

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evaluación de la expresión de genes de defensa vegetal bajo  
tratamientos a base de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en  
*Arabidopsis thaliana*.**

**Proyecto de Investigación**

**Damaris Alarcón**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

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

Quito, 11 de diciembre de 2017

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

HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación de la expresión de genes de defensa vegetal bajo tratamientos a base de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en *Arabidopsis thaliana*.

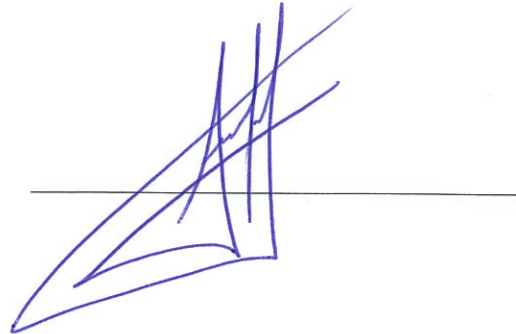
**Damaris Alarcón**

Calificación: 7,9/10

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Firma del profesor



Quito, 11 de diciembre de 2017

## 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:

Damaris Irene Alarcón Vallejo

Código:

00023422

Cédula de Identidad:

1716174048

Lugar y fecha:

Quito, 11 de diciembre de 2017

## **Dedicatoria**

El presente trabajo está dedicado a mi madre, Irene Vallejo, y a mi padre, Fabián Alarcón, quienes son los pilares fundamentales de mi vida, mi motivación diaria, mi apoyo incondicional y mi ejemplo para lograr todas las metas que me propongo.

## RESUMEN

La nutrición constituye uno de los factores más importantes para el desarrollo óptimo de los cultivos. Sin embargo, este factor al ser parte del entorno de la planta, puede generar un efecto de estrés en condiciones de insuficiencia o exceso. Los fertilizantes cumplen un papel fundamental en la nutrición de los cultivos, entre los más utilizados están los fertilizantes nitrogenados. El nitrógeno es esencial para la producción de aminoácidos, enzimas, proteínas, hormonas, entre otros componentes fundamentales para la planta. Este macronutriente es absorbido por la planta en su forma oxidada, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), o reducida, amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La planta ha desarrollado varios mecanismos de defensa cuando es atacada por un patógeno, uno de ellos es la resistencia sistémica adquirida (SAR). Este mecanismo es activado por la acumulación de hormonas que interactúan y activan un conjunto de genes de defensa específicos. Estas hormonas pueden activar dos rutas diferentes: la ruta dependiente de ácido salicílico (SA) que activa los genes *PR-1* los cuales actúan contra organismos biotróficos o obligados; y la ruta dependiente del ácido jasmónico (JA) que inducen los genes *LOX2*, *PDF1.2*, *VSP2* y la ruta del etileno (ET) que activa los genes *PR-4*, que actúan contra organismos necrotróficos. La presente investigación analizó la expresión de estos genes en plantas *Arabidopsis thaliana* sometidas a tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , mediante la cuantificación del mRNA mediante la técnica RT-qPCR. Adicionalmente se realizó un análisis de supresión para determinar el efecto de estos tratamientos cuando la planta se encuentra en un estado inducido. Los resultados indicaron que el  $\text{NO}_3^-$  induce gradualmente la expresión del gen *PR-1*, dependiente de la ruta de SA, en concentraciones de 50% y 100% de nitrógeno basado en el aporte total del medio Murashige y Skoog (MS). Por otro lado, la concentración de 25% de  $\text{NO}_3^-$  induce la expresión del gen *VSP2* dependiente de la ruta JA. En cuanto a los tratamientos con  $\text{NH}_4^+$ , se observó que en una concentración de 25% se induce todos los genes de defensa de las dos rutas. Los tratamientos con 200% tanto de  $\text{NO}_3^-$  como de  $\text{NH}_4^+$ , tienden a suprimir la expresión de todos los genes analizados. Esto sugiere que los cambios realizados sobre el nitrógeno en la dieta nutricional, genera un cambio en la expresión de la respuesta de defensa. Estos cambios pueden fortalecer el conocimiento sobre la defensa de los cultivos ante posibles ataques de organismos patógenos. Por otra parte, los indicios de que los excesos de fertilizante pueden inducir a susceptibilidad de los cultivos, puede traer como consecuencia la valoración sobre el aporte de nitrógeno en los mismos. Validación de estos estudios en campo deben ser estudiados más a fondo en el futuro.

**Palabras clave:** Defensa vegetal, Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), Ácido Salicílico (SA), Ácido Jasmónico (JA), expresión génica, RT-qPCR.

## ABSTRACT

Nutrition is one of the most important factors for the optimal development of crops. However, this factor, being part of the environment of the plant, can generate a stress effect in conditions of insufficiency or excess. Fertilizers play a key role in the nutrition of crops; among the most used are nitrogen fertilizers. Nitrogen is essential for the production of amino acids, enzymes, proteins, hormones, among other fundamental components for the plant. This macronutrient is absorbed by the plant in its oxidized form, nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), or reduced, ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). The plant has developed several defense mechanisms when it is attacked by a pathogen, one of them is acquired systemic resistance (SAR). This mechanism is activated by the accumulation of hormones that interact and activate a set of specific defense genes. These hormones can activate two different pathways: the salicylic acid (SA) dependent pathway that activates the PR-1 genes, which act against biotrophic or obligate organisms; and the jasmonic acid (JA) -dependent pathway induced by the LOX2, PDF1.2, VSP2 genes and the ethylene (ET) pathway that activates the PR-4 genes, which act against necrotrophic organisms. The present investigation analyzed the expression of these genes in *Arabidopsis thaliana* plants subjected to treatments with different concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, by quantifying the mRNA by the RT-qPCR technique. Additionally, a suppression analysis was carried out to determine the effect of these treatments when the plant is in an induced state. The results indicated that the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> gradually induces the expression of the PR-1 gene, dependent on the SA pathway, in 50% and 100% nitrogen concentrations based on the total contribution of the Murashige and Skoog medium (MS). On the other hand, the concentration of 25% NO<sub>3</sub><sup>-</sup> induces the expression of the VSP2 gene dependent on the JA pathway. Regarding the treatments with NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, it was observed that in a concentration of 25% all the defense genes of the two routes are induced. The treatments with 200% of both NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, tend to suppress the expression of all the analyzed genes. This suggests that the changes made to nitrogen in the nutritional diet generates a change in the expression of the defense response. These changes can strengthen knowledge about the defense of crops against possible attacks by pathogenic organisms. On the other hand, the indications that the excess of fertilizer can induce susceptibility of the crops can bring consequently the valuation on the contribution of nitrogen in them. Validation of these studies in the field should be further studied in the future.

**Key words:** Plant defense, nitrate, ammonium, salicylic acid, jasmonic acid, gene expression, RT-qPCR.

## TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	10
Justificación.....	23
Objetivos.....	24
Área de estudio .....	25
Materiales.....	26
Métodos .....	31
Resultados.....	38
Discusión .....	48
Conclusiones .....	58
Recomendaciones .....	59
Referencias bibliográficas.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de los primers utilizados.....	30
<b>Tabla 2.</b> Composición del medio MS sin nitrógeno. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Concentraciones de Nitrógeno en cada tratamiento.....	33
<b>Tabla 4.</b> Composición del master mix para una muestra. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Composición de tratamientos para pruebas de supresión. ....	37
<b>Tabla 6.</b> Efecto del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en algunas enfermedades.....	53
<b>Tabla 7.</b> Efecto del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en algunas enfermedades.....	55



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Activación de la expresión del gen PR-1. ....	18
<b>Figura 2.</b> Activación de la expresión de genes de defensa dependientes de JA. ....	19
<b>Figura 3.</b> Genes analizados y sus rutas de activación. ....	19
<b>Figura 4.</b> Plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	31
<b>Figura 5.</b> Esquema de desarrollo de plantas y aplicación de tratamientos nutricionales.....	32
<b>Figura 6.</b> Respuesta a tratamientos con diferentes concentraciones de $\text{NO}_3^-$ . ....	39
<b>Figura 7.</b> Respuesta a tratamientos con diferentes concentraciones de $\text{NH}_4^+$ . ....	42
<b>Figura 8.</b> Respuesta a pruebas de supresión con diferentes concentraciones de $\text{NO}_3^-$ . ....	44
<b>Figura 9.</b> Respuesta a pruebas de supresión con diferentes concentraciones de $\text{NH}_4^+$ .....	46
<b>Figura 10.</b> Resumen expresión génica bajo efecto de nitrato $\text{NO}_3^-$ con respecto al control (0%N). ....	52
<b>Figura 11.</b> Resumen expresión génica bajo efecto de amonio $\text{NH}_4^+$ con respecto al control (0%N). ....	54

# INTRODUCCIÓN

## **Situación actual de la agricultura**

Los procesos de producción y los avances tecnológicos desarrollados a lo largo del último siglo han aportado grandes beneficios en el sistema agrícola a nivel mundial. Sin embargo en la actualidad es necesario remodelar estas prácticas, con el objetivo de generar resultados más productivos de manera sostenible (FAO, 2017).

En Ecuador, la agricultura es uno de los principales ejes que influye en la economía del país. Dicha actividad representa: un aporte en promedio de 8,5% al PIB y la principal fuente de empleo que involucra al 25% de la población económicamente activa (UTN, 2017).

## **Uso de fertilizantes inorgánicos en los cultivos**

La nutrición adecuada de los cultivos es esencial para un desarrollo productivo de la agricultura. Es por esto que actualmente uno de los insumos más importantes es el empleo de fertilizantes, ya que aportan los nutrientes que se requieren para el normal crecimiento y reproducción de las plantas (Datnoff et al., 2008).

Los fertilizantes no son aprovechados adecuadamente en la producción agrícola, ya que los cultivos absorben únicamente entre el 10% y el 60% del fertilizante aplicado, debido a varias rutas por las que se pierde este nutriente como: el riego, volatilización y lixiviación (Peña et al., 2002). Es por esto que el uso de este insumo ha generado problemas de contaminación ambiental cuando se aplica de forma inadecuada. Los principales problemas relacionados a la contaminación por nitrógeno inorgánico son: acidificación de ríos y lagos, eutrofización de las aguas dulces y marinas, toxicidad por estos compuestos en animales acuáticos (Camargo, 2007).

## **Fertilizantes nitrogenados empleados en la agricultura**

Uno de los fertilizantes más utilizados son los nitrogenados, los cuales están compuestos por nitrógeno en una forma asimilable para las plantas, es decir nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (SIPSA, 2012). Existen varios tipos de fertilizantes nitrogenados, entre los más utilizados por los agricultores se encuentra: la urea, nitrato de amonio, nitrato de calcio y sulfato de amonio. La urea es el fertilizante más barato, formado por 46% de nitrógeno en forma amídica y es apropiada para suelos salinos, este compuesto es transformado a carbonato de amonio para ser asimilado por la planta (Ruiz, 2000). El nitrato de amonio, que contiene 34,5% de nitrógeno, del cual la mitad está presente en forma nítrica, que genera un efecto inmediato, y la otra mitad en forma amoniaca, la cual tiene un efecto a largo plazo debido a que queda retenido en la arcilla del suelo (Ruiz, 2000). El nitrato de calcio es un fertilizante de alta solubilidad, contiene 15,5% de nitrógeno en forma nítrica. Finalmente, el sulfato de amonio que está formado por 10% de nitrógeno amoniaca (Ruiz, 2000).

Estos compuestos son importantes en la agricultura debido al aporte de su componente principal, el nitrógeno. Este macronutriente es absorbido mediante las raíces ya sea en forma reducida u oxidada. Adicionalmente es el cuarto elemento más abundante en la planta y esencial para la producción de aminoácidos, enzimas, proteínas, hormonas, entre otros componentes fundamentales para la planta (Huber, 2007).

## **Metabolismo del nitrógeno en las plantas**

A pesar de la abundancia de nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) en la atmósfera (78% del volumen), las plantas no son capaces de utilizar ni convertir esta molécula en una forma biológicamente asimilable, debido a que no poseen la enzima dinitrogenasa, la cual reduce el enlace triple a amonio. Las plantas dependen de organismos procariotas fijadores de nitrógeno

como *Azotobacter* y *Rhizobium* para convertir el nitrógeno atmosférico en una forma asimilable para la planta (Hopkins, 2008).

En el medio natural las plantas son capaces de asimilar el nitrógeno en su forma oxidada ( $\text{NO}_3^-$ ) o reducida ( $\text{NH}_4^+$ ). Sin embargo, el nitrógeno presente en el suelo es absorbido por la planta principalmente en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). En forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) puede ser utilizado directamente por las plantas para la síntesis de aminoácido y aminos, mientras que en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) primero es reducido a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) y posteriormente a ( $\text{NH}_4^+$ ) antes de ser utilizados por las células. La asimilación de nitrógeno a partir de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) también puede darse mediante reacciones de nitrificación mediadas por un grupo de bacterias conocidas como nitrificantes. Este proceso consiste en la oxidación del amonio a nitrito ( $\text{NO}_2$ ), y posteriormente oxidado a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Hopkins, 2008).

Las diferentes formas de nitrógeno absorbidas por la planta son metabolizadas de manera distinta, razón por la cual pueden tener un efecto profundo sobre las enfermedades, directa o indirectamente a través de la modificación de características de crecimiento, metabolitos inmediatos, exudados de raíces, entre otros. Adicionalmente, el desarrollo de una enfermedad puede estar influenciado por el efecto de las tasas de aplicación, tiempos de aplicación, condiciones del suelo y las interacciones del nitrógeno con otros elementos (Huber, 2007).

La nutrición al ser parte del ambiente de la planta, se ha determinado que puede influir en la severidad de las enfermedades, ya que determina en gran parte la susceptibilidad o resistencia de la planta a los diferentes patógenos (Huber, 2007).

### **Uso de pesticidas en los cultivos**

Las plagas y enfermedades de las plantas generan pérdidas significativas en los cultivos. El constante ataque de estas plagas causa grandes consecuencias a nivel social, ambiental y

económico, debido a esto ha sido necesario recurrir al uso de pesticidas. El uso excesivo de plaguicidas químicos, muchas veces sin asistencia técnica, perjudica la productividad de la agricultura y afecta a la naturaleza y a la salud del ser humano. La toxicidad de estas sustancias no es específica, por lo que afecta a varios organismos superiores. Cuando los plaguicidas ingresan en las cadenas alimentarias se distribuyen a través de ellas, se concentran en cada nicho ecológico y se acumulan sucesivamente hasta que alcanzan una concentración letal para algún organismo constituyente de la cadena (del Puerto, 2014). Adicionalmente los remanentes en el suelo se disipan con las lluvias y el riego, contaminando ecosistemas cercanos (Blanco-Labra, 2002).

### **Mecanismos de defensa vegetal**

Las plantas al estar fijadas en el suelo, están obligadas a interactuar con varios retos que plantea su entorno y responder a ellos. Están expuestas a diferentes factores de estrés ya sean bióticos o abióticos, las respuestas generadas ante estos factores implican redistribuir de mejor forma sus recursos entre crecer, reproducirse y defenderse (Vivanco et al., 2005).

Uno de los factores que más afecta el entorno de las plantas son los fitopatógenos. Estos organismos obtienen nutrientes mediante la invasión y/o la destrucción de los tejidos de la planta hospedera. De acuerdo a su modo de ataque a la planta estos patógenos se dividen en biotróficos, necrotrofofos o hemibiotrofofos. Los biotrofofos toman los nutrientes de células vivas, usando estructuras especializadas, las invaden sin dañarlas. En el caso de los patógenos necrotrofofos, producen la muerte de la célula hospedera para tomar sus nutrientes de dicho tejido muerto (Madriz, 2002). Los patógenos hemibiotrofofos matan a las células después de un período previo de colonización, es decir, en la fase inicial son biotrofofos y luego necrotrofofos (Angarita, 2010).

A lo largo de la evolución se han desarrollado varios mecanismos de defensa como respuesta al ataque de agentes patógenos. Al reconocer a estos patógenos se activan distintos mecanismos, ya sean físicos o bioquímicos, y se da una cadena de reacciones para generar una defensa tanto en el lugar de la infección como en toda la planta mediante la activación de vías sistémicas (Vivanco et al., 2005).

La defensa vegetal está compuesta por dos tipos; mecanismos constitutivos, los cuales son expresados como características normales del desarrollo de la planta y están presentes antes de la intervención de un patógeno. Entre estos mecanismos está la presencia de espinas, cutícula, tricomas, paredes celulares rígidas, fenoles, quitinasas, entre otros. Por otro lado, los mecanismos inducidos se activan después del contacto con un agente patógeno. La activación de estos mecanismos de defensa puede generar la formación de callo, engrosamiento de la pared celular, lignificación, halos, producción de fitoalexinas, producción de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) (Blanco, 2002).

Las heridas causadas por insectos o daños mecánicos a causa de factores físicos, activan la transcripción de diversos genes necesarios para la cicatrización de la herida y la prevención de una invasión por patógenos. Estos genes codifican para proteínas, las cuales intervienen en la fortificación de la pared celular, formación de lignina, producción de inhibidores de proteasas, enzimas líticas y la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana o antioxidante (Sepúlveda, 2004).

La defensa inducida se expresa bajo un sistema de vigilancia que permite el reconocimiento del invasor, se da un proceso de transducción de señales que desencadena una ruta de respuesta, la cual es regulada a nivel transcripcional mediante la expresión de determinados genes de defensa vegetal (Blanco, 2002). Este tipo de defensa no se expresa de manera constitutiva, ya que requiere elevados costos energéticos y se encuentra regulada por diferentes fitohormonas (León-Reyes, 2009).

## **Fitohormonas que intervienen en la defensa vegetal**

Los reguladores principales de la activación de estas respuestas son las fitohormonas, moléculas pequeñas que intervienen también en procesos de regulación de crecimiento, reproducción y defensa de las plantas (Van Hulten, 2006). La acumulación de estas moléculas frente a diferentes factores de estrés biótico o abiótico induce la activación de una gran variedad de respuestas adaptativas en las plantas. Las fitohormonas con funciones clave en la defensa inducida de las plantas son; ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). (León-Reyes, 2009).

El ácido salicílico (SA) interviene en el control del estado redox de las plantas, probablemente mediante el antioxidante glutatión (Rubio, 2008). Esta hormona se acumula e interviene en la activación de la respuesta ante el ataque de patógenos biotróficos. El ácido jasmónico (JA) es una molécula lipídica que regula varios procesos del desarrollo de la planta; como la elongación de raíces, maduración de semillas, entre otros. Interviene en la señalización de la respuesta ante una herida o ataque de insectos, modulando la síntesis de las proteínas de pared celular como las proteínas ricas en prolina, activa la expresión de los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides y los fenilpropanoides (Sepúlveda, 2004).

La función del etileno como hormona que interviene en procesos de defensa fue descubierta recientemente, es la única hormona volátil específica de las plantas. El etileno se produce etileno en los tejidos afectados de la planta y tiene función como mensajero, además permite la activación sistémica de genes de defensa en tejidos distantes a la zona afectada que también podrían ser afectados por el patógeno (Vivanco et al., 2005). Un estudio realizado en la Universidad de Utrecht con plantas de tabaco insensibles al etileno, demostraron la gran importancia de la intervención de esta hormona en la defensa vegetal, ya que estas plantas mostraron gran susceptibilidad al ataque de patógenos en comparación con las líneas silvestres.

Incluso requieren de un medio aséptico para su cultivo, y no desarrollaron SAR ante la aplicación de inductores sintéticos (Bart, 2003).

La comunicación cruzada entre las vías de defensa permite que actúen en conjunto para evitar la colonización del patógeno, modulando y priorizando una estrategia de defensa dependiendo del atacante (Harrison, 2005). Las hormonas actúan de manera antagónica o sinérgica dependiendo de la concentración relativa de cada hormona, generando una regulación eficiente sin causar un excesivo costo energético (Van Hulten, 2006).

### **Mecanismos de defensa inducida**

Una de las primeras respuestas activadas por la planta luego de una infección es la muerte celular generada por reacción de hipersensibilidad (HR). Se da a nivel local y es muy notoria ya que causa lesiones necróticas en los tejidos afectados a causa de una alteración en el metabolismo de la planta y posteriormente la muerte celular programada (Madriz, 2002).

Al activarse una respuesta sistémica, se genera defensa en toda la planta y no únicamente en los lugares afectados. Se reconocen dos tipos que actúan ante el ataque de patógenos; “la resistencia sistémica inducida” (ISR) y la “resistencia sistémica adquirida” (SAR).

La respuesta sistémica inducida (ISR), puede ser activada por organismos benéficos presentes en el suelo como micorrizas y rizobacterias. Esta activación es leve pero muy efectiva en la inmunidad sistémica. Esta respuesta es usualmente regulada por vías de señalización dependientes de JA y ET, cuyas defensas son eficaces contra patógenos necrotróficos e insectos herbívoros (León-Reyes, 2009).

La resistencia sistémica adquirida (SAR), es inducida por un amplio espectro de elicitores tanto bióticos como abióticos (Madriz, 2002). Esta respuesta es inducida por la acumulación de SA o de JA a nivel local y sistémico. A pesar de que las investigaciones sobre

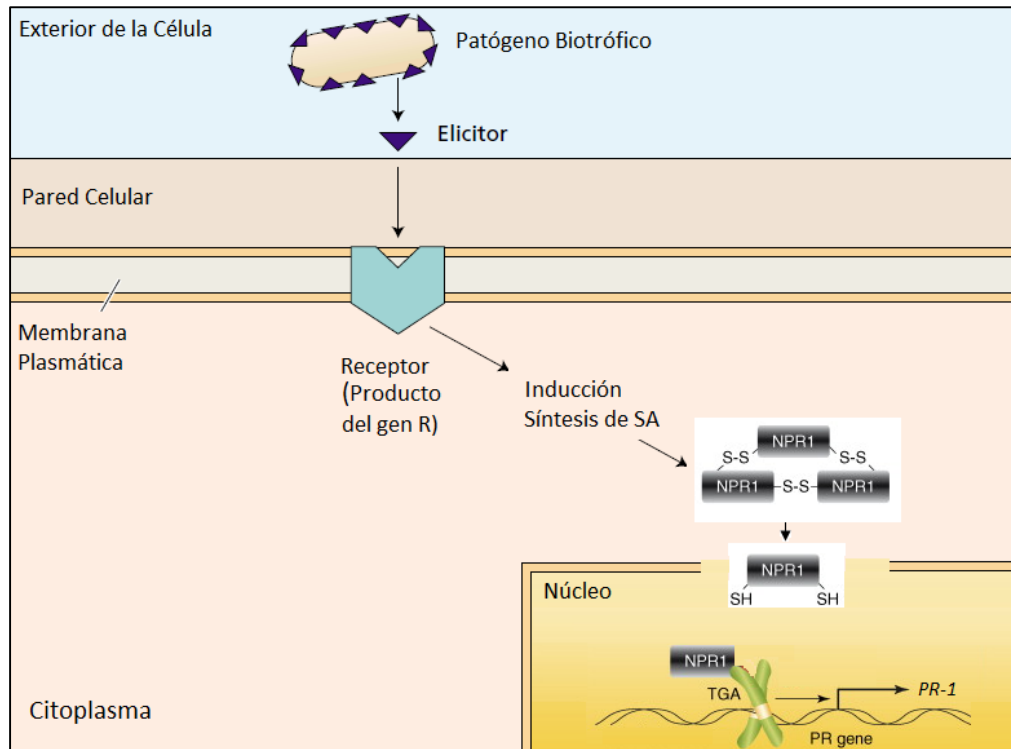


SAR se han basado únicamente en SA como agente regulador, en los últimos años se han desarrollado estudios sobre la intervención también de JA en este complejo mecanismo (Díaz-Puentes, 2012). Esta respuesta se caracteriza por una alta expresión de genes PR, la mayoría de los cuales codifican proteínas con actividad antimicrobiana. Esta respuesta tiene un amplio espectro y es de larga duración (León-Reyes, 2009).

### **Genes que intervienen en la defensa vegetal**

Los genes PR codifican proteínas que actúan en la inhibición del crecimiento, multiplicación y propagación de agentes patógenos e infecciones causadas por los mismos. Estos genes se clasifican en familias de acuerdo a las secuencias de aminoácidos compartidos, relación serológica y la actividad enzimática o biológica que poseen (Van Loon, 1999).

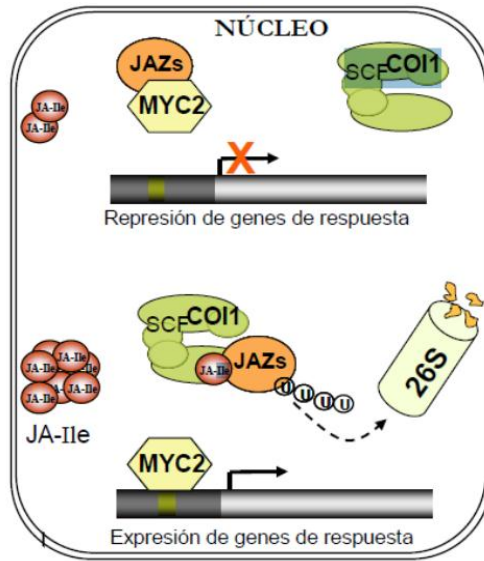
La expresión del gen *PR-1* es dependiente de la ruta de SA, se expresa cuando existe una acumulación de esta hormona en el citosol de la célula. Esto genera un cambio en el potencial redox, lo que inactiva la formación oligomérica de la proteína *NPRI* (Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1) y se reduce a su forma monomérica activa (Figura 1). Los monómeros de *NPRI* entran en el núcleo y actúan como factor de transcripción del gen *PR-1* (Pieterse, Van Loon, 2001).



**Figura 1.** Activación de la expresión del gen *PR-1*.

Tomado de: (Criollo, 2013).

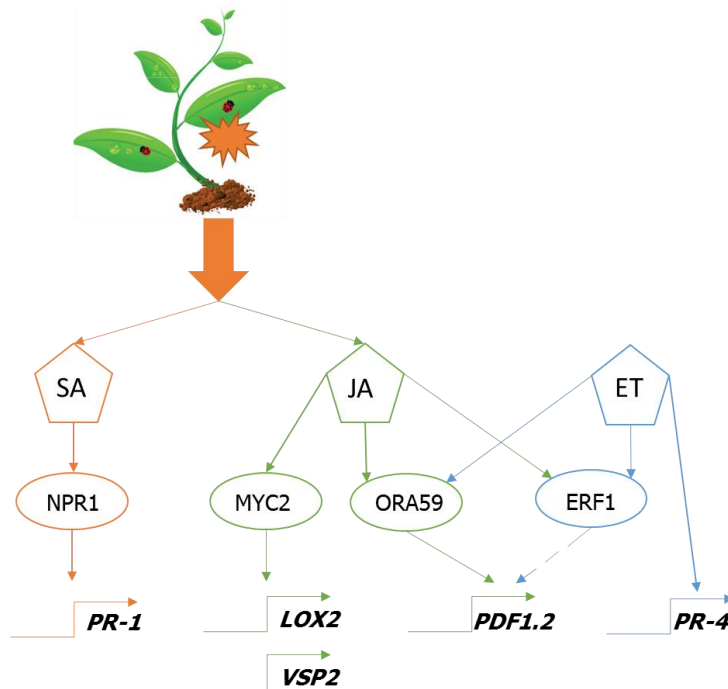
La expresión de los genes *PDF1.2*, *LOX2* y *VSP2* está relacionada con la ruta de señalización del JA. La acumulación de grandes cantidades de esta hormona en el núcleo de la célula permite que se una al receptor *COI1* (Coronatine Intensive 1). Este receptor es una proteína F-box y forma parte de la ligasa ubiquitina E3 de tipo SCF (Figura 2). Este complejo interactúa con la proteína jasmonato dominio-ZIM (JAZ), la cual es ubiquitinada para liberar los factores de transcripción. En caso de daños mecánicos se libera MYC2, activando la expresión de los genes *LOX2* y *VSP2*; mientras que en respuesta de patógenos necrotrofos se libera *ORA59* o *ERF-1*; activando así la expresión del gen *PDF1.2* (Pieterse et al., 2009).



**Figura 2.** Activación de la expresión de genes de defensa dependientes de JA.

Tomado de: (Criollo, 2013)

En esta señalización también interviene el etileno (ET) (Figura 3), en presencia de esta hormona se expresa *PDF1.2*, mientras que en ausencia de ET se induce la expresión de *VSP2* (León-Reyes, 2009).



**Figura 3.** Genes analizados y sus rutas de activación.

El gen patógeno inducible *PR-1*, tiene una actividad antimicrobiana dependiente del secuestro de esterol, la defensa activada se dirige a los esteroides de los patógenos. Debido a esto, el potencial de *PR-1* para causar daño depende de la capacidad biosintética de esteroides de un organismo (van't Hof et al., 2016). *LOX2* es una lipoxigenasa requerida para la síntesis de JA inducida por heridas en las hojas de la planta a partir del ácido linoléico (UniProt, 2014). El gen *VSP2* se activa para generar una respuesta que protege a la planta de una amenaza externa detectada directamente desde un insecto o insectos (Uniprot, 2014). Por otro lado, el gen *PDF1.2* es una defensina que codifica un péptido antifúngico (Brown, 2003).

Estos marcadores han sido ampliamente estudiados y utilizados como genes vinculados a las hormonas inductoras de defensa vegetal. El gen *PR-1* ha sido relacionado con la ruta de activación mediada por ácido salicílico y la activación de SAR (Li, 2004) (León Reyes et al., 2010), por lo que fue seleccionado como marcador de la activación de la defensa vegetal mediada por SA. Por otro lado, varios estudios han vinculado a los marcadores *VSP2* y *LOX2* con la ruta mediada por el ácido jasmónico y por lo mismo como indicadores clave de esta ruta (Wenqiong et al., 2002) (Van der Does, 2013). El gen *PDF1.2* se ha relacionado con la ruta de activación mediada por JA/ET, por lo que se lo consideró como marcador referencia de esta ruta (León-Reyes, 2009) (Ndamukong, 2007).

### **RT-qPCR y análisis de expresión génica**

La expresión génica es un proceso en el cual la información codificada en el ADN se transforma a proteínas mediante la intervención de un mRNA. El RT-qPCR permite cuantificar esta expresión génica en función de la cuantificación del DNA complementario (cDNA) al mRNA de interés (Mestdagh et al, 2009). Este proceso utiliza una molécula indicadora fluorescente que se une con el producto de DNA, generando niveles de fluorescencia acorde al

aumento de DNA. La fluorescencia emitida medida es proporcional a la cantidad total de amplicón (Bio-Rad).

El proceso de RT-qPCR se divide en 4 fases principales: 1) fase inicial, se establece la línea base; 2) fase exponencial donde la fluorescencia emitida por el producto de PCR sobrepasa el umbral establecido por el equipo y se obtiene un ciclo umbral o CT (ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral). El valor de CT es relativo a la cantidad inicial de templado; 3) fase lineal, en la cual la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo; y 4) fase estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección (Wong, Medrano, 2005).

El análisis de la expresión puede realizarse mediante el método de expresión absoluta, en el cual se realiza una curva de calibración con diluciones de ADN de concentración definida; o mediante el método de expresión relativa, el cual mide la expresión de determinados genes de interés en función de un gen calibrador. Este debe ser un gen de referencia (house-keeping) es decir que su expresión es estable en las células y no cambia frente a las condiciones del experimento (Livak, 2001).

Los genes *UBI* son genes promotores de ubiquitina, proteína presente en células eucariotas que participa en procesos de control del ciclo celular, estructura de la cromatina, reparación del ADN, entre otros. Sus funciones esenciales para la célula, hace que su secuencia sea altamente conservada entre organismos. La expresión de este gen es constante, por lo que es utilizado como gen calibrador para el análisis de expresión relativa (Lens, 2017).

Para analizar los datos de expresión relativa se han desarrollado varios modelos matemáticos, sin embargo el más utilizado es el método  $\Delta\Delta Ct$ , el cual calcula los cambios de expresión génica como una diferencia entre una muestra experimental y una muestra del gen calibrador. Este método asume que la eficiencia de amplificación del gen calibrador y el gen target son aproximadamente iguales (Livak, 2001).

### ***Arabidopsis thaliana* como modelo vegetal**

*Arabidopsis thaliana* es una planta angiosperma de ciclo anual, la cual pertenece a la familia de las Brassicaceas (Boyes et al., 2001). Tiene una longitud entre diez y treinta centímetros, sus flores son muy pequeñas (2mm), son hermafroditas, sus semillas que son llamadas también silicuas miden alrededor de 0,5 mm (TAIR, 2017). Esta planta ha sido adoptada como organismo modelo vegetal debido a que se ha estudiado ampliamente su genética, tiene un corto ciclo de vida, alta producción de semillas viables y pequeño tamaño (Koornneef, 2008). El 95% de las funciones de los aproximadamente 25500 genes que contiene esta especie se conoce y se encuentra en base datos de acceso libre (TAIR, 2017). El enfoque principal de las investigaciones en esta planta modelo se basa en entender la dinámica de los genes y las redes que controlan el funcionamiento de la planta, para lo cual se han identificado mutantes en los componentes de regulación. El uso de líneas reporteras de *Arabidopsis* (con genes de fusión promotor-reportero), han permitido la identificación y caracterización de los genes que tienen un papel fundamental en la regulación de las respuestas de defensa vegetal (Koornneef, 2008).

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el crecimiento demográfico a nivel mundial se ha ralentizado, la seguridad alimentaria global llegaría a estar en peligro. Esto a causa de la presión que se ha incrementado en los últimos años acerca del manejo sostenible y las prácticas integradas sobre los recursos naturales y la calidad de los cultivos. Se estima que para el 2030 la población mundial llegará a 8.500 millones de habitantes y en el 2050 alcanzará los 9.700 millones. Para entonces, cubrir la demanda requerirá un aumento casi del 50% de la producción de alimentos, forraje y biocombustibles de lo generado en el 2012 (FAO, 2017), es por esto que se requiere fortalecer la agricultura optimizando las prácticas actuales.

Es importante determinar un plan de fertilización y las dosis adecuadas para cada caso, sin embargo en Ecuador únicamente el 40% de los productores realizan dicho análisis para la aplicación de fertilizantes (SIPSA, 2012). La aplicación inadecuada de nitrógeno genera acidificación del suelo, acumulando sustancias tóxicas y modificando su composición, lo que genera más costos de producción (SIPSA, 2012). La aplicación permanente de sustancias químicas ha ocasionado que los organismos desarrollen resistencia a estos químicos y ya no causan ningún efecto, de manera que se recurre a la aplicación de mayores concentraciones de estas sustancias. Es por esto que en la actualidad se busca alternativas más favorables que puedan optimizar los mecanismos de defensa propios de las plantas, remodelando así las técnicas de cultivo tradicionales (Brechtel, 2004).

La investigación sobre la inducción de resistencia de una planta, sería una alternativa biológica, ambiental y comercialmente viable ya que se podría disminuir el uso de sustancias tóxicas en cultivos alimenticios, evitaría la resistencia por parte de los patógenos, y pueden ser efectivos a un amplio espectro (Lundstedt, 2013). Este estudio busca evaluar la expresión de la defensa natural en una planta modelo, como es *Arabidopsis thaliana*, mediante el análisis de la

influencia de la nutrición a partir de nitrato y amonio. Los resultados obtenidos servirán como base para aplicar este sistema en cultivos de gran importancia.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Evaluar el efecto de las fuentes de nitrógeno (nitrato y amonio) en la defensa vegetal de *Arabidopsis thaliana*, mediante el análisis de expresión relativa usando RT-qPCR.

### Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  en la expresión de genes marcadores de las rutas de defensa de: el ácido salicílico (*PR-1*), el ácido jasmónico (*VSP2* y *LOX2*), el etileno (*PR-4*) y jasmónico/etileno (*PDF1.2*).
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  en la expresión de genes marcadores de las rutas de defensa de: el ácido salicílico (*PR-1*), el ácido jasmónico (*VSP2* y *LOX2*), el etileno (*PR-4*) y jasmónico/etileno (*PDF1.2*).
- Evaluar la expresión de los genes de defensa bajo tratamientos con 100% y 200% de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  más las hormonas inductoras SA y JA.



## **ÁREA DE ESTUDIO**

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones de la Universidad San Francisco de Quito, USFQ, en el laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos y en el invernadero perteneciente al mismo laboratorio. Ecuador, provincia de Pichincha, cantón Quito, calle Diego de Robles y Vía Interoceánica (Cumbayá).

Ubicación geográfica: 0° 11,78' S; 78° 26,08' W.

## MATERIALES

### **Siembra de plantas *Arabidopsis thaliana* Col-0:**

- Semillas de *Arabidopsis thaliana* COL-0.
- Arena de río.
- Autoclave. (MCR)
- Vasos plásticos de 2 y 3 onzas.
- Plástico de empaque.
- Ligas plásticas.
- Pinzas
- Bandejas plásticas.

### **Tratamientos nutricionales:**

- Reactivos para Hoagland:
  - 2M  $\text{KNO}_3^-$
  - 2M  $\text{Ca}(\text{NO}_3^-)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
  - Iron (Sprint 138 iron chelate)
  - 2M  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
  - 1M  $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$
  - $\text{H}_3\text{BO}_4$
  - $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{CuSO}_4$
  - $\text{H}_3\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
  - 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.0 con 3M KOH)

- Reactivos para tratamientos en base al medio MS:
  - Fuentes de Nitrógeno:
    - $\text{HNO}_3^-$
    - $\text{NH}_4^+\text{OH}$
  - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
  - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{H}_3\text{BO}_3$
  - KI
  - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Balanza analítica. (Pioneer)
- Plancha agitadora. (Boeco)
- Vasos de precipitación.
- Botellas de vidrio de 500 ml.
- Probetas.
- Potenciómetro. (Milwaukee)
- Solución NaOH 0,1M.
- Solución HCl 0,1M.

- Jeringuillas.
- Cajas Petri.

#### **Extracción de ARN total:**

- RNase Zap (Ambion)
- Nitrógeno líquido.
- Morteros.
- Pipetas.
- Vórtex. (Benuer)
- Centrífuga refrigerada (Sigma).
- Tubos Eppendorf de 2ml.
- Buffer de extracción:
  - 0,35 M glicina.
  - 0,048 M de NaOH.
  - 0,34 M EDTA.
  - 4% SDS (autoclavado).
- Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico [25:24:1 v/v].
- Cloroformo/alcohol isoamílico [24:1 v/v].
- 8M LiCl (100 ml) 33,91 gr LiCl.
- 3M NaAc pH 5,2 (500 ml) 204,1 gr NaAc.3H<sub>2</sub>O.
- Etanol al 70%.
- Etanol 96%
- Agua PCR (invitrogen).

**Visualización de bandas en gel de agarosa:**

- Agarosa. (Bioline)
- TAE 1X.
- Balanza. (Nimbus)
- Vasos de precipitación.
- Plancha Agitadora. (Boeco)
- SYBR Safe (invitrogen).
- Blue juice (invitrogen).
- Parafilm.
- Cámara de electroforesis (Labnet).
- Fuente de poder (invitrogen)
- Fotodocumentador (Labnet).

**Cuantificación de ARN:**

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

**Purificación con DNasa I:**

- DNase I Kit (invitrogen).
- Agua PCR (invitrogen).
- Termociclador (Labnet).

**Síntesis de cDNA:**

- GoScript Reverse Transcription System (Promega).

- Termociclador (Labnet).

### **RT-qPCR:**

- SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad)
- Agua PCR (Invitrogen)
- Strips de microtubos (Bio-Rad)
- Termociclador PrimeQ (Techne)
- Primers (Biolegio):

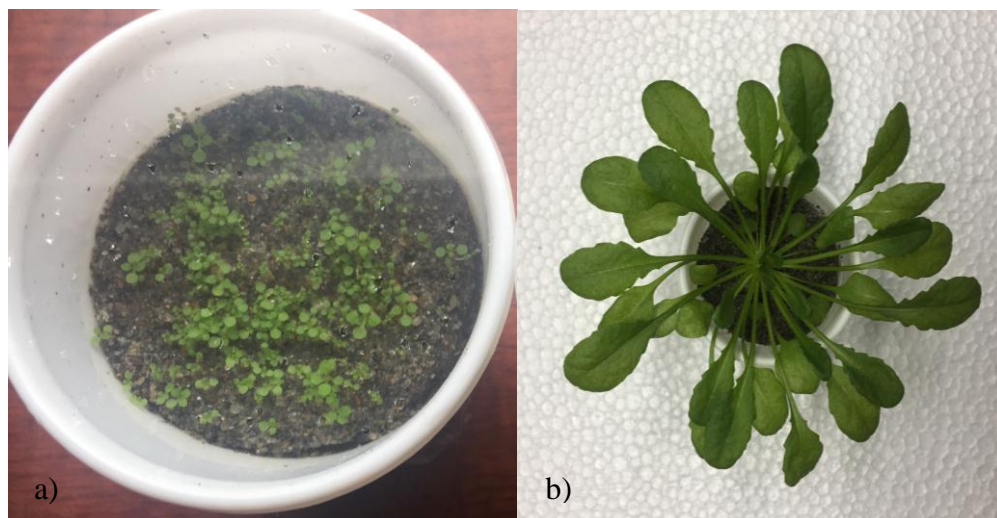
**Tabla 1.** Secuencias de los primers utilizados.

<b>Primer</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b><i>UBI-10</i></b>	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
<b><i>PR-1</i></b>	CTCGGAGCTACGCAGAACAAC	TTCTCGCTAACCCACATGTTCA
<b><i>LOX2</i></b>	CGGAACATAGGCCACGGAGA	TGAGGTGACCCATGCAATCG
<b><i>PDF1.2</i></b>	CGAGAAGCCAAGTGGGACAT	TCCATGTTGGCTCCTTCAA
<b><i>VSP2</i></b>	TGGGCTGATTTGGTTGAGGA	ACAAGGGGACAATGCGATGA
<b><i>PR4</i></b>	GCAACGGAGGCTTGGATTTG	TGAGCTCATTGCCACAGTCG

## MÉTODOS

### Siembra de *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 (Col-0)

En base al protocolo utilizado por Astudillo (2012), se sembró semillas de la línea silvestre de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 en vasos plásticos de 3 onzas. Como sustrato se utilizó arena de río, a la cual previamente se le realizaron varios lavados con agua destilada y posteriormente fue autoclavada. Los vasos con las semillas fueron cubiertos con plástico y sostenido con una liga. Las semillas requieren romper su dormancia a temperaturas bajas para germinar, debido a esto se colocó los vasos en el refrigerador a 4°C durante tres días. Luego de este tiempo se los colocó en el invernadero, donde gradualmente se realizan agujeros en el plástico para aclimatar las plantas al ambiente (Astudillo, 2012). Después de dos semanas de su germinación fueron transplantadas a nuevos vasos individuales (Figura 4).

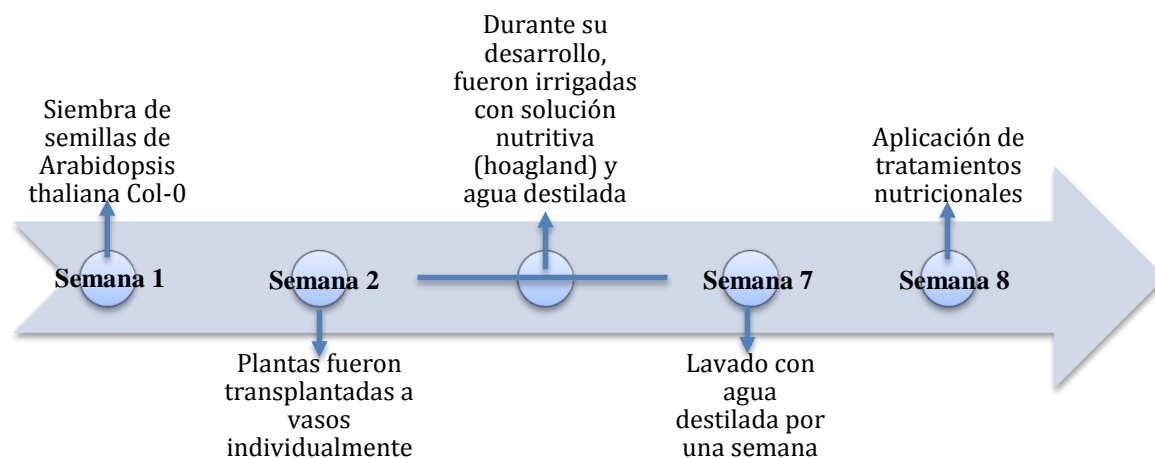


**Figura 4.** Plantas *Arabidopsis thaliana*.

a) En proceso de aclimatación. b) Plantas listas para aplicación de tratamiento.

Las plantas fueron regadas con agua destilada y Hoagland durante 7 semanas (figura 5). Se realizó dos repeticiones biológicas y tres repeticiones técnicas de cada tratamiento. Se utilizó 5 plantas para cada uno de los tratamientos.

## Aplicación de tratamientos nutricionales



**Figura 5.** Esquema de desarrollo de plantas y aplicación de tratamientos nutricionales

Los tratamientos fueron realizados en base al medio nutricional Murashige y Skoog (MS), modificando únicamente la concentración y fuente de nitrógeno a partir de la concentración sugerida (Tabla 2). Como fuente de  $\text{NO}_3^-$  se utilizó  $\text{HNO}_3^-$ , mientras que como fuente de  $\text{NH}_4^+$  se utilizó  $\text{NH}_4^+\text{OH}$  para tener la misma concentración molar que el medio MS.

**Tabla 2.** Composición del medio MS sin nitrógeno.

	(mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,2



Se realizó 9 tratamientos; 4 con  $\text{NO}_3^-$ , 4 con  $\text{NH}_4^+$  y un tratamiento sin nitrógeno utilizado como control (Tabla 3). Se ajustó el pH de los tratamientos a un pH entre 5,5 y 6. Previo a la aplicación de los tratamientos se realizaron lavados con agua destilada durante una semana para eliminar residuos de nutrientes en el sustrato. Se colocó 15 ml de tratamiento en cada planta.

**Tabla 3.** Concentraciones de Nitrógeno en cada tratamiento.

(En base a 60mmol/L recomendado en el medio MS).

<b>Tratamiento</b>	<b><math>\text{NO}_3^-</math></b>	<b><math>\text{NH}_4^+</math></b>
T1	25%	-
T2	50%	-
T3	100%	-
T4	200%	-
T5	-	25%
T6	-	50%
T7	-	100%
T8	-	200%
T9 (Control)	0%	0%

Después de 24 horas de haber aplicado el tratamiento se cosechó las plantas y se colocaron inmediatamente a  $-80^\circ\text{C}$  hasta ser procesadas.

### **Extracción total de ARN**

Se limpió toda el área de trabajo y los materiales que fueron utilizados con RNase Zap. Se enfrió los morteros previamente con nitrógeno líquido. Utilizando el protocolo empleado por Gutiérrez, (2017), se colocó el tejido vegetal congelado y se añadió nitrógeno líquido para tritularlo hasta obtener un polvo muy fino. Se llenó aproximadamente dos tercios de dos tubos Eppendorf de 2 ml con el polvo obtenido y se colocó 650 ul de buffer de extracción (precalentado a  $50^\circ\text{C}$ ) y 500 ul de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se mezcló en el vórtex hasta que se descongele el tejido. Se colocó los tubos en la centrífuga refrigerada durante 3 minutos a 14.000 rpm a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadió nuevamente 500 ul de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó durante 3 minutos

a 14.000 rpm a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, se añadió 500 ul de cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó por 3 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Finalmente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo con 150 ul de LiCl 8M y se dejó precipitar durante dos días.

Transcurrido ese tiempo, se centrifugó los tubos durante 20 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 500 ul de etanol al 70% (-20°C) y se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante completamente, para esto se colocó los tubos boca abajo sobre un papel absorbente durante 15 minutos. Luego se hidrató en pellet con 400 ul de agua PCR en 4°C durante 30 minutos. Posteriormente se añadió 40 ul de NaAc pH 5,2 y 1.000 ul de etanol al 96% (-20°C). Se incubó los tubos durante 60 minutos a -80°C. Después de este tiempo se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet nuevamente con 400 ul de alcohol 70% (-20°C), se centrifugó durante un minuto a 14.000 rpm a 4°C para luego secar el pellet colocando los tubos boca abajo sobre papel absorbente durante 15 minutos. Finalmente se disolvió el precipitado en 25 ul de agua PCR (Gutiérrez, 2017).

### **Visualización de integridad de ARN total**

Para comprobar el procedimiento de extracción de ARN total se realizó un gel de agarosa. Para esto se disolvió 1,2 gr de agarosa en 60 ml de TAE en la plancha de agitación y se dejó enfriar unos minutos para colocar 2 ul de SYBR Safe. Esta mezcla se colocó en el molde protegiéndolo de la luz hasta que se solidifique. Posteriormente se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se llenó la cámara con TAE 1X. En un pedazo de parafilm se mezcló 2 ul de blue juice con 4 ul de ARN. Se cargaron las muestras en cada pocillo del gel y se corrió

durante media hora a 80 V. Finalmente se observó las bandas correspondientes al ARN mediante el fotodocumentador.

### **Purificación de ARN con DNase I (Invitrogen)**

Para purificar el ARN con DNasa fue necesario medir la concentración de cada muestra. Para esto se utilizó un Kit de cuantificación mediante el fluorómetro Qubit, con un rango de lectura entre 5 a 100 ng. Se diluyeron las muestras para ajustar la concentración a este rango de lectura. Una vez establecida la concentración de ARN (ug/ml) en cada muestra, se calculó el volumen necesario para tener 1 ug de ARN.

Se colocó el volumen calculado de ARN en un tubo Eppendorf, más 1 ul de Buffer 10X, 1 ul de DNase I y se aforó a un volumen de 10 ul con agua PCR. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de esto se añadió 1 ul de EDTA, se colocaron los tubos en el termociclador a 65°C durante 10 minutos. Finalmente se guardó los tubos en el congelador.

### **Síntesis de cDNA**

Para este proceso se tomó 1 ul de ARN purificado con DNasa en un tubo Eppendorf, se añadió 1 ul de Oligo dt y 3 ul de agua PCR. Se colocó los tubos en el termociclador a 70°C por 5 minutos, luego a 4°C durante 5 minutos. Se centrifugó por 10 segundos y se guardó a 4 °C. Mientras tanto se realizó un master mix con; 4ul de Buffer 5X, 3 ul de MgCl<sub>2</sub>, 1 ul de DNTPs, 0,5 ul de RNAsin, 1 ul de RT y 5,5 de agua PCR por muestra. Se colocó 15 ml de este master mix en cada muestra y se colocó nuevamente en el termociclador, con un programa de 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C. Finalmente se guardó las muestras a -20°C.

## RT-qPCR

Se realizó un master mix (Tabla 4) para cada primer analizado, se colocó los strips en el equipo PrimeQ. Se utilizó el programa QuanSoft Software de Biorad, donde se ingresó los datos de las muestras que fueron analizadas con el programa: Desnaturalización a 95°C durante 10 minutos; Amplificación a 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Tm: 60°C-95°C.

**Tabla 4.** Composición del master mix para una muestra.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (ul)</b>
SsoFast Eva Green Supermix	7,5
Forward primer	0,45
Reverse primer	0,45
Agua PCR	5,1
cDNA	1,5
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>

## Análisis de expresión génica

Con los datos de CT obtenidos del programa Quansoft, se realizó un promedio de CTs de las tres repeticiones técnicas tanto del gen target como del gen calibrador. Se calculó el delta delta CT mediante el método de Livak para determinar la expresión relativa de mRNA de cada gen en estudio. En este caso, se utilizó el gen UBI-10 como gen calibrador (Gutiérrez, 2017).

## Análisis de la interacción hormona-nitrógeno

Para profundizar el análisis sobre el efecto que tiene el nitrógeno en la defensa de las plantas se colocaron los mismos tratamientos aplicados añadiendo fitohormonas, el SA y JA. Para esta prueba se seleccionaron los tratamientos de 100% y 200% tanto de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y los controles: 0% N, SA y JA (Tabla 5). Se desarrollaron 15 tratamientos diferentes,

con los cuales se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para el análisis de expresión génica.

**Tabla 5.** Composición de tratamientos para pruebas de supresión.

<b>Tratamiento</b>	<b>Nitrógeno</b>	<b>HORMONA</b>
<b>T1</b>	0	-
<b>T2</b>	100 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-
<b>T3</b>	200 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-
<b>T4</b>	100 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-
<b>T5</b>	200 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-
<b>T6</b>	0	SA
<b>T7</b>	100 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SA
<b>T8</b>	200 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SA
<b>T9</b>	100 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SA
<b>T10</b>	200 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	SA
<b>T11</b>	0	JA
<b>T12</b>	100 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	JA
<b>T13</b>	200 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	JA
<b>T14</b>	100 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	JA
<b>T15</b>	200 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	JA

## RESULTADOS

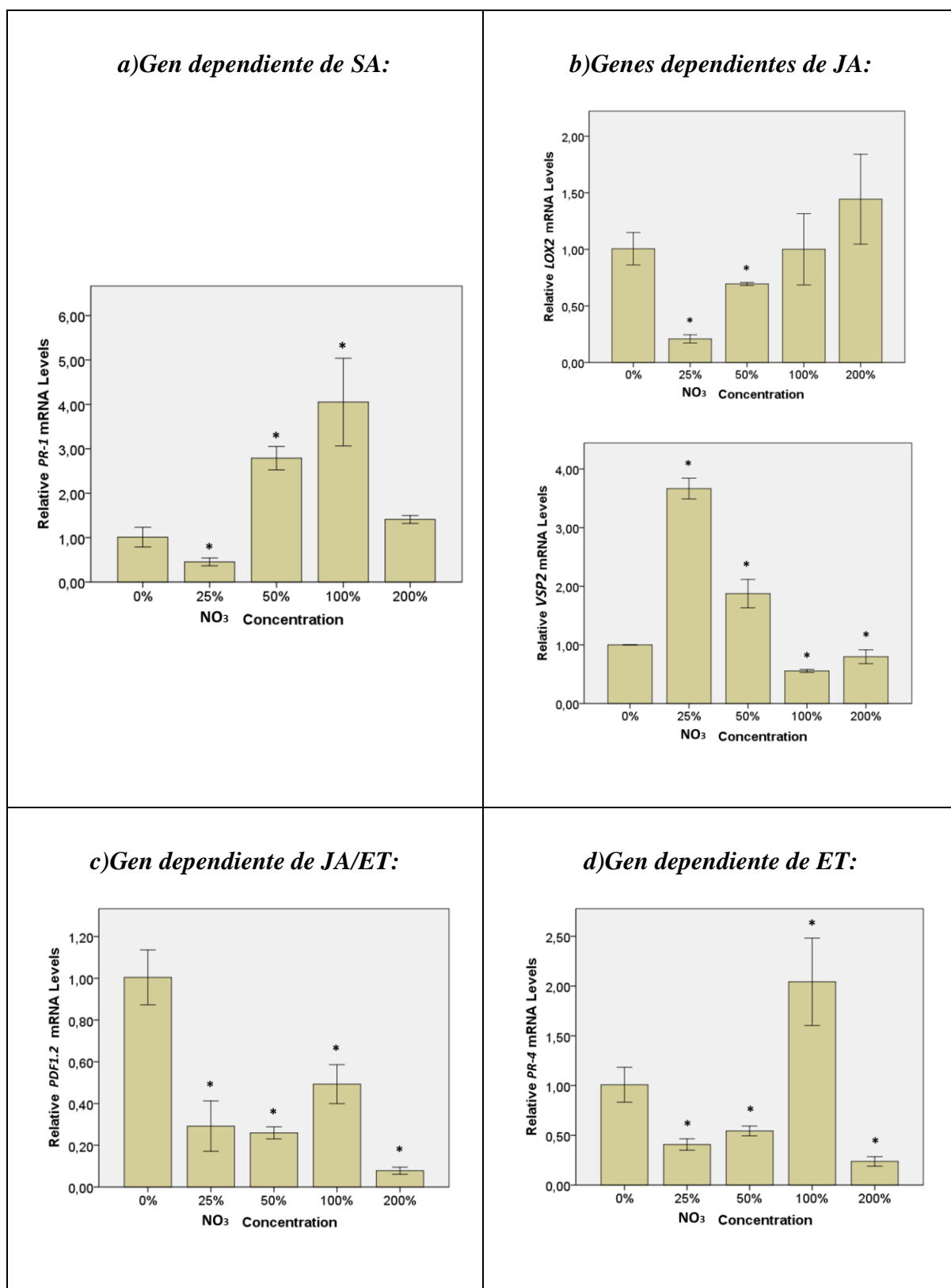
### Evaluación de las diferentes concentraciones de nitrato sobre la defensa vegetal

La Figura 6 muestra la expresión de los genes analizados bajo diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  como fuente de nitrógeno.

Se observó que la expresión del gen *PR-1* dependiente de la ruta de SA (figura 6, a), en una concentración de 50%, aumenta a tres veces más su expresión con respecto al control, y en la concentración de 100% aumenta a cuatro veces más la expresión de este gen expresión con respecto al control. Sin embargo bajo un exceso de  $\text{NO}_3^-$  (200%), disminuye nuevamente la expresión de este gen en comparación con el nivel obtenido bajo una concentración óptima (100%). La deficiencia de este compuesto suprime la expresión de *PR-1*, comparándolo con el tratamiento de control sin nitrógeno.

En cuanto a los genes dependientes de JA se pudo observar que; la expresión de *LOX2* (figura 6, b1) se suprime significativamente en las concentraciones de 25% y 50% de  $\text{NO}_3^-$ , mientras que al aumentar la concentración de este compuesto se observa que llega a estabilizarse con respecto al control, tanto en los tratamientos de concentración óptima (100%) y exceso (200%) de  $\text{NO}_3^-$ . Por otro lado, la expresión del gen *VSP2* (figura 6, b2) se induce cuatro veces más, en comparación con el control, cuando existe una baja concentración de  $\text{NO}_3^-$  (25%). A medida que aumenta la concentración de este compuesto, disminuye el nivel de respuesta hasta que la concentración óptima (100%) y el exceso (200%) suprimen significativamente la expresión. La expresión del gen *PDF1.2* (figura 6, c) dependiente de la ruta JA/ET, se suprime significativamente bajo todos los tratamientos aplicados, sin embargo se observa una supresión más drástica en el tratamiento de exceso de  $\text{NO}_3^-$  (200%). La expresión del gen *PR-4* (figura 6, d) dependiente de la presencia de ET, se suprime en las concentraciones de 25% y 50% de  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo se observa una inducción significativa a

un nivel óptimo (100%) de  $\text{NO}_3^-$ , mientras que en un exceso de este compuesto la expresión se suprime nuevamente.



**Figura 6.** Respuesta a tratamientos con diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ .

\*Representa diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, según la prueba t al 5%.

El incremento de nitrato hasta la concentración óptima (100%) induce significativamente la activación de la ruta dependiente de SA, activando la expresión del gen *PR-1*, mientras que suprime la expresión de los genes de defensa dependientes de JA. Sin embargo el nitrato a bajas concentraciones induce la expresión del gen *VSP2* dependiente de la ruta de JA, y a la vez se suprime la activación de la ruta de SA. El exceso de este compuesto suprime o no genera un cambio significativo en la expresión de los genes analizados con respecto al control.

### **Evaluación de diferentes concentraciones de amonio sobre la defensa vegetal**

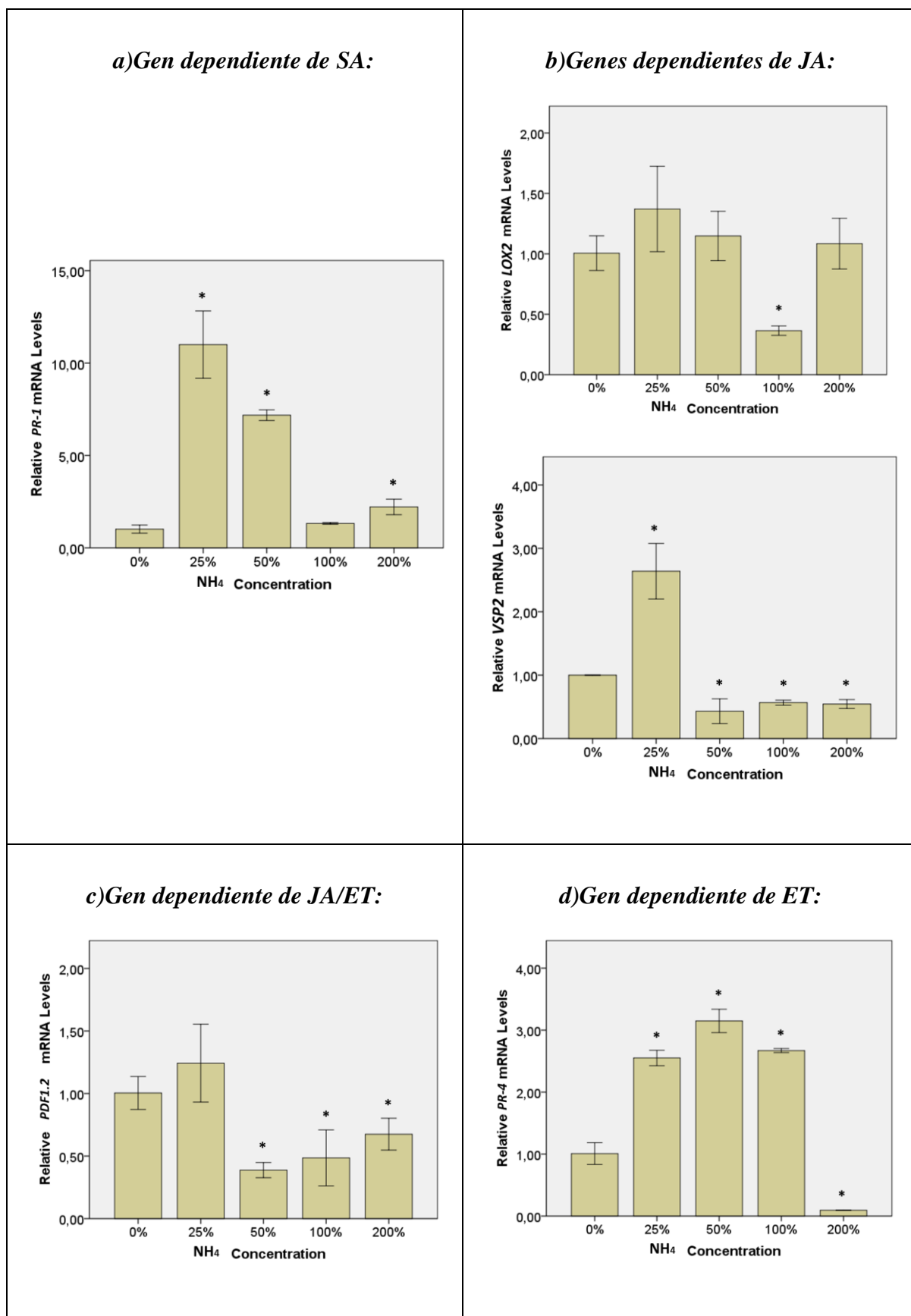
En la figura 7 se observa el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  sobre la expresión de los genes de defensa analizados. La expresión del gen *PR-1* dependiente de SA (figura 7, a), se induce once veces más y ocho veces más con respecto al control cuando existe una concentración de 25% y 50% respectivamente de  $\text{NH}_4^+$ , esta respuesta disminuye conforme aumenta la concentración de este compuesto hasta estabilizar su nivel con el control 0% N en las concentraciones de 100% y 200%.

Al analizar la expresión de los genes de defensa relacionados con la ruta de JA, se pudo observar que el gen *LOX2* (figura 7, b1) en general no presenta variación en su nivel de expresión, sin embargo se observó una supresión significativa únicamente en la concentración de 100% de  $\text{NH}_4^+$ . El comportamiento de la expresión del gen *VSP2* (figura 7, b2) se induce más del doble en una baja concentración de  $\text{NH}_4^+$  (25%) con relación al control. A partir de un 50% de concentración de  $\text{NH}_4^+$  la respuesta de *VSP2* se suprime.

La respuesta del gen *PDF1.2* (figura 7, c) dependiente de la ruta JA/ET se eleva levemente en una concentración de 25% de  $\text{NH}_4^+$  y se suprime significativamente en todos los tratamientos con concentraciones superiores al 25%. El gen *PR-4* dependiente de ET (figura 7, d) induce su expresión significativamente en los tratamientos de bajas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$



(25%) hasta un nivel óptimo de este compuesto (100%), aumentando alrededor de tres veces más la expresión de este marcador con respecto al control. Sin embargo bajo un exceso de  $\text{NH}_4^+$  la respuesta de *PR-4* se suprime drásticamente.



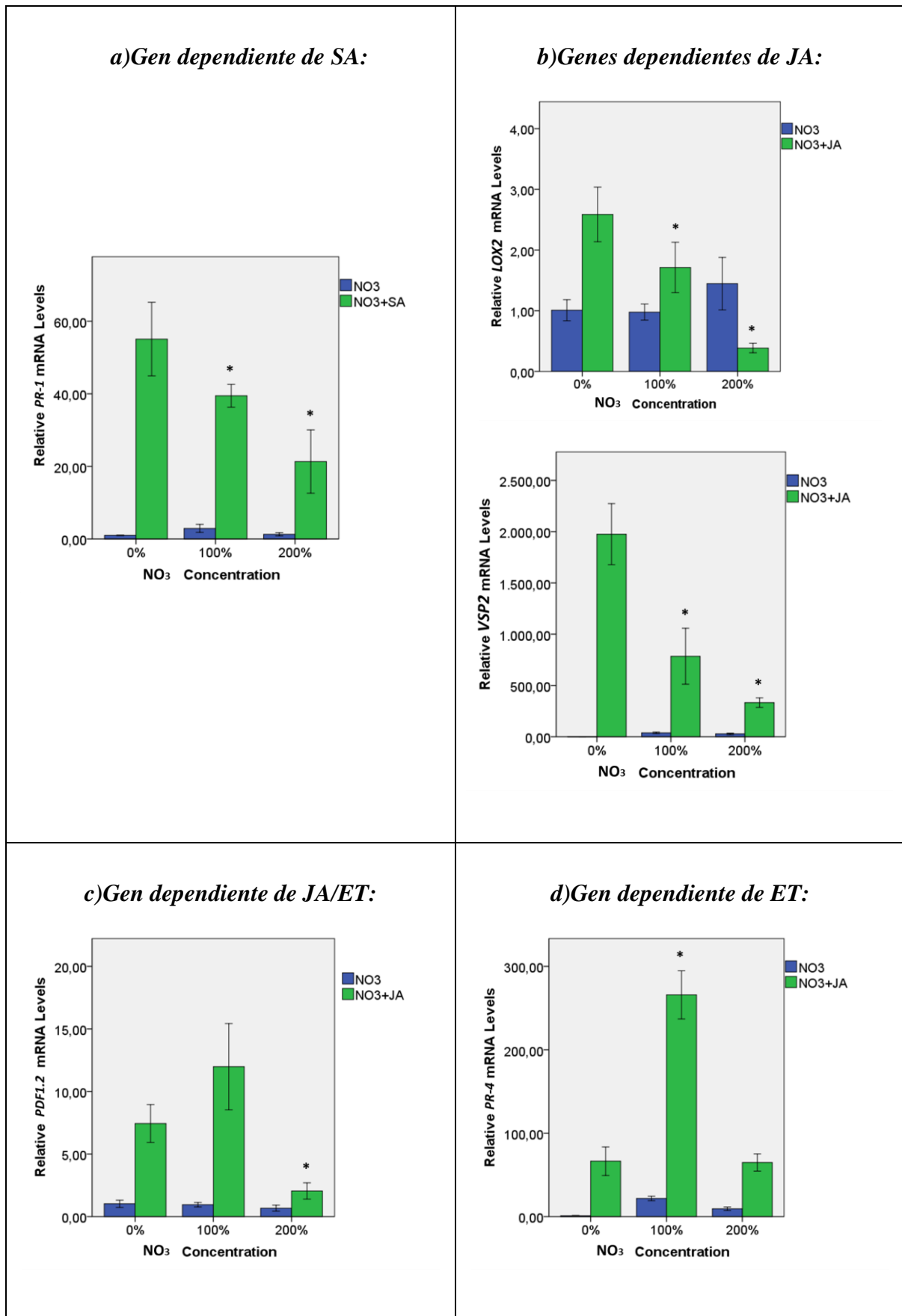
**Figura 7.** Respuesta a tratamientos con diferentes concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

\*Representa diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, según la prueba t al 5%.

El amonio en una concentración de 25% activó la expresión de todos los genes de defensa analizados, sin embargo a medida que aumenta la concentración de este compuesto, la respuesta se suprime en las rutas dependiente de SA, JA y JA/ET.

### **Análisis de la interacción hormona-nitrógeno**

En las figuras 7 y 8 se observa el comportamiento de la expresión de los genes de defensa analizados, bajo el efecto de los tratamientos seleccionados para esta prueba que fueron: óptimo (100%), exceso (200%) y en control 0%. Adicionalmente se puede observar el efecto de estos mismos tratamientos a los cuales se les añadió las fitohormonas SA y JA. La expresión de la respuesta inducida por SA del gen *PR-1* (figura 7, a), disminuye mientras aumenta la concentración de  $\text{NO}_3^-$ . En el tratamiento de exceso de  $\text{NO}_3^-$  (200%) más SA se observa una gran supresión en relación al control que contiene únicamente SA. En cuanto a los genes dependientes de JA/ET, se observó que la expresión inducida con hormona del gen *LOX2* (figura 7, b) se suprime con el aumento de la concentración de  $\text{NO}_3^-$ . En el tratamiento de exceso de  $\text{NO}_3^-$  (200%) se genera una supresión de la respuesta inducida con hormona a un nivel más bajo incluso que el nivel de respuesta activada por el tratamiento sin la presencia de la hormona. Por otro lado, la expresión del gen *PDF1.2* (figura 7, c) incrementa en el tratamiento de concentración óptima de  $\text{NO}_3^-$  más JA en relación a la expresión del tratamiento control sin nitrógeno. El tratamiento de exceso de  $\text{NO}_3^-$  suprime la expresión de este gen incluso con la presencia de JA, la hormona señal para su activación. La expresión del gen *VSP2* (figura 7, d) se suprime significativamente conforme aumenta la concentración de  $\text{NO}_3^-$ . El nivel óptimo de este compuesto, 100% + JA, suprime la expresión a menos de la mitad del nivel expresado en el control (JA). La expresión del gen *PR-4* (figura 7, e) en el tratamiento de 100% se induce a casi al triple del nivel inducido únicamente con JA. Al aumentar la concentración de este compuesto hasta un 200% la respuesta se estabiliza nuevamente con el tratamiento control.

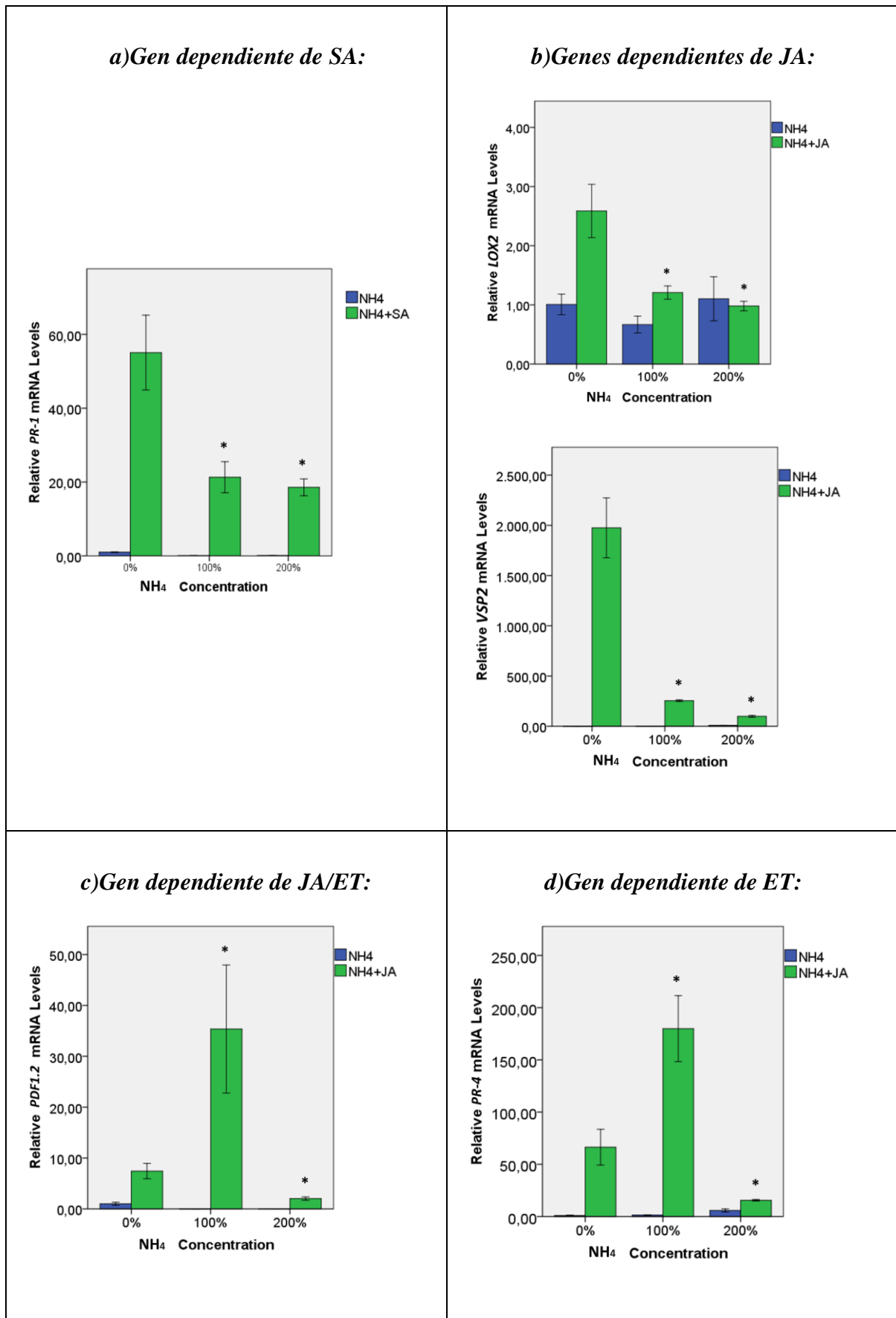


**Figura 8.** Respuesta a pruebas de supresión con diferentes concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

\*Representa diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, según la prueba t al 5%.

Finalmente la figura 8 muestra el efecto de los tratamientos seleccionados con  $\text{NH}_4^+$  más las fitohormonas. La expresión del gen *PR-1* (figura 8, a) disminuye conforme al aumento de la concentración de  $\text{NH}_4^+$ , tanto el tratamiento con 100% y 200% de  $\text{NH}_4^+$  suprimen drásticamente la expresión inducida por SA.

La expresión del gen *LOX2* dependiente de la ruta de JA (figura 8, b), se suprime en ambos tratamientos que contienen  $\text{NH}_4^+$ , igualando a los niveles de los tratamientos sin hormona. El gen *PDF1.2* (figura 8, c), incrementa ampliamente su expresión bajo una concentración óptima de  $\text{NH}_4^+$  y JA en relación al control. Nuevamente el exceso de este compuesto ocasiona la supresión de la expresión de este gen. En el caso del gen *VSP2* (figura 8, d), la expresión de este gen de defensa dependiente de JA se suprime drásticamente en ambos tratamientos con la presencia de nitrógeno, el control con JA genera una sobre expresión muy alta sobre este gen. En el caso del gen *PR-4* (figura 8, e), el efecto de JA y nitrógeno a concentración óptima induce su expresión en relación al control, mientras que un exceso de este compuesto aún con la presencia de la hormona señal se suprime.



**Figura 9.** Respuesta a pruebas de supresión con diferentes concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

\*Representa diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, según la prueba t al 5%.

Tanto el nitrato como el amonio suprimen la expresión de la respuesta inducida por las hormonas SA y JA en los genes *PR-1*, *LOX2* y *VSP2*. Mientras que la expresión de los genes *PDF1.2*, dependiente de la ruta JA/ET; y *PR-4*, dependiente de ET se induce en presencia de una concentración óptima de ambas fuentes de nitrógeno.

## DISCUSIÓN

El análisis de la expresión génica permite investigar y determinar los diferentes procesos que se desarrollan en la planta, cuando se encuentra influenciada por un factor de estrés ambiental. En el presente estudio el estrés inducido a las plantas fue de carácter nutricional, y se evaluó su efecto sobre la resistencia o susceptibilidad que desarrollaron las plantas posteriormente. La activación de los mecanismos de defensa requiere un consumo de energía, por lo que es importante considerar el estado nutricional de la planta para generar resistencia a patógenos. La cuantificación relativa de la expresión de los genes de defensa evidenció que el nitrógeno juega un papel importante en los mecanismos de respuesta de las plantas. La mayoría de los tratamientos aplicados generaron un cambio en el nivel de inducción de respuesta.

### **SAR e inducción de resistencia**

Como se mencionó anteriormente, las enfermedades de las plantas son producto de la interacción entre la planta, el patógeno y el ambiente en el que se encuentra. La nutrición al ser parte del ambiente de la planta determina la resistencia o susceptibilidad de la planta ante el ataque de un patógeno. El desarrollo de una enfermedad puede estar influenciado por los efectos de las tasas de aplicación (exceso o deficiencia), tiempos de aplicación, las características del suelo, e incluso la interacción entre los elementos (Huber, 2007). Una nutrición controlada de la planta puede optimizar las defensas propias de la planta, generando un sistema de prevención ante futuros ataques. De esta manera se puede disminuir o evitar la aplicación de pesticidas perjudiciales para la salud y el medio ambiente. Actualmente se investiga la posibilidad de que “cebar” artificialmente a las plantas resulta más rentable y sostenible que el uso de plaguicidas en los cultivos (Vivanco et al, 2005). La duración y efecto de protección de SAR se relaciona con la especie vegetal y el inductor (León-Reyes, 2009).



El análisis de la expresión de los genes de defensa ha permitido identificar las dos rutas de señalización, una mediada por SA y la otra por JA y ET. La primera se activa en respuesta a organismos biotróficos como *Pseudomonas*, y la segunda se activa en defensa de patógenos necrotróficos como *Botrytis* y *Erwinia* (Vidal, 1997). Además se ha identificado que estas hormonas interactúan dependiendo de varios factores; ambientales, el tipo de patógeno, el cambio en el estado redox de la célula y las proporciones de SA y JA (Díaz-Puentes, 2012). Formando un complejo mecanismo de defensa.

Aparentemente cuando existen bajas concentraciones de estas hormonas se da una interacción sinérgica entre estas rutas, activando la expresión de marcadores dependientes de JA y SA (Díaz-Puentes, 2012). Mientras que cuando se acumulan altos niveles de estas hormonas se genera una interacción antagónica entre SA y JA. Es decir, SA inhibe la síntesis de JA y por lo mismo, la capacidad de responder ante señales generadas por heridas en la planta. Mientras que el JA bloquea la respuesta de SA para la síntesis de proteínas PR (Vivanco et al, 2005). Se ha reportado que se genera una disminución de la resistencia a insectos herbívoros en plantas tratadas con SA o infectadas con patógenos inductores de SA (Díaz-Puentes, 2012). Lo que explicaría la incapacidad de las plantas de responder al mismo tiempo ante organismos biotróficos y necrotróficos con la misma efectividad. Esto se pudo evidenciar en la diferencia de la expresión relativa de los genes analizados dependientes de SA (*PR-1*) y dependientes de JA/ET (*LOX2*, *VSP2*, *PDF1.2* y *PR-4*).

### **Nutrición y defensa vegetal**

Las diferentes formas de nitrógeno absorbidas por la planta en un ambiente natural son asimiladas de diferente manera, esto puede generar un efecto sobre las enfermedades. La cantidad de nitrógeno disponible puede generar un efecto en la severidad de las enfermedades, se ha encontrado que plantas con deficiencia de este nutriente no proporcionan un ambiente

adecuado para ciertos patógenos, mientras que un exceso puede inhibir la activación de respuestas de defensa a otros patógenos (Huber, 2007). Se ha determinado que el nitrógeno es uno de los factores principales que determinan la cantidad de celulosa en la planta y por lo tanto afecta la resistencia mecánica de las paredes celulares. Por ejemplo, algunos patógenos foliares son capaces de penetrar, reproducirse y desarrollarse más rápidamente en tejidos ricos en este nutriente (Huber, 2007).

Cuando un patógeno infecta una planta, consume rápidamente los nutrientes de su huésped, de esto depende una infección exitosa por parte del patógeno. Del mismo modo, la planta puede modificar y reasignar sus nutrientes a respuestas de defensa situarlos lejos del sitio de la infección. Debido a esto, la aplicación exógena de nitrógeno puede alterar el equilibrio a favor de la planta o del patógeno (Mur, 2016). De acuerdo a esto, se ha determinado que el aumento de nitrógeno aumenta o disminuye la resistencia de las plantas hacia los patógenos. Esto puede justificar las diferentes respuestas inducidas por los tratamientos con diferentes fuentes nitrógeno, sobre la expresión de los genes analizados. El uso de fertilizantes nitrogenados en base a  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$  afecta el resultado de las interacciones planta-patógeno. La fertilización con  $\text{NO}_3^-$  aumenta la resistencia a la respuesta de hipersensibilidad (HR), mientras que la nutrición con  $\text{NH}_4^+$  puede comprometer la defensa de la planta. Metabólicamente,  $\text{NO}_3^-$  aumenta la síntesis de poliamidas como espermina y espermidina, que son señales de defensa establecidas. Por otro lado, la nutrición con  $\text{NH}_4^+$  induce un aumento del ácido aminobutírico (GABA), el cual puede ser una fuente de nutrientes para organismos patógenos (Mur, 2016).

Otro factor muy importante es la movilidad de ambas fuentes de nitrógeno, ya que esto influye en la captación y susceptibilidad a pérdidas de estos nutrientes. Por ejemplo el  $\text{NO}_3^-$  es altamente móvil, por lo que puede distribuirse fácilmente. Mientras que el  $\text{NH}_4^+$  es inmóvil en el suelo (Perdomo, 2001). La movilidad de los nutrientes en las plantas influye en la evidencia

de signos de deficiencia nutricional en las hojas. Una deficiencia de nutrientes inmóviles se observa en el amarillamiento de nuevas hojas, mientras que una deficiencia de nutrientes móviles se puede ver en el amarillamiento de las hojas viejas. Esto se debe a que los nutrientes móviles viajan desde las hojas viejas para un nuevo crecimiento, mientras que los nutrientes inmóviles no pueden transferirse entre el nuevo y viejo crecimiento, por lo que los síntomas de deficiencia aparecerán en el nuevo crecimiento (Perdomo, 2001).

### **Efecto de $\text{NO}_3^-$ en la expresión de los genes de defensa**

En el caso del  $\text{NO}_3^-$ , a bajas concentraciones (25%) se activa la ruta dependiente de JA ya que se observó una inducción en la expresión del gen *VSP2*, y supresión del gen *PR-1* lo que comprueba el antagonismo entre estas dos rutas (figura 10). A pesar de que en los genes *LOX2* y *VSP2* comparten el factor de transcripción que es *MYC2* (León-Reyes, 2009), se observó supresión de *LOX2* bajo esta concentración, esto puede ser debido a que el gen *VSP2* cumple su función en tejidos específicos, mientras que *LOX2* interviene en la síntesis de compuestos bioactivos en todos los tejidos de la planta (Mochizuki, 2016), es decir debido a su función se pueden expresar de manera diferente según los requerimientos de la planta. El gen *PDF1.2* también dependiente de JA, se suprimió en todos los tratamientos con  $\text{NO}_3^-$ , aparentemente a causa de la influencia de ET. En la ruta de JA en presencia de ET se expresa el gen *PDF1.2*, mientras que en ausencia de ET se induce la expresión de *VSP2* (León-Reyes, 2009). El gen *PR-4* dependiente de la señalización de ET, también se suprime a bajas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , lo que concuerda con la inactividad de *PDF1.2* y a su vez con la expresión de *VSP2*.

Por otro lado, mientras se incrementa la concentración de  $\text{NO}_3^-$  se activa la expresión del gen *PR-1* dependiente de SA. Este resultado fortalece los resultados obtenidos en varios estudios previos, por ejemplo Vega (2015) quien estableció en su investigación como

concentración óptima a 6mM, observó que plantas crecidas en condiciones de deficiencia de nitrato (2mM nitrato) son más susceptibles a la infección. Sin embargo, plantas crecidas con mayores concentraciones que lo recomendable (12 mM nitrato) también son más susceptibles a la infección por este patógeno (Vega, 2015).

En la concentración óptima de este compuesto (100%) se induce significativamente la expresión de *PR-1* y se suprimen todos los genes dependientes de JA, los que demuestra nuevamente su comportamiento antagónico. En este tratamiento también se observó la inducción del gen *PR-4* dependiente de ET, lo que pudo fortalecer la expresión de *PR-1*. Estudios han demostrado que ET potencializa la transcripción de genes relacionados a SA/*NPR1* (Leon-Reyes et al, 2009). Estos resultados concuerdan con los análisis anteriormente realizados en el laboratorio de Biotecnología agrícola y de alimentos de la USFQ, en los que se aplicaron tratamientos con diferentes combinaciones de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . Se demostró que el gen *PR-1* se expresó gradualmente conforme aumentó la proporción de  $\text{NO}_3^-$  en las soluciones nutritivas (Astudillo, 2012).

En general a mayor concentración de  $\text{NO}_3^-$  se induce únicamente la expresión de *PR-1* hasta la concentración óptima (100%), la expresión de los demás genes tiende a suprimirse conforme se aumenta  $\text{NO}_3^-$ .

	$\text{NO}_3^-$	Ausencia (0%)	Deficiencia (25%)	Óptimo (100%)	Exceso (200%)
SA	<i>PR-1</i>	—	↓	↑	—
JA	<i>LOX2</i>	—	↓	—	—
JA	<i>VSP2</i>	—	↑	↓	↓
JA/ET	<i>PDF1.2</i>	—	↓	↓	↓
ET	<i>PR-4</i>	—	↓	↑	↓

**Figura 10.** Resumen expresión génica bajo efecto de nitrato  $\text{NO}_3^-$  con respecto al control (0%N).

El nitrógeno es el elemento más reportado que influye en las enfermedades de las plantas, la mayor parte de contradicciones en estos reportes se deben a la falta de conocimiento de los diferentes efectos de las diversas formas iónicas (Huber, 2007). La forma disponible de este nutriente influye en la respuesta a la enfermedad, independientemente de la concentración del elemento. Existen varios estudios reportados sobre el efecto de estas formas de nitrógeno frente a varias enfermedades (tabla 6).

**Tabla 6.** Efecto del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en algunas enfermedades.

Enfermedad	Patógeno	Hospedero	Efecto del $\text{NO}_3^-$
Pudrición de la raíz y corona	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate	D
Marchitamiento	<i>Pseudomonas</i>	Tomate	D
Pudrición de la corona	<i>Rhizoctonia solani</i>	Remolacha	D
Mancha ocular	<i>Pseudocercospora</i>	Trigo	D
Pudrición de la raíz	<i>Fusarium</i>	Guisantes	D
Raíz corchosa	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	Tomate	I
Pudrición de la raíz negra	<i>Thielaviopsis basicola</i>	Tabaco	I
Explosión	<i>Magnaporthe grisea</i>	Arroz	I
Pudrición de la raíz negra	<i>Rhizoctonia fragariae</i>	Fresas	I
Lesión nematode	<i>Pratylenchus penetrans</i>	Fresas	I

D=disminuye la severidad de la enfermedad, I= incrementa la severidad de la enfermedad.

Modificado de Huber (2007).

### **Efecto de $\text{NH}_4^+$ en la expresión de los genes de defensa**

En cuanto al efecto de  $\text{NH}_4^+$  en la inducción de defensa vegetal (figura 11), se pudo determinar que a bajas concentraciones (25%) se induce la expresión de los genes: gen *PR-1*, *LOX2*, *PDF1.2*, *VSP2* y *PR-4*. Lo que demuestra un sinergismo entre las rutas de activación, generado por las proporciones de las hormonas señal acumuladas en los tejidos (Díaz-Puentes, 2012). A partir de este tratamiento, el aumento de  $\text{NH}_4^+$  suprime gradualmente la expresión de los genes *PR-1*, *LOX2* y *VSP2*. La expresión del gen *PR-4* dependiente de ET, se induce significativamente en los tratamientos 25%, 50% y 100%. Esta inducción puede relacionarse con la fuente de N, en este caso el  $\text{NH}_4^+$  y su relación con la inducción de ET. A pesar del alto nivel de inducción de ET, se suprime la expresión de *PDF1.2* dependiente de la ruta JA/ET.

	NH <sub>4</sub>	Ausencia (0%)	Deficiencia (25%)	Optimo (100%)	Exceso (200%)
SA	<i>PR-1</i>	—	↑	—	—
JA	<i>LOX2</i>	—	↑	↓	—
JA	<i>VSP2</i>	—	↑	↓	↓
JA/ET	<i>PDF1.2</i>	—	↑	↓	↓
ET	<i>PR-4</i>	—	↑	↑	↓

**Figura 11.** Resumen expresión génica bajo efecto de amonio NH<sub>4</sub><sup>+</sup> con respecto al control (0%N).

Los tratamientos de exceso (200%) tanto de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, generan una supresión drástica o no genera efecto evidente sobre la expresión de los genes de defensa analizados. Una alta concentración de nitrógeno en los cultivos tiende a incrementar la susceptibilidad a enfermedades, sin embargo es importante tener en cuenta los efectos de la cantidad aplicada (deficiencia, suficiencia o exceso), la etapa en la que se aplica, la forma de nitrógeno, las condiciones del suelo y las interacciones con otros nutrientes (Huber, 2007).

Usualmente se ha observado un efecto opuesto entre el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sobre la susceptibilidad hacia algunas enfermedades (tabla 7), debido principalmente a las diferencias en la disponibilidad o en la selección de las diversas vías metabólicas de la planta (Huber, 2007).

**Tabla 7.** Efecto del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en algunas enfermedades.

Enfermedad	Patógeno	Hospedero	Efecto del $\text{NH}_4^+$
Mancha de hoja	<i>Alternaria macrospora</i>	Algodón	D
Parche marrón	<i>Rhizoctonia solani</i>	Lolium	D
Hernia de la col	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Col	D
Lesión nematode	<i>Pratylenchus penetrans</i>	Fresas	D
Mummy Berry	<i>Minilinia vacciniicorymbosi</i>	Blueberry	D
Pudrición de la raíz	<i>Fusarium oxysporum</i>	Espárragos	I
Pudrición	Desorden fisiológico	Tomate	I
Raíz corky	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	Tomate	I
Pudrición de la corona	<i>Rhizoctonia solani</i>	Remolacha	I
Pudrición de la raíz	<i>Fusarium</i>	Guisantes	I

D=disminuye la severidad de la enfermedad, I= incrementa la severidad de la enfermedad.

Modificado de Huber (2007).

### **Análisis de la interacción hormona-nitrógeno**

Para comprender de mejor manera la influencia del nitrógeno en la defensa vegetal se realizó un análisis de pruebas de supresión. Para esto se seleccionó los tratamientos de concentraciones óptima (100%) y exceso (200%) tanto de  $\text{NO}_3^-$  como de  $\text{NH}_4^+$ . Se seleccionaron estos tratamientos debido a que es común pensar que a mayor cantidad de fertilizante, se desarrolla de mejor manera la planta. Se aplicó estos tratamientos en presencia y ausencia de las hormonas inductoras SA y JA para determinar el efecto del nitrógeno en plantas inducidas con las hormonas señal.

En los tratamientos con  $\text{NO}_3^-$ +SA y  $\text{NO}_3^-$ +JA se observó un nivel de expresión muy superior a los tratamientos que no tenían hormona. Demostrando claramente la dependencia de SA para la expresión de *PR-1* y la dependencia de JA para la expresión de los genes *LOX2*, *PDF1.2* y *VSP2*. También se pudo comprobar la influencia de ET para la expresión de *PDF1.2* tanto en los tratamientos con  $\text{NO}_3^-$  como con  $\text{NH}_4^+$ . En la expresión del gen *PR-4* dependiente de ET, se observó mayor expresión en el tratamiento 100%+JA que en tratamiento con JA solo. Esto comprueba la presencia y actividad de ET en los procesos de respuesta vegetal. La

expresión inducida de los genes *PDF1.2* y *PR-4* aumenta en presencia las dos fuentes de nitrógeno en una concentración óptima (100%), demostrando un efecto de sinergia entre la hormona JA y estos tratamientos. Sin embargo, en los tratamiento con exceso de nitrógeno, 200%+JA, se suprime la expresión de *PDF1.2* y de *PR-4*.

Debido al carácter antagónico de las rutas a grandes concentraciones de hormonas, la expresión de *PDF1.2* pudo influir también en la supresión del gen dependiente de SA, el *PR-1*.

En cuanto al efecto de  $\text{NO}_3^-$ , se pudo observar que a medida de que aumenta la concentración de  $\text{NO}_3^-$  disminuye la expresión de los genes *PR-1*, *LOX2* y *VSP2* en los tratamientos con inducción exógena de hormonas.

Los tratamientos con  $\text{NH}_4^+$  mostraron la misma tendencia. Conforme aumenta su concentración, disminuye la expresión de los genes *PR-1*, *LOX2* y *VSP2*. Sin embargo la supresión de la expresión con  $\text{NH}_4^+$  fue mucho más drástica.

En todos los tratamientos con exceso (200%) de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  más SA y JA se observó el nivel más bajo de supresión de todos los genes analizados.

Gracias al análisis de la expresión génica se pudo determinar que en general, a una mayor concentración de nitrógeno en cualquiera de sus formas, disminuye la inducción de los genes de defensa. La aplicación inadecuada de nitrógeno genera acidificación del suelo, acumulando sustancias tóxicas y modificando su composición (SIPSA, 2012) esto aparentemente también causa susceptibilidad de las plantas a patógenos.

Estos resultados fortalecen el estudio realizado por Astudillo (2007), quien observó que a proporciones de 75% y 100% de  $\text{NH}_4^+$  las plantas desarrollan mayor susceptibilidad a *Pseudomonas syringae*, un patógeno hemibiotrófico. Mientras que en las mismas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , se observó resistencia a la infección causada por este patógeno.



El  $\text{NH}_4^+$  como fuente única de N en altas concentraciones parece tener un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de la planta, debido a que acidifica el medio y puede generar toxicidad. Es por esto que es recomendable emplear una combinación de ambas fuentes de N en una proporción adecuada, y de esta manera generar un equilibrio beneficioso para el desarrollo de la planta (Wang, 2003).

Se observó que el estrés nutricional inducido por bajas concentraciones de nitrógeno activa el sistema de defensa de la planta. Generando resistencia al posible ataque de patógenos. Esto sugiere que la aplicación de bajas cantidades de fertilizantes puede fortalecer la resistencia de los cultivos. Estudios realizados sobre la absorción de nutrientes a través del tiempo, principalmente N, P y K, sugieren la distribución de la cantidad requerida de fertilizante en las diferentes etapas de desarrollo, según su requerimiento (Sancho, 2000). Se requiere una mayor absorción de nutrientes durante el ciclo de crecimiento, lo que define a esta etapa como clave para la aplicación de fertilizantes y de esta manera maximizar su aprovechamiento por parte de la planta. En cultivos de fresa por ejemplo, se sugiere aplicar un 20% del fertilizante requerido durante las primeras 12 semanas, en las siguientes 6 semanas aplicar el 40% y posteriormente el 40% restante (Molina et al., 1993).

Diferentes estudios han demostrado que la disponibilidad de nitrógeno en la planta afecta el resultado final de la interacción planta-patógeno. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que explican esta interacción son poco conocidos y dependen, entre otros factores, de la especie vegetal y del patógeno en estudio. Por estos motivos, es difícil deducir reglas generales para el papel del nitrógeno y su efecto en la interacción de plantas y patógenos. (Vega, 2015)

## CONCLUSIONES

- La nutrición mineral a partir de las diferentes formas de nitrógeno influye en la expresión de genes de defensa vegetal de *Arabidopsis thaliana*, tanto en la expresión de genes dependientes de la ruta de SA como en la ruta mediada por JA/ET.
- La expresión del gen *PR-1* dependiente de SA, se induce gradualmente en los tratamientos con concentración 50% y 100% de  $\text{NO}_3^-$ . Mientras que la expresión de *VSP2* se induce a bajas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ .
- El tratamiento con una concentración 25% de  $\text{NH}_4^+$  induce la expresión de todos los genes analizados, dependientes de SA y de JA.
- Los tratamientos con 200% de ambas formas de nitrógeno,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , suprimen o no causan un cambio significativo, comparado al control, en la expresión de los genes de defensa *PR-1*, *LOX2*, *PDF1.2*, *VSP2* y *PR-4*.
- La nutrición mineral en base a diferentes fuentes de nitrógeno como son  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  optimiza la defensa de las plantas cuando es aplicada en concentraciones de 25%.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda desarrollar más repeticiones biológicas en áreas donde se pueda controlar condiciones como la temperatura, humedad y luz. Estos factores influyen en la síntesis de SA/JA. De esta manera se pueden obtener resultados más específicos a las variables independientes en estudio.
- Con el objetivo de implementar estas técnicas en cultivos de interés, es importante realizar ensayos en campo para validar los resultados obtenidos
- Para ampliar la información es importante analizar la expresión de estos genes de defensa al cosechar el material vegetal después de las 24 horas, ya que en estudios realizados con otros nutrientes se ha observado cambios significativos.
- Se recomienda realizar ensayos de supresión en tratamientos con bajas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ .
- Con el objetivo de complementar este estudio, se recomienda realizar bioensayos en plantas tratadas con bajas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ .
- Finalmente, para comprobar el comportamiento de la activación de las rutas de SA y JA/ET se recomienda aplicar los tratamientos que generaron un alto nivel de expresión, a plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensibles las hormonas inductoras, nitrato, amonio, o mutaciones sobre el metabolismo de nitrógeno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angarita, A. (2010). *Inducción de resistencia en plantas*. Tolima: Universidad de Tolima.
- Astudillo, I. (2012). *Evaluación del efecto de la señalización del Nitrato y Amonio en la defensa vegetal del Banano y Arabidopsis, mediante bioensayos y el sistema reportero histoquímico B-glucoronidase (GUS)*. Quito: Universidad Politécnica del Ejército.
- Bart, P. (17 de Marzo de 2003). *The role of ethylene perception in plant disease resistance*.  
Obtenido de Universidad de Utrecht:  
[https://www.uu.nl/sites/default/files/proefschrift\\_bart\\_geraats.pdf](https://www.uu.nl/sites/default/files/proefschrift_bart_geraats.pdf)
- Bio-Rad. (s.f.). *What is Real-Time PCR (RT-qPCR)*. Obtenido de Aplicaciones y tecnologías:  
<http://www.bio-rad.com/es-ec/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr>
- Blanco-Labra, A., & Aguirre Mancilla, C. (Septiembre de 2002). *Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas*. Obtenido de Redalyc.org:  
<http://www.redalyc.org/html/416/41612201/>
- Boller, T., & Meins, F. (1992). *Genes Involved in Plant Defense*. Viena: Springer.
- Bowen, G., & Zapata, F. (1991). Efficiency in uptake and use of nitrogen by plants. *Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies.*, 349-362.
- Boyes, D., Mayed, A., Ascenzi, R., McCaskill, A. ., Davis, K., & Görlach, J. (2001). *Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A model for high Throughput Functional Genomics in Plants*. *The Plant Cell*, Vol 13, 1499-1510.
- Brechelt, A. (Abril de 2004). *Manejo Ecológico de plagas y enfermedades*. Obtenido de Fundación Agricultura y Medio Ambiente: [http://www.cultivopapaya.org/wp-content/uploads/Manejo\\_Ecologico\\_de\\_Plagas\\_A.Bretchel.pdf](http://www.cultivopapaya.org/wp-content/uploads/Manejo_Ecologico_de_Plagas_A.Bretchel.pdf)

- Brown, R. . (2003). A role for the GCC-Box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gen of Arabidopsis. *Plant Physiol*, 132, 1020-1032.
- Camargo, J. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos. *Ecosistemas*, 98-110.
- Criollo, S. (2013). *Evaluación de la defensa vegetal mediada por genes PR en Arabidopsis thaliana bajo déficit nutricional a través del sistema reportero histoquímico B-glucoronidase y bioensayos*. Quito: Escuela Politécnica del ejército.
- Datnoff, L., Elmer, W., & Huber, D. (2008). *Mineral nutriyion and plant disease*. Phytopathological society.
- del Puerto, A. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Hig Epidemiol*, 52 no 3.
- Diaz-Puentes, L. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Bioteconología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 257-267.
- FAO. (22 de Febrero de 2017). *Tendencias y desafíos*. Obtenido de El futuro de la alimentación y la agricultura.: <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/es/c/471474/>
- Gutiérrez, D. (2017). *Análisis de la expresión de genes de defensa VSP2, LOX2, PR1 y PDF1.2 en Arabidopsis thaliana frente a diferentes concentraciones de calcio*. Quito: UDLA.
- Harrison, M. (2005). *Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Obtenido de NCBI: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123749
- Hopkins, W., & Huner, N. (2008). *Introduction to plant physiology. 4th ed*. Wiley.
- Huber, D. M., & Thompson, I. (2007). Nitrogen and Plant Disease. *The physiological role of minerals*, 31-43.
- Huber, D., & Haneklaus, S. (2007). Managing Nutrition to control plant disease. *Plant pathology* 10.

- Koornneef et al, A. (2008). Towards a reporter system to identify regulators of cross-talk between salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.*, 543-546.
- Koornneef, A., & Pieterse, C. (2008). Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology*, 146, 839-844.
- Lens, P. (2017). *Plant Ubiquitin Promoter*. Obtenido de Technology Landscapes: <http://www.bios.net/daisy/promoters/242/g2/265.html>
- Leon-Reyes et al, A. (2009). Ethylene Modulates the Role of NPR1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiology*, 1797-1807.
- León-Reyes, A. (9 de Julio de 2009). *Making sense out of signaling during plant defense*. Obtenido de Utrecht University: <https://www.uu.nl/en/file/21583/download?token=QAW5M2B1>
- León-Reyes, A., Van der Does, D., Delker, C., & Tita, R. P. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis. *Springer*, 1423-1432.
- Li, J. (2004). The WRKY70 Transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *American Society of plant biologists*.
- Livak, K., & Schmittgen. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ddCt Method. *Methods* 25, 402-408. Obtenido de Method.
- Lundstedt, J. (Marzo de 2013). *Mecanismos de defensa de las plantas e induccion de resistencia*. Obtenido de ASP Chile: <http://www.loveland.cl/wp-content/uploads/2015/02/boletin11.pdf>
- Madriz, K. (2002). *Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno*. Obtenido de Manejo Integral de Plagas:

<http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6562/A2097e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Mestdagh et al, P. (2009). A novel universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology*, 10, R64.
- Mochizuki, S., Sugimoto, K., Koeduka, T., & Matsui, K. (2016). Arabidopsis lipoxygenase 2 is essential for formation of green leaf volatiles and five-carbon volatiles. *FEBS Letters*, 1017-1027.
- Molina, E., Salas, R., & A., C. (1993). Curvas de crecimiento y absorcion de nutrientes en fresa (Fragaris x ananasa cv. Chandler) en Alajuela. *Agronomía Costarricense* 17 (1), 67-73.
- Mur, L. (2016). Moving nitrogen to the centre of the plant defence againts pathogens. *Annals of Botany*, 703-709.
- Ndamukong, I. (2007). SA inducible Arabidopsis factors and supresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *The plant journal*, 128-139.
- Peña Cabriles, J., Grageda Cabrera, O., & Vera Núñez, J. (2002). Manejo de los fertilizantes nitrogenados en Mexico: uso de las técnicas isotópicas. *Terra Latinoamericana*, 20 (1), 51-56. Obtenido de Terra Latinoamericana.
- Perdomo, C. (2001). *Nitrógeno*. Obtenido de Área de suelos y aguas cátedra de fertilidad. Universidad de la republica:  
<http://www.fagro.edu.uy/fertilidad/publica/Tomo%20N.pdf>
- Pieterse, C., & Van Loon, L. (2001). Cross.talk between plant defense signaling pathways: boost or burden? *AgBiotech*.
- Pieterse, C., León-Reyes, A., & Van der Ent, S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plan immunity. *Nature Chemical Biology*, 308-314.

- Rivas, F. (2010). *Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica de PCR en tiempo real, en tomate infectado con Phytophthora infestans*. Quito: Escuela Politécnica del Ejército.
- Rubio, V. (14 de Julio de 2008). *Plant hormones and nutrient signaling*. Obtenido de Plan Mol Biol: DOI 10.1007/s11103-008-9380-y
- Ruiz, R. (2000). Caracterización de fertilizantes nitrogenados para uso en goteo. *Serie La Platina*, 82.
- Sancho, H. (2000). Curvas de absorción de nutrientes: Importancia y uso en los programas de fertilización. *Informaciones Agronómicas* 36, 11-13.
- Sepúlveda, G. (27 de Enero de 2004). *La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas*. Obtenido de redalyc.org: <http://www.redalyc.org/html/612/61221317/>
- SIPSA. (2012). Importancia de los fertilizantes nitrogenados. *Boletín mensual, insumos y factores asociados a la producción agropecuaria.*, 1-3.
- TAIR. (s.f.). *Arabidopsis Informatipo Resource*. Obtenido de <http://www.arabidopsis.org>
- UniProt. (16 de Mayo de 2014). *UniProtKB-082122 (VSP2\_ARATH)*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2017, de <http://www.uniprot.org/uniprot/O82122>
- UniProt. (16 de Mayo de 2014). *UniProtKB-P38418 (LOX2\_ARATH)*. Recuperado el 8 de Diciembre de 2017, de <http://www.uniprot.org/uniprot/P38418#function>
- UTN, U. T. (23 de Marzo de 2017). *La importancia de la agricultura para nuestro país*. Obtenido de Ingeniería en Agropecuaria: <http://www.utn.edu.ec/ficaya/carreras/agropecuaria/?p=1091>
- Van Hulst, M. (24 de Marzo de 2006). *Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis*. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1459400/>



- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins*. Utrecht: Physiological and molecular plant pathology.
- Vega, A. (2015). El efecto del nitrógeno en las enfermedades de las plantas. *Agronomía y forestal*, 52, <http://agronomia.uc.cl/extension/133-el-efecto-del-nitrogeno-en-las-enfermedades-de-las-plantas/file>.
- Vidal, S., Ponce de León, I., Denecke, J., & Palva, E. (1997). Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense via antagonist pathways. *Plant J*, 115-123.
- Vivanco et al, J. (Febrero de 2005). *Mecanismos químicos de defensa en las plantas*. Obtenido de Prensa científica, S. A.: <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/vivanco-et-al-2005.pdf>
- Wang, R., Okamoto, M., & Brawford, N. (2003). Microarray Analysis of the nitrate response in *Arabidopsis thaliana* and shoots Reveals over 1000 rapidly responding genes. *Plant Physiology*, 132, no 2, 556-567.
- Wenqiong, C., & al, e. (2002). Expression Profile Matrix of *Arabidopsis* Transcription factors genes. *American society of plant biologists*.
- Wong, M., & Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 75-85.