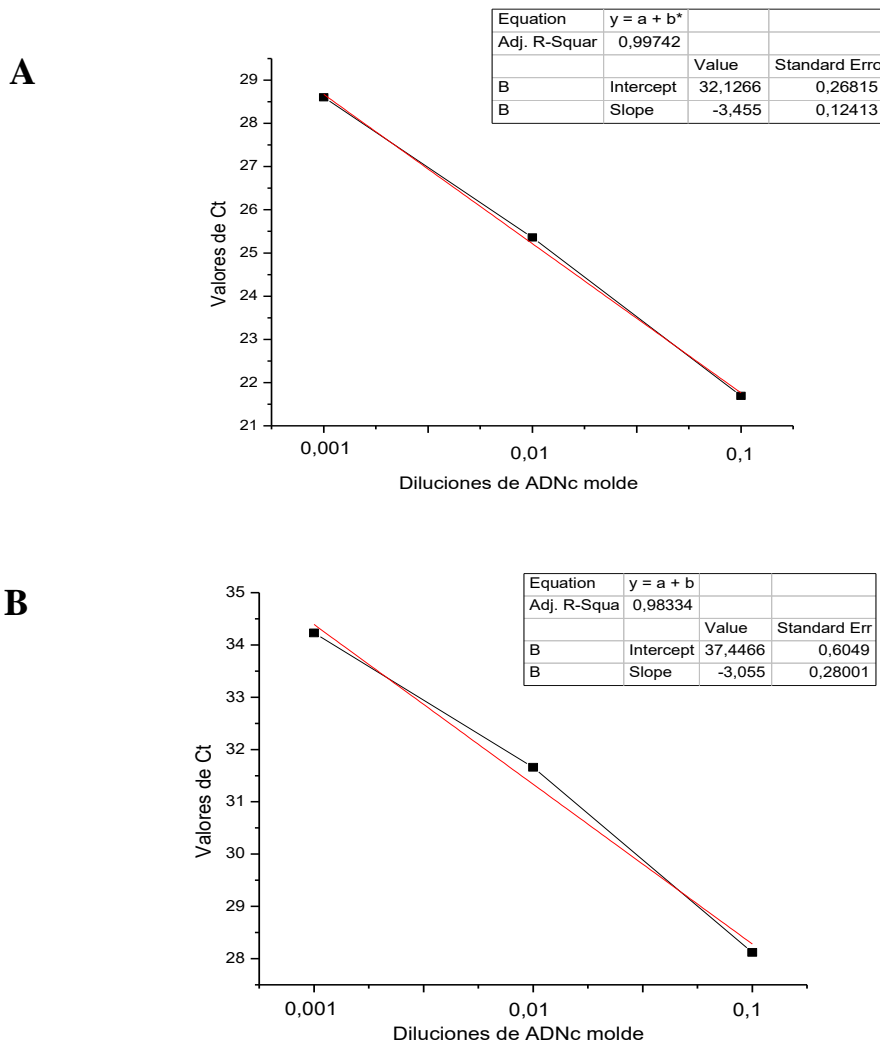


Figura 33. Curva estándar de la reacción qRT-PCR para la amplificación de **A.** EF-1 γ , y **B.** Lacasa-4. Se muestran los valores de Ct vs. concentraciones crecientes de ADNc molde. Se incluye la ecuación de la recta y el valor del coeficiente de correlación.

Una vez optimizada la metodología, se procedió a la cuantificación relativa de los transcritos de los genes que codifican EF-1 γ y lacasa-4 en nódulos y en raíces a los 40 días post-inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Los resultados indicaron que la expresión del gen que codifica el EF-1 γ está reducida en nódulos en comparación con las raíces, y no se detectaron transcritos correspondientes al gen que codifica para la lacasa-4 (**Figura 34 A y B**).

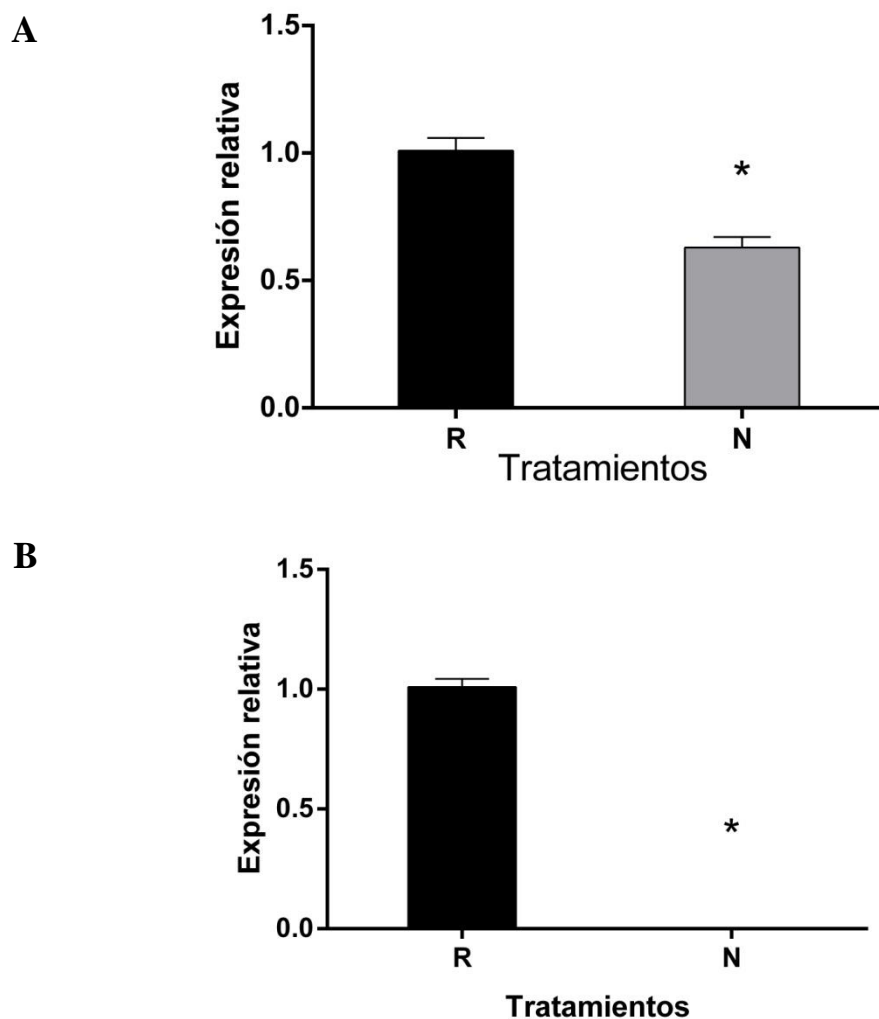


Figura 34. Expresión génica en nódulos y raíces de plantas de maní 40 dpi de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. **A.** EF-1 γ , y **B.** Lacasa-4. Los datos representan la media \pm E.E de 2 réplicas biológicas con un n=4. El asterisco indica diferencia significativa de acuerdo la prueba de Test-*t* de Student ($p < 0,05$). **R:** raíces inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, **N:** nódulos

Analizados en conjunto, los resultados obtenidos en la evaluación del patrón de expresión génica de *ahy-miR159* y *ahy-miR399* y sus correspondientes genes blanco EF-1 γ y lacasa-4, sugieren que estos nodos regulatorios participarían en la interacción simbiótica maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144.

Wang y col., (2009) reportaron que en la leguminosa *M. truncatula* la expresión del miR399 se encuentra inducida en nódulos respecto a raíces. Además, en *Arabidopsis* (Chiou y col., 2006) y poroto (Valdés-López y col., 2008) se ha informado que la expresión de este miARN se induce en condiciones deficientes de P, y que, a diferencia de lo encontrado en esta tesis para maní, su gen blanco codifica una ubiquina E2 conjugasa.

Hasta nuestro conocimiento, los genes que codifican para lacasas no han sido previamente identificados como blanco de miR399 en otras plantas, por lo que estos resultados podrían indicar una nueva función para el miR399 en maní. Las lacasas son glicoproteínas que contienen 4 átomos de Cu^{2+} y catalizan la oxidación de diferentes sustratos con la consecuente producción de agua y un oligómero oxidado. Estas proteínas están involucradas en la biosíntesis de lignina, adquisición de hierro, respuesta al estrés, mantenimiento de la integridad y estructura de las paredes celulares (Abdel-Ghany y Pilon, 2008). A diferencia de lo observado en maní, se ha reportado que en *G. max* y *L. japonicus* es el miR397 el que regula negativamente la traducción de genes que codifican para lacasas durante la nodulación (Yan y col., 2015; De Luis y col., 2012). En dichas leguminosas, el nodo regulatorio miR397/lacasa estaría implicado en la homeostasis del Cu^{2+} durante la FBN. Como es conocido, la FBN es energéticamente muy costosa, por lo que se requiere de una tasa respiratoria elevada para sostener la alta demanda de ATP. La producción eficiente de ATP es garantizada mediante una cadena transportadora de electrones especializada que culmina con una citocromo oxidasa tipo bb3 que contiene Cu^{2+} (cbb3) con alta afinidad por el O_2 . La disponibilidad de Cu^{2+} parece ser crucial para el funcionamiento de este complejo (Arunothayanan y col., 2010). En *Arabidopsis* se ha reportado que, en condiciones deficientes de Cu^{2+} , se activa la expresión de un conjunto de miARNs (miR397, miR408, miR857 y miR398) que regulan negativamente la traducción de transcriptos que codifican para proteínas que contienen Cu^{2+} (lacasas, plantacianinas y superóxido dismutasas), incrementándose de este modo la disponibilidad de este metal para su uso en procesos celulares esenciales para la planta (Abdel-Ghany y Pilon, 2008). Teniendo esta información en consideración, es posible inferir que, en maní, el incremento en la expresión génica del *ahy*-miR399, y la consecuente disminución de los niveles de expresión del gen que codifica para la lacasa-4, estarían relacionados con la homeostasis del Cu^{2+} en nódulos activos, lo que sería requerido para una eficiente FBN.

Con respecto al miR159, su expresión en *G. max* ha sido vinculada a las primeras etapas del desarrollo de nódulos (Subramanian y col., 2008) mientras que en *M. truncatula* se ha demostrado que su expresión se incrementa en nódulos respecto a raíces (Wang y col., 2009). En las plantas estudiadas hasta el momento, se han identificado como genes blanco de este miARN los que codifican factores de transcripción MYB, implicados en múltiples procesos biológicos. En cambio, en maní, los análisis bioinformáticos realizados en esta tesis basados en su transcriptoma identificaron al gen que codifica para el EF-1 γ

como potencial transcripto blanco del *ahy-miR159*, sugiriendo una nueva función para dicho miARN en esta leguminosa. El complejo eucariótico EF-1 está constituido por un conjunto de proteínas solubles que asisten a la traducción proveyendo aa-ARNt a la maquinaria involucrada en este proceso. En plantas, el EF-1 está conformado por las subunidades EF-1 α , EF-1 β , EF1- β' y EF-1 γ , que cumplen diferentes roles durante la traducción de ARNm (Sasikumar y col., 2012). Se ha demostrado que un incremento en los niveles del EF1 se correlaciona con la activa síntesis proteica que ocurre en los tejidos en desarrollo (Pokalsky y col., 1989). Dado que a los 40 días post-inoculación los nódulos ya se encuentran completamente desarrollados en maní, es posible que el incremento en la expresión del *ahy-miR159* y la consecuente disminución de la expresión del EF-1 γ en dichos órganos se correlacione con una menor actividad de síntesis de proteínas en comparación con las raíces. La regulación post-transcripcional del EF-1 γ mediada por *ahy-miR159* en nódulos de maní, se presenta entonces como un posible mecanismo por el cual la planta controlaría la síntesis proteica nodular.

No obstante, para confirmar estos hallazgos en maní, sería necesario identificar, mediante la técnica de 5' RACE (de su sigla en inglés: “*Rapid Amplification of cDNA Ends*”) en los transcriptos de EF-1 γ y las lacasas, los sitios de cortes de los miR159 y miR399, respectivamente.

Por otra parte, los estudios realizados con el fin de identificar ARNm vinculados a la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 revelaron que la expresión génica de la nodulina 21 y una proteína putativa canal de calcio voltaje dependiente se encuentra incrementada en nódulos respecto a raíces inoculadas (**Figura 35 A y B**).

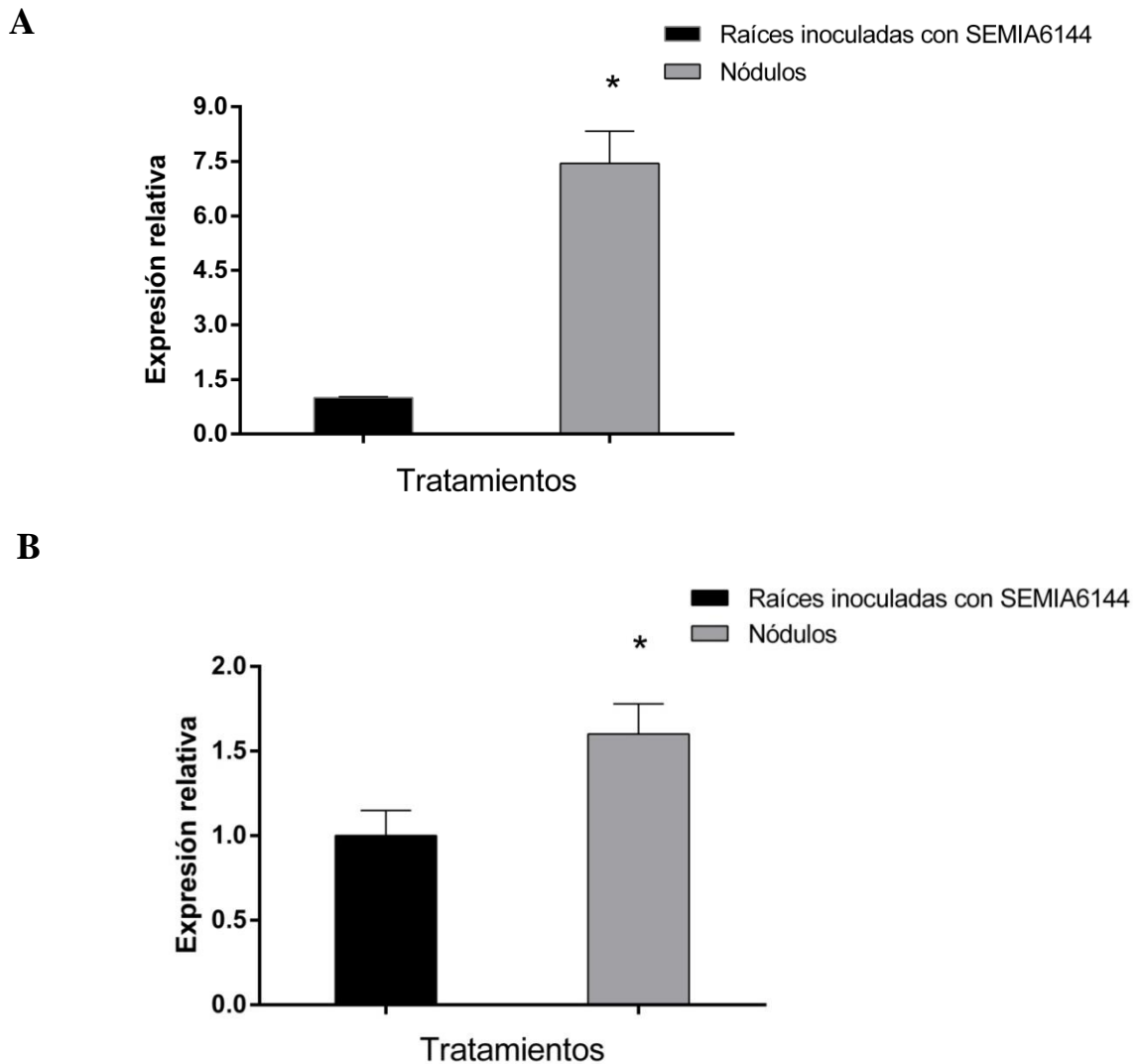


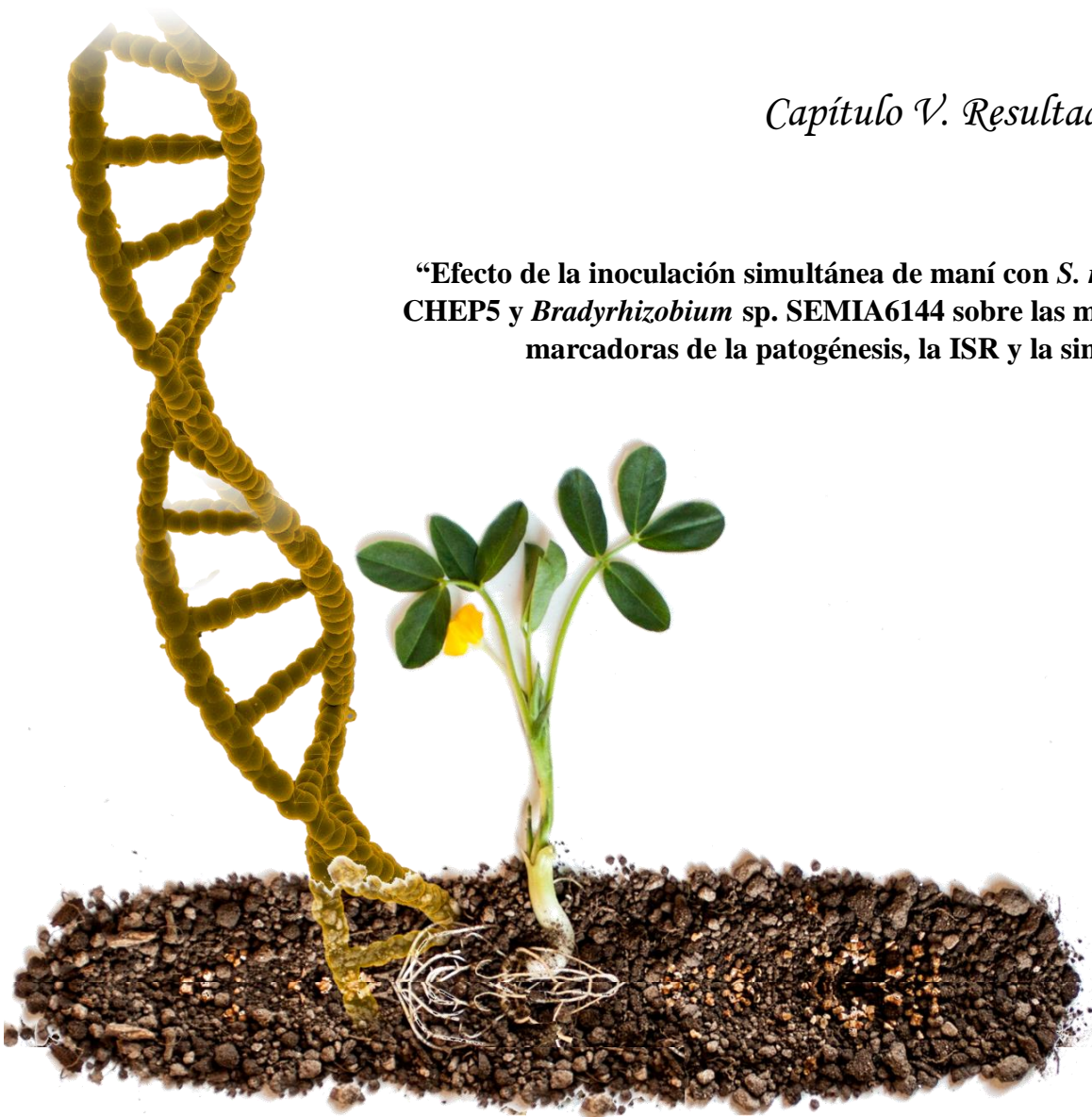
Figura 35. Expresión génica en raíces y nódulos de plantas de maní a los 40 dpi de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. **A**, nodulina 21, y **B**, proteína putativa canal de calcio voltaje dependiente. Los datos representan la media \pm E.E de 3 réplicas biológicas con un n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de Test-t ($p < 0,05$).

La nodulina 21 es una proteína de membrana con función desconocida, cuya expresión en nódulos de *G. max* es más alta que en raíces (Delauney y col., 1990). Además, plantas de *M. truncatula* mutantes en un gen homólogo a la nodulina 21 (SEN1) forman nódulos no funcionales (Hakoyama y col., 2012), indicando su participación en la simbiosis rizobios-leguminosas. Por otra parte, las proteínas canales de calcio voltaje dependiente han sido ampliamente vinculadas con la señalización celular e implicadas en múltiples procesos biológicos incluyendo la nodulación (Dodd y col., 2010). Estos antecedentes, y los resultados obtenidos en esta tesis, permiten sugerir que, también en maní, ambas proteínas podrían estar implicadas en el funcionamiento de nódulos.

Considerando en conjunto los resultados presentados en este capítulo, se propone como marcadores de a) patogénesis, a la actividad de enzimas PXs, b) de ISR, a los compuestos fenólicos, y c) de simbiosis a los miARNs *ahy-miR159* y *ahy-miR399*, la nodulina 21 y la proteína putativa canal de calcio voltaje dependiente.

Capítulo V. Resultados y discusión

“Efecto de la inoculación simultánea de maní con *S. rolf sii*, *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre las moléculas vegetales marcadoras de la patogénesis, la ISR y la simbiosis rizobiana”



Efecto de la inoculación simultánea de maní con *S. rolf sii*, *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre las moléculas vegetales marcadoras de la patogénesis, la ISR y la simbiosis rizobiana

En su ambiente natural, las plantas no pueden considerarse como un organismo aislado. Es necesaria una mirada holística que contemple la amplia variedad de microorganismos asociados a ellas para comprender acabadamente su fisiología. Particularmente, el microbioma rizosférico ha sido ampliamente estudiado. Su composición está regulada por factores bióticos y abióticos, y depende fundamentalmente de una comunicación dinámica no sólo de los microorganismos con las plantas sino también entre ellos. Esta comunicación ocurre mediante moléculas que son secretadas por ambos tipos de organismos, o bien que constituyen componentes estructurales. El diálogo molecular que se establece le permite a las plantas reconocer y discriminar entre agentes benéficos y patógenos (Smith y col., 2015). Luego que las plantas perciben a un microorganismo que comparte con ellas un determinado ecosistema, es posible que se desencadene una cascada de señalización que culmina con la respuesta defensiva vegetal y/o el establecimiento de una interacción benéfica. Sin embargo, dichas interacciones pueden modificarse en función de la composición de la microbiota circundante y de esta forma afectar positiva o negativamente la asociación planta-microorganismo (Berg, 2009). El efecto de un grupo de microorganismos sobre la interacción entre la planta y otro grupo particular de microorganismos puede ser consecuencia de diversos factores, como la ocurrencia de cambios en el perfil cuanti- y/o cualitativo de exudados radicales, en la producción de moléculas señal de los microorganismos y de fitohormonas, en la colonización de los tejidos vegetales, entre otras (Morel y col., 2015; Zhang y col., 2016), lo que puede influir en la vía de señalización molecular de cada asociación planta-microorganismo (Lopez-Gomez y col., 2012; Xie y col., 2017). Así, por ejemplo, se ha demostrado que cuando plantas de *M. truncatula* son inoculadas con su microsimbionte, *S. meliloti*, y la bacteria patógena *P. syringae* ocurren cambios en moléculas marcadoras de la simbiosis y de la patogénesis que afectan negativamente tanto el fenotipo simbiótico como el desarrollo de la enfermedad causada por el patógeno (Chen y col., 2017).

Con el objetivo de evaluar si los efectos demostrados en esta tesis sobre las actividades de promoción de crecimiento vegetal y la patogénesis que resultan de la inoculación simultánea de maní con *S. rolf sii*, *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 están asociados con alteraciones en las moléculas vegetales marcadoras de dichos procesos, se planteó estudiar en plantas co-inoculadas la actividad PX (como

marcador de patogénesis), la acumulación de compuestos fenólicos (como marcador de ISR) y la expresión génica de *ahy-miR159*, *ahy-miR399*, *Ahsymrk*, nodulina 21 y una proteína canal de calcio voltaje dependiente (como marcadores de simbiosis).

1. Efecto de la inoculación simultánea de maní con *S. rolf sii*, *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre la actividad PX vinculada a la patogénesis

En el *Capítulo III* se propuso que, considerando que *S. rolf sii* es un patógeno necrótrofo, la menor incidencia y severidad de la enfermedad determinada en plantas de maní co-inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 podría relacionarse con la fortificación de la pared celular y/o con un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, como parte de la inmunidad sistémica inducida por estas PGPBs. Por otra parte, en el *Capítulo IV* se demostró que la actividad PX de maní, determinada a las 48 ó 72 horas post-inoculación de *S. rolf sii*, podía considerarse como marcador molecular de patogenicidad. Con el objetivo de estudiar si el efecto protector mediado por la inoculación de los microorganismos benéficos *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 está asociado a cambios en la actividad PX en estas plantas, se cuantificó dicha actividad enzimática en plantas co-inoculadas a las 24 y 48 horas post-inoculación de *S. rolf sii*. La determinación de la actividad PX a las 24 horas post-inoculación del patógeno se realizó considerando que *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 protegen a maní contra *S. rolf sii* mediante ISR, mecanismo por el cual la respuesta defensiva se activa más rápidamente (van Loon y col., 1998).

Como era esperable, la inoculación bacteriana (en ausencia del fitopatógeno) no modificó la actividad enzimática. En cambio, en plantas desafiadas con *S. rolf sii* e inoculadas sólo con *Bacillus* sp. CHEP5 o en combinación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, se observó un incremento en la actividad PX a las 24 horas post-inoculación respecto a las desafiadas sólo con el fitopatógeno (controles positivos de patogenicidad), retornando a las 48 horas post-inoculación a los valores determinados en plantas sin inocular. Por otra parte, la ausencia de cambios en la actividad PX de plantas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 respecto a controles positivos de patogenicidad sugiere que estas enzimas no estarían involucradas en la protección inducida por este microorganismo (**Figura 36**).

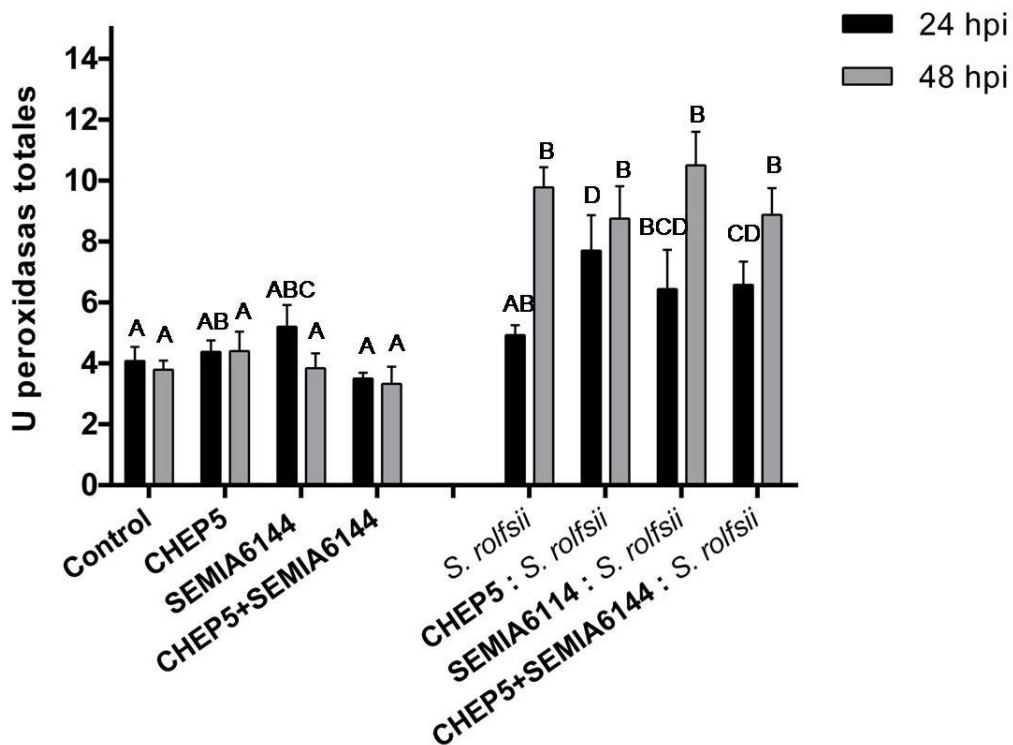


Figura 36. Cuantificación de la actividad de PXs totales en tallos de plantas de maní inoculados con *S. rolfsii* a las 24 y 48 horas post-inoculación. Los datos representan la media \pm E.E de dos ensayos con n=10 cada uno. Las letras diferentes para un mismo tiempo indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de LSD Fisher ($p < 0,05$). **hpi**: horas post-inoculación. **U**: unidades.

En conjunto, estos resultados indican que, en concordancia con la hipótesis planteada, el incremento en la actividad PX a las 24 post-inoculación estaría asociado a la protección contra *S. rolfsii* inducida por la co-inoculación de *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Los datos obtenidos también ponen en evidencia la inducción de “priming” durante la ISR ya que la respuesta de defensa frente a *S. rolfsii* ocurre más tempranamente en plantas que previamente fueron inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 o con ambas PGPBs. Además, se observa que el incremento en la actividad PX se produce sólo si *Bacillus* sp. CHEP5 está presente, y que el mismo no es afectado por el microsimbionte. Por lo tanto, al igual que la acumulación de compuestos fenólicos, esta actividad enzimática podría también vincularse a la ISR elicitada por *Bacillus* sp. CHEP5. Este hecho es congruente con la ausencia de cambios fenotípicos asociados a dicha resistencia sistémica contra el patógeno en aquellos tratamientos en los que se co-inoculan las dos PGPBs.

Numerosos autores han informado que plantas inoculadas con bacterias biocontroladoras y desafiadas con fitopatógenos exhiben un incremento en las actividades de diferentes enzimas implicadas en la defensa vegetal, respecto a plantas controles de patogenicidad (Senthilraja y col., 2013, Babu y col., 2015, Konappa y col., 2016, entre otros). Doley y col. (2017) informaron que plantas de maní inoculadas con los hongos benéficos *Trichoderma viride* y *Glomus fasciculatum*, y desafiadas con *S. rolf sii*, presentan mayor actividad de enzimas antioxidantes (entre ellas PX) que las inoculadas sólo con el fitopatógeno. Dicho incremento en la respuesta defensiva de la planta se correlacionó con una mayor resistencia al ataque de *S. rolf sii*. Por su parte, Asselbergh y col. (2007) reportaron que la actividad PX en plantas de tomate resistentes a *B. cinerea* fue más alta y se incrementó más temprano que en plantas de tomate susceptibles. Además, los autores demostraron que la actividad de estas enzimas está relacionada con la fortificación de la pared celular vegetal mediante el entrecruzamiento de sus componentes y la deposición de lignina. Por lo tanto, es posible proponer que, en maní, las enzimas PXs cumplen un rol en la modificación de la composición y/o estructura de la pared celular, lo que impide o retrasa la entrada de *S. rolf sii* al tejido vegetal.

2. Efecto de la inoculación simultánea de maní con *S. rolf sii*, *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre la acumulación de compuestos fenólicos asociada a la ISR

Los resultados presentados en el *Capítulo III* demuestran que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 no afecta la capacidad de *Bacillus* sp. CHEP5 de inducir en maní una respuesta de defensa sistémica contra *S. rolf sii*. Por otra parte, en el *Capítulo IV* se demostró que la acumulación de compuestos fenólicos totales en plantas de maní es un fenómeno vinculado con dicha ISR. Por lo tanto, es esperable que la presencia de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 no modifique el contenido de compuestos fenólicos totales de plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5. Con el propósito de confirmar esta hipótesis se analizó el contenido de estas moléculas en plantas co-inoculadas.

Los resultados demostraron que, como era esperable, en ausencia del fitopatógeno, la acumulación de compuestos fenólicos totales no varió entre los tratamientos. En cambio, en presencia del fitopatógeno, se observó un aumento significativo en plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 o con *Bacillus* sp. CHEP5 con respecto a plantas sin inocular. Ello permite suponer que no sólo la protección contra *S. rolf sii* inducida por *Bacillus* sp. CHEP5, sino también la mediada por *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144

(resultados mostrados en el *Capítulo III*) se asocia con la acumulación de compuestos fenólicos en plantas de maní. En este sentido, Azpilicueta y col. (2004) informaron que *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 induce en maní la síntesis sistémica de fitoalexinas, compuesto fenólico que inhibe el crecimiento de los fitopatógenos *Aspergillus niger* y *Cladosporium cucumerinum*. También Das y col. (2017) reportaron que cepas rizobianas protegieron sistémicamente a diferentes cultivos del ataque de fitopatógenos a través de la acumulación de compuestos fenólicos.

Sin embargo, contrariamente a lo hipotetizado, se encontró que en plantas co-inoculadas la acumulación de compuestos fenólicos es inferior a la observada en las inoculadas sólo con una de las cepas bacterianas, sin diferir de los valores obtenidos en las plantas controles de patogenicidad (**Figura 37**). Estos resultados son contrapuestos a los informados por Dutta y col. (2008) quienes encontraron que la co-inoculación en garbanzo con las cepas inductoras de resistencia sistémica *Bacillus* sp. BS03 o *Pseudomonas* sp. RRLJ04 y la cepa rizobiana RH2 indujo un incremento del contenido de compuestos fenólicos totales respecto a plantas inoculadas sólo con las cepas biocontroladoras, lo que se tradujo en mayor resistencia al fitopatógeno *Fusarium udum*. Resultados similares fueron encontrados por Singh y col. (2013; 2014), Doley y col. (2017), entre otros.

Las diferencias entre el contenido de compuestos fenólicos en plantas de maní co-inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y las inoculadas individualmente con cada cepa, podría deberse a cambios en la percepción de estas bacterias por la planta cuando ambas están colonizando simultáneamente la raíz, los que no afectan la protección sistémica (**Tabla 5** y **Figura 12**). En este sentido, Morel y col. (2015) informaron que en plantas de alfalfa co-inoculadas con *S. meliloti* y *Delftia* sp. el perfil de compuestos bioactivos (flavonoides, ácidos orgánicos y compuestos volátiles) secretados por la planta cambia respecto a los exudados por las plantas inoculadas sólo con una PGPB.

Se concluye, por lo tanto, que sólo en plantas inoculadas individualmente con las bacterias estudiadas, la protección frente a *S. rolf sii* estaría asociada a la producción de compuestos fenólicos.

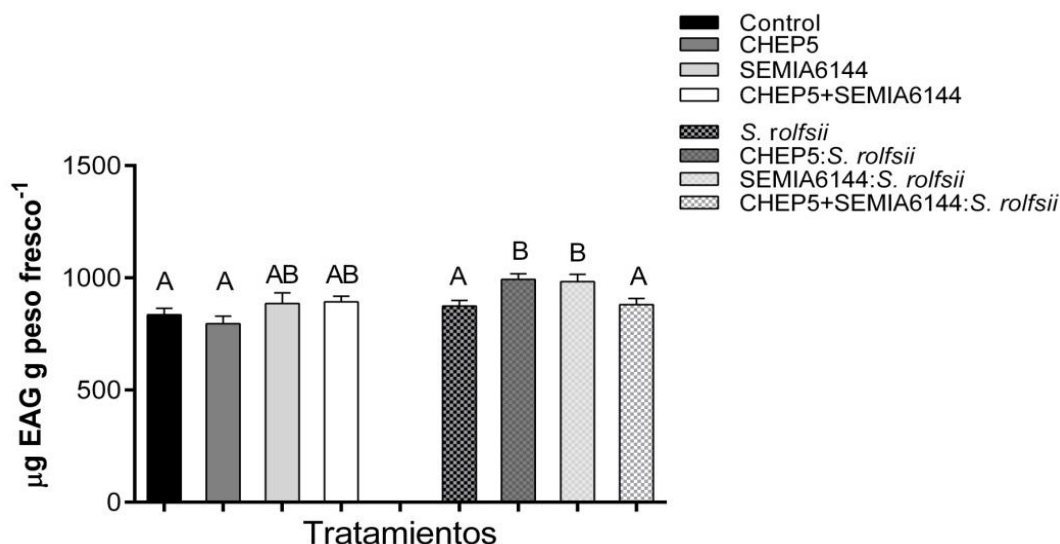


Figura 37. Cuantificación de compuestos fenólicos en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. CHEP5 y/o *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 48 horas post-inoculación de *S. rolf sii*. **EAG:** equivalentes de ácido gálico. Los datos representan la media ± E.E de tres ensayos con n=5-10. Los letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de LSD Fisher (p<0,05).

3. Efecto de la inoculación simultánea de *S. rolf sii*, *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sobre la expresión de genes marcadores de la simbiosis rizobiana

Los resultados presentados en el *Capítulo III* demostraron que la interacción simultánea de plantas de maní con ambas PGPBs y el fitopatógeno afecta parcialmente el fenotipo simbiótico, disminuyendo sólo el porcentaje de nódulos rojos y de plantas noduladas. En cambio, en ausencia de *Bacillus* sp. CHEP5, el efecto negativo de la interacción con el patógeno fue aún más marcado, reduciéndose además el número y peso seco de los nódulos formados. Por lo tanto, se propuso que, en dichas condiciones, la vía de respuesta defensiva en maní prevalece sobre la simbiótica. Con el fin de corroborar esta hipótesis, se cuantificó la expresión génica de las moléculas marcadoras de etapas tempranas (9 días post-inoculación) y tardías (40 días post-inoculación) de la simbiosis, previamente seleccionadas en el *Capítulo IV*, en plantas inoculadas simultáneamente con los tres microorganismos evaluados. Como parámetro fenotípico de las etapas tempranas se tomó en cuenta el número de nódulos, mientras que para las tardías el porcentaje de nódulos rojos y el contenido de N (datos mostrados en la **Tabla 9** y **Figura 16**).

3.1 Expresión del gen *Ahsymrk* en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144

En primer lugar, se realizaron ensayos para seleccionar el gen normalizador a utilizar en la cuantificación relativa de la expresión del gen *Ahsymrk*. Se analizaron los genes *Ahactina* y *Ahubiquitina*, ambos habitualmente utilizados en el laboratorio aunque bajo condiciones diferentes a las de este trabajo. Se evaluó la estabilidad de su expresión en los diferentes tratamientos. Se determinó que el gen *Ahactina* presentó menor variación de los valores de Ct entre los tratamientos (Δ Ct de entre 0,44 y 1,15 respecto al control) que el gen *Ahubiquitina* (Δ Ct de entre 0,03 y 2,37 respecto al control) (**Tabla 18**).

Tabla 18. Valores promedios de los Cts obtenidos a partir de los ensayos de qRT-PCR.

Tratamientos	Ct para el gen	Δ Ct	Ct para el gen	Δ Ct
	<i>Ahactina</i>	<i>Ahactina</i>	<i>Ahubiquitina</i>	<i>Ahubiquitina</i>
Control	27,99		25,28	
SEMIA6144	28,51	0,52	25,74	0,46
SEMIA6144: <i>S. rolf sii</i>	29,14	1,15	27,65	2,37
SEMIA6144+CHEP5	28,43	0,44	26,00	0,72
SEMIA+CHEP5: <i>S. rolf sii</i>	28,63	0,64	25,25	0,03

De acuerdo a estos resultados, se seleccionó *Ahactina* como gen normalizador. La expresión del gen *Ahsymrk* fue cuantificada en raíces de plantas de maní a los 9 días post-inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y/o *Bacillus* sp. CHEP5, en presencia o ausencia de *S. rolf sii*.

Se determinó que, cuando maní interacciona con los tres microorganismos, el nivel de expresión génica del *Ahsymrk* no se modificó con respecto a plantas inoculadas sólo con el microsimbionte (**Figura 38**), en coincidencia con la ausencia de cambios en el número de nódulos de estas plantas (**Tabla 9**). En cambio, en ausencia de *Bacillus* sp. CHEP5, se observó una disminución en la expresión de este gen que se correlacionó con el marcado efecto negativo de *S. rolf sii* sobre dicho parámetro simbiótico. Estos resultados indican que la presencia de este fitopatógeno en las etapas tempranas de la interacción de maní con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 (7 días post-inoculación del microsimbionte) afecta la señalización simbiótica, y como consecuencia se restringirían las divisiones corticales que se inducen por esta vía, lo que resulta en la formación de un menor número

de nódulos en dichas plantas. Resultados similares fueron informados en *L. japonicus* (Lopez-Gomez col., 2012) y *M. truncatula* (Chen y col., 2017).

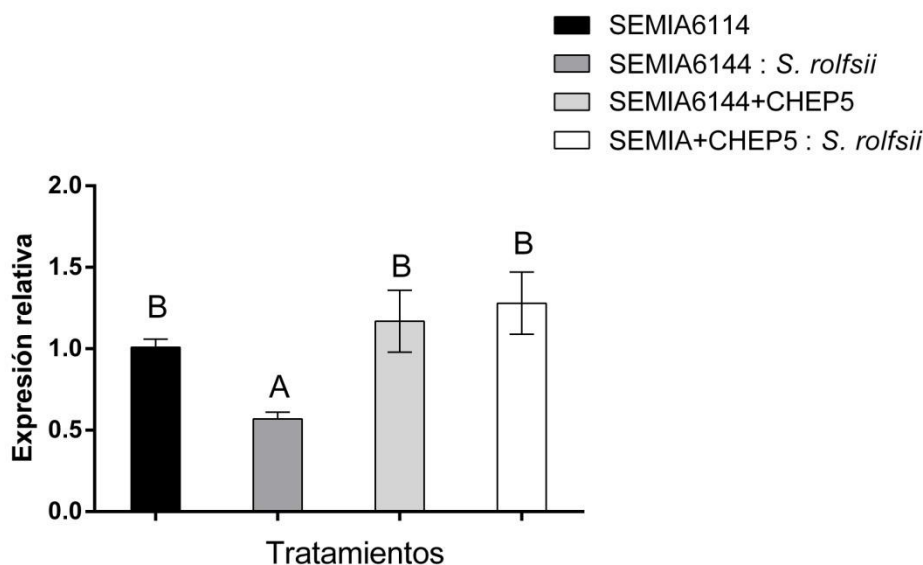


Figura 38. Expresión del gen *Ahsymrk* en raíces de plantas de maní 9 días post-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Los datos representan la media \pm E.E de 2 réplicas biológicas con un $n=4$. El asterisco indica diferencia significativa de acuerdo la prueba de LSD Fisher ($p<0,05$).

Por otra parte, la expresión génica del *AhSymRK* en plantas co-inoculadas (desafiadas o no con *S. rolfsii*) no difirió de las inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, lo que también está en concordancia con la ausencia de cambios en el número de nódulos formados en ambos tratamientos. Ello no sólo corrobora que *Bacillus* sp. CHEP5 revierte el efecto negativo del fitopatógeno en la expresión de *AhSymRK*, sino que además demuestra que la inoculación de este agente de biocontrol no interfiere en la vía simbiótica. El efecto positivo de *Bacillus* sp. CHEP5 podría ser consecuencia de que, tal como se describió en el Capítulo III, esta PGPB incrementa la colonización de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, lo que podría redundar en una aceleración de la cinética de nodulación. Por lo tanto, cuando la planta se enfrenta con el fitopatógeno y activa su respuesta defensiva, podría haber ya ocurrido un mayor número de eventos de infección rizobiana, y la organogénesis del nódulo podría encontrarse más avanzada en plantas co-inoculadas que en plantas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144.

En conjunto, la información obtenida indica que en maní existe una correlación entre la expresión de *Ahsymrk* y parámetros vinculados a las etapas tempranas de su

interacción con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. Resultados similares fueron informados por Xie y col. (2017) quienes reportaron un incremento en el número y peso seco de nódulos, y en el contenido de nitrógeno en plantas de maní inoculadas con el hongo benéfico *P. liquidambari*, y comprobaron que dichas variaciones fenotípicas se correlacionan con un incremento en la expresión de gen *Ahsymrk* a los 5 días post-inoculación.

3.2 Expresión de genes marcadores de las etapas tardías de la simbiosis (funcionamiento de nódulos)

La expresión de los genes *ahy-miR159*, *ahy-miR399*, nodulina 21 y proteína putativa canal de calcio voltaje dependiente fue analizada en nódulos maduros formados por *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. No se observó variación en el nivel de transcritos de ninguno de los genes evaluados entre plantas que interaccionan con los tres microorganismos y las inoculadas sólo con su microsimbionte (**Figura 39**). Ello se correlaciona con la ausencia de cambios en el contenido de N determinado en dichos tratamientos. Sin embargo, considerando además que en estas plantas el porcentaje de nódulos rojos disminuyó, es posible proponer que los genes evaluados no participen del proceso de control de los niveles de leghemoglobina en nódulos.

Por otro lado, en plantas tratadas con *Bacillus* sp. CHEP o *S. rolf sii* tampoco se observaron diferencias en la expresión de los genes *ahy-miR159* y *ahy-miR399* (**Figura 39**). Teniendo en cuenta que en maní el *ahy-miR159* controla la expresión del EF-1 γ , y que éste estaría implicado en la activa síntesis proteica de los tejidos en desarrollo, no fue inesperado encontrar que su expresión no se modifique en nódulos analizados a los 40 días post-inoculación, ya que a este tiempo se trata de órganos maduros. Con respecto al *ahy-miR399*, su función se relaciona con el mantenimiento de la homeostasis del Cu⁺² requerida durante el proceso de FBN. Considerando que en las plantas desafiadas con el patógeno su expresión no se modifica, aunque el contenido de N es menor al de plantas controles, parece probable entonces que dicha homeostasis es importante aún para el mantenimiento de bajos niveles de FBN.

La expresión de la nodulina 21 y la proteína putativa canal de calcio voltaje dependiente se reprime tanto en nódulos de plantas co-inoculadas con ambas PGPBs como en los de las desafiadas con *S. rolf sii* (**Figura 39**). Sin embargo, el contenido de N de las plantas co-inoculadas no se afecta negativamente. Esto podría deberse al aporte de este nutriente por *Bacillus* sp. CHEP5. En este contexto, es posible que la contribución de la

fijación simbiótica sea menor, con el consecuente ahorro de energía metabólica en dichas plantas.

En función de los resultados obtenidos, se propone que las moléculas marcadoras codificadas por los genes evaluados, no estarían implicadas en el efecto fenotípico de la inoculación simultánea de los tres microorganismos sobre las etapas tardías de la simbiosis (evaluado en base al contenido de N y al porcentaje de nódulos rojos por planta).

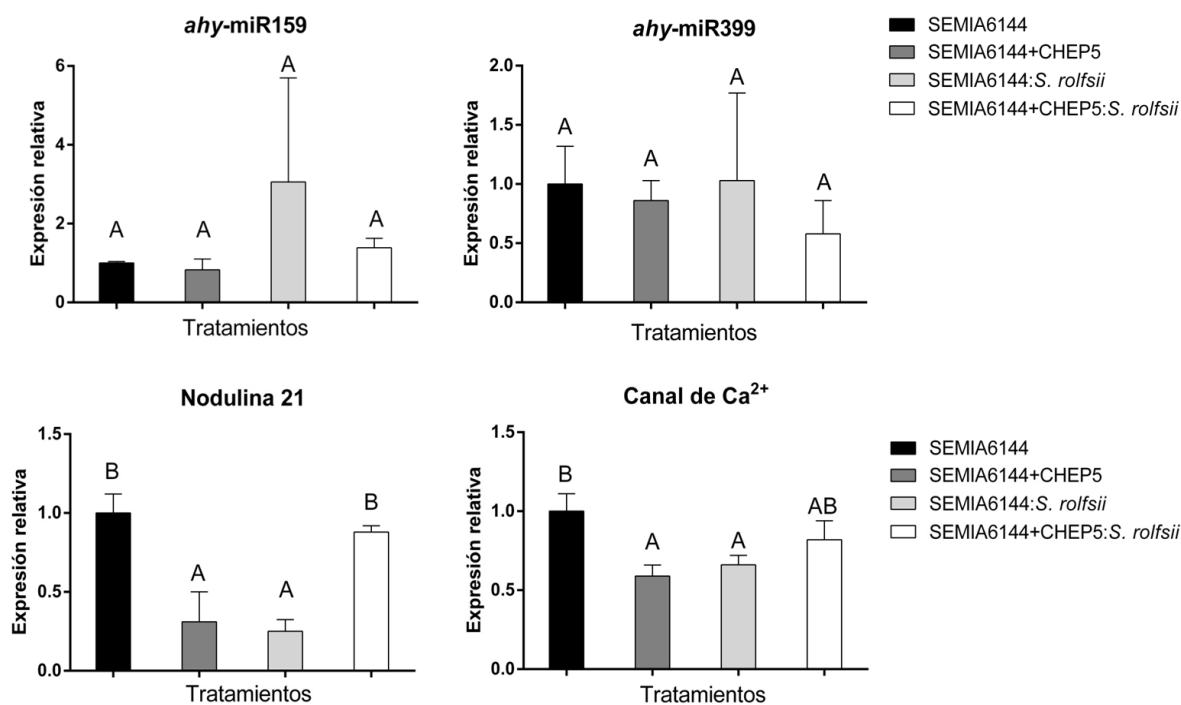


Figura 39. Expresión génica en nódulos de plantas de maní a los 40 días post-inoculación. Los datos representan la media \pm E.E de 3 réplicas biológicas con un n=4. Las letras diferentes dentro de un gráfico indican diferencias significativas de acuerdo la prueba de LSD Fisher ($p < 0,05$).

Analizando en conjunto los resultados presentados en este capítulo, se concluye que el fenotipo de plantas de maní que interactúan simultáneamente con *S. rolf sii*, *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, puede correlacionarse con los cambios en la actividad PX y en la expresión del *Ahsymrk*.

Capítulo VI. Conclusiones



Las plantas, como organismos sésiles, necesitan intercambiar continuamente información con el medio. Ello les permite percibir cambios y adaptarse rápidamente a distintas condiciones ambientales así como también responder a la presencia de los diversos y abundantes organismos con los que interactúan tanto en la parte aérea como en la raíz. Estas interacciones son de mucha importancia ya que pueden afectar el crecimiento y la salud de la planta. Específicamente la raíz, mediante el intercambio de moléculas señal con el medio, juega un papel muy importante en estas interacciones. Para la planta, éstas pueden ser beneficiosas o perjudiciales, debiendo determinar con qué tipo de organismo se enfrenta, y responder en consecuencia.

Para defenderse de los organismos perjudiciales, las plantas poseen mecanismos constitutivos de defensa (que incluyen la producción de metabolitos antimicrobianos y de barreras estructurales, como un primer nivel de protección pre-invasivo) así como inducibles, los que conllevan a cambios en el metabolismo como consecuencia de la expresión diferencial de algunos genes. Esta respuesta inducible requiere de sistemas de reconocimiento específico que le permiten a la planta identificar un microorganismo patógeno y desencadenar una respuesta específica.

Las asociaciones beneficiosas que establece la planta son también múltiples y los mecanismos que posibilitan que ellas se beneficien de dichas interacciones son diversos. En las plantas leguminosas, cobra relevancia el aporte de la FBN producto de la asociación simbiótica con rizobios. Los microorganismos beneficiosos son reconocidos primeramente por el sistema inmunológico de la planta como potenciales invasores, por lo que el éxito de estas interacciones se vincula con la estrategia que desarrollen estos microorganismos para interferir con dicho sistema.

En síntesis, después del reconocimiento mutuo entre la planta y el microorganismo, se activan en ella diferentes cascadas de señalización para adecuar la respuesta de defensa a la interacción que está ocurriendo. Para diferenciar entre estos tipos de señales, las plantas poseen receptores específicos, aunque algunos de ellos muestran una relación evolutiva entre los procesos de señalización de defensa y los que se inducen frente a microorganismos benéficos. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los receptores del tipo LysM quinasas reconocen no sólo los FN rizobianos sino también a la quitina, moléculas que participan en dos mecanismos opuestos como la simbiosis y la defensa (Nakagawa y col., 2011). Si bien las respuestas que se activan frente a un grupo de microorganismos benéficos (como por ejemplo los rizobios, o las rizobacterias que inducen ISR), o frente a patógenos (como los hongos necrótrofos) han sido profundamente estudiadas, a la luz de

estos nuevos conocimientos, y considerando que la planta en su ambiente natural interacciona con un microbioma complejo, es relevante analizar cómo responde la planta cuando establece simultáneamente no sólo interacciones beneficiosas sino también perjudiciales con diversos grupos de microorganismos.

Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis fue evaluar en maní los efectos de la inoculación simultánea de bacterias beneficiosas (fijadores simbióticos de nitrógeno e inductores de respuesta de defensa sistémica) y de patógenos fúngicos sobre las actividades bacterianas promotoras del crecimiento vegetal y la acción patogénica de hongos, así como sobre moléculas de las plantas involucradas en la interacción con cada uno de estos microorganismos.

En este trabajo, se demostró que la inoculación simultánea de maní con su microsimbionte *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, la bacteria biocontroladora *Bacillus* sp. CHEP5 y el fitopatógeno fúngico *S. rolf sii*, afecta parcialmente las actividades promotoras del crecimiento vegetal de las PGPB y la acción patogénica del hongo.

Cuando la planta de maní interacciona con los tres microorganismos en simultáneo se reduce el efecto deletéreo causado por *S. rolf sii* alcanzando valores similares a los observados en plantas inoculadas sólo con *Bacillus* sp. CHEP5. Ello revela además que la capacidad de esta PGPB de proteger a plantas de maní contra *S. rolf sii* no se afecta en presencia de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144.

Por otro lado, la inoculación simultánea de los microorganismos afecta negativamente el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, y dicho efecto está asociado exclusivamente a la presencia del fitopatógeno ya que, en ausencia de *Bacillus* sp. CHEP5, el efecto adverso es aún más severo. Los estudios realizados demostraron que *Bacillus* sp. CHEP5 podría contribuir a una mayor colonización radical del microsimbionte, previo al ataque del fitopatógeno. Se propone que esto redundaría en una aceleración de la cinética de nodulación, por lo que cuando la planta se enfrenta con el patógeno, la organogénesis del nódulo se encontraría más avanzada y, consecuentemente no se afectaría la cantidad de nódulos que se inducen. Además, mediante estudios fenotípicos se demostró que *Bacillus* sp. CHEP5 fija el N atmosférico y coloniza el interior de los nódulos. La condición de microorganismo diazotrófico podría contribuir al incremento en el contenido de nitrógeno y de la biomasa aérea determinado en plantas co-inoculadas.

En esta tesis, se identificaron además algunos genes y moléculas vegetales cuya concentración, actividad enzimática o nivel de expresión se vinculan con las actividades

promotoras del crecimiento vegetal de las PGPBs utilizadas y con la patogénesis del hongo.

Se evidenció que las enzimas PXs participan en la respuesta defensiva de la planta en las primeras horas de la interacción con *S. rolf sii*, aunque el incremento en su actividad no sería suficiente para impedir el establecimiento de la interacción patogénica.

Por otro lado, se demostró que la acumulación de compuestos fenólicos totales en maní es un evento vinculado a la ISR elicitada por *Bacillus* sp. CHEP5 contra *S. rolf sii*.

En cuanto a la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, se demostró que el gen simbiótico *Ahsymrk* se encuentra diferencialmente expresado en las etapas tempranas de la interacción, mientras que en las tardías (relacionadas con el funcionamiento del nódulo) se identificaron los miARNs *ahy-miR159* y *ahy-miR399*, la nodulina 21 y la proteína putativa canal de calcio voltaje dependiente.

La señalización que se activa cuando la planta percibe un microorganismo puede modificarse por la presencia de otros, y consecuentemente afectar el fenotipo resultante de la interacción. Los estudios realizados en esta tesis permiten concluir que la interacción simultáneamente de plantas de maní con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, *Bacillus* sp. CHEP5 o *S. rolf sii*, modifica el contenido o actividad de moléculas vinculadas con las respuestas que se activan cuando la planta interacciona con cada uno de estos microorganismos.

La actividad PX se induce más tempranamente en plantas que interaccionan con los tres microorganismos que en las tratadas sólo con *S. rolf sii*, lo que podría contribuir a la mayor resistencia al fitopatógeno observada en dichas plantas. El incremento en la actividad de esta enzima está mediado por *Bacillus* sp. CHEP5, y no es afectado por *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Ello se asocia con la ausencia de cambios en el fenotipo protector de plantas inoculadas con ambas PGPB en relación a las inoculadas sólo con *Bacillus* sp. CHEP5.

El incremento en el contenido de compuestos fenólicos solubles como respuesta a la interacción de maní con *Bacillus* sp. CHEP5 no se observa en plantas que interaccionan con los tres microorganismos; sin embargo ello no altera la protección de esta bacteria frente a *S. rolf sii*. Parece probable que, en estas condiciones, la mayor actividad PX de estas plantas esté contribuyendo al control del fitopatógeno.

Finalmente, la respuesta transcripcional del gen *Ahsymrk* vinculado a las etapas tempranas de la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 no se modifica por la interacción con los restantes microorganismos, lo que se relaciona con el fenotipo

simbiótico normal de estas plantas en dichas etapas. En cambio, en plantas inoculadas sólo con el microsimbionte y el patógeno, la expresión de dicho gen se encontró reprimida, también en concordancia con su fenotipo simbiótico alterado. Por lo tanto, se confirma que los cambios en el fenotipo y en la expresión génica ocasionada por *S. rolfsii* en la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, son revertidos por la presencia de *Bacillus* sp. CHEP5. Al igual que en las etapas tempranas, la expresión de los genes vinculados a las etapas tardías de la simbiosis no se modifica por la interacción simultánea de maní con los restantes microorganismos. Se concluye, por lo tanto que dichos genes no estarían asociados al procesos de control de los niveles de leghemoglobina o a la cantidad de nitrógeno fijado, los que podrían estar afectados, si se consideran las variaciones en el porcentaje de nódulos rojos y contenido de nitrógeno en dichas plantas.

En el proceso de selección de una PGPB es necesario confirmar su comportamiento en condiciones de campo, previo a recomendarla para su uso como biofertilizante o biofungicida. En este trabajo se demostró que, en condiciones de campo, la co-inoculación de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 y *Bacillus* sp. CHEP5 incrementa el crecimiento y rendimiento de maní. Además, estos estudios también revelaron que *Bacillus* sp. CHEP5 protegió a las plantas de maní contra *T. frezii*, y que tal como fue observado *in vitro*, su co-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 no afecta actividad de biocontrol. De igual modo, se determinó que *Bacillus* sp. CHEP5 no sólo no afecta el comportamiento simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 sino que además mejora el de los rizobios nativos, con el consecuente incremento en la biomasa vegetal. Se propone, por lo tanto, que la formulación de un inoculante mixto en base a *Bacillus* sp. CHEP5 y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 representa una estrategia sustentable para el manejo de enfermedades fúngicas y el incremento del rendimiento y la calidad del cultivo de maní.

La información obtenida en esta tesis es un aporte al conocimiento de aspectos fenotípicos y moleculares asociados a las respuestas que se desencadenan en maní durante la interacción simultánea con microorganismos patógenos y benéficos. Su comparación con las respuestas que se generan frente a un único grupo de microorganismos, permite confirmar que mucho del conocimiento que proviene de este tipo de estudios, es probable que no se reproduzca cuando las plantas crecen en condiciones naturales, interactuando con una enorme diversidad de microorganismos. Aún cuando los estudios realizados en esta tesis no abarcan la totalidad de las interacciones que podrían establecerse en la rizósfera de plantas de maní, sin duda son superadores a los que plantean analizar las respuestas de una planta frente a un único grupo microbiano. Por lo tanto, se hace

necesario profundizar en esta línea, especialmente en los aspectos moleculares de las vías de señalización que se activan en maní frente a microorganismos benéficos y patógenos. La disponibilidad de la secuencia del genoma de esta leguminosa así como de mutantes en genes que participan de dichas vías contribuirá a ampliar nuestro conocimiento.

Referencias bibliográficas



- Abdel-Ghany, S. E., Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 15932-15945.
- Abdullah, S. N. A., Akhtar, M. S. (2016). Plant and Necrotrophic Fungal Pathogen Interaction: Mechanism and Mode of Action. In *Plant, Soil and Microbes* (pp. 29-53). Springer, Cham.
- Ainsworth, E., Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2: 875-877.
- Akhtar, M. S., Shakeel, U., Siddiqui, Z. A. (2010). Biocontrol of Fusarium wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil. *Turkish Journal of Biology*, 34: 1-7.
- Sosa Alderete, L. G. S., Talano, M. A., Ibáñez, S. G., Purro, S., Agostini, E., Milrad, S. R., Medina, M. I. (2009). Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidases and its application for phenol removal. *Journal of Biotechnology*, 139: 273-279.
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., Pedreno, M. A. (2008). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60: 377-390.
- Altschul, T., Madden, A., Schäffer, J., Zhang, Z., Zhang, W., Miller, D. Lipman. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- Alves Silva, H., da Silva Romeiro, R., Macagnan, D., Almeida Halfeld-Vieira, B., Baracat Pereira, M., Mounteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, 29: 288-295.
- Anzuay, M. S., Frola, O., Angelini, J. G., Ludueña, L. M., Fabra, A., Taurian, T. (2013). Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis*, 60: 143-154.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Arunothayanan H., Nomura M., Hamaguchi R., Itakura M., Minamisawa K., Tajima S. (2010). Copper metallochaperones are required for the assembly of bacteroid cytochrome c oxidase which is functioning for nitrogen fixation in soybean nodules. *Plant Cell Physiology*, 51: 1242-1246.
- Asselbergh, B., Curvers, K., França, S. C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F., Höfte, M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology*, 144: 1863-1877.
- Azpilicueta, C., Zawoznik, M., Tomaro, M. (2004). Phytoalexins synthesis is enhanced in groundnut plants inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (*Arachis*). *Crop Protection*, 23: 1069-1074.
- Babu, A. N., Jogaiah, S., Ito, S. I., Nagaraj, A. K., Tran, L. S. P. (2015). Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*, 231: 62-73.

- Badawi, F.S.F., Biomy, A.M.M., Desoky, A.H. (2011). Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizomicroorganisms under sandy loam soil conditions. *Annals of Agricultural Science*, 56: 17-25.
- Badri, D., Weir, T., van der Lelie, D., Vivanco, J. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 642-650.
- Baez-Rogelio, A., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Muñoz-Rojas, J. (2017). Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microbial Biotechnology*, 10: 19-21.
- Baker, K., Cook, R. (1985). Biological control of plant pathogens. En: *Biological control in agricultural IPM systems*. Academic Press Inc., New York, (pp. 25-39).
- Bakker, P., Berendsen, R., Doornbos, R., Wintermans, P., Pieterse, C. (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 4: 165.
- Bal, A., Hameed, S., Jayaram, S. (1989). Ultrastructural characteristics of the host symbiont interface in nitrogen-fixing peanut nodules. *Protoplasma*, 150: 19-26.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.
- Barea, J., Pozo, M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1761-1778.
- Bartel, D. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-97.
- Bazin, J., Khan, G. A., Combier, J. P., Bustos-Sanmamed, P., Debernardi, J. M., Rodriguez, R., Lelandais-Brière, C. (2012). miR396 affects mycorrhization and root meristem activity in the legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 74: 920-934.
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 101-110.
- Bellincampi, D., Cervone, F., Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5: 228.
- Benhamou, N., Bélanger, R., Paulitz, T.C. (1996). Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. Pisi and *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 86: 1174-1185.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 11-18.
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13: 66-75.
- Bindschedler, L. V., Dewdney, J., Blee, K. A., Stone, J. M., Asai, T., Plotnikov, J., Ausubel, F. M. (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, 47: 851-863.
- Bolsa de Cereales de Córdoba, Noviembre de 2017. Sistema de Información Agronómica. Informe N° 115.

- Boogerd, F., van Rossum, D. (1997). Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 5-27.
- Boretto, D., Vélez, J. P., Scaramuzza, F. (2011). Predicción del Rendimiento de Maní en grano limpio y seco, a partir de monitor volumétrico y atributos del terreno. On line <http://www.agriculturadeprecision.org/descargaItem.asp>.
- Brewin, N. (2004). Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Critical Review in Plant Sciences*, 23: 293-316.
- Bustos-Sanmamed P., Mao G., Deng Y., Elouet M., Khan G, Bazin J., Turner M., Subramanian S., Yu O., Crespi M., Lelandais-Brière C. (2013). Overexpression of miR160 affects root growth and nitrogen-fixing nodule number in *Medicago truncatula*. *Functional Plant Biology*, 40: 1208-1220.
- Cámara argentina de maní. (2017). (www.camaradelmani.org.ar).
- Chebotar, V. K., Asis, C. A., Akao, S. (2001). Production of growth-promoting substances and high colonization ability of rhizobacteria enhance the nitrogen fixation of soybean when coinoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 427-432.
- Chen, T., Duan, L., Zhou, B., Yu, H., Zhu, H., Cao, Y., Zhang, Z. (2017). Interplay of pathogen-induced defense responses and symbiotic establishment in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Microbiology*, 8: 973.
- Chiou, T. J., Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Chiang, S. F., Su, C. L. (2006). Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18: 412-421.
- Choudhary, D., Johri, B. (2008). Interactions of *Bacillus* spp. and plants-with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164: 493-513.
- Colodete, C. M., Ruas, K. F., de Oliveira Barbirato, J., Barroso, A. L. P., Dobbss, L. B. (2015). Biochemistry characterization of proteins defense against oxidative stress in plants and their biosynthetic pathways of secondary metabolites. *Natureza on line* 13: 195-204.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Ait Barka, E. (2005). Minireview: Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant disease: principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4951-4959.
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16: 524-531.
- Conrath, U., Pieterse, C., Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Sciences*, 7: 210-216.
- Cope, J. T., Starling, J. G., Ivey, H. W., Mitchell Jr, C. C. (1984). Response of peanuts and other crops to fertilizers and lime in two long term experiments. *Peanut Science*, 11: 91-94.
- Couzigou, J. M., Combier, J. P. (2016). Plant microRNAs: key regulators of root architecture and biotic interactions. *New Phytologist*, 212: 22-35.
- Dai X, Zhao PX. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*, 39: W155-W159.
- Das, K., Prasanna, R., Saxena, A. K. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica*, 62: 425-435.
- De Faría, S., Hay, G., Sprent, J. (1988). Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* bentham occurs between epidermal cells. *Journal of General Microbiology*, 134: 2291-2296.

- De Luis, A., Markmann, K., Cognat, V., Holt, D. B., Charpentier, M., Parniske, M., Voinnet, O. (2012). Two microRNAs linked to nodule infection and nitrogen-fixing ability in the legume *Lotus japonicus*. *Plant physiology*, 160: 2137-2154.
- Delauney, A. J., Cheon, C. I., Snyder, P. J., Verma, D. P. S. (1990). A nodule-specific sequence encoding a methionine-rich polypeptide, nodulin-21. *Plant Molecular Biology*, 14: 449-451.
- Diario La Nación. (www.lanacion.com.ar).
- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J. F., Oldroyd, G. E. (2008). Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 20: 2681-2695.
- Distéfano, G., Stefano, L., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z., Gentile, A. (2008). Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research*. 17: 873-879.
- Dodd, A., Kudla, j., Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 593-620.
- Doley, K., Dudhane, M., Borde, M. (2017). Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in groundnut by using microbial inoculants. *Notulae Scientia Biologicae*, 9.
- Downie, A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34: 150-170.
- Dutta, S., Mishra, A., Dileep Kumar, B. (2008). Induction of systemic resistance against fusarial wilts in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 452-461.
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Sundaresan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: E911-E920.
- El Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernié, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L., Gamas, P. (2004). Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiology*, 136: 3159-3176.
- Elbadry, M., Taha, R., Eldougoug, K., Gamal-Eldin, H. (2006). Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113: 247-251.
- Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L. M. C., Toffanin, A., Tagliasacchi, A. M., Nuti, M. (2008). Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*, 40: 260-270.
- Figueredo, M. S., Tonelli, M. L., Taurian, T., Angelini, J., Ibañez, F., Valetti, L., Fabra, A. (2014). Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis on peanut plants. *Journal of Biosciences*, 39: 877-885.
- Fiske, C. H., Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66: 375-400.

- Formey, D., Sallet, E., Lelandais-Brière, C., Ben, C., Bustos-Sanmamed, P., Niebel, A, Poulain, J. (2014). The small RNA diversity from *Medicago truncatula* roots under biotic interactions evidences the environmental plasticity of the miRNAome. *Genome Biology*, 15: 457.
- Francis, I., Holsters, M., Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant-microbe interaction. *Environmental Microbiology*, 12: 1-12.
- Gara, L., de Pinto, M., Tommasi, F. (2003). The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 863-870.
- Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 20: 338-343.
- Giandana, E. (1997). El cultivo de maní: cultivares. Manual de maní. Segunda Edición. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi (INTA).
- Giayetto, O. (2017). Crecimiento del cultivo de maní. En: El cultivo del Maní en Córdoba. ISBN 978-987-42-3736-1
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205-227.
- Glick, B. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*.
- Goel, A., Sindhu, S., Dadarwal, K. (2002). Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas* spp. antagonistic to fungal pathogens. *Biology and Fertility of Soils*, 36: 391-396.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., Stacey, G. (2015). Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science*, 20: 186-194.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, 29: 644-652.
- Gregory, W., Gregory, M., Krapovickas, A., Smith, B., Yarbruogh, J. (1973). Structures and genetic resources of peanuts. Peanut culture and uses. American Peanut Research & Education Association Inc. Stillwater, Okla. 47-133.
- Gupta, C., Dubey, R., Maheshwari, D. (2002). Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 399-405.
- Guo, H. S., Xie, Q., Fei, J. F., Chua, N. H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *The Plant Cell*, 17: 1376-1386.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., Singh, V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7: 96-102.
- Hakoyama, T., Niimi, K., Yamamoto, T., Isobe, S., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Kumagai, H., Umehara, Y., Suganuma, N. (2012). The integral membrane protein SEN1 is required for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell Physiology*, 53: 225-236.
- Hoagland, D., Arnon, D. (1950). Water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*. 347.
- Holt, D. B., Gupta, V., Meyer, D., Abel, N. B., Andersen, S. U., Stougaard, J., Markmann, K. (2015). micro RNA 172 (miR172) signals epidermal infection and is

- expressed in cells primed for bacterial invasion in *Lotus japonicus* roots and nodules. *New Phytologist*, 208: 241-256.
- Ibañez, F., Angelini, J., Taurian, T., Tonelli, M.L., Fabra, A., (2009). Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Thematictic and Applied Microbiology*, 32: 49-55.
 - Ibañez, F., Fabra, A. (2011). Rhizobial Nod factors are required for cortical cell division in the nodule morphogenetic programme of the Aeschynomeneae legume *Arachis*. *Plant Biology*, 13: 794-800.
 - Ibañez, F., Wall, L., Fabra, A. (2016). Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *Journal of Experimental Botany*, 68: 1905-1918.
 - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 2014, (INTA, <http://inta.gob.ar/>).
 - Jain, A., Singh, S., Kumar Sarma, B., Bahadur Singh, H. (2012). Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 112: 537-550.
 - Jain, S., Varma, A., Tuteja, N., Choudhary, D. K. (2016). Plant growth-promoting microbial-mediated induced systemic resistance in plants: induction, mechanism, and expression. In *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants* (pp. 213-226). Springer Singapore.
 - Jha, N., Gupta, G., Jha, P., Mehrotra, R. (2013). Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. *Greener Journal of Agricultural Sciences*, 3: 73-84.
 - Johansen, D.A. (1940). *Plant Microtechnique VI-VII*. Mc- Graw-Hill Book, New York.
 - Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
 - Kim, J. H., Choi, D., Kende, H. (2003). The *AtGRF* family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 36: 94-104.
 - Kjeldahl, J. (1883) "Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern" *Zeitschrift für analytische Chemie*, 22: 366-383.
 - Kloepper, J., Schroth, M. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceeding of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Gilbert-Clarey, Tours, (pp 879-882).
 - Konappa, N. M., Maria, M., Uzma, F., Krishnamurthy, S., Nayaka, S. C., Niranjana, S. R., Chowdappa, S. (2016). Lactic acid bacteria mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt. *Scientia Horticulturae*, 207: 183-192.
 - Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X., Yu, F. (2010). Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 31-35.
 - Krapovickas, A., Gregory, W. (1994). Taxonomía del Género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8: 1-186.
 - Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W., Mendes, R., Geraldi, I., Pizzirani-Kleiner, A., Azevedo, J. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental of Microbiology*, (pp. 1-8).

- Kumar, M., Teotia, P., Varma, A., Tuteja, N., Kumar, V. (2016). Induced Systemic Resistance by Rhizospheric Microbes. In *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants* (pp. 197-206). Springer Singapore.
- Lai, Z., Mengiste, T. (2013). Genetic and cellular mechanisms regulating plant responses to necrotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 505-512.
- Lareen, A., Burton, F., Schäfer, P. (2016). Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Molecular Biology*, 90: 575-587.
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S. E., Metraux, J. P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry*, 112: 54-62.
- Lelandais-Briere, C., Moreau, J., Hartmann, C., Crespi, M. (2016). Noncoding RNAs, Emerging Regulators in Root Endosymbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29: 170-180.
- Lelandais-Brière, C., Naya, L., Sallet, E., Calenge, F., Frugier, F., Hartmann, C., Crespi, M. (2009). Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *The Plant Cell*, 21: 2780-2796.
- Li B, Dewey CN. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12: 323.
- Liu, Q., Chen, YQ. (2009). Insights into the mechanism of plant development: Interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384: 1-5.
- Livak, K., Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-2\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lopez-Gomez, M., Sandal, N., Stougaard, J., Boller, T. (2012). Interplay of flg22-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 63: 393-401.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15: 550.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, 63: 541-556.
- Mao, G., Turner, M., Yu, O., Subramanian, S. (2013). miR393 and miR164 influence indeterminate but not determinate nodule development. *Plant Signaling & Behavior*, 8: e26753.
- March, G. (2001). La Voz del Interior, 9 de Abril.
- March, G., Marinelli, A. (2005). En: *Enfermedades del maní en Argentina*. ISBN 987-43-8755-6.
- Marinelli, A., March, G., Oddino, C. (2017). Enfermedades fúngicas del maní. En: *El cultivo del Maní en Córdoba*. ISBN 978-987-42-3736-1.
- Martínez-Hidalgo, P., Hirsch, A. M. (2017). The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes*, 1: 70-82.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M., Pozo, M. J., Conrath, U. (2016). Recognizing plant defense priming. *Trends in Plant Science*, 21: 818-822.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., Flors, V. (2017). Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68: 485-512.

- Mayz, J. (1997). Simbiosis leguminosas/rizobia. Ediciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IIAPUDO. Universidad de Oriente. Núcleo de Monagas. Maturín. Venezuela (pp. 113).
- Mc Kinney, G. (1939). Some absorption spectra of leaf extract. *Plant Physiology*, 13: 128-140.
- Mehta, S., Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*, 43: 51-56.
- Mei, L., Liang, Y., Zhang, L., Wang, Y., Guo, Y. (2014). Induced systemic resistance and growth promotion in tomato by an indole-3-acetic acid-producing strain of *Paenibacillus polymyxa*. *Annals of Applied Biology*, 165: 270-279.
- Mengiste, T. (2012). Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 267-294.
- Merrick, M. (2005). Regulation of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. In: Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J., Newton, W., (eds.). *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*, Washington, D.C, USA (pp. 197-223).
- Mishra, P., Mishra, S., Selvakumar, G., Bisht, J., Kundu, S., Gupta, H. (2009). Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 25:753-761.
- Morel, M. A., Cagide, C., Minteguiaga, M. A., Dardanelli, M. S., Castro-Sowinski, S. (2015). The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: an interaction that improves plant yield. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28: 134-142.
- Moss, J., Ramanatha Rao V. (1995). The peanut–reproductive development to plant maturity. En: Eds. H.E. Pattee, H.T. Stalker, *Advances in Peanut Science*. American Peanut Research and Education. Society. Inc., Stilwater (pp. 1-13).
- Muñoz, V., Ibáñez, F., Tordable, M., Megías, M., Fabra, A. (2015). Role of reactive oxygen species generation and Nod factors during the early symbiotic interaction between bradyrhizobia and peanut, a legume infected by crack entry. *Journal of Applied Microbiology*, 118: 182-192.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G. Benguedouar, A. (2008). Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, 63: 383-400.
- Nafisi, M., Fimognari, L., Sakuragi, Y. (2015). Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry*, 112: 63-71.
- Nakagawa, T., Kaku, H., Shimoda, Y., Sugiyama, A., Shimamura, M., Takanashi, K., Yazaki, K., Aoki, T., Shibuya, N., Kouchi, H. (2011). From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume–*Rhizobium* symbiosis. *Plant Journal*, 65: 169-180.
- Nakagawa, T., Kawaguchi, M. (2006). Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology*, 47: 176-180.
- Nandi, S., Dutta, S., Mondal, A., Adhikari, A., Nath, R., Chattopadhyaya, A., Chaudhuri, S. (2013). Biochemical responses during the pathogenesis of *Sclerotium rolfsii* on cowpea. *African Journal of Biotechnology*, 12.
- Nova-Franco, B., Íñiguez, L. P., Valdés-López, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S. I., Hernández, G. (2015). The Micro-RNA172c-APETALA2-

- 1 Node as a Key Regulator of the *Common Bean-Rhizobium etli* Nitrogen Fixation Symbiosis. *Plant Physiology*, 168: 273-291.
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., Bolwell, G. P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236: 765-779.
 - Odoh, C. K. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiology. A review. *International Journal of Advanced Research in Biological Science*, 4: 123-142.
 - Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 252-263.
 - Oldroyd, G., Murray, J., Poole, P., Downie, J. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Reviews of Genetics*, 45: 119-144.
 - Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16: 115-125.
 - Paredes, J.A., Cazón, L.I., Bisonard, E.M., Oddino, C., Rago, A.M. (2015). Efecto de ingredientes activos fungicidas sobre la intensidad del carbón del maní. 36: 73.
 - Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24: 255-265.
 - Passardi, F., Penel, C., Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9: 534-540.
 - Pedelini, R. (1997). El cultivo de maní: suelo, rotación de cultivos. En: *Manual de maní. Segunda Edición. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi (INTA)*.
 - Pedelini, R. (2008). *Maní, guía práctica para su cultivo. INTA-FMA; Manfredi (Córdoba) - Argentina*.
 - Peña, H.B., Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*, 32.
 - Perez, S., Torralba, A. (1997). La fijación del nitrógeno por los seres vivos. *Seminario Fisiología Vegetal, Facultad de Biología Oviedo* (pp. 21).
 - Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 180-201.
 - Pieterse, C.M., de Jonge, R., Berendsen, R.L. (2016). The soil-borne supremacy. *Trends in Plant Science*, 21: 171-173.
 - Pieterse, C.M., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C., Bakker, P.A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 347-375.
 - Pokalsky, A.R., Hiatt, W.R., Ridge, N., Rasmussen, R., Houck, C.M., Shewmaker, C.K. (1989). Structure and expression of elongation factor 1 α in tomato. *Nucleic Acids Research*, 17: 4661-4673.
 - Poole, P. (2017). Shining a light on the dark world of plant root-microbe interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 4281-4283.
 - Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., Li, H.Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 2-18.
 - Raaijmakers, J., Paulitz, T., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, 321: 341-361.

- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappam, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20: 1-11.
- Ramos Solano, B., Barriuso Maicas, J., Pereyra de la Iglesia, M., Domenech, J., Gutiérrez Mañerp, F. (2008). Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*, 98: 451-457.
- Rees, D., Tezcan, F., Haynes, C., Walton, M., Andrade, S., Einsle, O., Howard, J. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 363: 971-984.
- Reinhart, B., Weinstein, E., Rhoades, M., Bartel, B., Bartel, D. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Development*, 16: 1616-1626.
- Reitz, M., Rudolph, K., Schröder, I., Hoffmann-Hergarten, S., Hallmann, J., Sikora, R. A. (2000). Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 Act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3515-3518.
- Rey, T., Nars, A., Bonhomme, M., Bottin, A., Huguet, S., Balzergue, S., Jacquet, C. (2013). NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytologist*, 198: 875-886.
- Reyes, J.L., Chua, N.H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, 49: 592-606.
- Rogers, K., Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25: 2383-2399.
- Saeki, K. (2011). Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems. *Cellular and Molecular Life Science*, 68: 1327-1339.
- Saharan, B., Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21: 1-30.
- Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., Kawaguchi, M. (2014). Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature Communications*, 5: 4983.
- Sasikumar, A.N., Perez, W.B., Kinzy, T.G. (2012). The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3: 543-555.
- Schenk, S.T., Hernández-Reyes, C., Samans, B., Stein, E., Neumann, C., Schikora, M. Schikora, A. (2014). N-acyl-homoserine lactone primes plants for cell wall reinforcement and induces resistance to bacterial pathogens via the salicylic acid/oxylipin pathway. *The Plant Cell*, 26: 2708-2723.
- Schlüter, P.M. Harris, S.A. (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes*, 6: 569-572.
- Sen, D., Weaver, R., Bal, A. (1986). Structure and organization of effective peanut and cowpea root nodules induced by rhizobial strain 32H1. *Journal of Experimental Botany*, 37: 356-363.
- Senthilraja, G., Anand, T., Kennedy, J.S., Raguchander, T., Samiyappam, R. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and entomopathogenic fungus bioformulation enhance the expression of defense enzymes and pathogenesis-

- related proteins in groundnut plants against leafminer insect and collar rot pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 82: 10-19.
- Sepúlveda-Caamaño, M., Gerding, M., Vargas, M., Moya-Elizondo, E., Oyarzúa, P., Campos, J. (2018). Lentil (*Lens culinaris* L.) growth promoting rhizobacteria and their effect on nodulation in coinoculation with rhizobia. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64: 244-256.
 - Sharma, C.K., Vishnoi, V.K., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. (2018). A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. *Rhizosphere*.
 - Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*.
 - Shores, M., Yedidia, I., Chet, I. (2004). Involment of Jasmonic acid/etilene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *The American Phytopathological Society*, 95: 76-84.
 - Singh, A., Jain, A., Sarma, B.K., Upadhyay, R.S., Singh, H.B. (2014). Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during *Sclerotium rolfsii* infection. *Microbiological Research*, 169: 353-360.
 - Singh, A., Sarma, B.K., Upadhyay, R.S., Singh, H.B. (2013). Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. *Microbiological Research*, 168: 33-40.
 - Singh, S.K., Pathak, R., Choudhary, V. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria-mediated acquired systemic resistance in plants against pests and diseases. In *microbial-mediated induced systemic resistance in plants* (pp. 125-134). Springer Singapore.
 - Sinharoy, S., Saha, S., Chaudhury, S.R., DasGupta, M. (2009). Transformed hairy roots of *Arachis hypogea*: A tool for studying root nodule symbiosis in a non-infection thread legume of the Aeschynomeneae tribe. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 132-142.
 - Smith, D.L., Subramanian, S., Lamont, J.R., Bywater-Ekegård, M. (2015). Signaling in the phytomicrobiome: breadth and potential. *Frontiers in Plant Science*, 6: 709.
 - Somasegaran, P., Hoben, H. (1994). Quantifying the growth of rhizobia. In: *Handbook for Rhizobia*. New York, USA. Springer-Verlag Inc. Sección 3 (pp 382).
 - Sorensen, J. (1997). The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: J. van Elsas, J. Trevors, E. Wellington (Eds.). *Modern Soil Ecology*. New York: Marcel Dekker, Inc. (pp. 21-46).
 - Soto, M., Dominguez-Ferreras, A., Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J., Olivares, J. (2009). Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular Microbiology* 11: 381-388.
 - Spaink, H. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, 54: 257-288.
 - Sprent, J., Sprent, P. (1990). Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman and Hall, Cambridge. Great Britain (pp. 256).
 - Stalker, H. (1997). Peanut (*Arachis hypogaea*). *Field Crops Research*, 53, 205-217.

- Stevenson, F.J. (1999). Cycles of soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. John Wiley and Sons.
- Subramanian, P., Kim, K., Krishnamoorthy, R., Sundaram, S., Sa, T. (2015). Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. *Plant Growth Regulation*, 76: 327-332.
- Subramanian, S. (2012). MicroRNA regulation of symbiotic nodule development in legumes. In: *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses*. Springer Berlin Heidelberg (pp. 177-195).
- Subramanian, S., Fu, Y., Sunkar, R., Barbazuk, W., Zhu, J., Yu, O. (2008). Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics*, 9: 160.
- Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M., Imagama, Y., Osuki, K. I., Uchiumi, T., Abe, M. (2004). Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant and Cell Physiology*, 45: 914-922.
- Tariq, M., Noman, M., Ahmed, T., Hameed, A., Manzoor, N., Zafar, M. (2017). Antagonistic features displayed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review.
- Taurian, T., Anzuay, M.S., Angelini, J.G., Tonelli, M.L., Ludueña, L., Pena, D., Fabra, A. (2010). Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil*, 329: 421-431.
- Tilak, K., Ranganayaki, N., Manoharachari, C. (2006). Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Sciences*, 57: 67-71.
- Tonelli, M., Furlán, A., Taurian, T., Castro, S., Fabra, A. (2011). Peanut priming induced by biocontrol agents. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75: 100-105.
- Tonelli, M., Taurian, T., Ibáñez, F., Angelini, J., Fabra, A. (2010). Selection and *in vitro* characterization of biocontrol agents with potential to protect peanut plants against fungal pathogens. *Journal of Plant Pathology*, 92: 73-82.
- Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138: 414-429.
- Turner, M., Nizampatnam, N., Baron, M., Coppin, S., Damodaran, S., Adhikari, S., Arunachalam, S., Yu, O., Subramanian, S. (2013). Ectopic expression of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant Physiology*, 162: 2042-2055.
- Uheda, E., Daimon, H., Yoshizako, F. (2001). Colonization and invasion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots by gusA-marked *Bradyrhizobium* sp. *Canadian Journal of Botany*, 79: 733-738.
- Valdés-López, O., Arenas-Huertero, C., Ramirez, M., Girard, L., Sanchez, F., Vance, C. P., Hernandez, G., (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant, Cell & Environment*, 31: 1834-1843.
- Valdés-López, O., Hernández, G. (2015). Chapter six-early responses in the root-rhizobia interaction. *Advances in Botanical Research*, 75: 137-147.
- Vallad, G., Goodma, R. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44: 1920-1934.
- van Dam, N.M., Bouwmeester, H.J. (2016). Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends in Plant Science*, 21: 256-265.

- Van der Putten, W.H., Klironomos, J.N., Wardle, D.A. (2007). Microbial ecology of biological invasions. *The ISME Journal*, 1: 28.
- van Loon, L., Bakker, P., Pieterse, J. (1998). Systemic Resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206: 1196-1206.
- Venturi, V., Fuqua, C. (2013). Chemical signaling between plants and plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 17-37.
- Verma, D., Hong, Z. (1996). Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends Microbiology*, 4: 364-368.
- Verma, J., Yadav, J., Tiwari, N., Lavakush, H, Singh, V. (2010). Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research*, 5: 954-983.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F., Lupski, J. (1994). Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods in Molecular and Cell Biology*, 5: 25-30.
- Vincent, J. (1970). In: *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. International Biological Programme Handbook n° 15. Oxford, Blackwell Scientific Publications Ltd. (pp.73-97).
- Virtanen, A.I., Jorma, J.U.H.O., Linkola, H., Linnasalmi, A. (1947). On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules. *Acta Chemica Scandinavica*, 1: 90-111.
- Walsh, P., Metzger, D., Higuchi. (1991). Chelex TM 100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechnology*, 10: 506- 513.
- Walters, M. (2015). The plant innate immune system. *Endocytobiosis & Cell Research*, 26.
- Wang, H., Chua, N. H. (2014). Big effects of small RNAs on legume root biotic interactions. *Genome Biology*, 15: 475.
- Wang, Y., Li, P., Cao, X., Wang, X., Zhang, A., Li, X. (2009). Identification and expression analysis of miRNAs from nitrogen-fixing soybean nodules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378: 799-803.
- Wang, Y., Wang, L., Zou, Y., Chen, L., Cai, Z., Zhang, S., Gresshoff, P. M. (2014). Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate ENOD40 expression and regulate nodule initiation. *The Plant Cell*, 26: 4782-4801.
- Whipps, J. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
- Xie, X.G., Fu, W.Q., Zhang, F.M., Shi, X.M., Zeng, Y.T., Li, H., Dai, C.C. (2017). The endophytic fungus *Phomopsis liquidambari* increases nodulation and N₂ fixation in *Arachis hypogaea* by enhancing hydrogen peroxide and nitric oxide signalling. *Microbial Ecology*, 74: 427-440.
- Yan, Z., Hossain, M., Wang, J., Valdés-López, O., Liang, Y., Libault, M., Qiu, L., Stacey, G. (2013). miR172 regulates soybean nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 12: 1371-1377.
- Yan, Z., Hossain, M.S., Arikrit, S., Valdés-López, O., Zhai, J., Wang, J., Stacey, G. (2015). Identification of microRNAs and their mRNA targets during soybean nodule development: functional analysis of the role of miR393j-3p in soybean nodulation. *New Phytologist*, 207: 748-759.

- Yang, Y., Shah, J., Klessig, D.F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development*, 1: 1621-1639.
- Zahran, H., Ahmad, M., Abdel-Fattah, M., Zaki, A. (1999). Phenotypic characteristics cross nodulation and nitrogen fixation of root-nodule bacteria isolated from wild leguminous plants in Egypt. In: *Proceedings of the International Symposium on Biological Nitrogen Fixation and Crop Production*, Cairo, 11-13 May 1999 (pp. 77–90).
- Zehr, J., Paerl, H. (1998). Molecular aspects of nitrogen fixation in the sea. In: *Molecular Approaches to the study of the Ocean*. K. E Coojssen [ed]. Chapman and Hole.
- Zhang, W., Wang, H.W., Wang, X.X., Xie, X.G., Siddikee, M.A., Xu, R.S., Dai, C.C. (2016). Enhanced nodulation of peanut when co-inoculated with fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* and *Bradyrhizobium*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 98: 1-11.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333.
- Zipfel, C., Oldroyd, G.E. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543: 328.

Anexo I

Precursores de miARNs identificados a partir del análisis *in silico* de librerías de expresión génica de nódulos y raíces de maní.

"contigs" de <i>A. hypogaea</i> L.	Precursor de miARN	Nivel de transcritos (log₂ u.r)
TRINITY_DN209709_c0_g1_i1	ahy-MIR156b	-2,386751043
TRINITY_DN207585_c0_g1_i1	ahy-MIR156b	-1,363311341
TRINITY_DN7279_c0_g2_i1	ahy-MIR156c	3,775418801
TRINITY_DN69640_c0_g1_i1	ahy-MIR159	1,328903407
TRINITY_DN69199_c0_g1_i3	ahy-MIR160	1,72812197
TRINITY_DN53731_c0_g1_i1	ahy-MIR167	0,695333925
TRINITY_DN32626_c0_g1_i1	ahy-MIR3508	1,704576846
TRINITY_DN80880_c3_g1_i6	ahy-MIR3508	2,897725554
TRINITY_DN74823_c0_g1_i2	ahy-MIR3509	3,160273325
TRINITY_DN69221_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-3,179397394
TRINITY_DN68954_c0_g1_i3	ahy-MIR3509	5,348619188
TRINITY_DN32833_c0_g2_i1	ahy-MIR3509	-1,574894189
TRINITY_DN26864_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-3,224419072
TRINITY_DN77306_c4_g2_i2	ahy-MIR3509	1,485386538
TRINITY_DN79752_c0_g2_i1	ahy-MIR3509	-3,665378788
TRINITY_DN94267_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	3,737290767
TRINITY_DN79934_c0_g1_i2	ahy-MIR3509	-1,681646636
TRINITY_DN75728_c0_g1_i2	ahy-MIR3509	-2,033362092
TRINITY_DN73788_c0_g1_i2	ahy-MIR3509	-1,310127566
TRINITY_DN77906_c0_g3_i4	ahy-MIR3509	-1,461602184
TRINITY_DN60963_c2_g1_i1	ahy-MIR3509	1,795369825
TRINITY_DN145753_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-2,136823226
TRINITY_DN236883_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-2,207571925
TRINITY_DN68037_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-1,455286695
TRINITY_DN94157_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	1,477846152
TRINITY_DN55008_c1_g1_i1	ahy-MIR3509	-1,431355939
TRINITY_DN50852_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	1,716275124
TRINITY_DN48241_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	1,295059323
TRINITY_DN77326_c3_g2_i2	ahy-MIR3509	0,668887278
TRINITY_DN221091_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-1,104347809
TRINITY_DN68718_c2_g3_i1	ahy-MIR3509	-0,300187856
TRINITY_DN74648_c0_g2_i1	ahy-MIR3509	0,512545743
TRINITY_DN77022_c1_g1_i3	ahy-MIR3509	-0,276471378
TRINITY_DN84372_c0_g1_i3	ahy-MIR3509	0,497756647
TRINITY_DN49766_c0_g2_i1	ahy-MIR3509	-0,385673839
TRINITY_DN61621_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,436482097
TRINITY_DN80169_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,397792634
TRINITY_DN58854_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,133002392

TRINITY_DN79151_c1_g2_i3	ahy-MIR3509	-0,142723537
TRINITY_DN63225_c0_g1_i2	ahy-MIR3509	-0,095335737
TRINITY_DN61319_c0_g2_i2	ahy-MIR3509	-0,098331265
TRINITY_DN105597_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,655583407
TRINITY_DN138753_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,834707736
TRINITY_DN140361_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,168839678
TRINITY_DN145247_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,698370571
TRINITY_DN160719_c0_g1_i2	ahy-MIR3509	-1,935505583
TRINITY_DN174856_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,72800252
TRINITY_DN177186_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,786204257
TRINITY_DN178478_c0_g2_i1	ahy-MIR3509	0,508835501
TRINITY_DN179246_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-2,189370982
TRINITY_DN179967_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,177641215
TRINITY_DN192158_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,642217917
TRINITY_DN208335_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-1,020285973
TRINITY_DN214912_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,642217917
TRINITY_DN233480_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,252433906
TRINITY_DN239938_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,198389727
TRINITY_DN252801_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-1,121445358
TRINITY_DN268227_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,963589677
TRINITY_DN275378_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,932151367
TRINITY_DN291379_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,255025638
TRINITY_DN293517_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,711943844
TRINITY_DN293540_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-1,052840665
TRINITY_DN32897_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,537822638
TRINITY_DN34312_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	1,250115266
TRINITY_DN34768_c0_g3_i1	ahy-MIR3509	-0,743283255
TRINITY_DN35839_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-1,221563656
TRINITY_DN36791_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,323480605
TRINITY_DN46604_c1_g1_i1	ahy-MIR3509	1,971555219
TRINITY_DN50595_c0_g2_i1	ahy-MIR3509	0,02936435
TRINITY_DN53385_c1_g1_i1	ahy-MIR3509	1,393000144
TRINITY_DN65629_c1_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,642217917
TRINITY_DN6659_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,508835501
TRINITY_DN68440_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,696753945
TRINITY_DN72618_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,339741438
TRINITY_DN75959_c3_g2_i1	ahy-MIR3509	0,192890169
TRINITY_DN76699_c1_g1_i1	ahy-MIR3509	0,652794561
TRINITY_DN79329_c3_g1_i1	ahy-MIR3509	0,704339693
TRINITY_DN80095_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,337630436
TRINITY_DN8303_c1_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,053913773
TRINITY_DN83954_c7_g1_i1	ahy-MIR3509	1,589272922
TRINITY_DN84061_c3_g1_i1	ahy-MIR3509	-0,127153921

TRINITY_DN88515_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	2,399613662
TRINITY_DN95657_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	1,141916766
TRINITY_DN98174_c0_g1_i1	ahy-MIR3509	0,00490229
TRINITY_DN78723_c2_g1_i1	ahy-MIR3512	-0,178437395
TRINITY_DN81675_c2_g4_i4	ahy-MIR3513	0,110120077
TRINITY_DN62229_c0_g2_i1	ahy-MIR3514	-1,803259689
TRINITY_DN104619_c0_g1_i1	ahy-MIR3514	-0,619128402
TRINITY_DN42511_c0_g2_i1	ahy-MIR3515	-0,82636307
TRINITY_DN51050_c0_g1_i1	ahy-MIR3516	-1,079595128
TRINITY_DN9876_c0_g1_i1	ahy-MIR3518	-1,047313707
TRINITY_DN197191_c0_g1_i1	ahy-MIR3520	0,21617174
TRINITY_DN9226_c0_g1_i1	ahy-MIR3520	-0,72800252
TRINITY_DN76550_c3_g2_i1	ahy-MIR3521	-1,718894928
TRINITY_DN65395_c0_g1_i1	ahy-MIR398	0,8030311
TRINITY_DN80993_c2_g2_i6	ahy-MIR408	6,25049423
TRINITY_DN250999_c0_g1_i1	ath-MIR157a	-0,25243393
TRINITY_DN5279_c0_g1_i1	ath-MIR168a	0,070074975
TRINITY_DN75973_c0_g1_i1	ath-MIR8175	-0,110365227
TRINITY_DN160823_c0_g1_i1	ath-MIR8175	-0,899012691
TRINITY_DN53843_c0_g1_i1	bdi-MIR166e	1,24668758
TRINITY_DN48778_c1_g1_i1	bdi-MIR166e	1,206736716
TRINITY_DN81015_c2_g5_i1	cln-MIR166	-2,503978657
TRINITY_DN92973_c0_g1_i1	cme-MIR156f	0,098017958
TRINITY_DN83379_c2_g23_i1	csi-MIR159	1,473519038
TRINITY_DN82277_c1_g1_i2	far-MIR166	-1,263568405
TRINITY_DN42482_c0_g1_i1	far-MIR166	-1,453277101
TRINITY_DN59303_c0_g1_i1	far-MIR529	-2,103960665
TRINITY_DN62237_c0_g1_i3	ghr-MIR399d	-0,508888133
TRINITY_DN82924_c0_g3_i1	gma-MIR1510b	-0,978555616
TRINITY_DN235461_c0_g1_i1	gma-MIR1510b	-0,507942863
TRINITY_DN52297_c0_g1_i1	gma-MIR1511	-0,550409978
TRINITY_DN80524_c0_g1_i4	gma-MIR156c	-1,449557118
TRINITY_DN53611_c0_g1_i1	gma-MIR160d	0,808270585
TRINITY_DN275076_c0_g1_i1	gma-MIR164i	-0,221711957
TRINITY_DN60247_c0_g1_i1	gma-MIR166g	-1,541627444
TRINITY_DN70857_c0_g2_i1	gma-MIR166k	-0,997173318
TRINITY_DN131701_c0_g1_i1	gma-MIR166s	0,413048136
TRINITY_DN32556_c0_g1_i1	gma-MIR171c	-0,743283255
TRINITY_DN265989_c0_g1_i1	gma-MIR171n	-0,22756832
TRINITY_DN11191_c0_g1_i1	gma-MIR172a	-0,250688221
TRINITY_DN96518_c0_g1_i1	gma-MIR172b	-0,597122126
TRINITY_DN79768_c3_g2_i7	gma-MIR172c	3,769478139
TRINITY_DN50688_c0_g2_i1	gma-MIR172c	0,604861705

TRINITY_DN69261_c0_g1_i1	gma-MIR2118a	-0,242601047
TRINITY_DN72240_c0_g1_i1	gma-MIR319g	-0,814790242
TRINITY_DN76435_c1_g1_i1	gma-MIR390b	0,531725048
TRINITY_DN75525_c0_g1_i2	gma-MIR390f	4,30384891
TRINITY_DN10913_c0_g1_i1	gma-MIR393e	-0,743283255
TRINITY_DN71333_c0_g1_i1	gma-MIR395g	-1,154842071
TRINITY_DN84371_c1_g1_i4	gma-MIR396a	2,984159035
TRINITY_DN52514_c0_g1_i1	gma-MIR396g	-1,020285973
TRINITY_DN82716_c4_g3_i3	gma-MIR398d	4,908394963
TRINITY_DN71224_c1_g1_i2	gma-MIR399c	3,959701034
TRINITY_DN275260_c0_g1_i1	gma-MIR4995	-0,925050932
TRINITY_DN58816_c6_g1_i1	gma-MIR4995	-4,059983114
TRINITY_DN240604_c0_g1_i1	gma-MIR530a	-0,338836195
TRINITY_DN69666_c35_g3_i1	gma-MIR5368	-4,170876055
TRINITY_DN133712_c0_g1_i1	gma-MIR6300	3,440519479
TRINITY_DN85109_c1_g1_i1	hbr-MIR6173	-4,0053991
TRINITY_DN84010_c1_g6_i2	lja-MIR7517	0,221818797
TRINITY_DN2436_c0_g1_i1	lus-MIR166a	-1,926760077
TRINITY_DN65661_c0_g1_i1	mdm-MIR172b	-0,743257905
TRINITY_DN60579_c0_g1_i1	mmu-mir-6236	-2,336537607
TRINITY_DN33069_c0_g1_i1	mmu-mir-6236	-1,605544601
TRINITY_DN45701_c0_g1_i1	mmu-mir-6236	-2,280461302
TRINITY_DN70140_c29_g1_i1	mmu-mir-6236	-4,123913587
TRINITY_DN72354_c1_g1_i4	mtr-MIR1507	0,112563778
TRINITY_DN71725_c1_g1_i8	mtr-MIR156b	4,384668052
TRINITY_DN169652_c0_g1_i1	mtr-MIR159b	-0,786204257
TRINITY_DN79186_c1_g1_i2	mtr-MIR160a	1,699308624
TRINITY_DN72179_c0_g1_i1	mtr-MIR160d	1,135819396
TRINITY_DN85977_c0_g1_i1	mtr-MIR164a	-0,528266626
TRINITY_DN66006_c0_g1_i2	mtr-MIR164b	-2,64451668
TRINITY_DN67538_c0_g2_i1	mtr-MIR166b	-0,478191652
TRINITY_DN83980_c0_g1_i1	mtr-MIR2086	0,535240983
TRINITY_DN68388_c0_g2_i1	mtr-MIR2609a	-0,039043965
TRINITY_DN146577_c0_g1_i1	mtr-MIR5204	0,169384481
TRINITY_DN80895_c2_g6_i1	mtr-MIR5241c	0,161930176
TRINITY_DN60223_c0_g1_i1	mtr-MIR5256	-0,642217917
TRINITY_DN81083_c2_g1_i10	nta-MIR156c	1,164799872
TRINITY_DN82306_c4_g1_i1	nta-MIR162b	1,285807886
TRINITY_DN200277_c0_g1_i1	nta-MIR166e	0,015453426
TRINITY_DN8428_c1_g1_i1	nta-MIR166e	0,508845003
TRINITY_DN65785_c0_g1_i1	osa-MIR396d	-0,432197745
TRINITY_DN77349_c0_g1_i1	osa-MIR396g	1,168842848
TRINITY_DN78128_c4_g18_i3	osa-MIR5538	-2,017695839

TRINITY_DN65920_c0_g1_i1	ppe-MIR169a	1,314890816
TRINITY_DN73708_c0_g3_i1	ptc-MIR156e	4,82598851
TRINITY_DN63403_c0_g1_i1	ptc-MIR171j	-0,428229693
TRINITY_DN54257_c0_g1_i1	ptc-MIR172g	-0,205869446
TRINITY_DN51785_c0_g1_i1	rco-MIR167b	0,465663143
TRINITY_DN77164_c1_g3_i10	rgl-MIR5141	-1,645396179
TRINITY_DN67994_c0_g1_i2	sly-MIR167b	2,877887999
TRINITY_DN44061_c0_g1_i1	tcc-MIR394a	0,508835501
TRINITY_DN80629_c0_g1_i6	vvi-MIR166c	-2,077381856
TRINITY_DN134704_c0_g1_i1	vvi-MIR166f	-0,395673155
TRINITY_DN83374_c3_g1_i1	vvi-MIR319e	0,194473314

El nivel de transcriptos indica su expresión en nódulos respecto a raíces de plantas de maní. **u.r:** unidades relativas

Άνεχο II

Nuevos genes blanco de miARNs específicos de *A. hypogaea* L.

Precursor de miARN	Número de acceso del blanco de miARN	Expectativa
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77306_c4_g2_i3	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77306_c4_g2_i2	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN72618_c0_g1_i2	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77326_c3_g2_i2	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN72618_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN192158_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN35839_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN284537_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN98174_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN140354_c1_g1_i1	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77306_c4_g3_i1	0.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN288300_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN62229_c0_g3_i1	0.0
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN104619_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN62229_c0_g2_i1	0.0
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN62229_c0_g2_i2	0.0
ahy-miR3515	TRINITY_DN42511_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3519	TRINITY_DN9876_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3519	TRINITY_DN9876_c0_g2_i1	0.0
ahy-miR3520-3p	TRINITY_DN42286_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN42286_c0_g4_i1	0.0
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN42286_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN42286_c0_g3_i1	0.0
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN197191_c0_g1_i1	0.0
ahy-miR3521	TRINITY_DN76550_c3_g2_i3	0.0
ahy-miR3521	TRINITY_DN76550_c3_g2_i12	0.0
ahy-miR3521	TRINITY_DN76550_c3_g2_i10	0.0
ahy-miR3521	TRINITY_DN76550_c3_g2_i14	0.0
ahy-miR3521	TRINITY_DN76550_c3_g2_i11	0.0
ahy-miR3521	TRINITY_DN76550_c3_g2_i1	0.0
ahy-miR3521	TRINITY_DN76550_c3_g2_i8	0.0
ahy-miR3521	TRINITY_DN76550_c3_g2_i9	0.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN106177_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79940_c2_g3_i4	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79940_c2_g3_i6	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN61050_c0_g4_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN47007_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN61050_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN61480_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN61050_c0_g3_i1	1.0

ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81042_c3_g6_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81042_c3_g6_i2	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN10304_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN34768_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN53835_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN145753_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN148485_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN36423_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN239938_c0_g2_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77022_c1_g1_i3	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN264396_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN153034_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN171730_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN145719_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN81394_c4_g2_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN58483_c0_g1_i2	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN81394_c4_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN75958_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN50536_c0_g2_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN35839_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN50536_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN75958_c0_g2_i1	1.0
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN72186_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN64681_c0_g2_i2	1.0
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN64681_c0_g2_i3	1.0
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN64681_c0_g2_i4	1.0
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN64681_c0_g2_i1	1.0
ahy-miR3517	TRINITY_DN84587_c2_g2_i1	1.0
ahy-miR3519	TRINITY_DN206102_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3519	TRINITY_DN297623_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3520-3p	TRINITY_DN97491_c0_g1_i1	1.0
ahy-miR3520-3p	TRINITY_DN42286_c0_g3_i1	1.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79833_c2_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81042_c3_g8_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN199509_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77615_c6_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN89015_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN78897_c0_g1_i2	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81042_c3_g5_i7	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN95657_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN146488_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN170703_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN64554_c1_g1_i1	1.5

ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN247642_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN60963_c2_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN227907_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN141636_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN69984_c1_g1_i3	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN69984_c1_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN69984_c1_g1_i2	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN177186_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN141302_c1_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN6440_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN78070_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN64936_c3_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN75291_c0_g1_i2	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN75291_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN206003_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN166720_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN77326_c3_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN3509_c1_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN79867_c1_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN7587_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN8565_c0_g3_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN76752_c2_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN93053_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN49766_c0_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN11378_c0_g1_i2	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN105469_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN89895_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN8197_c0_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN16480_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN211316_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN52375_c1_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN1886_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN273654_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN75959_c1_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN79604_c6_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN75959_c1_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80210_c0_g2_i17	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80210_c0_g2_i8	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80210_c0_g2_i6	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80210_c0_g2_i11	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80210_c0_g2_i3	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN84325_c6_g7_i4	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80210_c0_g2_i9	1.5

ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80210_c0_g2_i4	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80210_c0_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN64652_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN64652_c0_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN70035_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN84673_c6_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN73005_c2_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN73005_c2_g2_i3	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN47007_c0_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN47007_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN102603_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN60503_c1_g1_i1	1.5
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN47818_c0_g3_i1	1.5
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN47818_c0_g1_i1	1.5
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN47818_c0_g2_i1	1.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN58005_c0_g2_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN75190_c0_g1_i2	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN72115_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN78472_c0_g2_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN75190_c0_g3_i2	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN33256_c1_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN43748_c0_g3_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN215585_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN283240_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN283240_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN8565_c0_g2_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN221268_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN199527_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN204239_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN80169_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN59453_c0_g1_i2	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN3944_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN12449_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN141754_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN69294_c3_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79329_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83322_c2_g1_i2	2.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN196532_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN78943_c4_g12_i3	2.0
ahy-miR3510	TRINITY_DN131471_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3510	TRINITY_DN238804_c0_g1_i1	2.0
ahy-miR3508	TRINITY_DN67989_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN70342_c0_g1_i1	2.5

ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN78706_c2_g3_i4	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79604_c2_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79604_c2_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN78706_c2_g3_i6	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81042_c3_g6_i3	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN72027_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN494_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN494_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN45154_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN88515_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN102468_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN136447_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN257531_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN68440_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN82549_c1_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83578_c0_g3_i4	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83578_c0_g4_i2	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83578_c0_g3_i3	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83578_c0_g4_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83665_c5_g2_i2	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77806_c1_g1_i5	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN47007_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN80155_c1_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN59158_c0_g1_i2	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN59158_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN3667_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN3667_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN55015_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN55015_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83019_c3_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN36421_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN11483_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN34768_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN65100_c0_g1_i3	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN11483_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN46882_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN95011_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN39487_c0_g1_i2	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN102564_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN34768_c0_g3_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN33256_c2_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN239566_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN46882_c0_g3_i1	2.5

ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN71335_c0_g3_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81102_c2_g19_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN18288_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN202802_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN46882_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83665_c5_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83019_c4_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81102_c2_g17_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN64026_c4_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN279588_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN49766_c2_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN246980_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN13543_c1_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN31435_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN234174_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN62068_c0_g1_i6	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN62068_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN62068_c0_g1_i8	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN62068_c0_g1_i2	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN34312_c2_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN156481_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN54554_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN246969_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN64554_c1_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN83665_c5_g3_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN33256_c1_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN82708_c1_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN54554_c0_g4_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN282196_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN60496_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN57162_c1_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN60493_c0_g1_i2	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN81650_c11_g34_i2	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN79604_c2_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN79604_c2_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN78070_c3_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN82549_c1_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN18424_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN72800_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN40893_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN35747_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN35747_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN26178_c0_g1_i1	2.5

ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN80108_c2_g7_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN195754_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN72887_c2_g1_i2	2.5
ahy-miR3509-5p	TRINITY_DN79102_c2_g2_i2	2.5
ahy-miR3510	TRINITY_DN84043_c2_g18_i2	2.5
ahy-miR3510	TRINITY_DN84043_c2_g18_i1	2.5
ahy-miR3512	TRINITY_DN209784_c1_g1_i1	2.5
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN271109_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN15602_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN30550_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN37415_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN72186_c0_g1_i2	2.5
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN21390_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN82938_c1_g2_i2	2.5
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN82938_c1_g2_i1	2.5
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN82938_c1_g2_i3	2.5
ahy-miR3514-5p	TRINITY_DN102008_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3517	TRINITY_DN84587_c2_g1_i7	2.5
ahy-miR3517	TRINITY_DN84587_c2_g1_i1	2.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN295885_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3520-3p	TRINITY_DN47818_c0_g3_i1	2.5
ahy-miR3520-3p	TRINITY_DN47818_c0_g1_i1	2.5
ahy-miR3520-3p	TRINITY_DN47818_c0_g2_i1	2.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77306_c4_g1_i1	3.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77306_c4_g1_i3	3.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN175034_c0_g1_i1	3.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77560_c1_g1_i1	3.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN62344_c0_g1_i2	3.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN62344_c0_g1_i1	3.0
ahy-miR3510	TRINITY_DN212260_c0_g1_i1	3.0
ahy-miR3511-3p	TRINITY_DN129761_c0_g1_i1	3.0
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN64585_c0_g2_i1	3.0
ahy-miR3515	TRINITY_DN152978_c0_g1_i1	3.0
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN83542_c1_g2_i1	3.0
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN83542_c1_g5_i5	3.0
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN32833_c0_g2_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN32833_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN221091_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81532_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN62191_c1_g1_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77557_c1_g2_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83472_c3_g1_i5	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83472_c3_g1_i6	3.5

ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79143_c5_g9_i2	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79143_c5_g9_i6	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77114_c0_g1_i2	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN41273_c8_g1_i2	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN41273_c8_g1_i3	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN77114_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83472_c3_g1_i4	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79143_c5_g9_i7	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN73793_c0_g1_i3	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN550_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81268_c1_g1_i4	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79143_c5_g9_i12	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79143_c5_g9_i11	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN73793_c0_g1_i2	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN79831_c0_g1_i2	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN46424_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN60827_c0_g1_i2	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN71595_c0_g2_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN65571_c1_g1_i3	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN81650_c11_g34_i2	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN83472_c3_g7_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN65571_c1_g1_i5	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN65571_c1_g1_i1	3.5
ahy-miR3509-3p	TRINITY_DN14616_c0_g2_i1	3.5
ahy-miR3510	TRINITY_DN1693_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3510	TRINITY_DN1693_c0_g2_i1	3.5
ahy-miR3510	TRINITY_DN269202_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3511-5p	TRINITY_DN197253_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3511-5p	TRINITY_DN74389_c0_g6_i2	3.5
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN30550_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN286738_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN82011_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN82011_c0_g1_i3	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN82011_c0_g1_i4	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN82011_c0_g1_i5	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN82011_c0_g1_i6	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN82011_c0_g1_i2	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN82011_c0_g1_i8	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN82011_c0_g1_i7	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN49036_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN81757_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN49183_c0_g2_i1	3.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN49183_c0_g1_i1	3.5

ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN75725_c5_g1_i1	3.5
ahy-miR3515	TRINITY_DN59119_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3515	TRINITY_DN69128_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3515	TRINITY_DN200639_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN84623_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN84623_c0_g1_i2	3.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN253038_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN231544_c0_g1_i1	3.5
ahy-miR3510	TRINITY_DN39349_c0_g1_i1	4.0
ahy-miR3512	TRINITY_DN162311_c0_g1_i1	4.0
ahy-miR3520-3p	TRINITY_DN79317_c0_g1_i1	4.0
ahy-miR3510	TRINITY_DN84198_c3_g1_i1	4.5
ahy-miR3511-3p	TRINITY_DN270211_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3511-5p	TRINITY_DN70100_c1_g1_i1	4.5
ahy-miR3511-5p	TRINITY_DN70100_c1_g2_i1	4.5
ahy-miR3511-5p	TRINITY_DN70100_c1_g5_i4	4.5
ahy-miR3511-5p	TRINITY_DN70100_c1_g5_i2	4.5
ahy-miR3512	TRINITY_DN273049_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3512	TRINITY_DN233228_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN71486_c1_g1_i2	4.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN71486_c1_g1_i1	4.5
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN56108_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3514-3p	TRINITY_DN56108_c0_g1_i2	4.5
ahy-miR3515	TRINITY_DN171417_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3515	TRINITY_DN203305_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3517	TRINITY_DN77152_c1_g3_i1	4.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN79030_c2_g1_i1	4.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN79030_c2_g1_i2	4.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN138813_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN81022_c0_g1_i3	4.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN81022_c0_g1_i2	4.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN37901_c0_g2_i1	4.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN37901_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3519	TRINITY_DN89617_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN200824_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN221098_c0_g1_i1	4.5
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN221659_c0_g1_i1	4.75
ahy-miR3511-3p	TRINITY_DN64538_c0_g1_i2	5.0
ahy-miR3511-3p	TRINITY_DN138649_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3512	TRINITY_DN290606_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN20366_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3513-3p	TRINITY_DN46291_c0_g2_i1	5.0
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN5437_c0_g1_i1	5.0

ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN179018_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3513-5p	TRINITY_DN84376_c1_g4_i5	5.0
ahy-miR3515	TRINITY_DN12694_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3515	TRINITY_DN72144_c1_g1_i2	5.0
ahy-miR3515	TRINITY_DN72144_c1_g1_i1	5.0
ahy-miR3515	TRINITY_DN83415_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3515	TRINITY_DN273135_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3518	TRINITY_DN104992_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3518	TRINITY_DN78371_c1_g1_i1	5.0
ahy-miR3519	TRINITY_DN256330_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3519	TRINITY_DN83935_c0_g1_i2	5.0
ahy-miR3519	TRINITY_DN85074_c6_g2_i1	5.0
ahy-miR3519	TRINITY_DN90859_c0_g1_i1	5.0
ahy-miR3520-5p	TRINITY_DN84362_c0_g1_i1	5.0