

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Evaluación de crecimiento y expresión de genes relacionados a las rutas metabólicas del ácido jasmónico y ácido salicílico después de la aplicación de glifosato en *Arabidopsis thaliana*

Proyecto de Investigación

Michelle Andrea Pazmiño Cajiao

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en
Procesos Biotecnológicos

Quito, 12 de julio del 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Evaluación de crecimiento y expresión de genes relacionados a las rutas metabólicas
del ácido jasmónico y ácido salicílico después de la aplicación de glifosato en**
Arabidopsis thaliana

Michelle Andrea Pazmiño Cajiao

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 12 de Julio del 2018

© Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:	_____
Nombres y apellidos:	Michelle Andrea Pazmiño Cajiao
Código:	00103626
Cédula de Identidad:	1714160130
Lugar y fecha:	Quito, 12 de julio del 2018

Dedicatoria

Doy gracias a mi familia, en especial a mis padres, por permanecer siempre a mi lado y ayudarme a cumplir todos mis sueños, por más inverosímiles que hayan sido. Gracias por ser el pilar base de mi vida, por compartir conmigo tanto mis triunfos como mis fracasos. También doy gracias al kleiner por apoyarme en maneras que solo él lo pudo hacer, por hacer mi vida un caos, pero al mismo tiempo interesante y llena de aventuras. Agradezco a mis amigos, con los que hemos crecido y madurado y también a mi directo de tesis, Antonio, a Darío, Noelia y a mis compañeros del laboratorio, por brindarme su ayuda y tiempo en esta investigación. Finalmente doy gracias al laboratorio de biotecnología y a la Universidad San Francisco de Quito por darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

RESUMEN

El glifosato es un herbicida no selectivo de acción foliar. De acuerdo a las estadísticas, el glifosato en el año 2011 representó aproximadamente el 11% de ventas totales mundiales de productos agroquímicos. Esto quiere decir que el glifosato es el herbicida más usado en el mundo. Este herbicida tiene como función la inhibición de la enzima EPSPS la cual va a afectar ciertos procesos metabólicos como la fotosíntesis y síntesis de proteínas. A pesar de todos los efectos negativos, también se ha visto que el glifosato tiene un efecto positivo en el crecimiento vegetal al ser aplicado a bajas dosis. A pesar de este uso masivo, existe información experimental muy limitada sobre los efectos trazas de este herbicida tanto a nivel de crecimiento vegetal como de inmunidad. Es por esto que, en la presente investigación se realizaron una serie de experimentos, en *Arabidopsis thaliana*, los cuales están divididos en dos categorías: los análisis de crecimiento y los análisis de respuesta inmunitaria. Para los análisis de crecimientos se eligieron 6 tratamientos con diferentes concentraciones de glifosato. Se analizó el efecto traza del glifosato comercial RANGER 480 y del glifosato PESTANAL (Estándar Analítico) tanto en el crecimiento diferencial a nivel del largo de hojas 10, 12 y 13 como también se evaluó el peso fresco y seco. En la evaluación de la respuesta inmunitaria, se monitoreó el efecto traza del glifosato en la expresión génica de marcadores ligados a la inmunidad sobre con ayuda del RT-qPCR. Para estos experimentos se utilizaron diversos genes: el *PR1* y *PR5* relacionados a de la ruta de la defensa dependiente de ácido salicílico (SA) los cuales actúan en respuesta a los organismos biotróficos, el *AOS* y *LOX2* representativos de la ruta de defensa dependiente del ácido jasmónico (JA) los cuales actúan contra insectos, y el *PDF1,2* representativo de la ruta de defensa dependiente del JA/ET el cual actúa contra organismos necrotrofos y el gen *PR4* que es representativo de la ruta del etileno. Los resultados indicaron que el glifosato tiene un efecto letal a concentraciones altas y estimulación del crecimiento cuando son aplicadas a concentraciones bajas. A estas concentraciones, también se observó que el glifosato promueve ligeramente la expresión relativa de los genes *PR1*, *PR5*, *AOS*, *LOX2*, *PDF1,2* pero no del gen *PR4*. Sin embargo, al momento de medir la expresión relativa en los tratamientos con glifosato más la aplicación externa de las hormonas AS y AJ, se observó un efecto supresor de todos los genes mencionados comparados con la aplicación hormonal individual, con excepción del gen *PR4*. Esto nos lleva a pensar que la planta sería mucho más vulnerable en el caso de ser amenazada por insectos herbívoros y organismos biotróficos/necrotrofos debido al efecto traza de glifosato. Análisis posteriores sobre el fenómeno de supresión inmunitaria vegetal causado por el glifosato, debe ser estudiado más a fondo usando bioensayos y cultivos de interés comercial.

Palabras clave: Glifosato, Ácido Salicílico (AS), Ácido Jasmónico (AJ), expresión relativa, RT-qPCR.

ABSTRACT

Glyphosate is a non-selective herbicide, which is absorbed through leaves. Glyphosate has the function of inhibiting the EPSPS enzyme, which is directly related to the metabolic processes like photosynthesis and protein synthesis. In spite of negative effects, studies have shown positive effect called hormesis. In the year 2011, glyphosate represented around 11% of total sales of agrochemical products, making glyphosate the herbicide most used in the world. Notwithstanding, there is very limited information about the effect of glyphosate traces in the plant growth and immunity. In the present investigation, several experiments were performed with *Arabidopsis thaliana*. The experiments were classified in two categories: growth and molecular analysis. Six treatments with different glyphosate concentration were used. The differential growth of the trace effect of the RANGER 480 glyphosate and the PESTANAL (Analytic standard) glyphosate were analyzed in leaf 10, 12 and 13 length, dry and fresh weight. In the immune response analysis, several experiments were conducted, with RT-qPCR, which studied the trace effect of glyphosate in immunity. Different primers were used for this study: *PR1* and *PR5*, salicylic acid defense route representatives which work against biotrophic organisms, *AOS* and *LOX2* jasmonic acid defense route representatives which work against insects, *PDF1,2*, JA/ET defense route representative which work against necrotrophic organism and *PR4*, ethylene defense route representative which work against necrotrophic. The growth results indicate that glyphosate has a lethal effect in high concentrations but a growing effect in low concentrations. It is also evident that glyphosate promotes gene expression in the genes *PR1*, *PR5*, *AOS*, *LOX2*, *PDF1,2*. Nevertheless, the gene expression of glyphosate and hormones (AJ/AS) was suppressed in the genes mentioned before. The only exception was the gene *PR4*, where neither glyphosate nor glyphosate with hormones had an effect on relative expression. Therefore, it is expected a plant is more vulnerable in case of an insect and biotrophic/necrotrophic organism attack due to the gene suppression in the routes mediated by the hormones AS and AJ. New experiments with pathogens and different crops are suggested in order to verify the immunity model presented.

Key words: Glyphosate, Salicylic acid (AS), Jasmonic acid (JA), relative expression, RT-qPCR.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	20
ÁREA DE ESTUDIO	21
MATERIALES	22
MÉTODOS	26
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados.	25
Tabla 2. Master mix I para reacción de cDNA (Invitrogen).....	30
Tabla 3. Master mix II para reacción de cDNA (Invitrogen).	30
Tabla 4. Concentraciones de reactivos por cada reacción.	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis y metabolismo del AS.	13
Figura 2. Respuesta inmunitaria de los factores transcripcionales AtMYC2 y ERF1	16
Figura 3. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
Figura 4. Efecto del glifosato en <i>Arabidopsis thaliana</i> durante los días 0 y 15.	32
Figura 5. Crecimiento diferencial (control vs tratamiento) en <i>Arabidopsis thaliana</i> a diferentes dosis de glifosato comercial RANGER 480 en el día 15.....	35
Figura 6. Crecimiento diferencial (control vs tratamiento) en <i>Arabidopsis thaliana</i> a diferentes dosis de glifosato PESTANAL (Estándar Analítico) en el día 15.....	38
Figura 7. Expresión relativa de los genes en <i>Arabidopsis thaliana</i> a diferentes dosis de glifosato comercial RANGER 480.....	42
Figura 8. Expresión relativa de los genes en <i>Arabidopsis thaliana</i> luego de la aplicación de ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS) y diferentes dosis de glifosato comercial RANGER 480.....	45

INTRODUCCIÓN

El glifosato en la agricultura

El glifosato es el herbicida mayormente usado en el mundo. A pesar de que el glifosato fue inventado en 1950 por un científico suizo, Monsanto logro sintetizar este químico en los años de 1970 para usarlo como herbicida (Roundup) (Nandula, 2010). A mediados de 1990, el uso selectivo de glifosato en para el control de malezas en todo tipo de siembras (jardines, caminos, cuerpos de aguas y áreas no agrícolas) paso a ser extensamente usado a partir de la introducción de cultivos genéticamente modificados. Los estudios nos muestran que, en la actualidad, el 95% de los terrenos que se manejan con siembra directa usan este herbicida en algún punto del ciclo, el cual incluye la pre-siembra (Cox, 2004).

Composición química del glifosato y mecanismo de acción.

Este químico es un herbicida sistémico, no selectivo, de acción foliar, es decir, el cual va a ser absorbido a la planta a través de las hojas principalmente para luego ser metabolizado (Velini, Trindade, Barberis, & Duke, 2010). El glifosato (N-fosfometilglicina) es una sal con un peso molecular de 228,18 g/mol, el cual tiene la función de inhibir la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), la cual se encuentra tanto en plantas como en microorganismos (Salazar & Aldana, 2011). Su participación es crítica en la ruta del shikimato ya que, su inhibición produce una reducción de la biosíntesis de amino ácidos aromáticos como la fenilalanina, tirosina y triptófano, lo cuales al fin y al cabo van a afectar los procesos metabólicos en general como la síntesis de proteínas y la fotosíntesis (Eker, Ozturk, Yazici, Erenoglu B, & Cakmak, 2006). En otras palabras, la

inhibición de la EPSPS afecta el desarrollo de la planta y en su gran mayoría produce la muerte (Velini, Trindade, Barberis, & Duke, 2010).

Efecto de hormesis producido por glifosato

En el ámbito del crecimiento, de acuerdo con ciertos estudios previos, se conoce que varios herbicidas tienen un efecto de hormesis. Esto quiere decir que en altas concentraciones actúa como un agente tóxico que mata la planta pero que, a su vez, a bajas concentraciones, este puede actuar como un estimulante (Cedergree, 2008). Este efecto ha sido observado tanto en *E. grandis* y *P. caribea* (Velini, y otros, 2008), como también en *Hordeum vulgare* (Cebada), *Zea mays* (Maíz), *Glycine max* (Soja), *Eucalyptus grandis* (Eucalypto) y *Pinus caribea* (Pino) (Duke, Cedegreen, Velini, & Belz, 2006). Cabe recalcar que no se conoce con exactitud si es que este efecto afecta a la expresión de otra característica, si se mantiene a través del tiempo o si es que aumenta la producción rápida de semillas (Cedergree, 2008).

Mecanismos de defensa vegetal e inmunidad

Las plantas, para poder defenderse de los patógenos o reaccionar ante el estrés ambiental (hídrico, químico, etc.), usan un sofisticado sistema de defensa, el cual al igual que el sistema inmune de los animales, reconoce moléculas extrañas o las señales producidas por sus propias células en peligro, llevando a que se active una respuesta inmune. Este estado aumentado de la capacidad de defensa que es desarrollado cuando la planta es estimulada, se conoce como resistencia inducida (IR). IR permite resistir a la planta futuros ataques de patógenos como virus, hongos e insectos y condiciones climáticas adversas. Esto quiere decir que IR puede ser activado tanto por factores bióticos como

abióticos (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon, & Van Wees, 2012). Los principales agentes que activan señales dentro del sistema inmune son las hormonas. Originalmente se reconocía a estas hormonas solo como agentes regulatorios del crecimiento y desarrollo de la planta (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon, & Van Wees, 2012). Sin embargo, actualmente se categoriza al ácido salicílico (AS), al ácido jasmónico (AJ) y al Etileno (ET) como las más importantes hormonas de defensa. El ácido abscísico, gibberelinas (Gas), las auxinas, las citoquininas (CKs), etc. también funcionan como agentes moduladores inmunitarios de las plantas los cuales participan en esta compleja red de señales. Se han descrito que las rutas de AS y AJ/ET son mutuamente antagonistas; sin embargo, también se han reportado casos de interacciones sinérgicas entre estas vías lo cual sugiere que la red de señalización es activada por la planta dependiendo de la naturaleza del estrés (Rangel, Castro, Beltran, Reyes, & García, 2010).

Hormonas de defensa vegetal

El ácido salicílico (AS) pertenece al grupo de los fenoles (Raisman & Gonzalez, 2007). Este actúa como un regulador de crecimiento endógeno, el cual controla la germinación, el crecimiento, desarrollo de la planta, el transporte de los iones, las tasas de fotosíntesis, transpiración e induce cambios en la anatomía de las hojas y en la ultra estructura de los cloroplastos (Venegas, 2013). También participa como un inhibidor de la maduración del fruto y se presenta como respuesta a estrés abiótico (Gómez & Capeda, 2010). A nivel de biosíntesis, este compuesto es sintetizado en los cloroplastos a partir del metabolito primario corismato a través de dos rutas enzimáticas: “fenilalanina amonía liasa (PAL) y isochorismate sintetasa (ICS/SID2) (Fig1A) (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon, & Van Wees, 2012). Cabe considerar que el AS tiene la habilidad de producir un

efecto protector sobre las plantas que están bajo estreses, tanto abiótica como biótica, de diferente naturaleza (Riveros, 2011). Esto se debe a que, a nivel de defensa de la planta, cuando esta está amenazada por patógenos biotróficos (patógenos que invaden la planta y que se alimentan de células metabólicamente vivas), se produce la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR), un tipo de IR, la cual está mediada por la acumulación de SA (Raisman & Gonzalez, 2007). Este incremento en la concentración de ácido salicílico provoca un cambio en el potencial redox a nivel celular, ya que produce la reducción del oligómero NPR1 al monómero (forma activa). El NPR1 es translocado al núcleo donde va a funcionar como co-activador transcripcional de los genes de respuesta relacionados al AS tales como el *PR1* y *PR5* (Figura 1B) (Pieterse, Reyes, Van der Ent, & C M Van Wees, 2009).

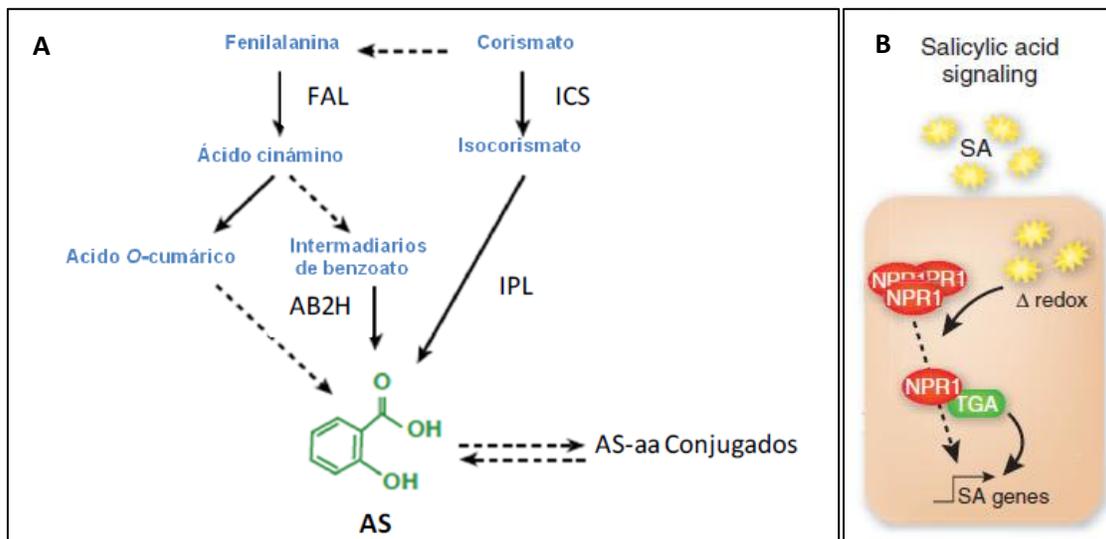


Figura 1.(A): Biosíntesis y metabolismo del AS. (B): Ruta de defensa mediada por el AS. Abreviaturas: FAL, fenilalanina amonio liasa; ICS, isocorismato sintasa; IPL, isocorismato piruvato liasa; AB2H, ácido benzoico 2-hidroxilasa; AS, ácido salicílico

Tomado de: (Rangel, Castro, Beltran, Reyes, & García, 2010) y (Pieterse, Reyes, Van der Ent, & C M Van Wees, 2009).

El ácido jasmónico (AJ) se encuentra ampliamente distribuido en las plantas. Entre los procesos de desarrollo en los que participa el AJ están el crecimiento de la raíz, la

tuberización, la maduración de frutos, la senescencia y desarrollo del polen (Mogollón & Castaño, 2011). Este compuesto es sintetizado a través de una ruta conocida como octadecanoides. Los jasmonatos se forman a partir de los ácidos grasos no saturados linoleico y linolénico. El ácido linolénico, a través de una serie de pasos: lipoxidación, ciclización y β -oxidación, es transformado en el ácido isoajasmónico y este a su vez es isomerizado en ácido jasmónico. Entre las enzimas claves para este proceso están las enzimas: LOX2, aleno oxido sintetasa (AOS), 18 etileno, ácido abscisico, etc (Jordán & Casaretto, 2006).

A nivel de respuesta inmune, se conoce que el ácido jasmónico y sus metabolitos relacionados estructuralmente, los cuales son derivados de los lípidos, intervienen en la respuesta de defensa de la planta frente a insectos herbívoros y microorganismos necrotróficos (patógenos que destruyen las células con ayuda de toxinas para luego alimentarse de estas) a través de la resistencia sistémica inducida (ISR) (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon, & Van Wees, 2012). Al momento en que los insectos dañan la planta al romper sus tejidos o también cuando se da una infección por patógenos necrotróficos, se incrementa la concentración del ácido jasmónico y los metabolitos. Esto produce la degradación de las proteínas JAZ, ocasionando la activación de las diferentes rutas de señalización de defensa en *Arabidopsis*: MYC2, ERF1 y ORA59 (Pieterse, Reyes, Van der Ent, & C M Van Wees, 2009). La vía del MYC está controlado por factores de transcripción tipo-MYC y a su vez regula la actividad del marcador genético “VEGETATIVE STOREAGE PROTEIN 2 (VSP2) y LOX2. Por el otro lado, la vía del ERF está regulada por miembros de los factores de respuesta APETALA2/ETHYLENE (AP2/ERF) y también OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS59 (ORA59).

Esta vía regula la actividad del gen marcador en respuesta al JA, PLANT DEFENSIN1.2 (*PDF1.2*) (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon, & Van Wees, 2012).

El etileno (ET) es un gas producido en todas las plantas. Esta regula múltiples procesos fisiológicos y de desarrollo. Por ejemplo: senescencia de hojas, maduración, etc. (Aucique, Daza, & Romero, 2012). También se presenta en respuesta a una infección o herida, seguido de un incremento de una serie de compuestos de defensa (lignina, proteínas PR, etc.) (Segundo, 2011). Las señales van a ser recibidas por los receptores como ETR1 en la membrana plasmática. Esta señal del ET va a eliminar la supresión producida por el regulador CTR1 hacía el regulador positivo EIN2. Este va a inhibir a EIN3 y va a activar el factor de transcripción de ERF1 y, por ende, los genes de defensa (figura2). (Pieterse, Reyes, Van der Ent, & C M Van Wees, 2009). Uno de los genes marcadores de respuesta de esta vía es el *PR4*.

Cabe recalcar que el AJ y el ET van a ser antagónico o van a cooperar dependiendo del estrés existente. En el caso de organismos necrotróficos, por ejemplo, ambas rutas de señalización van a activarse a través de la inducción transcripcional de ERF1. Por el otro lado, el JA por sí solo va a inducir la expresión de la vía MYC, la cual es la responsable de la activación de genes de respuestas a herida y de la represión de genes de respuesta a patógenos (Lorenzo, 2005).

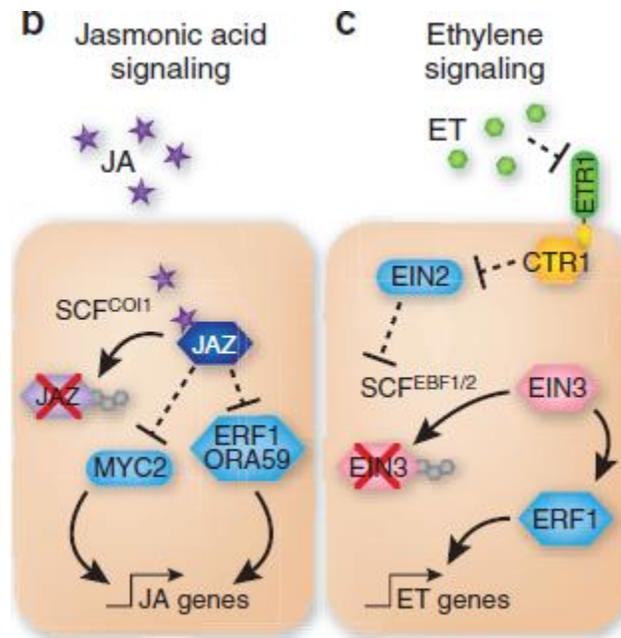


Figura 2. Respuesta inmunitaria dependientes de los factores transcripcionales AtMYC2 y ERF1

Tomado de: (Pieterse, Reyes, Van der Ent, & C M Van Wees, 2009).

Arabidopsis thaliana como modelo vegetal

Arabidopsis thaliana es una de las plantas más usadas como modelo vegetal dentro del área de la ciencia (NCBI, 2017) debido a que tiene uno de los genomas más pequeños del reino Plantae (125Mb), grandes mapas genéticos de todos los 5 cromosomas, corto ciclo de vida, fácil de cultivar en espacios pequeños, fácil de inducir mutaciones, etc (Somerville & Koomneef, 2002). La *Arabidopsis*, es una planta herbácea de pequeño tamaño y ciclo anual que pertenece a la familia de Brassicaceae (Cruciferae). Pese a que está emparentada con numerosas plantas comestibles como la col, el nabo o la planta de la mostaza, esta especie es usualmente considerada como una mala hierba (CSIC, 2016). La línea Col-0 es de tipo silvestre y no tiene ningún tipo de mutación evidente (Tair, 2016).

RT-qPCR y análisis de expresión génica

Existen dos tipos de RT-qPCR, el cualitativo y el cuantitativo. El RT-qPCR cualitativo tiene como objetivo detectar la presencia o ausencia de una determinada secuencia. Se usa para la sub-tipificación de virus y la identificación de especies bacterianas (Agilent-technologies, 2016). También se puede utilizar para la discriminación alélica entre tipo salvaje y mutante, entre diferentes SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) o entre diferentes formas de empalme (Eurogentec, 2013). Por el otro lado está el RT-qPCR cuantitativo. En este tipo de PCR, adicionalmente a la amplificación de ADN, se da el proceso de cuantificación de la expresión génica en función de la cuantificación del ADN complementario (cDNA). La expresión génica es un proceso en el que, mediante la intervención de un mRNA, la información codificada en el ADN se transforma a proteínas (Alarcón, 2017).

El software de PCR cuantitativo utiliza la fase exponencial de PCR para la cuantificación. El qPCR es inicialmente un proceso exponencial. En este punto, una molécula fluorescente, que se une con el producto del ADN, va a generar diferentes niveles de fluorescencia acorde al aumento de ADN (Alarcón, 2017). Después de un tiempo, como se mencionó antes, se mantiene constante debido al reactivo limitante. Las reacciones pueden estabilizarse en diferentes niveles a pesar de que tengan la misma concentración inicial de ADN. Es aquí donde se obtiene un ciclo umbral o CT (ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral), el cual va a ser usado para los cálculos. La cantidad detectada en un cierto punto de la ejecución está directamente relacionada con la cantidad inicial de blanco en la muestra (Eurogentec, 2013). Cabe recalcar que, cuanto más abundante es el ADN, más rápido se alcanza este punto, dando así valores Ct prematuros. Para que estos valores de Ct sean significativos tienen que ser correlacionadas con algunos otros valores cuantitativos (Eurogentec, 2013). Las aplicaciones más comunes del PCR

cuantitativo son el análisis de la expresión génica, la detección o cuantificación de patógenos y la cuantificación de microARN.

JUSTIFICACIÓN

Desde la aparición de la agricultura, el ser humano ha utilizado métodos para el control de malas hierbas, los cuales han afectado los cultivos. En el 2011, los herbicidas representaron el 56% del total de ventas mundiales de productos agroquímicos (INTA, 2012). Se conoce que el herbicida más usado en el mundo es el glifosato cuyas ventas constituyen el 11% de las ventas totales de los productos agroquímicos (Valverde, 2017). Aproximadamente hasta un 10% de los residuos de glifosato que se encuentran en el suelo (traza), son absorbidos por plantas que se encuentran al alrededor y también por los cultivos subsiguientes (Eker, Ozturk, Yazici, Erenoglu B, & Cakmak, 2006). El glifosato tiene como función el inhibir la enzima EPSPS. Este efecto produce una reducción de la biosíntesis de amino ácidos aromáticos, lo cuales al fin y al cabo van a afectar los procesos metabólicos en general (Velini, Trindade, Barberis, & Duke, 2010). También se ha visto que, este herbicida afecta la capacidad de tomar los micronutrientes disponibles en el medio, los cuales juegan un rol clave en muchos puntos críticos de las funciones fisiológicas que incluyen los involucrados en la resistencia de enfermedades (Sanogo, Yang, & Scherm, 2000). Por este motivo en varios estudios se ha visto un aumento en la susceptibilidad en enfermedades como *Fusarium*, *Pythium* en frejol, la reaparición de enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa*, etc (Johal & Huber, 2009). A pesar de los efectos negativos del glifosato, también se ha visto que la aplicación del glifosato a muy bajas concentraciones puede estimular el crecimiento; efecto conocido como Hormesis (Cedergree, 2008). Por ende, cabe recalcar que, a pesar del alto uso del glifosato, existe información experimental muy limitada con respecto al efecto de las trazas del glifosato tanto a nivel de crecimiento como de respuesta inmunitaria. Por este motivo, en esta investigación con la utilización de

Arabidopsis thaliana Col-0, se busca comprender los efectos traza del glifosato a nivel de crecimiento y también se busca comprender los mecanismos que participan en la respuesta inmunitaria.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el crecimiento y la expresión de genes que están relacionados a las rutas metabólicas del ácido jasmónico y ácido salicílico en *Arabidopsis thaliana* después de la aplicación de glifosato.

Objetivos Específicos

- Evaluar los efectos del glifosato en el crecimiento de la planta usando diferentes variables: largo de las hojas, peso fresco y peso seco de planta.
- Medir la expresión de los genes *PDF1.2*, *PR1*, *PR5*, *PR4*, *AOS*, y *LOX2* para determinar la respuesta de AJ/AS después de la aplicación del glifosato.
- Cuantificar la expresión de los genes *PDF1.2*, *PR1*, *PR5*, *PR4*, *AOS*, y *LOX2* después de la aplicación conjunta del glifosato y las hormonas que regulan la respuesta de inmunitaria.

ÁREA DE ESTUDIO

Las semillas utilizadas fueron la variedad COL-0 de *Arabidopsis thaliana* las cuales fueron sembradas en el invernadero de la Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá, Quito, Ecuador. Por otro lado, todos los análisis moleculares obtenidos a partir de la extracción del material vegetal, se llevaron a cabo dentro de las instalaciones del mismo Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, Cumbaya, Quito, Ecuador.

MATERIALES

Cultivo de *Arabidopsis thaliana*:

- Semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 o Wild Type
- Arena de río
- Autoclave (MCR)
- Vaso de plástico de 3 onzas
- Plastic wrap

Tratamientos nutricionales:

- Reactivos para Hoagland
 - 2MKNO_3^-
 - $2\text{M Ca}(\text{NO}_3^-)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
 - Iron (Sprint 138 iron chelate)
 - $2\text{M Mg SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 - $1\text{M NH}_4^+\text{NO}_3^-$
 - H_3BO_4
 - $\text{MnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$
 - $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 - CuSO_4
 - $\text{H}_3\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 - $1\text{M KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0 con 3M KOH)
- Balanza analítica (Pioneer)
- Plancha agitadora (Boeco)

- Vasos de precipitación
- Botellas de vidrio de 500ml
- Probetas

Obtención de la concentración adecuada de glifosato:

- *Arabidopsis thaliana* Col-0 o Wild Type
- Glifosato RANGER 480
- Regla
- Horno
- Crisol

Extracción de RNA total:

- *Arabidopsis thaliana* Col-0 o Wild Type
- Nitrógeno líquido
- Tubo *Eppendorf* de 2ml
- Tampón de extracción
 - 0,35M glicina
 - 0,048 M de NaOH
 - 0,34 M EDTA
 - 4% SDS (autoclavado)
- Pipeta 10-1000uL
- Pipeta 20-200uL
- Fenol/ cloroformo / alcohol isoamílico [25:24:1 v/v].
- Vórtex (Benuer)

- Centrifugadora refrigerada (Sigma)
- Cloroformo / alcohol isoamílico [24:1 v/v].
- 8M LiCl (100ml) 33,91 gr LiCl
- Etanol al 70%
- Agua PCR o Agua MiliQ
- NaAc (Acetato de sodio) pH 5,2
- Etanol al 96%

Preparación de geles de agarosa:

- Agarosa (Bioline)
- Balanza (Nimbus)
- Plancha agitadora (Boeco)
- TAE 1X
- SYBER SAFE (Invitrogen)
- Blue juice (Invitrogen)
- Parafilm
- Máquina de electroforesis (Labnet)

Cuantificación de ARN:

- Fluorómetro Qubit (invitrogen)
- Qubit RNA Kit (5-100 ng) (life technologies)

Purificación con DNasa I:

- ARN
- Buffer 10X (Invitrogen)
- DNasa I Amp (Invitrogen)

- Agua PCR o Agua MiliQ (Invitrogen)
- EDTA (Invitrogen)

Síntesis de cDNA

- ARN libre de DNasa
- Oligo dT primer (Promega)
- 10nM dnTPs (Promega)
- 5X Buffer (Promega)
- DTT (Promega)
- Superscript III (Promega)
- H2O PCR (Promega)
- Termociclador (Labnet)

RT-qPCR

- Sso FastTM EvaGreen Supermix (Bio-Rad)
- Agua PCR
- cDNA
- Primers (Invitrogen):

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados.

Primers	Forward	Reverse
UBI10	GGCCTTGTATAATCCCTGATGA ATAG	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACA TAGT
PR1	CTCGGAGCTACGCAGAACAAC	TTCTCGCTAACCCACATGTTCA
PR5	GCTGCCGTGGAGCTAACG	AGGTGCTCGTTTCGTCGT
AOS	CCGGAGAGATTCGTCGGA	AGGTGCTCGTTTCGTCGT
LOX2	CGGAACATAGGCCACGGAGA	TGAGGTGACCCATGCAATCG
PDF1,2	CGAGAAGCCAAGTGGGACAT	TCCATGTTTGGCTCCTTCAA
PR4	GCAACGGAGGCTTGGATTTG	TGAGCTCATTGCCACAGTCG

MÉTODOS

Cultivo de *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 (Col-0)

Se utilizó el ecotipo de *Arabidopsis thaliana* Col-0 como wild type. Se esparció las semillas en un vaso de 20mL que contenía arena de río autoclavada. Se regó con el medio Hoagland, se cubrió con un plástico transparente y se almacenó a temperatura -4°C por 3 días. Una vez germinada la semilla, se almacenó a temperatura 22°C hasta que tuvo un tamaño de 1cm de largo. En ese momento, se trasplantó cada planta a otro vaso con arena de río autoclavada (Figura 3).



Figura 3.Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Evaluación del crecimiento

Se tomó 5 plantas de *Arabidopsis thaliana* para cada tratamiento y se colocó 1 planta en cada caja Petri. Los tratamientos constaron en diferentes diluciones (0, 5, $5 \cdot 10^{-1}$, $5 \cdot 10^{-2}$, $10 \cdot 10^{-3}$, $10 \cdot 10^{-4}$, $10 \cdot 10^{-6}$, $10 \cdot 10^{-9}$ mL por L de solución) del glifosato Ranger. Se adicionó 5 mL de cada tratamiento a cada planta y se observó los efectos fenotípicos en el día 0, 5, 10, 15 a temperatura ambiente. Para los análisis de crecimiento diferencial, se

tomó la hoja 10, 12 y 13 y se midió el largo de estas. Este crecimiento diferencial fue calculado a través de una fórmula matemática CD:

$$\{[\text{largo de hoja en día 15 del tratamiento(cm)} - \text{largo de hoja en día 0 del tratamiento (cm)}] - [\text{largo de hoja en día 15 del control(cm)} - \text{largo de hoja en día 0 del control (cm)}]\}.$$

Otras variables que se midieron fueron el peso fresco y seco. Este se realizó una vez concluido las otras mediciones. Primeramente, se pesó el crisol. Después se cortó las plantas en pedazos y se las colocó en el crisol. A continuación, se llevó todas las plantas al horno a una temperatura de 160°C por 90 min. Una vez frías las muestras, se volvió a pesar la planta con el crisol. Finalmente, para determinar el crecimiento diferencial en el peso fresco y seco se realizaron ciertos cálculos. PF y PS:

$$\text{peso del tratamiento g} - \text{peso del control(g)} .$$

Cabe recalcar que los resultados obtenidos fueron el promedio de 4 repeticiones biológicas.

Análisis estadístico

El diseño estadístico utilizado fue DCA (diseño completamente al azar). Los datos de crecimiento diferencial fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), y adicionalmente se realizó una prueba de Tukey para comparación de las medias del diferencial de crecimiento usando el programa estadístico SPSS 22®. También se usó la prueba t para los análisis de expresión relativa.

Extracción de RNA

En primer lugar, se enfrió el mortero autoclavado con nitrógeno líquido. Es necesario tomar en cuenta que todo el proceso de extracción tenía que realizarse en frío. Se usó 5 plantas de *Arabidopsis thaliana* de cada tratamiento y se les molió con nitrógeno

líquido hasta obtener un polvo. Una vez que se obtuvo el polvo fino, se transfirió a un tubo *Eppendorf* pre-frío hasta que se obtuvo la mitad del tubo lleno. A continuación, se añadió 650µL de tampón de extracción el cual fue calentado a 50 ° C para disolver el SDS. Adicionalmente, se añadió 0,5 ml de fenol/ cloroformo / alcohol isoamílico en cada muestra y se colocó en el vórtex por 30 segundos. Debido a que el fenol es peligroso, se usó guantes, mandil y el manejo del reactivo fue siempre en la sorbona. Este último paso se repitió una vez. Después, se centrifugó durante 3 minutos a 14000 rpm a 4 °C y la fase acuosa o superior se transfirió a otro nuevo tubo *Eppendorf* mientras que la fase de fenol o fase inferior se desechó. Se añadió 0,5 mL de cloroformo / alcohol isoamílico y se agitó enérgicamente. Se llevó la muestra a la centrifugadora durante 3 minutos a 14000 rpm y a 4°C. Una vez centrifugado, se transfirió nuevamente la fase acuosa a un nuevo tubo *Eppendorf* en donde se añadió 1/3 volumen de LiCl 8M (aprox. 150 uL). La muestra purificada se mezcló bien y se incubó a 20 ° C por 24 horas o un fin de semana. Después de un día o fin de semana, se centrifugó las muestras por 20 minutos a 14 000 rpm a 4 C °. Es en este punto donde un claro pellet de ARN fue visible. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta, tomando en cuenta no descargar el sedimento, y se añadió 0,5 mL de etanol al 70% (-20 ° C). Este se mezcló suavemente para lavar más no disolver el pellet. Se centrifugó durante 1 minuto a 14 000 rpm a 4 ° C, se eliminó el sobrenadante incluyendo las pequeñas gotitas en el lado del tubo y se dejó boca abajo el tubo para conseguir que el etanol se evapore. Se añadió 400 µL de Agua PCR o Agua MiliQ y mantuvo en hielo o a 4°C durante 1 hora para permitir que el sedimento de ARN se hidrate. Para disolver el precipitado de ARN, se lo llevó al vórtex. Luego se añadió 40 uL de NaAc (Acetato de sodio) pH 5,2 y 1 mL de etanol al 96% (-20 ° C) y esta se incubó por 60 minutos a -80 ° C. A continuación, se centrifugó durante 4 minutos a 14 000 rpm a 4 ° C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el

precipitado con 400 μ L de etanol 70% (-20 ° C). Se volvió a centrifugar durante 3 minutos a 14 000 rpm a 4 ° C, se colocó el tubo boca abajo el tubo para que el etanol se evapore y conseguir secar el pellet. Finalmente, se disolvió el precipitado en 25 μ L de H₂O MQ o H₂O PCR, se determinó la concentración en el Qubit RNA Kit (5-100 ng) (life technologies) y se realizó los respectivos cálculos para tener la concentración de (1ug) de cada muestra de RNA (Sanchez & Carbajosa, 2008).

Preparación de geles de agarosa

Se adicionó 1.2 gramos de agarosa y 60 mL de TAE 1X a una botella, se dejó hervir y posteriormente se dejó enfriar para colocar 2 uL de SYBER SAFE. Una vez que el gel esté en una fase sólida, se cargó las muestras. Se corrió el gel por 40 minutos a 80 voltios, 200 de corriente, 200 watts.

Obtención de ARN libre de ADN

Se utilizó 1ug de ARN, 1uL de Buffer 10X, 1uL de DNasa I Amp del kit invitrogen y se aforó la solución a 10uL. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se adicionó 1uL de EDTA y se colocó las muestras en el termociclador MULTIGENE a 65°C durante 10 minutos.

Obtención cDNA usando la transcripción reversa

Se preparó el master mix I (Tabla 1) y se puso los tubos en el termociclador MULTIGENE a 65 °C por 5 minutos, luego se puso en un racket frío por 5 minutos.

Tabla 2. Master mix I para reacción de cDNA (Invitrogen).

Reactivo	Cantidad uL
ARN libre de DNasa	11 uL
Oligo dT primer	1 uL
10nM dnTPs	1 uL

Luego se adicionó el master mix II (tabla 2) a la solución previa y esta se incubó nuevamente en el termociclador MULTIGENE a 50°C durante 60 minutos, a 55°C durante 15 minutos y finalmente a 70°C durante 15 minutos. Una vez terminada la corrida, se puso las muestras a -20°C.

Tabla 3. Master mix II para reacción de cDNA (Invitrogen).

Reactivo	Cantidad uL
5X Buffer	4 uL
DTT	1 uL
Superscript III	0,75 uL
H2O PCR	1,25 uL

q RTPCR

Se preparó un master mix para cada primer (Tabla 3) y se colocó las muestras en el PRIMEQ (Desnaturalización: 95°C por 10 minutos; Amplificación: 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 30 seg)

Tabla 4. Concentraciones de reactivos por cada reacción.

Reactivo	Cantidad uL
Sso Fast™ EvaGreen Supermix	7,5 uL
Foward primer	0,45 uL
Reverse primer	0,45 uL
Agua PCR	5,1 uL
cDNA	1,5 uL

RESULTADOS

Primeramente, se evaluó el efecto del glifosato en el crecimiento usando las variables visuales comparativas. De acuerdo a la figura 4, se puede ver que la dosis de aplicación recomendada de glifosato ($A = 4,8 \cdot 10^1 \text{ mg/L}$) provoca un amarillamiento y deshidratación de la planta. También se puede percibir que a medida que la concentración baja, estos efectos van disminuyendo. Incluso de manera contrastante, se puede apreciar en los tratamientos con las concentraciones de E ($4,8 \cdot 10^{-3} \text{ mg/L}$) y F ($4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mg/L}$), una mayor densidad foliar. Cabe recalcar que a partir del tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1} \text{ mg/L}$) ya no se observan visualmente ningún tipo de lesiones en la planta causadas por el glifosato.

Tratamiento	DIA 0	DIA 15
Control 0mg/L		
A $4,8 * 10^1$ mg/L		
B $4,8 * 10^0$ mg/L		
C $4,8 * 10^{-1}$ mg/L		
D $4,8 * 10^{-2}$ mg/L		
E $4,8 * 10^{-3}$ mg/L		
F $4,8 * 10^{-5}$ mg/L		

Figura 4. Efecto del glifosato en *Arabidopsis thaliana* durante los días 0 y 15. Barra de referencia= 58.5mm

Efecto del glifosato RANGER 480 en el crecimiento

Para determinar el efecto traza del glifosato en el crecimiento se analizó el crecimiento diferencial de las hojas 10, 12 y 13 de *Arabidopsis thaliana* y también se usaron medidas de peso fresco y peso seco.

En la figura 5 se muestra el crecimiento diferencial en *Arabidopsis thaliana* a diferentes dosis de glifosato comercial RANGER 480. Los resultados obtenidos fueron el promedio de 4 repeticiones biológicas experimentales. En la sección A, que analiza más específicamente el diferencial de crecimiento (cm) en el largo de las hojas 10, 12 y 13, se puede apreciar que el tratamiento A ($4,8 \cdot 10^1 \text{mg/L}$) tiene un diferencial de crecimiento negativo de aproximadamente -0.56 cm en la hoja 10, -0.80 cm en la hoja 12 y -0.83 cm en la hoja 13 y similarmente el tratamiento B ($4,8 \cdot 10^0 \text{mg/L}$) tiene un diferencial de crecimiento negativo de aproximadamente -0.04 cm en la hoja 10, -0.07 cm en la hoja 12 y -0.10 cm en la hoja 13. Adicionalmente cabe recalcar que en estos tratamientos (Figura 4) se produce una deshidratación y amarillamiento de la hoja en el día 15 después de la aplicación de glifosato. A partir del tratamiento D ($4,8 \cdot 10^{-2} \text{mg/L}$) en donde la planta tiene un crecimiento positivo constante de aproximadamente 0.04 cm en la hoja 10, 0.05 cm en la hoja 12 y 0.12 cm en la hoja 13 en comparación del control. De la misma manera, en la figura 5 sección B y C se puede notar que el diferencial de crecimiento pasa de negativo (-1.250 g) en peso fresco y (-0.050 g) en peso seco en una concentración alta de glifosato (A= $4,8 \cdot 10^1 \text{mg/L}$) a positivo a medida que la concentración de este químico va disminuyendo hasta obtener un diferencial de crecimiento de (0.250 g) en peso fresco y (0.020 g) en peso seco, en el tratamiento F ($4,8 \cdot 10^{-5} \text{mg/L}$). Entre los tratamientos que entran dentro del crecimiento diferencial negativo en peso fresco (g) estan: A (4,8

10^1 mg/L), B ($4,8 \cdot 10^0$ mg/L), C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) y D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) (figura 5, sección B) con un rango de -1.250 g a -0.100 g. En el caso del peso seco (g) están: A ($4,8 \cdot 10^1$ mg/L), B ($4,8 \cdot 10^0$ mg/L) y C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) con un rango de aproximadamente -0.050 g a -0.010 g. Adicionalmente, se puede apreciar nuevamente en la figura 4, sección B y C que los tratamientos E ($4,8 \cdot 10^{-3}$ mg/L), con aproximadamente 0.200 g en peso fresco y 0.020 g en peso seco, y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) con aproximadamente 0.250 g en peso fresco y 0.025 g en peso seco tienen un diferencial de crecimiento notablemente alto en comparación del control.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5 % realizada en el crecimiento diferencial con diferentes tratamientos de glifosato comercial RANGER 480 (Figura 5), se ubicaron dos rangos de significación, habiéndose agrupado en el primero (a) el tratamiento A ($4,8 \cdot 10^1$ mg/L) en el caso del crecimiento diferencial en largo de hoja y peso fresco. En el caso del peso seco, los tratamientos A ($4,8 \cdot 10^1$ mg/L), B ($4,8 \cdot 10^0$ mg/L) y C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) forman parte del grupo (a) mientras que los tratamientos B ($4,8 \cdot 10^0$ mg/L), C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L), D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L), E ($4,8 \cdot 10^{-3}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) del grupo (b).

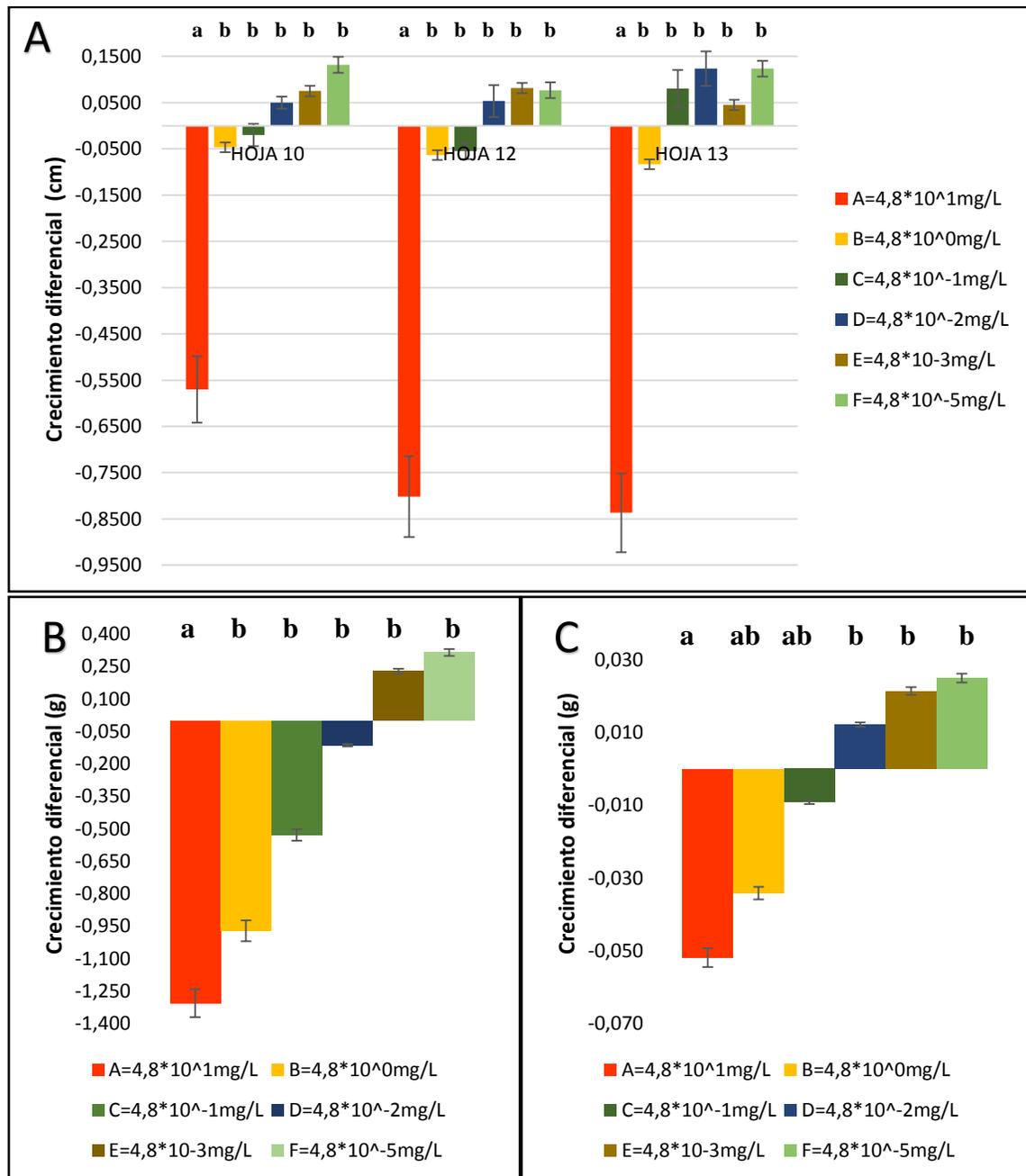


Figura 5. Crecimiento diferencial (control vs tratamiento) en *Arabidopsis thaliana* a diferentes dosis de glifosato comercial RANGER 480 en el día 15. (A): Largo de la hoja 10, 12 y 13, (B): Peso fresco, (C): Peso seco. Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la Prueba de Tuckey

Efecto del glifosato PESTANAL (Estándar Analítico) en el crecimiento

Al momento de realizar los análisis de crecimiento diferencial con el glifosato PESTANAL (Estándar Analítico) se pudo observar que al igual que con el glifosato Ranger, los tratamientos A ($4,8 \cdot 10^1$ mg/L) con un rango de -0.530 cm a -0.620 cm y B ($4,8 \cdot 10^0$ mg/L) con un rango de -0.220 cm a -0.440 cm tienen un diferencial de crecimiento negativo a nivel de las tres hojas analizadas (figura 6, sección A). Asimismo, en la sección B y C también se puede observar un crecimiento negativo de valores entre -0.60 g y -1.650 g en peso fresco y valores entre -0.010 g y -0.065 g en peso seco.

De igual manera que con el glifosato comercial, sólo a partir del tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) se da un crecimiento positivo en comparación al control. Como muestra la figura 6, sección B los tratamientos A ($4,8 \cdot 10^1$ mg/L), B ($4,8 \cdot 10^0$ mg/L), C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) y D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) tienen un diferencial de crecimiento en peso (g) negativo con valores entre -0.150 g y -1.650 g mientras que los tratamientos E ($4,8 \cdot 10^{-3}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) tienen positivo con valores entre 0.100 g y 0.200 g. A diferencia del peso fresco, en el peso seco (figura 6, sección C), los tratamientos con un diferencial de crecimiento en peso (g) positivo son: D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L), E ($4,8 \cdot 10^{-3}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) los cuales tienen valores entre -0.010 g y -0.065 g.

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5 % realizada en el crecimiento diferencial con diferentes tratamientos de glifosato comercial RANGER 480 (Figura 6), se ubicaron tres rangos de significación. En el caso del crecimiento diferencial a nivel de largo de hoja 10, 12 y 13 y de peso fresco, están agrupados en el primero (a) el tratamiento A ($4,8 \cdot 10^1$ mg/L) y B ($4,8 \cdot 10^0$ mg/L). Solamente a nivel de crecimiento diferencial en peso seco, el tratamiento F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) no pertenece al grupo (a). En el último rango de significación

(c), se encuentran los tratamientos E ($4,8 \cdot 10^{-3}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) pero solo a nivel de crecimiento diferencial de largo de hoja 12. El resto de tratamientos se ubican en el grupo (b). Se observa pocas diferencias significativas entre grupos.

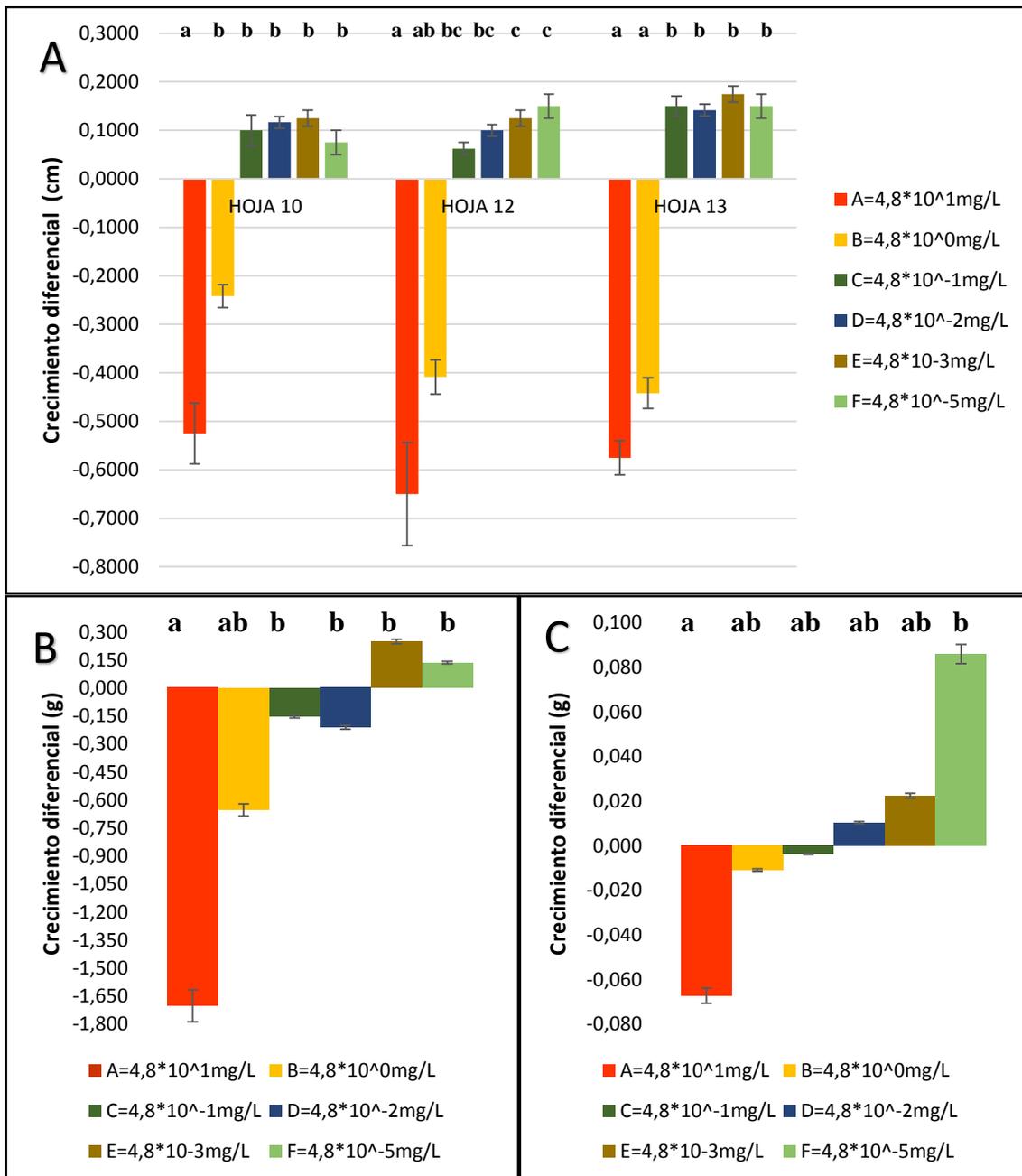


Figura 6. Crecimiento diferencial (control vs tratamiento) en *Arabidopsis thaliana* a diferentes dosis de glifosato PESTANAL (Estándar Analítico) en el día 15. (A): Largo de la hoja 10, 12 y 13, (B): Peso fresco, (C): Peso seco. Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la Prueba de Tuckey

Efecto del glifosato traza en la expresión de los genes de defensa

El objetivo de los análisis de la respuesta inmunitaria fue el examinar el efecto del glifosato a nivel de inmunidad. Estos análisis se llevaron a cabo con la utilización de la técnica del RT-qPCR, en donde se usaron diferentes marcadores que participan en las diferentes rutas de defensa de la planta.

Para la elección de estos tratamientos, se buscó las concentraciones de glifosato las cuales no tengan un efecto negativo a nivel de crecimiento (menor a 0) pero que al mismo sus valores se acerquen a 0 (figura 5 y 6). Por este motivo, se eligió a los tratamientos C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) y D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L). Adicionalmente también se buscaba analizar el efecto de glifosato en la inmunidad en plantas con hormesis. Por ende, se eligió el tratamiento F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) ya que este fue el que tuvo mayor crecimiento tanto en largo de hojas como en peso fresco y seco (Figura 5 y 6).

La figura 7 mide la expresión relativa de los genes a diferentes dosis de glifosato RANGER 480. Los marcadores *PR1* y *PR5* participan dentro de la ruta de defensa del ácido salicílico mientras que los genes *AOS* y *LOX2* en la del ácido jasmónico. El marcador *PDF1,2* participa en la ruta de defensa JA/ET y el PR4 solamente en la del etileno.

Como se puede observar en la figura 7 sección A, el glifosato provoca que el gen *PR1* sea notablemente expresado en el tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) en comparación al control (aproximadamente 30 veces más) y a medida que la concentración de glifosato tratada disminuye, la expresión de este gen también. En el caso del gen *PR5* (figura 7, sección B) se puede observar un efecto similar de expresión al momento en que la planta está expuesta a glifosato en donde el gen *PR5* se expresa 55 veces más aproximadamente

en el tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L). A diferencia del gen *PRI*, aquí no se ve una disminución gradual de expresión del gen *PR5*. Esto quiere decir que la expresión del gen *PR5* en los tratamientos D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) es menor que la del tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) pero similar entre ellos (Valores de Ct entre 12 y 17). En el caso del gen *AOS* (figura 6, sección C), el glifosato también provoca una considerable expresión en una concentración alta de glifosato ($C=4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) de aproximadamente 105 veces más que el control y una menor expresión en concentraciones más bajas pero aún así mayor en comparación al control (valores de Ct entre 20 y 21). Por el otro lado, el gen *LOX2* (figura 7, sección D) no solamente se expresa notablemente en el tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) (aproximadamente 22 veces más que el control) sino que incluso este gen se expresa más en el tratamiento D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) (aproximadamente 27 veces más que el control). Al igual que en los otros genes, el tratamiento F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) produce una expresión de aproximadamente 8 veces más que el control pero esta expresión no es tan alta como en los otros tratamientos. Cuando analizamos la ruta de JA/ET podemos observar que los tres tratamientos a analizar tienen una mayor expresión en el gen *PDF1,2* en comparación al control (figura 7, sección E). En orden de mayor a menor expresión se encuentra: la concentración F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) con una expresión de casi 200 veces más que el control, seguido por el tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) con una expresión de 130 veces más que el control y concluido con el tratamiento F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) con una expresión de 25 veces más que el control. Finalmente, en la ruta del etileno que está representada con el gen *PR4*, podemos ver que los tres tratamientos cuando se los compara al control (figura 7, sección F) tienen una expresión relativamente igual. El tratamiento D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) apenas se encuentra 1.5 veces más expresado que el control y los otros dos tratamientos apenas 0,5 veces más expresado.

De acuerdo a la prueba t (figura7), los tratamientos marcados con * tienen significación estadística. Solo en el caso del gen PR4, ninguno de los tratamientos tiene significación estadística comparados con el control (figura 7, sección F).

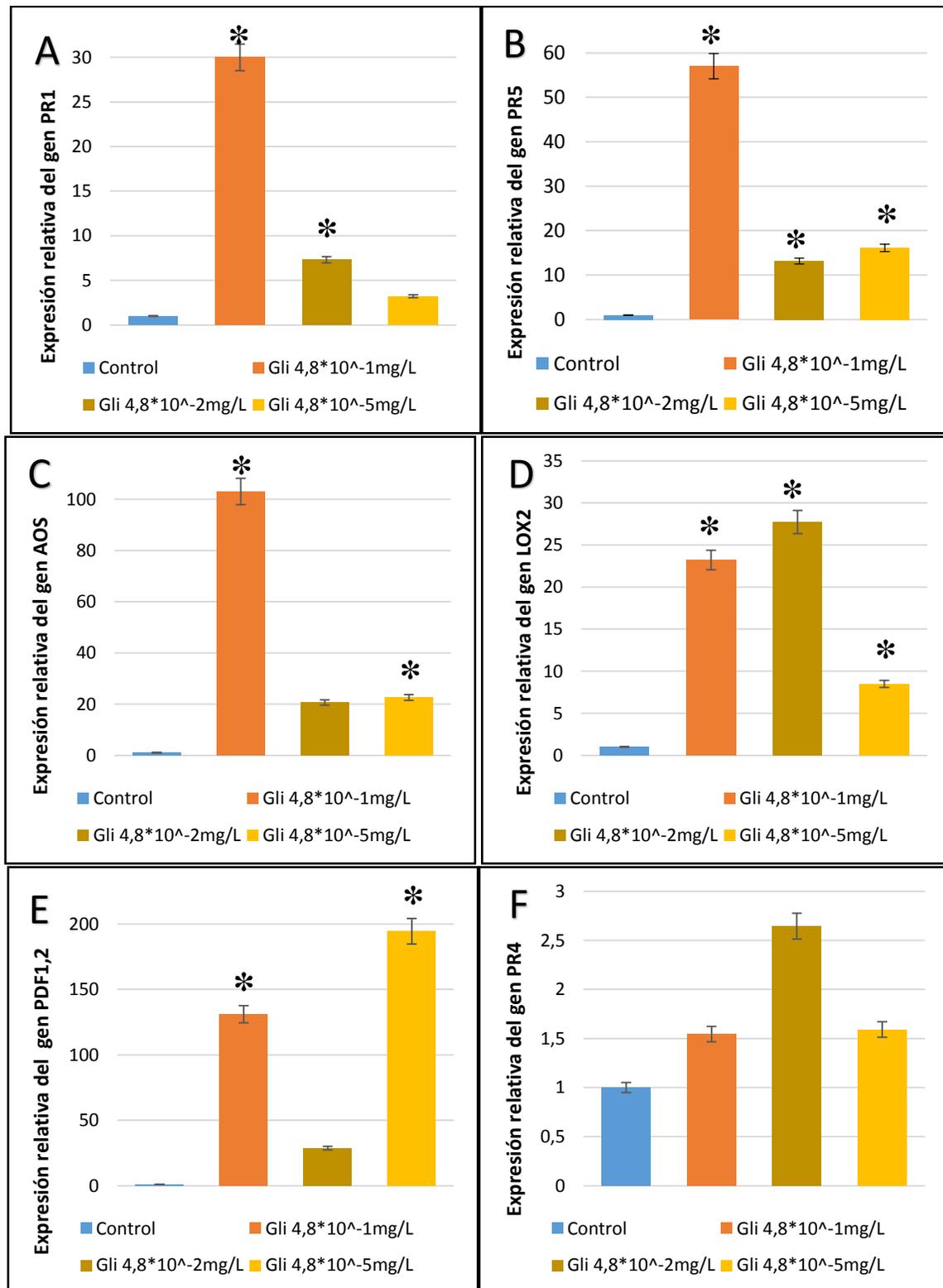


Figura 7. Expresión relativa de los genes en *Arabidopsis thaliana* a diferentes dosis de glifosato comercial RANGER 480. (A): PR1, (B): PR5, (C): AOS, (D): LOX2, (E): PDF1,2, (F): PR4. *Representa diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, según la prueba t al 5%.

Efecto del glifosato traza y hormonas en la expresión de los genes de defensa

Finalmente, el objetivo de este ensayo fue evaluar la expresión de los genes de defensa en respuesta a la aplicación conjunta de glifosato RANGER 480 y tratamientos hormonales (AS y AJ). Aquí, se observó si el efecto residual del glifosato afecta a la respuesta inmunitaria cuando las rutas de defensa se encuentran activas.

Al analizar la ruta del ácido salicílico, podemos ver que tanto el gen *PR1* como el *PR5* son expresados notablemente cuando solo están expuestos al ácido salicílico (figura 8, sección A y B). Aproximadamente 400 veces más que el control en el caso del gen *PR1* y 70 veces más en el gen *PR5*. Al momento en que la planta está expuesta a los tratamientos D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) con AS, la expresión relativa baja a 90 y 105 respectivamente pero no tan drásticamente como en el tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) con AS, ya que la expresión del gen *PR1* es de aproximadamente 15. Por el otro lado, en el caso del gen *PR5*, cuando a la planta se le aplica el tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) con AS, se observa una supresión de este gen (aproximadamente 40). De igual manera que con el gen *PR1*, a medida que la concentración de glifosato baja, la expresión de este gen también. Por ende, en los tratamientos D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L), la expresión relativa es menor a 10 (figura 8).

Dentro de la ruta de defensa del ácido jasmonico (AJ), al momento en que los genes *AOS* y *LOX2* están expuestos solo a AJ, se produce una notable expresión de 50 y 15 veces más que el control respectivamente (figura 8, sección C y D). En el caso del gen *AOS*, al momento en que la planta es expuesta a las distintas concentraciones de glifosato más la hormona AJ, la expresión del gen *AOS* es suprimido marcadamente a menos que 5 (figura

8, sección C). La misma tendencia sucede con el gen *LOX2* pero a un nivel menor, ya que la expresión relativa de los tratamientos con AJ es menor a 4 (figura 8, sección D).

Al momento de analizar el gen *PDF1,2*, el cual participa en la ruta del JA/ET, podemos apreciar una expresión elevada de este gen, de casi 650 veces más que el control, al momento de entrar en contacto con el AJ (figura 8, sección E). Asimismo, al momento en que a la planta se le aplica diferentes concentraciones glifosato y la hormona AJ, la expresión de este gen es notablemente suprimida a aproximadamente 80 en el caso del tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L), 50 en el caso del tratamiento D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) y 20 en el tratamiento F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L).

Finalmente, en el caso del gen *PR4* (figura 8, sección F), el cual participa en la ruta de defensa del etileno (ET), se da una sobreexpresión con el AJ (aproximadamente 10 veces más al control) pero también con los diferentes tratamientos de glifosato: C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) y D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) (valores de expresión relativa entre 8 y 11).

De acuerdo a la prueba *t* (figura 8), los tratamientos marcados con * tienen significación estadística ya que tuvieron valores de *t* menores al 0.05%. Solo en el caso del gen *LOX2*, ninguno de los tratamientos tiene significación estadística.

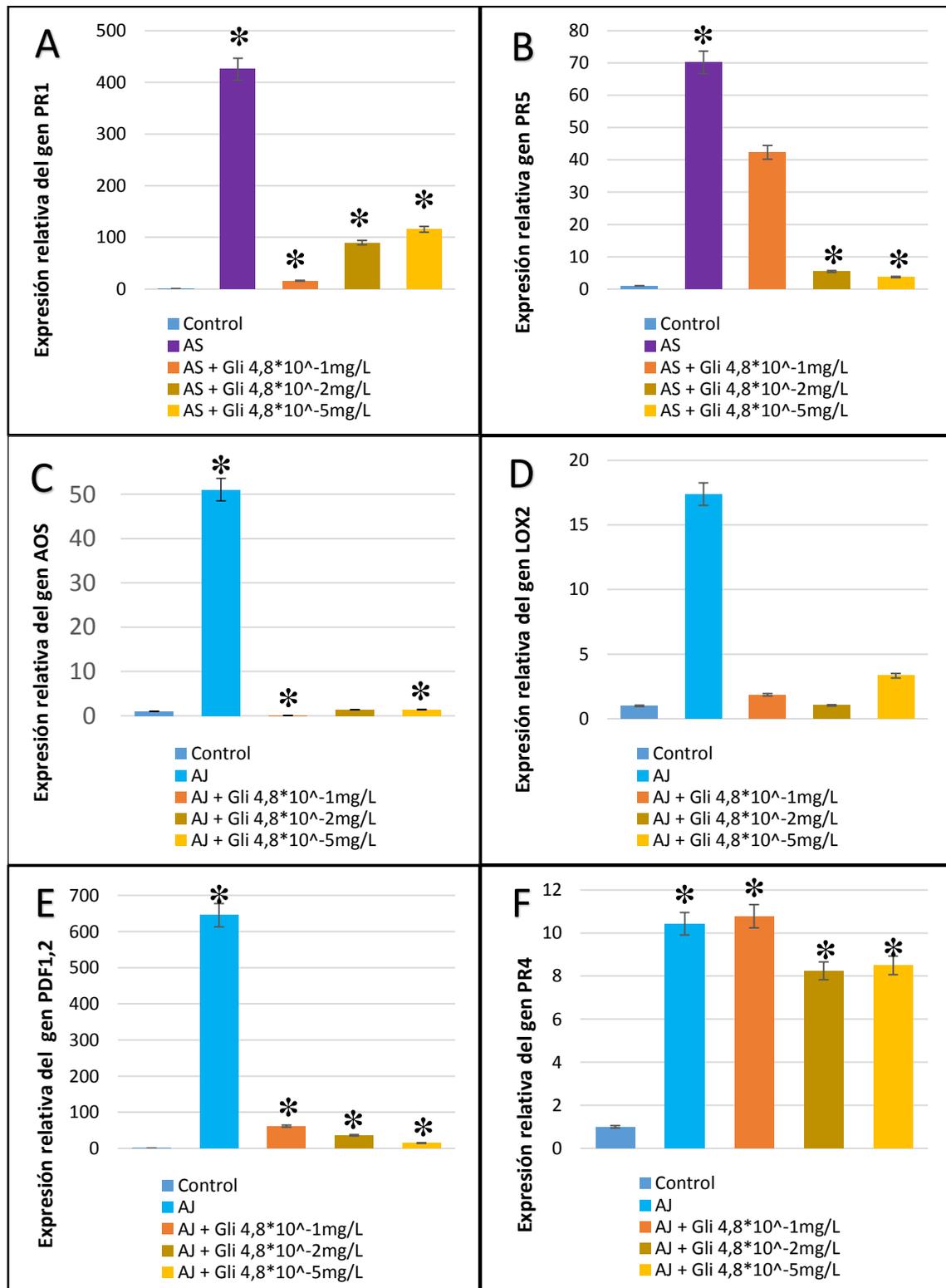


Figura 8. Expresión relativa de los genes en *Arabidopsis thaliana* luego de la aplicación de ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS) y diferentes dosis de glifosato comercial RANGER 480.

(A): PR1, (B): PR5, (C): AOS, (D): LOX2, (E): PDF1,2, (F): PR4.

*Representa diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tratamientos correspondientes sin hormonas, según la prueba *t* al 5%.

DISCUSIÓN

El glifosato es un herbicida muy ampliamente usado en todo tipo de cultivo para el control de malas hierbas. Este químico, que es regularmente aplicado, puede causar grandes daños en plantas “non-target”. El glifosato después de ser aplicado, este suele ser lavado de las hojas y termina llegando al suelo. Más o menos el 90% de los residuos de glifosato son encontrados en los primeros 15 cm de suelo desde la superficie y hasta un 10% del glifosato aplicado que se encuentra en el suelo puede ser absorbido por otras plantas (Eker, Ozturk, Yazici, Erenoglu B, & Cakmak, 2006). De acuerdo a estudios realizados por Monsanto en 47 diferentes lugares y 5 diferentes países, se ha visto que la vida promedio del glifosato es de 32 días pero que en lugares con condiciones climáticas adversas como Suecia, donde no hay mucha actividad microbiana y un extenso invierno, esta permanencia puede extenderse hasta 3 años (Monsanto, 2014). Algunos autores, que midieron con carbono 14, también encontraron que el glifosato puede permanecer en suelos hasta 217 día después de ser aplicados, incluso encontraron que entre el 6% y 18% de los niveles iniciales de este herbicida pueden detectarse después de 360 días posteriores a su aplicación (Sterre, Uhrich, & Benintende, 2016). La variabilidad de las condiciones climáticas y los diferentes tipos de suelos producen esta fluctuación de permanencia. Incluso, en caña de azúcar, se ha observado que la permanencia del glifosato en el suelo varía de acuerdo a la humedad y también a la concentración de ácido fosforoso (Nomura & Hilton, 1977).

Estudios previos mencionan que el excesivo uso de glifosato puede causar un incremento en la severidad de las enfermedades que afectan a la planta. Algunos estudios demuestran que la aplicación excesiva de glifosato incrementa el daño de *Corynespora* en la raíz, promueve la reaparición de enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa*,

incrementa las enfermedades producidas por *Fusarium*, etc. Incluso se ha visto una mayor susceptibilidad al patógeno *Pythium* y también un incremento en las lesiones anthracnose en plantas de frejol en el día 20 después de ser expuestas a una baja dosis de glifosato (10 ug); misma concentración analizada en esta investigación (tratamiento E = $4,8 \cdot 10^{-3}$ mg/L) (Johal & Huber, 2009). Otros artículos sugieren que el glifosato puede inducir el debilitamiento de la defensa de la planta, puede promover la resistencia de plagas y reducir el vigor de la planta (Sanogo, Yang, & Scherm, 2000). Sin embargo, a pesar de que el glifosato es el herbicida mayormente usado, existe muy limitada información experimental sobre el efecto de este herbicida en concentraciones trazas (Velini, y otros, 2008).

Efecto del glifosato en el crecimiento

Se puede observar, en la figura 4, que la coloración amarilla-café y la deshidratación de las plantas en el tratamiento A ($4,8 \cdot 10^1$ mg/L) (dosis recomendada de aplicación en cultivos) se debe al efecto letal que produce el glifosato. De la misma manera, la dosis B ($4,8 \cdot 10^0$ mg/L), que se encuentra 10 veces diluída aun sigue teniendo un efecto danino en la planta. Este efecto, representado por un crecimiento negativo, también se lo puede visualizar en la figura 5 tanto en los análisis del crecimiento diferencial en el largo de las hojas 10, 12 y 13 (sección A) como en los análisis de peso fresco (sección B) y seco (sección C) (Ecuaquímica, 2016).

De manera contrastante, se puede ver que en la figura 4, los tratamientos E ($4,8 \cdot 10^{-3}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) tienen una mayor densidad foliar. Este efecto también se puede percibir tanto en los análisis realizados en las diferentes hojas como también en los análisis de peso fresco y seco (figura 5, sección A) ya que el crecimiento diferencial en los tratamientos E ($4,8 \cdot 10^{-3}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) es el notablemente más alto en relación

al control. Una de las posibles explicaciones es la hormesis, que es un efecto que estimula el crecimiento en dosis leves subtoxicas. Se han reportado casos en donde el glifosato a concentraciones muy bajas puede afectar el crecimiento de la planta, su desarrollo y composición en maneras que podrían ser beneficiosas para la planta. Por ejemplo, en varios estudios se ha observado un mayor crecimiento en *E. grandis* and *P. caribea* (Velini, y otros, 2008). También se ha visto este efecto en plantas como *Tripleurospermum inodorum* (Scentless Mayweed), *Commelina benghalensis* (Tropical Spiderwort), *Hordeum vulgare* (Cebada), *Zea mays* (Maíz), *Glycine max* (Soja), *Eucalyptus grandis* (Eucalypto) y *Pinus caribea* (Pino) las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de glifosato (4, 8, 16, 32, 63, 125, 250 and 500 g a.e. ha⁻¹) durante 7 semanas. En este estudio se vio que, el glifosato en las primeras semanas promueve notablemente el crecimiento pero que a medida que el tiempo este efecto va disminuyendo (Cedergree, 2008). En otro estudio, se vio un efecto notable de hormesis con glifosato a una concentración de 18g a.e/ha en *Eucalyptus grandis* a los 60 días después de su aplicación (Duke, Cedegreen, Velini, & Belz, 2006). De acuerdo a varios autores, los efectos de hormesis pueden variar considerable debido a varios factores los cuales incluyen: el clima, la variedad de planta, la etapa de desarrollo en que se encuentra la planta y la formulación del glifosato (Velini, Trindade, Barberis, & Duke, 2010). Entre las fórmulas de glifosato más usadas están el Round Up, Pilar (Atanor), Glifosato 36% K y el Glifosato 48% SN (INTA, Agrositio, 2004).

Estos estudios de crecimiento diferencial se realizaron nuevamente con el glifosato PESTANAL (Estándar Analítico) con el objetivo de comprobar que los efectos en la planta fueron provocados por el ingrediente activo glifosato y no por los componentes

secundarios. Las distintas formulaciones de glifosatos varían no solamente en la concentración del glifosato sino también en la proporción de sales, la utilización de otros químicos y la propiedad de los productos incluidos en la formulación (Hartzler, Boerboom, Nice, & Sikkema, 2018). En efecto, se obtuvo resultados muy similares a los obtenidos con el glifosato comercial RANGER 480 tanto a nivel de efecto letal como efecto de hormesis (figura 6).

Efecto del glifosato traza en la expresión de los genes de defensa

Las plantas tienen un sofisticado sistema de defensa, que van desde mecanismos bioquímicos hasta fisiológicos, para poder responder y adaptarse a un estrés determinado (Venegas, 2013). Un número de hormonas en la planta tienen un rol clave en la activación de la señalización de genes que participan en la defensa. Entre estas hormonas están el ácido salicílico (AS), el ácido jasmónico (AJ) con sus derivados y el etileno (ET) (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon, & Van Wees, 2012). Se conoce que el AS media la defensa contra patógenos biotróficos y el estrés ambiental mientras que el AJ media la defensa contra los patógenos necrotrofos (Quing Fu & Dong, 2013). A pesar de la cantidad de información que existe sobre los mecanismos y las rutas de defensa en plantas y el funcionamiento del glifosato como tal, la información de esta dos variables e conjunto es muy limitada. Por este motivo, en esta investigación se buscó analizar el efecto traza de glifosato en la inmunidad.

Para determinar este efecto a nivel de la inmunidad, se llevaron a cabo varios análisis de la respuesta inmunitaria con tres diferentes tratamientos y diversos marcadores moleculares que participan en las diferentes rutas de defensa. Se utilizaron los resultados del diferencial del crecimiento para la elección de los tratamientos, en especial los del peso

seco (figura 5 y 6, sección C). Se seleccionó los tratamientos, los cuales en sus características físicas sean los más parecidos al control. Por ende, se seleccionaron los tratamientos C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L) y D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) ya que tuvieron valores más cercanos a 0 tanto a nivel de crecimiento diferencial de hojas (figura 5 y 6, sección A) como también a nivel de peso fresco y seco (figura 5 y 6, sección B y C). Adicionalmente también se buscaba analizar el efecto del glifosato en la respuesta inmunitaria en plantas con un desarrollo estimulado. Por este motivo, el tratamiento F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) el cual tuvo mayor crecimiento diferencial tanto en largo de hojas como en peso fresco y seco (Figura 5 y 6), fue elegido.

De acuerdo a estudios previos, la aplicación externa de la hormona SA también activa SAR y por ende, los diversos genes de defensa. De igual manera que con el AS, la exposición de la hormona del ácido jasmonico externamente también provoca la activación de los genes de defensa relacionados al AJ (Quing Fu & Dong, 2013). Por este motivo, los genes *PRI* y *PR5* de la ruta de defensa del AS y los genes *AOS*, *LOX2*, *PDF1,2* y *PR4* de la ruta de defensa del AJ/ET, al estar expuestos a las hormonas de resistencia inmunitaria AS/AJ, son expresados significativamente (figura 8).

Como se muestra la figura 7 sección A y B, los genes *PRI* y *PR5*, ligados a la actividad de la ruta de defensa del AS, tienen una expresión relativa mayor en comparación al control al momento en que estos se encuentran expuestos a los tratamientos de glifosato con diferentes concentraciones: C ($4,8 \cdot 10^{-1}$ mg/L), D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) y F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L). Esto nos muestra que el glifosato per se si activa la ruta de defensa del AS especialmente a una concentración traza alta pero en una dilución menor, la expresión, a pesar de ser superior al control, disminuye. Esta sobre expresión del gen *PR5* también fue identificada

en un estudio en donde se analizaba el efecto de varios herbicidas en *Arabidopsis thaliana*. En este estudio se encontró que el glifosato produce una expresión diferencial positiva de 0.95 ± 0.52 en el gen *PR5* (Das, y otros, 2010). Antagonista al efecto individual del glifosato (figura 8 sección A y B), al momento de exponer a la planta a glifosato y la hormona del AS conjuntamente, la expresión de los genes *PR1* y *PR5* es inhibida parcial o casi completamente en los diferentes tratamientos de glifosato. Esto quiere decir que el glifosato tiene un efecto supresor en la expresión del gen *PR1* y *PR5*. Por ende, si es que la planta fuera atacada por patógenos biotróficos, es muy probable que, debido a las trazas de glifosato, la respuesta inmune de la planta mediada por AS no sea tan efectiva.

Para la ruta de defensa del AJ se tomaron a los genes *AOS* y *LOX2* como representativos. Como muestra la figura 7, sección C y D, al momento en que la planta está expuesta a los diferentes tratamientos de glifosato, la expresión relativa de estos genes sube en diferentes proporciones dependiendo del tratamiento. Por lo tanto, se puede decir que el glifosato activa la ruta de defensa del JA que está controlada por los factores de transcripción MYC2 (Leon-Reyes, 2010). De acuerdo a estudios previos se observó que, el tratamiento foliar de glifosato en las yemas apicales de *Euphorbia esula L* después de 7 días, afectaba generalmente de manera positiva la expresión del gene *LOX2* (valores de hasta +4.56) en las diferentes etapas de dormancia. Cabe recalcar que, en algunos casos esta expresión podía ser negativa. En esta misma investigación, contrariamente a los resultados obtenidos, se ha observado que el glifosato a (2.24 vs. 0 kg ha⁻¹) tiene un efecto supresor, con valores en rango de -1.51 a -0.35, del gen *AOS* en las diferentes etapas de dormancia (Doğramaci, y otros, 2017). Esto se puede deber a que el efecto del glifosato puede variar entre variedades, tipos y estructuras de la planta. Contrariamente a los resultados obtenidos

con solo glifosato, al momento en que la planta se encuentra en contacto con la hormona AJ y glifosato conjuntamente, la expresión del gen *AOS* y *LOX2* va a ser casi completamente nula (figura 8, sección C y D). Esto quiere decir que los efectos traza del glifosato van a afectar de manera negativa a la defensa de la planta ya que suprime la ruta de defensa mediada por el JA. Por lo tanto, las trazas de glifosato, hace que la defensa mediada por el JA baje provocando una sensibilidad a un ataque de insectos.

Cuando analizamos la ruta de JA/ET, representada por el gen *PDF1,2*, podemos observar que el glifosato hace que se active la ruta de defensa mediada por los factores de transcripción ERF1 y ORA59 (Figura 7, sección E) (Pieterse, Van der Does, Zamioudis, Leon, & Van Wees, 2012) ya que tanto el tratamiento C ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) como el F ($4,8 \cdot 10^{-5}$ mg/L) y el tratamiento D ($4,8 \cdot 10^{-2}$ mg/L) pero a menor nivel, tienen una expresión relativa mucho más alta en comparación al control. De acuerdo a un estudio realizado en plantulas de *A. thaliana* accession Landsberg erecta (Ler-0) de 16 días, las cuales fueron sumergidas en 200 μ M glyphosate (SIGMA), mostraron una induccion de genes de defensa, de los cuales uno de ellos era el PDF1.2 (Faus, y otros, 2015). Por ende, este estudio corrobora con los resultados obtenidos en esta investigación. De acuerdo a la figura 8, sección E, al momento de exponer a la planta a glifosato con AJ conjuntamente, podemos ver que se da una supresión considerable de la expresión del gen *PDF1,2*. Por consiguiente, se puede decir que es muy probable que el glifosato afecte de manera severa la respuesta inmunitaria de la ruta JA/ET en el caso de un ataque de patógenos necrotróficos.

Para el análisis de la ruta del etileno se usó el marcador gen *PR4*. En la figura 7, sección F se puede observar la expresión relativa de este gen en los diferentes tratamientos de glifosato no es considerablemente diferente al control. Esto significa que el glifosato no

activa la ruta de defensa que está controlada por este gen. Por ese motivo, al momento en que se aplica AJ con los diferentes tratamientos de glifosato en conjunto, la expresión relativa del gen *PR4* no varía considerablemente a la del AJ. Esto nuevamente confirma que el glifosato no tiene ningún efecto en este gen. De manera contraria, se vieron en estudios de aplicación foliar de glifosato en *Festuca arundinacea*, después de dos días de tratamiento, que el glifosato al 6.32 mM producen una expresión relativa de +18,67 en la “Pathogenesis related protein 4” (*PR4*) (Unver, Bakar, Shearman, & Budak, 2010). Esto nos lleva a pensar que el efecto del glifosato puede variar entre especies de plantas.

De acuerdo a la prueba t, se observó que la mayoría de los tratamientos mostraban significancia estadística pero no en su totalidad (Figura 8). Esto se puede deber a varias razones, primeramente, están las condiciones variables a las cuales la planta está sometida; temperatura, luz, los diferentes sistemas inmunes entre cada planta y también las interacciones sinérgicas y antagónicas entre las hormonas de defensa mencionadas previamente (Quing Fu & Dong, 2013).

Para resumir, cabe recalcar que a pesar de que existe mucha información sobre el glifosato y su aplicación para el control de malezas, la información disponible con respecto al efecto del glifosato en el crecimiento y en la inmunidad en *Arabidopsis thaliana* es muy limitada. Por ende, para ampliar este conocimiento, se llevó a cabo un conjunto de experimentos. En los análisis de crecimiento diferencial se pudo apreciar que las altas dosis de glifosato tienen un efecto letal en las plantas mientras que las bajas dosis estimulan el crecimiento; efecto conocido como hormesis. Con respecto a los análisis del efecto traza del glifosato en la respuesta inmunitaria, se pudieron observar diferentes fenómenos. Primeramente, con ayuda de los marcadores moleculares PR1, PR5, AOS, LOX2 y PDF1,2

se pudo divisar que el glifosato per se activa las diferentes rutas de defensa del ácido salicílico y del ácido jasmónico con excepción a la ruta de defensa mediada solo por el ET. En segundo lugar, la adición del glifosato y las hormonas de defensa AS/AJ en conjunto provocó la supresión tanto parcialmente como casi de manera total de los genes analizados. Esta simulación nos hace pensar que, la planta se vuelve más vulnerable a amenazas como los insectos y patógenos biotróficos/ necrotróficos al momento de estar expuesto a trazas de glifosato.

CONCLUSIONES

- Tanto en los análisis de crecimiento diferencial en largo de hojas 10, 12 y 13 como en el de peso fresco y seco, se observó un efecto letal en concentraciones altas ($A = 4,8 \cdot 10^1 \text{ mg/L}$) pero también contrariamente un mayor crecimiento en concentraciones de glifosato bajas ($E (4,8 \cdot 10^{-3} \text{ mg/L})$ y $F (4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mg/L})$).
- Se evidencia una inducción leve de la expresión relativa de genes después de la aplicación de glifosato tanto en la ruta de defensa del AS (representada por los genes *PR1* y *PR5*) como en la ruta de defensa del AJ (representada por los genes *AOS* y *LOX2*). El glifosato no afecta significativamente a la ruta de defensa del ET ya que la expresión relativa del *PR4* fue muy parecida al control.
- La supresión de la expresión relativa de los genes *PR1*, *PR5*, *AOS*, *LOX2*, *PDF1.2* al ser sometidos a los diferentes tratamientos de glifosato traza y a las hormonas conjuntamente demuestran la probable vulnerabilidad de la respuesta inmune mediada por las hormonas AS/AJ ante un ataque de insectos y/o patógenos biotróficos/ necrotrofos.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda controlar de una mejor manera las condiciones ambientales durante el cultivo de las plantas, como la temperatura, humedad y luz, para obtener resultados más estables ya que estos factores afectan la respuesta de AS/AJ.
- Utilizar un mayor número de tratamientos a diferentes concentraciones de glifosato con el fin de analizar el efecto de la concentración del glifosato a nivel de la inmunidad.
- Con el objetivo de verificar los resultados obtenidos en esta investigación, se recomienda la realización de bioensayos con Botrytis y Pst DC3000.
- Realizar nuevos análisis de transcriptomas usando las seq ARN de última generación con el objetivo de evaluar los genes de inmunidad y de crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Agilent-technologies. (2016). *Introduction to Quantitative PCR*. Retrieved from https://www.agilent.com/cs/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf
- Alarcón, D. (2017). *Evaluación de la expresión de genes de defensa vegetal bajo tratamientos a base de nitrato (NO₃⁻) y amonio (NH₄) en Arabidopsis thaliana*. Quito.
- Argenbio. (n.d.). *El glifosato*. Retrieved from <http://www.argenbio.org/adc/uploads/Glifosato.pdf>
- Aucique, C., Daza, E., & Romero, H. (2012). Efecto del etileno en el crecimiento y desarrollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*. Jacq.), en fase de vivero. *Ceniavances*(169), 1-4.
- Cedergree, N. (2008). Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time? *Environmental Pollution*(156), 1099–1104.
- Cox, C. (2004). Glyphosate. *Journal od pesticide reform*, 24(4).
- CSIC. (2016). *Anónima en el campo, popular en el laboratorio*. Retrieved from <http://seresmodelicos.csic.es/planta.html>
- Das, M., Reichman, J., Harberer, G., Weizi, F., Mader, M., Watrud, L., . . . Gutierrez, R. (2010). A composite transcriptional signature differentiates responses towards closely related herbicides in Arabidopsis thaliana and Brassica napus. *Plant Mol Biol*, 72, 545-556.
- Doğramaci, M., Anderson, J., Chao, W., Horvath, D., Hernandez, A., Mikel, M., & Foley, M. (2017). Foliar Glyphosate Treatment Alters Transcript and Hormone Profiles in Crown Buds of Leafy Spurge and Induces Dwarfed and Bushy Phenotypes throughout its Perennial Lifecycle. *The Plant Genome*, 10(3), 1-23. doi:10.3835/plantgenome2016.09.0098
- Duke, S., Cedegreen, N., Velini, E., & Belz, R. (2006). Hormesis: is it n important factor in herbicide use and alleopathy? *Pest Management*, 29-33.
- Ecuauímica. (2016). *Ranger 480*.
- Eker, S., Ozturk, L., Yazici, A., Erenoglu B, R. V., & Cakmak, I. (2006). Foliar-Applied Glyphosate Substantially Reduced Uptake and Transport of Iron and Manganese in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plants. *Joournal of Agricultatural and Food Chemistry*, 10019-1125.
- Eurogentec. (2013). *qPCR guide*. Retrieved from <http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>

- Faus, I., Zabalza, A., Santiago, J., Nebauer, S., Royuela, M., Srrano, R., & Gadea, J. (2015). Protein kinase GCN2 mediates responses to glyphosate in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 1-12.
- Gómez, L., & Capeda, M. (2010). Ácido salicílico: inductor de resistencia a sequía en canola de riego bajo labranza reducida.
- Hartzler, B., Boerboom, C., Nice, G., & Sikkema, P. (2018). *AgroMeat*. Retrieved from La importancia de entender el glifosato para mejorar su performance: <http://www.agromeat.com/32510/la-importancia-de-entender-el-glifosato-para-mejorar-su-performance>
- INTA. (2004, 08 04). *Agrositio*. Retrieved from Evaluación eficacia de varias formulaciones de glifosato: <http://www.agrositio.com/vertext/vertext.php?id=34407&se=1000>
- INTA. (2012). Evolución del mercado de hebicida en Argentina. *Economía y desarrollo Agroindustrial*, 1(2).
- Johal, G., & Huber, D. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *ELSEVIER*, 144–152.
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. *Fisiología Vegetal*.
- Leon-Reyes, A. V. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta*, 6(232), 1423-1432.
- Lorenzo, O. (2005). Señalización de Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal*(1).
- Mendoza, A. (2011). *Información general sobre los herbicidas*. Retrieved from http://www.inecc.gob.mx/descargas/bioseguridad/2011_simp_ogm_tolerancia_pres_1.pdf
- Mogollón, A., & Castaño, J. (2011). Efecto de inductores de resistencia en plantulas de platano dominico-Hartón contra *Mycosphaerella* SPP. doi:0370-3908
- Montsanto. (2014). Glyphosate Half-life in Soil. *Backgrounder*, 1-2.
- Nandula, V. (2010). *Glyphosate resistance in crops and weeds*. Missisipi: John Wiley.
- NCBI. (2017). *Arabidopsis thaliana (thale cress)*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/4>
- Nomura, N., & Hilton, H. (1977). The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane. *Weed Research*, 17, 113-121.

- Pieterse, C., Reyes, A., Van der Ent, S., & C M Van Wees, S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *nature chemical biology*, 5(4).
- Pieterse, C., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon, A., & Van Wees, S. (2012). Hormonal Modulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
- Quing Fu, Z., & Dong, X. (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology*, 7.1-7.25. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105606
- Raisman, J., & Gonzalez, A. (2007). *Otros reguladores de crecimiento*. Retrieved from <http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores.htm>
- Rangel, G., Castro, E., Beltran, P., Reyes, H., & García, E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 2, 90-95.
- Riveros, A. (2011). Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *En Manejo Integrado de Plagas*, 4-11.
- Salazar, N., & Aldana, M. (2011). Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. *Revista biotécnica*. Retrieved from https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0ahUKEwi_t8P_iYXXAhXFKiYKHQhsD4cQFggqMAE&url=https%3A%2F%2Fbiotecnia.unison.mx%2Findex.php%2Fbiotecnia%2Farticle%2Fdownload%2F83%2F76&usq=AOvVaw1TBibqSlm-mub5qLHbvetJ
- Sanchez, L., & Carbajosa, V. (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*. doi:10.1186/1756-0500-1-93
- Sanogo, S., Yang, X., & Scherm, H. (2000). Effects of Herbicides on *Fusarium solani* f. sp. glycines and Development of Sudden Death Syndrome in Glyphosate-Tolerant Soybean. *The American Phytopathological Society*, 90(1), 57-66.
- Sf. (2000). *Identificación del herbicida glifosato propiedades y toxicidad*. Retrieved from Documento Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos: http://www.mamacoca.org/docs_de_base/Fumigas/glifosato_DNE.pdf
- Somerville, A., & Koomneef. (2002). *A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant*. .
- Sterre, M., Uhrich, W., & Benintende, S. (2016). Residualidad de glifosato en suelos de Entre Ríos y su efecto sobre los microorganismos del suelo. *Ecología Austral*, 26, 246-255.
- Tair. (2016). *About Arabidopsis*. Retrieved from <https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>

- Unver, T., Bakar, M., Shearman, R., & Budak, H. (2010). Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* application. *Mol Genet Genomics*, 283, 397-413. doi:10.1007/s00438-010-0526-7
- Valverde, B. (2017). *Manejo de la resistencia a los herbicidas en los países en desarrollo*. Retrieved from FAO: <http://www.fao.org/docrep/007/y5031s/y5031s0h.htm>
- Velini, E., Alves, E., Godoy, M., Menschede, D., Souza, R., & Duke, S. (2008). Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Where science meet business*, 64, 489-496.
- Velini, E., Trindade, M., Barberis, R., & Duke, S. (2010). Growth Regulation and Other Secondary Effects of Herbicides. *Weed Science*, 58(3), 351-354.
- Venegas, J. (2013). Evaluación de inductores de resistencia, para el control de lepidopteros y tolerancia a estrés hidrico en brócoli y en *Arabidopsis*.

ANEXOS

ANEXO 1. Ficha técnica glifosato RANGER 480.

Ingrediente Activo: Glifosato..... 480 g/l	
RANGER® 480 es un herbicida no selectivo, de aplicación post-emergente y acción sistémica, para el control de la mayoría de las malezas anuales y perennes.	
PRECAUCIONES: El producto es nocivo en caso de inhalación e ingestión. El contacto prolongado con los ojos o la piel causa irritación. Durante la preparación y utilización del producto NO FUMAR - COMER o BEBER. Evitar: La inhalación e ingestión y el contacto directo con la ropa, piel, ojos y boca. Usar: Ropa protectora adecuada como Overol, guantes y botas de caucho, careta y mascarilla. ANTES DE COMER - BEBER O FUMAR: Sacarse la ropa contaminada, lavarse bien las partes expuestas de la piel con abundante agua	
FRASES DE ADVERTENCIA: No contaminar con el producto, sus desechos o envases vacíos: lagos, ríos, estanques, arroyos y otras fuentes de agua. Conservar el producto en el envase original etiquetado y cerrado herméticamente. No usar este envase para ningún otro fin. No reenvasar o depositar el contenido en otros envases. Conservar el producto en un lugar seguro, lejos de los alimentos, los niños y los animales. Evite que la lluvia de la atomización sea acarreada por el viento a áreas o cultivos vecinos. Antes de destruir el envase, enjuagarlo con agua (cuarta parte del contenido) por lo menos tres veces y luego depositar el resto en el equipo de aplicación. Enterrar el envase vacío y destruido en una fosa diseñada para el efecto.	
INSTRUCCIONES PARA PRIMEROS AUXILIOS Y CONSEJOS PARA LOS MÉDICOS: En caso de inhalación, mantenga a la persona en un lugar ventilado fuera del sitio de aplicación. En caso de ingestión, haga beber al paciente dos vasos con agua y no induzca al vómito. En caso de contaminación con la piel o ropa debe eliminarse la ropa contaminada, y la parte afectada, lavarse con abundante agua y jabón. Si el contacto es con los ojos, lávelos abundantemente con agua, por lo menos durante 15 minutos y a flujo continuo. Consultar con un médico y mostrarle la etiqueta. LOS SÍNTOMAS: Por contacto externo, causa ardor o irritación en los ojos, membrana de la mucosa, boca o garganta. Por ingestión, los síntomas tempranos pueden incluir náuseas y malestar estomacal. EL DIAGNÓSTICO: El examen de sangre y de orina pueden ayudar a confirmar la absorción del producto. Con métodos analíticos se confirman los resultados. EL TRATAMIENTO: No existe antídoto específico. Su tratamiento es sintomático. No induzca al vómito ni dé nada de tomar a una persona inconsciente.	
Para mayor información diríjase a: Ecuaquímica Quito. Teléfonos: (593-2) 286 1690	
FABRICANTE FORMULADOR: C.A.C. Ltda y Cia, S.C.A. Av. Cl 116 # 7 - 15, Interior 2 piso 11 Teléfono 6575100 Bogotá D.C. Colombia	IMPORTADOR REGISTRADO: BBR Representaciones Cia Ltda Quito, Ecuador. Tel: (593-2)-256-2680
CONTENIDONETO: 1 LITRO	DISTRIBUIDOR AUTORIZADO ECUAQUIMICA. Quito, Ecuador, Avda. Ijaló Km. 1-1/2 entre Alondras y Cisnes - El Tingo Tel: (593-2) 286 1690 Guayaquil Av. José Santiago Castillo y Av. Juan Tenca Marengo, Km. 1.8 Tel: (593-4) 268 2050
MONSANTO	EQ EQUAQUIMICA La mano amiga
© Marna Registrada de Monsanto	

ANEXO 2. Ficha técnica glifosato PESTANAL (Estándar analítico).

1911324 Product of Switzerland
CAS: 1071-83-6 607-315-00-8 $C_3H_8NO_3P$ MW: 169.07
/mol

PESTANAL® is a reg. TM of Sigma-Aldrich International GmbH. Safety datasheet is available. Exp: April 22
For R&D use only. Not for drug, household, or other uses.



sigma-aldrich.com
SIGMA-ALDRICH INC., P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178 USA 314-771-4300
SIGMA-ALDRICH AG Industriestrasse, 25 Buchs Switzerland 041-819-1234

ANEXO 3. Análisis estadísticos del experimento de peso fresco con aplicación de glifosato RANGER 480.

ANOVA

Peso.Fresco Glifosato Ranger

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.951	5	1.390	20.804	.000
Within Groups	1.136	17	.067		
Total	8.088	22			

Peso.Fresco Glifosato Ranger

Tukey HSD^{a,b}

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	4	-1.306225	
4,8*10 ⁻³ mg/L	3		-.136667
4,8*10 ⁻⁵ mg/L	4		-.069200
4,8*10 ⁻¹ mg/L	4		.127825
4,8*10 ⁰ mg/L	4		.228150
4,8*10 ⁻² mg/L	4		.267350
Sig.		1.000	.309

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.789.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

ANEXO 4. Análisis estadísticos del experimento de peso seco con aplicación de glifosato RANGER 480.

ANOVA

Peso. Seco glifosato Ranger

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.016	5	.003	6.513	.001
Within Groups	.009	17	.001		
Total	.025	22			

Peso Seco glifosato Ranger

Tukey HSD^{a,b}

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	4	-.051925	
4,8*10 ⁻³ mg/L	3	-.012508	-.012508
4,8*10 ⁻⁵ mg/L	4	-.001400	-.001400
4,8*10 ⁻¹ mg/L	4		.010750
4,8*10 ⁰ mg/L	4		.021350
4,8*10 ⁻² mg/L	4		.026600
Sig.		.060	.210

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.789.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

ANEXO 5. Análisis estadísticos del experimento de crecimiento diferencial en hoja 10 con aplicación de glifosato RANGER 480.

ANOVA

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 10 glifosato Ranger

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.410	5	.882	13.496	.000
Within Groups	3.137	48	.065		
Total	7.548	53			

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 10 glifosato Ranger

Tukey HSD^a

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	9	-.688889	
4,8*10 ⁻¹ mg/L	9		-.033333
4,8*10 ⁰ mg/L	9		-.022222
4,8*10 ⁻² mg/L	9		.044444
4,8*10 ⁻³ mg/L	9		.100000
4,8*10 ⁻⁵ mg/L	9		.177778
Sig.		1.000	.506

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

ANEXO 6. Análisis estadísticos del experimento de crecimiento diferencial en hoja 12 con aplicación de glifosato RANGER 480.

ANOVA

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 12 glifosato Ranger

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.368	5	1.274	20.825	.000
Within Groups	2.936	48	.061		
Total	9.304	53			

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 12

glifosato Ranger

Tukey HSD^a

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	9	-0.833333	
4,8*10 ⁰ mg/L	9		.011111
4,8*10 ⁻¹ mg/L	9		.011111
4,8*10 ⁻² mg/L	9		.100000
4,8*10 ⁻³ mg/L	9		.122222
4,8*10 ⁻⁵ mg/L	9		.144444
Sig.		1.000	.860

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

ANEXO 7. Análisis estadísticos del experimento de crecimiento diferencial en hoja 13 con aplicación de glifosato RANGER 480.

ANOVA

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 13 glifosato Ranger

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.777	5	1.755	23.122	.000
Within Groups	3.644	48	.076		
Total	12.421	53			

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 13

glifosato Ranger

Tukey HSD^a

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	9	-0.977778	
4,8*10 ⁰ mg/L	9		-0.033333
4,8*10 ⁻³ mg/L	9		.088889
4,8*10 ⁻¹ mg/L	9		.100000
4,8*10 ⁻⁵ mg/L	9		.120000
4,8*10 ⁻² mg/L	9		.177778
Sig.		1.000	.586

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

ANEXO 8. Análisis estadísticos del experimento de peso fresco con aplicación de glifosato PESTANAL (Estándar analítico).

ANOVA

Peso fresco glifosato PESTANAL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.249	5	2.050	7.792	.000
Within Groups	4.735	18	.263		
Total	14.984	23			

Peso fresco glifosato PESTANAL

Tukey HSD^a

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	4	-1.702500	
4,8*10 ⁰ mg/L	4	-.654050	-.654050
4,8*10 ⁻² mg/L	4		-.211525
4,8*10 ⁻¹ mg/L	4		-.153217
4,8*10 ⁻⁵ mg/L	4		.134650
4,8*10 ⁻³ mg/L	4		.247650
Sig.		.087	.180

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ANEXO 9. Análisis estadísticos del experimento de peso seco con aplicación de glifosato PESTANAL (Estándar analítico).

ANOVA

Peso seco glifosato PESTANAL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.050	5	.010	5.184	.004
Within Groups	.035	18	.002		
Total	.084	23			

Peso seco glifosato PESTANAL

Tukey HSD^a

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	4	-.067325	
4,8*10 ⁰ mg/L	4	-.010942	-.010942
4,8*10 ⁻¹ mg/L	4	-.003808	-.003808
4,8*10 ⁻² mg/L	4	.010325	.010325
4,8*10 ⁻³ mg/L	4	.022358	.022358
4,8*10 ⁻⁴ mg/L	4		.085875
Sig.		.086	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ANEXO 10. Análisis estadísticos del experimento de crecimiento diferencial en hoja 10 con aplicación de glifosato PESTANAL (Estándar analítico).

ANOVA

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 10 glifosato PESTANAL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.240	5	.248	14.928	.000
Within Groups	.266	16	.017		
Total	1.506	21			

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 10 glifosato PESTANAL

Tukey HSD^{a,b}

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	4	-0.525000	
4,8*10 ⁰ mg/L	3		-.183333
4,8*10 ⁻² mg/L	3		.016667
4,8*10 ⁻⁵ mg/L	4		.075000
4,8*10 ⁻¹ mg/L	4		.100000
4,8*10 ⁻³ mg/L	4		.125000
Sig.		1.000	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.600.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

ANEXO 11. Análisis estadísticos del experimento de crecimiento diferencial en hoja 12 con aplicación de glifosato PESTANAL (Estándar analítico).

ANOVA

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 12 glifosato PESTANAL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.176	5	.435	8.851	.000
Within Groups	.787	16	.049		
Total	2.963	21			

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 12 glifosato

PESTANAL

Tukey HSD^{a,b}

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4,8*10 ¹ mg/L	4	-.650000		
4,8*10 ⁰ mg/L	3	-.425000	-.425000	
4,8*10 ⁻¹ mg/L	4		.062500	.062500
4,8*10 ⁻² mg/L	3		.075000	.075000
4,8*10 ⁻³ mg/L	4			.125000
4,8*10 ⁻⁵ mg/L	4			.150000
Sig.		.748	.072	.994

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.600.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

ANEXO 12. Análisis estadísticos del experimento de crecimiento diferencial en hoja 13 con aplicación de glifosato PESTANAL (Estándar analítico).

ANOVA

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 13 glifosato PESTANAL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.380	5	.476	8.338	.000
Within Groups	.913	16	.057		
Total	3.293	21			

Crecimiento.Diferencial(g) HOJA 13 glifosato PESTANAL

Tukey HSD^{a,b}

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4,8*10 ¹ mg/L	4	-.575000	
4,8*10 ⁰ mg/L	3	-.508333	
4,8*10 ⁻¹ mg/L	4		.150000
4,8*10 ⁻² mg/L	4		.150000
4,8*10 ⁻³ mg/L	3		.158333
4,8*10 ⁻⁴ mg/L	4		.175000
Sig.		.999	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.600.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.