

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Determinación de la expresión de genes de defensa dependientes del Ácido Jasmónico, Ácido Salicílico y Etileno después de la aplicación de dietas e inhibidores de calcio en *Arabidopsis thaliana*

Proyecto de investigación

María Sol Llerena Llerena

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 30 de julio de 2019

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

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Determinación de la expresión de genes de defensa dependientes del Ácido Jasmónico, Ácido Salicílico y Etileno después de la aplicación de dietas e inhibidores de calcio en *Arabidopsis thaliana*

María Sol Llerena Llerena

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León-Reyes, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 30 de julio de 2019

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: María Sol Llerena Llerena

Código: 00125444

Cédula de Identidad: 1803537545

Lugar y fecha: Quito, 30 julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mis padres Homero y Mónica y a mi hermano Sebastián por estar siempre a mi lado durante todo este viaje a pesar de la distancia. Les agradezco porque siempre creyeron en mí y por el inmenso cariño y apoyo que siempre me hicieron sentir, que fue lo que siempre me impulsó a seguir adelante. Agradezco a mi familia por el apoyo que me dieron cada uno a su manera, a mis abuelos, mis tíos y mis primos. A Darío Ramírez y Antonio León, un agradecimiento especial por todo lo que me enseñaron estos últimos años y por estar siempre cuando necesité su ayuda. A los miembros del Laboratorio de Agrobiotecnología y Biotecnología de Alimentos de la USFQ porque siempre estuvieron dispuestos a ayudar en lo que fuera necesario.

Finalmente, quisiera agradecer de forma especial a esos amigos que se convirtieron en familia durante estos años, Camilo Ramírez y Camila Arboleda gracias por estar siempre y por la inmensa amistad que nos une, porque los últimos meses no hubieran sido posibles sin ustedes. Nathalia Valencia y Ricardo Campoverde gracias por ayudarme siempre que los necesité. A todo el BIOTEC SQUAD que se volvieron mi familia lejos de casa. A todos ustedes gracias por hacer de estos años los mejores.

RESUMEN

El ataque de patógenos a cultivos ha demostrado ser un problema de interés socio-económico debido a que generan grandes pérdidas del 20% de los cultivos que alimentan a la población mundial. Actualmente se buscan estrategias alternativas al uso excesivo de fertilizantes que no afecten al ecosistema. Estudios dentro de este campo han demostrado que la susceptibilidad o resistencia a patógenos en las plantas está ligada a la nutrición de las mismas. El calcio forma parte de la pared celular y actúa como un segundo mensajero intracelular por lo que está relacionado con la defensa física, así como a la metabólica.

El desarrollo de nuevas técnicas de control de plagas, necesita de un claro entendimiento de los mecanismos moleculares detrás de la defensa además de su conexión con la nutrición. Se cree que el calcio tiene un gran potencial de inducir a esta resistencia sin necesidad de una exposición previa al patógeno. Existen tres rutas importantes para la defensa que son la ruta del ácido jasmónico(AJ), ácido salicílico(AS) y etileno (ET). En el presente estudio se utilizó *Arabidopsis thaliana* para analizar la expresión de genes de defensa bajo diferentes tratamientos de calcio: estándar con 3mM (S), exceso 15mM (+) y deficiencia 0mM (-). Se analizaron los genes *LOX 2* y *PDF1.2* como marcadores de la activación de la ruta del AJ que converge con la ruta del Etileno. Se utilizó metiljasmonato (MeJA), un elicitador de esta ruta como control positivo. Se analizó también el efecto sobre la concentración de calcio total presente en las hojas.

La evaluación de la expresión de genes se realizó mediante la técnica de qRT-PCR utilizando como gen normalizador *UBC-10*. La concentración de calcio total en las hojas se midió mediante ICP-MS. Se encontró que un tratamiento con exceso de calcio (15mM) induce la activación de los genes *LOX2* y *PDF1.2*. La medición de calcio total demostró que no existen diferencias significativas en la concentración de calcio presente en las hojas luego de la aplicación de los tratamientos (ANOVA $\alpha=0.05$).

Previo a la aplicación de tratamientos, se realizó un lavado de los nutrientes del sustrato en el que crecieron las plantas. Al analizar el efecto de este proceso sobre la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* se determinó que es necesario para observar el efecto positivo del exceso de calcio. Para determinar el mecanismo por el cual es posible que se induzca este efecto al aplicar un exceso de calcio, se analizó el efecto de dos bloqueadores de calcio EGTA y *LaCl₃*. Se demostró que este último, tiene un efecto inhibitorio en la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* incluso en presencia del elicitador MeJA. Al analizar el efecto de los mismos factores sobre la expresión del gen *PR1*, se determinó que aquellos tratamientos que inhiben la expresión de los genes de la ruta del AJ, promueven la expresión del marcador mediado por el AS. Sin embargo se encontró que el exceso de calcio también induce la expresión de este gen en una menor proporción.

Palabras clave: qRT-PCR, defensa en plantas, calcio, señalización

ABSTRACT

The attack of pathogens on crops on crops has proven to be a socio-economic problem due to the 20% losses of crops that feed the world population generated by them. New strategies for pest control are sought in order to find alternatives to the excessive use of fertilizers. Studies have shown susceptibility or resistance to pathogens in plants is strongly linked to nutrition. Calcium, is part of the cell wall and acts as a second messenger, therefore it is related to physical as well as metabolic defense.

The development of new pest control techniques requires a clear understanding of the molecular mechanisms that occur to trigger the defense, as well as its connection with nutrition. It is believed that calcium has a great potential to induce this resistance without the need for prior exposure to a pathogen. There are three important pathways for defense that include the Jasmonic Acid pathway (JA), Salicylic Acid pathway (SA) and Ethylene pathway (ET) that interact with one another to trigger the defense. *Arabidopsis thaliana* was used to analyze the expression of defense genes expressed at the end of the pathways under treatments with three different calcium concentrations: standard with 3mM (S), excess 15mM (+) and deficiency 0mM (-). The LOX2 and PDF1.2 genes were analyzed as markers of the activation of the JA pathway that converge with de ET pathway. Methyl Jasmonate (MeJA) was used as elicitor for the JA pathway as positive control. It was also analyzed if the treatments applied had an effect on the total calcium concentration in leaves.

The evaluation of gene expression was performed using qRT-PCR technique using the *UBC-10* normalizer gene. The concentration in leaves was measured by ICP-MS. Results show that a treatment with excess calcium (15mM) strongly induces the activation of the genes LOX2 and PDF1.2. The total calcium measurements showed that there are no significant differences in the concentration of calcium in leaves after the application of the treatments (ANOVA $\alpha=0.05$). Prior to the application of treatments, a washing of the nutrients from the substrate in which the plants grew was carried out. By analyzing the effect of this process on the expression of the LOX 2 and PDF1.2 genes, it was determined that it is necessary to generate the positive effect of excess calcium (+) in their expression. To determine the mechanism by which it is possible to induce this effect by applying an excess of calcium, the effect of two calcium blockers EGTA and **LaCl₃** was analyzed. Results showed that **LaCl₃** has an inhibitory effect of the expression of the LOX2 and PDF1.2 genes. The inhibitory effect was observed even when the MeJa elicitor was present. When analyzing the effect of the same factors on the expression of the PR1 gene, it was determined that those treatments that inhibit the expression of the JA pathway, promote the expression of this gene. However, it was found that excess calcium also induces the expression of this genes in a lower proportion.

Key Words: qRT-PCR, Plant defense, Calcium, Signaling

TABLA DE CONTENIDO

_Toc14082620

Introducción.....	12
1.1 Calcio y nutrición vegetal.....	12
1.2 Defensa contra patógenos en plantas.....	13
1.2.1 Rutas moleculares de los genes de defensa.....	15
1.2.1.1 Ruta de Ácido Salicílico (AS)	15
1.2.1.2 Ruta de Ácido Jasmónico (AJ)	15
1.2.1.3 Ruta del Etileno (ET)	16
1.2.1.4 Interacción entre rutas de AS, AJ y ET	16
1.3 Calcio e inmunidad en plantas	17
1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo	18
1.5 Estudios de expresión génica	19
JUSTIFICACIÓN.....	21
OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
ÁREA DE ESTUDIO	24
MATERIALES	25
5.1 Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> y almacenamiento.....	25
5.2 Soluciones para tratamientos.....	25
5.3 Cuantificación de Calcio en Tejido Foliar	26
5.4 Extracción de ARN total y cuantificación	26
5.5 RT-qPCR.....	27
5.5.1 Tratamiento con DNasa I y Transcripción reversa	27
5.5.2 Ensayos qPCR.....	28
Métodos	29
6.1 Siembra y cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
6.2 Aplicación de tratamientos elicitores de defensa y bloqueadores de calcio.....	30
6.2.1 Bloqueadores de Calcio.....	30
6.2.2 Elicitor de defensa y bloqueador de calcio	31
6.2.3 Preparación de soluciones bloqueadoras de calcio	32
6.3 Cosecha y almacenamiento.....	32
6.4 Medición de calcio en tejido foliar	32
6.4.1 Análisis de resultados.....	33
6.5 Estudios de expresión génica	33
6.5.1 Extracción de ARN total.....	33
6.5.2 Síntesis de cDNA.....	34
6.5.2.1 Tratamiento de DNasa.....	34
6.5.3 qRT-PCR.....	35
6.5.4 Análisis de resultados.....	35
RESULTADOS.....	36
7.1 Siembra y cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36

7.2 Estudios de Expresión Génica	37
7.2.1 Efecto de las diferentes concentraciones de calcio en la expresión de genes de defensa en <i>A.thaliana</i> Col-O	37
7.2.2 Concentración de calcio en tejido foliar	38
7.2.3 Efecto del lavado en la expresión de genes de defensa en <i>A.thaliana</i> Col-O	40
7.2.4 Efecto de los bloqueadores de calcio en la expresión de genes de defensa en <i>A.thaliana</i> Col-O	42
7.2.5 Análisis de la expresión del gen PR1 de la ruta de AS bajo tratamientos con exceso de calcio y bloqueadores de calcio	45
DISCUSIONES.....	48
8.1 El exceso de calcio induce la expresión de los genes LOX 2 y PDF1.2 mediante cambios en la concentración de calcio circulante en el protoplasto.	48
8.1.1 Realizar un lavado previo a la aplicación de tratamientos es necesario para observar un cambio significativo en la expresión de genes de defensa	51
8.1.2 Bloquear los canales de calcio en la membrana celular reduce la expresión de genes de defensa.....	52
8.2 Antagonismo entre rutas de AS y AJ	54
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	58
Bibliografía.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers de <i>A.thaliana</i> utilizados para qPCR.....	28
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del cultivo de <i>A.thaliana</i> empleado para el estudio	29
Figura 2. Esquema de la línea de tiempo experimental empleada para determinar el mejor bloqueador de calcio	30
Figura 3. Esquema de la línea temporal experimental empleada para la aplicación del elicitador de defensa y bloqueador de calcio	31
Figura 4. <i>Arabidopsis thaliana</i> seis semanas después de la siembra listas para iniciar lavado y posterior aplicación de tratamientos.	36
Figura 5. Expresión relativa de los genes LOX2 y PDF1.2 luego de la aplicación de calcio .	37
Figura 6. Determinación de la concentración de calcio total en hojas después de la aplicación de tratamientos con diferentes concentraciones de calcio	39
Figura 7. Expresión Relativa de los genes PDF1.2 y LOX 2 con y sin lavado	41
Figura 8. Efecto de bloqueadores de calcio EGTA y LaCl ₃ en la expresión relativa del gen PDF1.2	43
Figura 9. Efecto de LaCl ₃ sobre la expresión relativa de LOX 2 y PDF 1.2	44
Figura 10. Expresión Relativa del gen PR1 frente a diferentes concentraciones de calcio y la aplicación de un bloqueador de calcio	46

INCICE DE ANEXOS

Anexo 1. ANOVA para medicipon de calcio en tejido foliar	65
Anexo 2.Prueba de Tukey para medicion de calcio en tejido foliar	66
Anexo 3. Datos obtenidos para la expresión de PDF1.2	66
Anexo 4. Datos obtenidos para la expresión de LOX2.....	67
Anexo 5. Datos obtenidos para la expresión de PR1	67

INTRODUCCIÓN

1.1 Calcio y nutrición vegetal

Los nutrientes son elementos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas. Para que un elemento se considere esencial, la ausencia del mismo debe impedir que esta complete el ciclo de vida normal o si este es parte importante de un constituyente o metabolito de la planta, siendo este único e imposible de reemplazar por completo por otro elemento (Marshner, 1995). Los nutrientes requeridos por las plantas se clasifican en dos grandes grupos que son los macro y micronutrientes; estos se diferencian entre sí principalmente en la cantidad en la que son requeridos por las plantas. Los macronutrientes son requeridos en mayores cantidades e incluyen el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre, magnesio, carbono, oxígeno e hidrógeno. Los micronutrientes son requeridos en dosis pequeñas e incluyen el hierro, boro, cloro, manganeso, zinc, cobre, molibdeno y níquel (Barker & Pilbeam, 2006).

Estos nutrientes se encuentran en el suelo como sales y son absorbidos como iones por las plantas. Debido a que los macronutrientes son consumidos en mayor cantidad, estos constituyen la mayor parte de la biomasa en peso seco de las plantas; el hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, calcio y carbono representan más del 0.1 % de dicho peso, mientras que los micronutrientes representan menos del 0.01% (Barker & Pilbeam, 2006). Las altas cantidades de nutrientes como el calcio en los tejidos de la planta dan un indicio de su importancia para el desarrollo y correcto funcionamiento de la planta. El calcio es un catión divalente requerido para la formación de la estructura de la pared celular y las membranas, este produce uniones entre la matriz de pectina de la pared celular manteniendo así la integridad celular; es un contra-ión para aniones orgánicos e inorgánicos en la vacuola y además sirve como segundo mensajero intracelular en el citosol de la célula (White & Broadley, 2003). Un nivel apropiado de calcio estimula el correcto desarrollo del sistema radicular, así como el desarrollo de las

hojas donde generalmente se acumula el mismo. Por lo mismo, la falta de calcio en las plantas puede resultar en varias afecciones como la muerte prematura de estructuras en crecimiento, la curvatura de las hojas, el apacamiento de las mismas, el desprendimiento prematuro de flores y capullos, tallos débiles, e incluso una disminución en la capacidad de defenderse frente al ataque de patógenos (Datnoff, Elmer, & Huber, 2007) (Eastwood, 2002).

Para cumplir todas estas funciones, el calcio se transporta a través de la xilema de la planta para llegar de las raíces al resto de la planta ya sea por la vía de simplasto o apoplasto en su forma soluble comúnmente encontrada en el suelo como nitrato de calcio o cloruro de calcio. Para entrar a la célula de la planta, el calcio atraviesa canales iónicos permeables al calcio (Ca^{2+}) que se encuentran en la membrana plasmática. Las concentraciones de calcio dentro y fuera de la célula son altamente controladas ya que un exceso en la concentración de calcio en el citosol puede resultar citotóxico (Sanders, Pelloux, Brownlee, & Harper, 2002). En una célula no estimulada se mantiene concentraciones menores a micromoles gracias a enzimas como ATPAsas sensibles a Ca^{2+} y enzimas antiportadoras de H^+ / Ca^{2+} que llevan el Ca^{2+} del citosol al apoplasto o a organelos intracelulares como las vacuolas o el retículo endoplasmático (RE) de ser necesario para mantener el metabolismo citoplasmático (White & Broadley, 2003). Desde hace años, se ha descrito ampliamente la relación estrecha que existe entre el calcio y la defensa de las plantas, por lo que a continuación se expondrá una explicación general acerca de la defensa en plantas para luego describir su relación con el calcio.

1.2 Defensa contra patógenos en plantas

En la naturaleza las plantas están constantemente expuestas al ataque de patógenos y plagas que incluyen bacterias, hongos, virus, oomicetos, nemátodos, insectos herbívoros, etc. Según su estilo de vida, los patógenos se clasifican en biótrofos y necrótrofos. Los patógenos necrótrofos destruyen las células del hospedero gracias a la producción de fitotoxinas y luego se alimentan de su contenido, por otro lado, los biótrofos obtienen los nutrientes de células

vivas a través de estructuras especializadas para alimentación que no destruyen las células de del hospedero. Varios patógenos presentan ambos a lo largo de su ciclo de vida y estos se conocen como hemibiotrofos (Corné, León, Van der Ent, & Van Wees, 2009). Debido a esto, las plantas han desarrollado un sistema basado en barreras estructurales y metabolitos antimicrobianos que les permitan prevenir o atenuar estos ataques. La primera línea de defensa se activa tras la invasión del patógeno ya que se reconocen estructuras de los mismos como flagelina, quitina, glicoproteínas, lipopolisacaridos que son conocidos como PAMPs (pathogen associated molecular patterns) por sus siglas en inglés que desencadenan una cascada de señales que terminan en la activación de la resistencia basal. La segunda línea de ataque se activa gracias a las moléculas efectoras de los patógenos que entran en la célula hospedera evitando la primera línea de defensa constituyendo así una gran y compleja red de defensa (Nürnberg & Kemmerling, 2009).

Estas redes de defensa que traducen las señales producidas por el patógeno en la activación de la defensa del hospedero, están reguladas por fitohormonas que son sintetizadas dependiendo del tipo de invasor y se divide en dos grandes grupos que son la SAR (systemic acquired resistance) e ISR (resistencia sistémica inducida) (De Vos, 2005). La resistencia sistémica adquirida SAR (systemic acquired resistance) por sus siglas en inglés es de larga duración, de amplio espectro y se caracteriza por que se encuentra asociada a un incremento en la acumulación de la hormona Ácido Salicílico (AS) lo que indica que su activación se encuentra regulada por rutas asociadas a la misma. Una vez activada en el sitio de la infección, la señal generada viaja a tejidos lejanos de la planta para activar la defensa en ellos también y se encarga del control de patógenos biotrofos y hemibiotrofos. Por otro lado, la resistencia sistémica inducida (ISR) por sus siglas en inglés se activa gracias a la presencia de estructuras similares a los PAMPs presentes en los microorganismos benéficos del suelo que son reconocidas por la planta, se encuentra regulada por rutas asociadas a las hormonas Ácido Jasmónico (AJ)

y Etileno (ET) y se encarga del control de patógenos necrótrofos (Corné, León, Van der Ent, & Van Wees, 2009) (Gamalero & Glick, 2012).

1.2.1 Rutas moleculares de los genes de defensa.

Como se mencionó anteriormente, las hormonas como el Ácido Salicílico (AS), Ácido Jasmónico,(AJ) y el Etileno (ET) tienen un rol fundamental para defensa. El AS está relacionado con la activación de la defensa contra patógenos biótrosos y hemibiotrosos mientras que JA y ET están involucrados en la defensa contra patógenos necrótrofos e insectos herbívoros. Sin embargo, existen varias señales generadas para activar una defensa efectiva a partir de estas hormonas. (Gamalero & Glick, 2012).

1.2.1.1 Ruta de Ácido Salicílico (AS)

Por un lado, la acumulación de AS en los tejidos resulta en la inducción de genes relacionados a patogénesis (PR). Estos son un grupo específico de genes que codifican proteínas con actividad antimicrobiana y por lo tanto potencian la resistencia a un amplio espectro de patógenos (van Loon, Rep, & Pieterse, 2006). Para que se dé la activación de los genes PR1, el AS provoca un cambio en el potencial de reducción de la célula que resulta en la deoligomerización del regulador NPR1 (Non.Expressor of PR gene 1). Este se transforma a su forma monomérica activa que viaja al núcleo donde actúa como un co-activador transcripcional de los factores TGA.

1.2.1.2 Ruta de Ácido Jasmónico (AJ)

Por otro lado, la cascada de señales generada por la acumulación del AJ inicia promoviendo la unión de su forma activa, la isoleucina JA (JA-Ile) a la proteína COI1(Coronatine Insensitive 1) del complejo ***SCF^{COI1}***. Esta unión permite que el complejo ***SCF^{COI1}*** se una a las a proteínas JAZ (jasmonate zim-domain) que se encuentran reprimiendo el factor de trascrición MYC2. Una vez que el complejo JA-Ile-***SCF^{COI1}*** se une a las proteínas

JAZ, estas son ubiquitinadas y posteriormente degradadas en el proteosoma 26S . Esto libera a MYC2 y permite la expresión de genes como *PDF1.2*, que codifica para defensinas con actividad antibiótica que ayudan con el control de patógenos necrótrofos, VSP2 que tiene actividad insecticida o *LOX2* que permite la biosíntesis/ acumulación de AJ. Otros factores de transcripción activados en esta cascada de reacciones son ERF1 y ORA59 (Corné, León, Van der Ent, & Van Wees, 2009) (Loake & Grant, 2007).

1.2.1.3 Ruta del Etileno (ET)

Finalmente, en la ruta mediada por ET, este es percibido por el receptor de membrana ETR1. En la ausencia de ET, el receptor ETR1 se encuentra unido al regulador negativo CTR1 que inhibe la regulación positiva de EIN2. En presencia de ET, se inhibe la regulación negativa de CTR1 permitiendo la regulación positiva de EIN2 y la activación de otros reguladores positivos como EIN3. EIN3 se vuelve activo ya que se inhibe su degradación por parte de la E3 ubiquitina ligasa *SCF^{EBF1/2}* dependiente del proteosoma 26S. El regulador EIN3 activa factores de transcripción como ERF1 que permite la expresión de genes como *PDF1.2* detallado anteriormente (Corné, León, Van der Ent, & Van Wees, 2009).

1.2.1.4 Interacción entre rutas de AS, AJ y ET

Como se observa, las diferentes rutas pertenecientes a las tres hormonas pueden interactuar entre sí. Por lo general, la interacción entre las rutas de AJ y ET es sinérgica como en el caso del gen *PDF1.2* que como se mencionó anteriormente se activa gracias a los factores de transcripción ERF1 y ORA59 pertenecientes a ambas rutas (Bari & Jones, 2009). Al contrario, la interacción entre las rutas de AJ y AS es por lo general antagónica (Wei, y otros, 2014). Se han realizado estudios en *Arabidopsis* que demuestran que la proteína NPR1 juega un rol fundamental en la interacción entre estas dos rutas, ya que en mutantes *npr1-1* no se observó el efecto antagónico de AS sobre los genes *PDF1.2* ni *VSP2* relacionados a la ruta del AJ (León-Reyes, y otros, 2009) (El Oirdi, y otros, 2011). Se han identificado varias moléculas que

interactúan en la señalización e interacción de ambas rutas cuya relación se ha demostrado con mutantes en los cuales se observa un efecto contrastante en la activación de la señalización de una u otra ruta. Se observan también cambios en la susceptibilidad ya sea a patógenos biotrofos o necrótrofos. Nuevos estudios han demostrado que el efecto antagónico que el AS tiene sobre la ruta del AJ radica en la supresión de la acumulación de la proteína ORA59 posiblemente por la de la estimulación de su degradación por parte del proteosoma (Van der Does, y otros, 2013).

1.3 Calcio e inmunidad en plantas

Como se mencionó anteriormente, parte de las funciones que cumple el calcio dentro de la planta está relacionado a la defensa contra patógenos, al formar parte de las cascadas de señales que desencadenan la expresión de genes de defensa. Para cumplir esta y varias otras de sus funciones, el flujo de calcio se da rápidamente a través de los canales catiónicos en la membrana plasmática, el tonoplasto o el RE provocando cambios en la concentración citoplasmática de Ca^{2+} que inician la respuesta celular frente a estímulos del ambiente (Sanders, Pelloux, Brownlee, & Harper, 2002). Para que el calcio pueda ser percibido dentro de la célula, y la señal generada por el mismo sea traducida en la célula, existen varias proteínas que cambian su conformación o actividad catalítica al unirse al Ca^{2+} como la calmodulina (CaM), proteínas como calcineurina B (CBLs) y proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) que por su función son referidas como sensores de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} . Se conoce que las diferentes concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma se presentan de forma específica dependiendo del estímulo que las provoca, ya sea este biótico o abiótico y de igual forma estas señales son traducidas por sensores específicos. Estos cambios percibidos y traducidos por sensores específicos provocan alteraciones en el metabolismo de la planta (White & Broadley, 2003). Para el presente estudio, la importancia de estos cambios radica cuando estas señales son provocadas por agentes bióticos del ambiente y como estas se

traducen en señales de defensa para eliminar, aminorar o evitar el ataque de estos agentes bióticos activando genes específicos.

Thor y Pieter (2014) realizaron un estudio utilizando plantas transgénicas que expresan proteínas fluorescentes sensibles al calcio analizando las células estomáticas diferenciando el calcio presente en células individuales. Se demostró que la flagelina 22 induce picos citoplasmáticos de calcio que duran 30 minutos. Al comparar este estudio con el realizado por Oldroyd (2013) se determinó que existe una diferencia en los picos de calcio celulares que se generan como respuesta a PAMPs y los generados como respuesta a organismos simbióticos. Se determinó las principales diferencias incluyen que el tiempo que tarda en darse el pico luego de la exposición a la molécula inductora en simbiosis tarda 10 minutos más. Los picos generados por simbiosis son más regulares y se mantiene por un periodo más largo de tiempo (hasta 4 horas). La diferencia principal es que los picos generados por simbiosis se localizan alrededor del núcleo mientras que los picos de calcio como respuesta a la flagelina 22 se generan en el citoplasma.

La información que se posee actualmente acerca de este tema, proviene de varios estudios realizados para elucidar las variadas y amplias rutas que llevan a la expresión de genes de defensa. La mayor parte de estos estudios se han realizado en *Arabidopsis thaliana* utilizando mutantes con los genes o proteínas de interés modificados y realizando un análisis posterior de la expresión de los genes en estudio.

1.4 *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo

Arabidopsis thaliana es una planta originaria de Euroasia y África, angiosperma y pertenece a la familia *Brassicaceae*. Su flor posee cuatro sépalos y pétalos dispuestos en cruz que se presenta en racimo y el fruto que alberga las semillas se conoce como silicua. La forma de sus hojas es elíptica y ovalada con bordes enteros. Por lo general es considerada una mala hierba inofensiva (Meyerowitz & Pruitt, 2014). Esta planta ha sido ampliamente utilizada en

estudios moleculares como un organismo modelo en reemplazo de los cultivos convencionales que tardan largos periodos para su desarrollo completo y que ocupan mucho espacio. *A thaliana* es un organismo pequeño y de fácil desarrollo que no requiere condiciones especiales de humedad, temperatura, pH, etc. (Koornneef & Meinke, 2010). Es un organismo diploide con solo cinco cromosomas en los que la mayoría de genes tienen una sola copia. Su genoma completo tiene 135 Mb y se encuentra totalmente secuenciado y en bases de datos que permite la validación de resultados (Jun Cao, 2011). En los últimos años, varios genes clave de las rutas de AS, AJ y ET se han identificado en *Arabidopsis* como los genes PR. Si bien es conocido que los patrones de expresión génica son diferentes para cada especie, en la mayoría de dicotiledóneas, los genes como PR-1, PR-2 y PR-5 son inducidos por una fuente externa de AS o alguno de sus derivados y se potencia la resistencia contra patógenos biótropos. De igual manera que AJ y ET co-regulan la expresión de genes como PR-3, PR-4 y PDF1.2 (Li-Na, Guo-Xing, Rui-Ying, Jun, & Yang, 2016).

1.5 Estudios de expresión génica

Para comprender los patrones de expresión de genes en un organismo se realizan estudios de cuantificación de los niveles de expresión de genes bajo una condición específica. Para esto, las técnicas de cuantificación se basan en la cantidad ARNm de una secuencia específica presente en una muestra biológica en un momento específico (Roth, 2002). Las técnicas de cuantificación han resultado una herramienta importante para entender las redes de regulación de genes. La técnica más usada es la PCR cuantitativa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR) por su sensibilidad, reproducibilidad y alto rango de cuantificación. Esta técnica se usa para cuantificar los niveles relativos de expresión basándose en la normalización con un gen de referencia cuya expresión es altamente estable y permite determinar los niveles de expresión basales (Guénin, y otros, 2009). Para la normalización del método, comúnmente se utilizan genes como ACTINA, TUBULINA, 3-FOSFATO-

GLICERALDEHIDO DEHIDROGENASA y UBIQUITINA que cumplen un rol fundamental en el funcionamiento celular y se conocen como genes Housekeeping (HKGs) por lo que se espera que su expresión sea estable en todos los tejidos (Dekkers, y otros, 2012). Estudios han demostrado que en tejidos de *A.thaliana* el gen UBQ10 parece ser uno de los estables entre un grupo de genes normalizadores para todos los tejidos excepto semillas (Czechowski, Stitt, Altmann, Udvardi, & Scheible, 2005). Teniendo el método normalizado, los niveles de expresión relativos se determinan con el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001).

JUSTIFICACIÓN

La interacción entre las plantas y el ambiente a su alrededor y un correcto balance de nutrientes es de vital importancia para su correcto desarrollo. Desde hace más de 10 000 años, desde el inicio del campo de la agricultura, la humanidad se ha enfrentado al gran problema que representan fitopatógenos que forman parte de la microbiota natural del suelo sobre los cultivos (Oerke, 2006). Existen alrededor de 300000 especies de plantas utilizadas para la alimentación humana y todas estas son atacadas por patógenos y herbívoros constantemente que disminuyen su rendimiento. Los ataques son causados mayoritariamente por hongos y bacterias patógenos (De Vos, y otros, 2005). En el caso de los cultivos la coevolución entre patógenos y plantas estaba dirigida principalmente por la adaptación de los patógenos a pequeños grupos de plantas en un estadio fisiológico y características en común. Sin embargo, con el aumento de la agricultura masiva y la producción de monocultivos esta coevolución se ha redirigido al ataque masivo y epidemias a agroecosistemas más vulnerables por la falta de variabilidad de los cultivos y la rápida evolución de los patógenos a fenotipos cada vez más agresivos y específicos (Zhan, Thrall, & Burdon, 2014). Se ha reportado hasta el 2019 que los ataques por patógenos causan una pérdida del 21,5% de la producción mundial de trigo, 30 % del arroz, 22,6 % de maíz, 17,2% de papa y 21,4% de soya (Savary, y otros, 2019)

Actualmente el uso de pesticidas y fertilizantes químicos es una de la solución más utilizadas en contra de los patógenos. Sin embargo, esta solución, al ser empleada de forma excesiva puede perjudicar tanto el suelo como el medio ambiente. Nuevas técnicas se han enfocado en el entendimiento de las interacciones entre las plantas y los patógenos para desarrollar estrategias que eviten el brote de epidemias en cultivos de alta escala (Guangyou, Nils, Jens, Dirk, & Oliver, 2013). Conociendo que una nutrición adecuada en plantas juega un rol fundamental en la defensa contra patógenos (Datnoff, Elmer, & Huber, 2007), y el entender los mecanismos moleculares detrás de la defensa inducida en plantas, puede llevar a la

aplicación en conjunto de estos conocimientos para optimizar los niveles de nutrientes adecuados a ser suministrados para permitir la estimulación de la defensa natural de las plantas. Al estimular una defensa natural de las plantas se disminuirá la necesidad de utilizar grandes cantidades de agro químicos, lo que resultará en una mejor calidad del suelo y reducirá su impacto ambiental (Sarfraz et al ., 2009).

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar la expresión de genes de defensa dependientes de Ácido Jasmónico, Ácido Salicílico y Etileno en *Arabidopsis thaliana* frente diferentes concentraciones de calcio e inhibidores de calcio mediante qPCR

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la expresión de los genes de defensa *LOX2, PR1 Y PDF 1.2* en la línea Col-0 de *Arabidopsis thaliana* al suministrar medio *Murashige* y *Skoog* (MS) estándar, medio MS con alta concentración de calcio (5x) y MS sin calcio
- Determinar la concentración de calcio presente en los tejidos foliares de las plantas de *Arabidopsis thaliana* posterior a la aplicación de los tratamientos establecidos.
- Comparar la expresión de los genes de defensa *LOX2, PR1 Y PDF 1.2* al utilizar bloqueadores de calcio como EGTA y *La Cl₃* en la línea Col-0 de *Arabidopsis thaliana* con su expresión frente a diferentes concentraciones de calcio y su expresión basal.

ÁREA DE ESTUDIO

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas pertenecen al ecotipo silvestre Columbia 0. Las mismas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Agrobiotecnología y Biotecnología de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito. Los análisis moleculares se realizaron en las instalaciones del mencionado laboratorio en colaboración con el Laboratorio de la Universidad de Utrecht en Holanda. Por otro lado, la siembra, cultivo y ensayos se realizaron en el invernadero del laboratorio. Los análisis que requirieron de equipo especializado como ICP-MS fueron realizados en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito.

MATERIALES

5.1 Cultivo de *Arabidopsis thaliana* y almacenamiento

- Semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0
- Arena de río lavada y esterilizada (sustrato)
- Conductímetro
- Medio de cultivo Hoagland
- Agua destilada
- Vasos de plástico 3 onz
- Envases de plástico
- Bandejas de plástico
- Jeringuillas 10 ml (Megar)
- Nitrógeno líquido
- Papel Aluminio

5.2 Soluciones para tratamientos

- Medio MS 0 mM de calcio
- Medio MS 3mM de calcio
- Medio Ms 15mM de calcio
- Metil Jasmonato (MeJA) 95% (Sigma Aldrich)
- Tween-20
- Etanol 96%
- $LaCl_3$ (MP Biomedicals)
- EGTA (MP Biomedicals)

5.3 Cuantificación de Calcio en Tejido Foliar

- Liofilizador (ilShinBioBase)
- Pioneer™ Balanza analítica (OHAUSE)
- Pistilos de plástico
- Ácido nítrico HNO_3 0.37 N
- Peróxido de Hidrogeno 95%
- Agua desionizada tipo 1
- Filtros 0.45 μm
- Plancha de calentamiento
- Jeringuillas 10 ml (Megar)
- iCAP 700 Series Espectrómetro de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (Thermo Scientific)
- Vibrador Ultrasonico (BRANSON)
- Tubos de ensayo plásticos
- Pipeta 100-1000 μl ()
- Puntas plásticas 100-1000 μl

5.4 Extracción de ARN total y cuantificación

- Nitrógeno líquido
- Mortero y pistilo
- Espátula
- Micropipetas
- Tubos Eppendorf de 2ml, 1,5ml y 0,6 ml
- Sea Star® Vortex Mixer (Heathrow Scientific)
- Centrifuga refrigerada (Sigma 1-14k)

- TRIzol Reagent (Invitrogen)
- Cloroformo
- Buffer 0.8 M citrate de sodio/1.2M NaCl
- Isopropanol
- Agua PCR
- Fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen)
- Qubit™ RNA XR Assay Kit (Invitrogen)
- Qubit™ RNA IQ Assay Kit (Invitrogen)
- TAE 1X
- SYBR Safe (Invitrogen)
- Agarosa (Bioline)
- Cámara de electroforesis Enduro™ Horizontal Electroforesis Unit (Labnet)
- Fotodocumentador Enduro™ GDS Gel Documentation System (Labnet)

5.5 RT-qPCR

5.5.1 Tratamiento con DNasa I y Transcripción reversa

- Tubos Eppendorf 0.2 ml
- DNase I (RNAase free) 2U/ μ l (Invitrogen)
- 10X DNase I Buffer
- EDTA 25 mM (Invitrogen)
- Oligo(*dTs*)₁₅ Primer (Promega)
- GoScript™ 5X Reaction Buffer (Promega)
- GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega)
- PCR Nucleotide Mix (Promega)
- Agua PCR

- Termociclador Labnet TC020-24 MultiGene™ Mini

5.5.2 Ensayos qPCR

- SsoFast™ Eva Green® Supermix (Biorad)
- Agua PCR
- Primers 10 μ M (Tabla 1)
- Termociclador Techne PrimeQ Real-time PCR System

Tabla 1. Primers de A.thaliana utilizados para qPCR

Locus	Gen	Primers
AT5G44420	<i>PDF1.2</i>	Forward:CGAGAAGCCAAGTGGGACAT Reverse: TCCATGTTTGGCTCCTCAA
<i>AT2G14610</i>	<i>PR1</i>	Forward:CTCGGAGCTACGCAGAACAAC Reverse:TTCTCGCTAACCCACATGTTCA
AT3G45140	<i>LOX 2</i>	Forward: CGGAACATAGGCCACGGAGA Reverse: TGAGGTGACCCATGCAATCG
AT4G05320	<i>UBI 10</i>	Forward:GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAG Reverse:AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT

MÉTODOS

6.1 Siembra y cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Para el cultivo de *A.thaliana* se utilizó arena obtenida de un río ubicado al sur de Santo Domingo de los Tsachilas como sustrato. La arena recolectada se pasó por un tamiz para eliminar objetos de gran tamaño. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con agua potable y finalmente se realizaron lavados con agua destilada, se midió la conductividad de la arena y se continuaron los lavados con agua destilada hasta que la conductividad de la misma fue menor a $500\mu\text{S}/\text{cm}$, indicando que se han eliminado los minerales presentes en la arena a un nivel insignificante. Posteriormente, se colocó la arena en un vaso plástico de 90 cm^3 con huecos en la base para permitir la absorción de agua y nutrientes. Se colocaron las semillas en la arena y se regaron con medio Hoagland, se tapó el vaso con plástico. Se regó periódicamente los brotes con agua destilada y medio Hoagland durante dos semanas y se realizaron pequeños orificios en el plástico cobertor cada dos días. Una vez que las plántulas desarrollaron dos hojas verdaderas, se trasplantó cada una de ellas a un vaso de plástico individual con el mismo sustrato. Se cultivaron 120 plantas durante seis semanas en el invernadero del Laboratorio de Agrobiotecnología y Biotecnología de Alimentos de la USFQ con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, utilizando focos led. Las plantas se cultivaron a condiciones ambientales y se regaron dos veces a la semana con 10 ml de agua destilada y una vez a la semana con 15 ml de medio Hoagland.

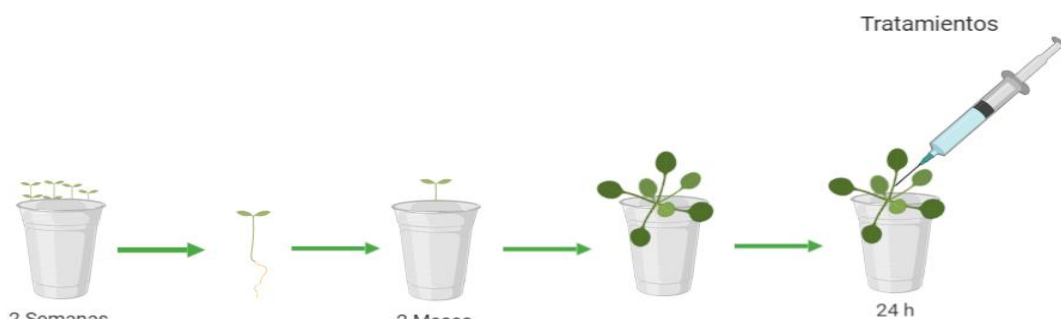


Figura 1. Esquema del cultivo de *A.thaliana* empleado para el estudio desde las etapas de brotes, plántulas hasta planta adulta

6.2 Aplicación de tratamientos elicitors de defensa y bloqueadores de calcio.

6.2.1 Bloqueadores de Calcio

Se realizó un primer ensayo en el cual, de 100 plantas cultivadas se seleccionaron 54 plantas que presenten un tamaño heterogéneo entre ellas. Estas se dividieron en tres grupos cada uno con 18 plantas, cada grupo se trató con medio MS normal (calcio 3Mm), MS deficiente de calcio (calcio 0mM), y MS con exceso de calcio (calcio 15 mM) respectivamente. Dentro de cada grupo, las 18 plantas se dividieron en tres grupos de 6 plantas cada uno que fueron tratadas con H₂O, LaCl₃ (10μM) (Ramirez, y otros, 2012) y EGTA (100mM) respectivamente para determinar el mejor bloqueador de calcio entre LaCl₃ y EGTA. Los bloqueadores de calcio se aplicaron 24 h antes de la aplicación del medio MS.

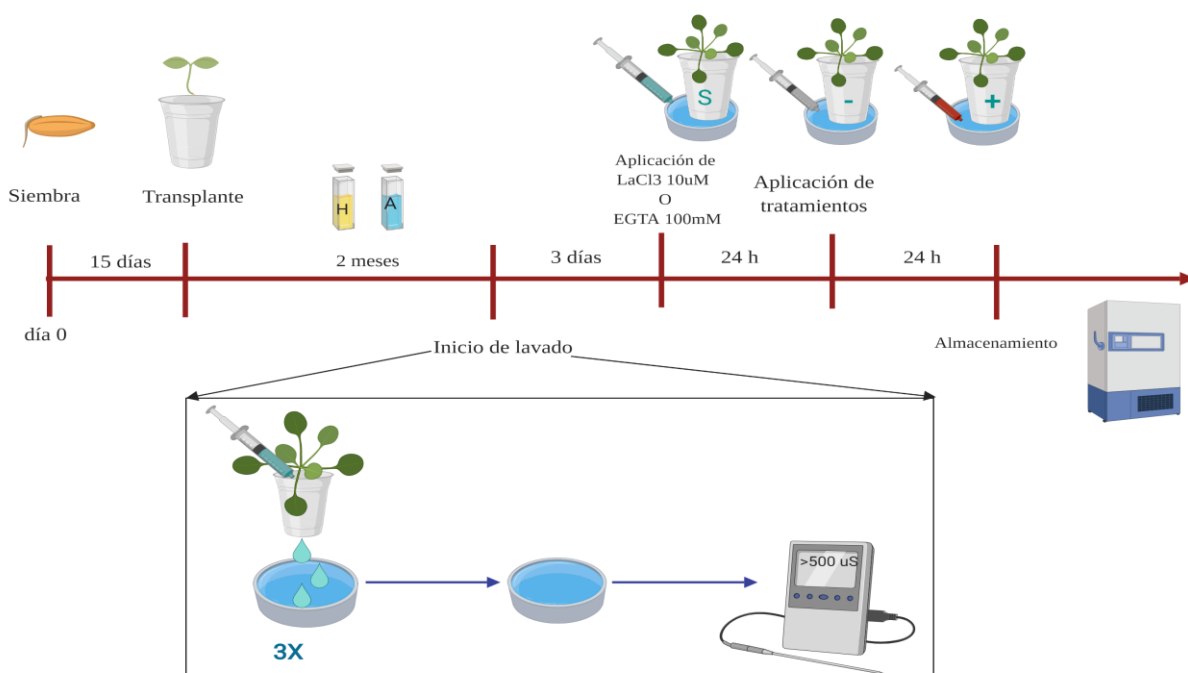


Figura 2. Esquema de la línea de tiempo experimental empleada para determinar el mejor bloqueador de calcio. Cultivo de plantas, lavado de nutrientes, aplicación de bloqueadores, aplicación de tratamientos y almacenamiento

6.2.2 Elicitor de defensa y bloqueador de calcio

Se cultivaron 120 plantas de las cuales se seleccionaron 96 plantas que presenten un tamaño heterogéneo entre ellas. De estas, se seleccionaron 72 plantas y se dividieron en tres grupos cada uno con 24 plantas, cada grupo se trató con medio MS normal (calcio 3Mm), MS deficiente de calcio (calcio 0mM), y MS con exceso de calcio (calcio 15 mM) respectivamente. Dentro de cada grupo, las 24 plantas se dividieron en tres grupos de 6 plantas cada uno que fueron tratadas con H₂O, LaCl₃ (10μM) (Ramirez, y otros, 2012) , MeJA (100 μM) (Venegas, 2013) y , LaCl₃ (10μM) + MeJA (100 μM) respectivamente. El bloqueador de calcio se aplicó 24 h antes de aplicar el elicitor de defensa y medio MS respectivo a cada grupo. El elicitor de defensa fue aplicado por inmersión de las plantas en la solución antes de aplicar el medio MS respectivo a cada grupo.

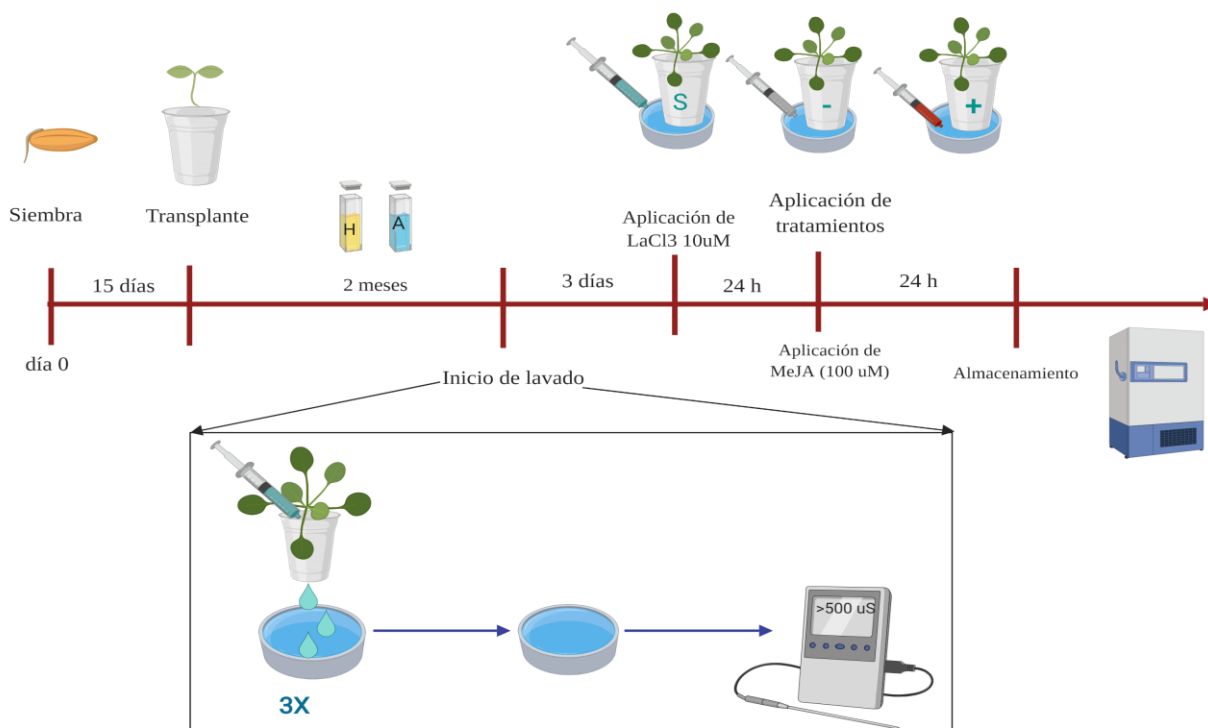


Figura 3. Esquema de la línea temporal experimental empleada para la aplicación del elicitor de defensa y bloqueador de calcio. Cultivo de plantas, lavado de nutrientes, aplicación de bloqueador y elicitor, aplicación de tratamientos y almacenamiento

6.2.3 Preparación de soluciones bloqueadoras de calcio

Solución de Cloruro de Lantano 10 μ M

Conociendo el peso molecular de $LaCl_3 + 6H_2O$ (371,4 gr/mol), se realizaron 200 ml de solución $LaCl_3$ 1mM diluyendo 0.074gr de $LaCl_3 + 6H_2O$ (MP Biomediclas) sólido en 200 ml de agua destilada. A partir de esta se prepararon 500 ml de solución $LaCl_3$ 10 μ M aforando 5 ml de la solución 1mM a 500 ml con agua destilada.

Solución de Ethylene Glycol Tetraacetic Acid 100 mM

Conociendo el peso molecular del Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA) (380.35 gr/mol), se realizaron 300 ml de solución 100 Mm, diluyendo 11,41 gr de EGTA en 300ml de agua destilada.

Solución de Metiljasmonato (MeJA) 100 μ M

Se disolvieron 2.3 μ l de Metiljasmonato (MeJA) 95% (Sigma Aldrich) en 9.7 μ l de etanol al 96% y se disolvió lo anterior en 100 ml de agua destilada con Tween-20 al 0.01%.

6.3 Cosecha y almacenamiento

Una vez transcurridas las seis semanas de cultivo en invernadero se cosecharon las plantas. Para los análisis de expresión relativa de genes, se cortaron 3 pares de hojas opuestas de la roseta de cada planta y se colocaron en papel aluminio para ser congeladas de inmediato con nitrógeno líquido deteniendo su metabolismo y se almacenaron a $-80^{\circ}C$. Las 6 hojas de cada una de las 96 plantas utilizadas en los ensayos se almacenaron en menos de 25 minutos. Para el análisis de la concentración de calcio en tejido foliar, se cortaron dos pares de hojas opuestas de la roseta de cada planta, se pesaron y almacenaron a $-80^{\circ}C$.

6.4 Medición de calcio en tejido foliar

Se determinó la concentración total de calcio en 4 hojas de cada planta (dos pares opuestos) mediante un Espectómetro de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (Thermo

Scientific). Cada tratamiento se analizó por duplicado. Se realizó una digestión previa a la medición según lo descrito en Barraza, et al (2017) para tejido foliar. Se secaron las hojas en un Liofilizador (ilShinBioBase) durante 24 h, se pesaron y trituraron. Teniendo un rango de peso de entre 200-400mg en las muestras, se agregaron 4 ml de HNO_3 0.37 N, 1ml de peróxido de hidrógeno y se dejaron toda la noche en una planta de calentamiento a $70^\circ C$ para permitir que se evapore el ácido. Se restituyó la capa de minerales formada en 500 μl de HNO_3 0.37 N y se mezcló durante 15 minutos en un Vibrador Ultrasónico (BRANSON). Se agregaron 19.5 ml de agua desionizada tipo 1 y se mezcló en el Vibrador Ultrasónico por 15 minutos más. Se tomó 1 gr de la solución anterior y se aforó a 10 gr en una balanza analítica (OHAUSE) para tener una dilución 10^{-1} que se encuentre dentro del rango de la curva de calibración previamente establecida por el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la USFQ para calcio que tiene un rango de 0.1-10 ppm.

6.4.1 Análisis de resultados

Se obtuvieron datos por triplicado de cada muestra (dos muestras por tratamiento). Por lo tanto, se obtuvieron las medias de cada muestra y con esto se realizó un análisis de ANOVA de un factor para determinar diferencias entre las medias de cada tratamiento (α 0.05) con el Software Estadístico Minitab 17.

6.5 Estudios de expresión génica

6.5.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó utilizando el método de TRIzol (Kamphuis, Hane, Nelson, Gao, & Atkins, 2015) propuesto para tejidos de *Lupinus angustifolius*, estandarizado para *Arabidopsis*. Se molieron las muestras con nitrógeno líquido y se tomaron 150 mg para trasvasar a un tubo Eppendorf de 2ml. Posteriormente se agregó 1ml de TRIzol (Invitrogen) y 200 μl de cloroformo lo anterior se homogenizó en un vortex durante 1 minuto. Se incubaron

las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a una temperatura de 4°C.

Se recolectó el sobrenadante en un tubo de 1,5 ml y se agregaron 200 µl de cloroformo, nuevamente se centrifugó la muestra a 12000 g y 4°C por 15 minutos. Se obtuvo el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf y se agregó 300 µl de buffer de precipitación salino (0.8 M citrato de sodio/1.2 M NaCl) y 300 µl de alcohol isopropílico. Se dejó incubar la muestra a -20 °C durante 30 minutos para permitir la precipitación del ARN y la muestra se centrifugó a 12000g y 4°C por 10 minutos para recolectarlo. El pellet obtenido se lavó con etanol 75% dos veces y se dejó secar por 12 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50 µl de agua PCR y se midió la concentración de ARN con el fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen).

6.5.2 Síntesis de cDNA

6.5.2.1 Tratamiento de DNAasa

Se utilizó el kit Ambion™ DNase I (Invitrogen), la digestión con DNase I realizó se siguieron las instrucciones del fabricante. El volumen final de la reacción fue de 10µl con 1µg de ARN, 1 µl de Buffer 10X, 0,5 µl de DNase 2U/µl y agua PCR que se colocaron en un tubo de 0.2 µl. La reacción se llevó acabo en un termociclador, donde se incubó la mezcla a 37°C por 15 min y se agregó 1 µl de EDTA para luego calentarlo a 65°C por 10 minutos.

6.5.2.2 Transcripción reversa

Se siguieron las instrucciones del fabricante del kit utilizado Go Script™ Reverse Transcription (Promega) para la transcripción reversa. Se tomaron los 11 µl de ARN libre de ADN y se agregó 1 µl de Primer oligo(*dT*)₁₅ y 1µl de dNnTPs y se incubó a 70°C por 5 minutos y a 4°C por 5 minutos en un termociclador. Posteriormente se agregó 7 µl de master mix con 4 µl de Reaction Buffer 5X, 1 µl de DTT 100 mM, 0.75 µl de Super Script Reverse Transcriptase (Promega) y 1.25 µl de agua PCR por reacción individual. Finalmente se incubó a 50°C por una hora, seguido de 15 minutos a 55°C y 15 minutos a 70 °C.

6.5.3 qRT-PCR

Cada reacción individual contiene un volumen final de 15 μ l con 1.5 μ l de cDNA, 0.45 μ l de Primer Forward UBI-10 10 μ M, 0.45 μ l de Primer Reverse UBI-10 10 μ M 7.5 μ l de 1X SsoFast™ EvaGreen® Supermix y agua PCR.

Las reacciones se realizaron en el equipo Techne Real-time PCR System (Prime Q) analizadas en el programa Quansoft versión 1.1.30. Cada muestra se analizó por duplicado para cada gen. El programa de PCR incluyó una desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos a 95°C por 15s, 55°C durante 30s y finalmente 72°C por 30s. Se realizó también un análisis de curvas de melting de 60-95°C

6.5.4 Análisis de resultados

Se realizó un análisis de expresión relativa de genes mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001) utilizando el gen UBI como gen normalizador y la muestra sometida a medio MS con 3mM de calcio, sin MeJA y sin $LaCl_3$ como control. Se analizaron las diferencias estadísticas entre los CT promedio de cada tratamiento con el control mediante la prueba t-student (α 0.05).

RESULTADOS

7.1 Siembra y cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Se sembraron las semillas de *A.thaliana* ecotipo Col-0 en un vaso de plástico con arena de río lavada con medio Hoagland como sustrato. Dos semanas después de la siembra se trasplantaron los brotes a vasos individuales. La Figura 1 muestra las plantas después de seis semanas de crecer en el invernadero del Laboratorio de Agrobiotecnología y Biotecnología de Alimentos de la USFQ, las plantas seleccionadas para el desarrollo del experimento muestran un tamaño y estadio homogéneos.



Figura 4. *Arabidopsis thaliana* seis semanas después de la siembra listas para iniciar lavado y posterior aplicación de tratamientos.

7.2 Estudios de Expresión Génica

7.2.1 Efecto de las diferentes concentraciones de calcio en la expresión de genes de defensa en *A.thaliana Col-O*

Se evaluó el efecto de la aplicación de medio MS con exceso de calcio (15mM) y de medio MS con deficiencia de calcio (0Mm) sobre la expresión de los genes *LOX2* y *PDF 1.2* comprando su expresión con un control tratado con una concentración estándar de calcio (3mM). Como control positivo se utilizó MeJA (100μM) (Venegas, 2013) que estimula la ruta de señalización del AJ (Turner, Ellis, & Devoto, 2002).

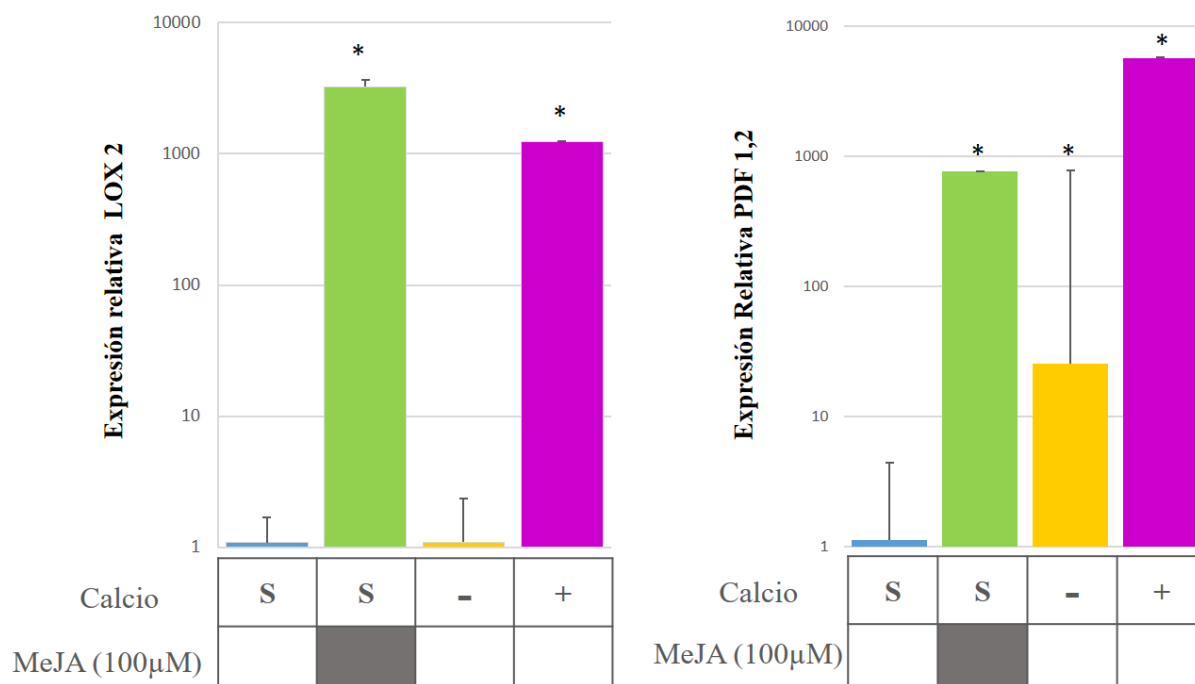


Figura 5. Expresión relativa de los genes *LOX2* y *PDF1.2* luego de la aplicación de calcio

Se usaron tres concentraciones de calcio: estándar 3mM (S), deficiencia 0mM (-), exceso 15mM (+) y la adición de metiljasmonato (MeJA) 100uM como control positivo de expresión. Las barras de errores representan 1 desviación estándar (n=2). *diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0,05$)

En la figura 2, las barras color azul representan el control interno tratado únicamente con agua y una concentración de calcio estándar (S). El control positivo se encuentra representado por el color verde, tratado con una concentración S de calcio y con MeJA (100 μ M). Se observa que la expresión de ambos genes es mayor a la del control al aplicar MeJA que es un elicitador de defensa. La barra de color morado representa el tratamiento con exceso de calcio (+), se observa que la expresión de ambos genes aumenta en relación al control al aplicar una dieta con exceso de calcio. En el caso de *LOX2*, el exceso de calcio aumenta la expresión del gen más de 1000 veces en relación al control. En el caso de *PDF1.2* la expresión aumenta 8000 veces más que el control, superando a la aplicación de MeJA. Finalmente, al aplicar una dieta deficiente en calcio (-), la expresión de ambos genes es menor que la expresión observada con la aplicación del exceso de calcio. En el caso de *LOX2* la expresión es igual a la del control bajo estas condiciones y en el caso de *PDF1.2* la expresión es 40 veces mayor al control, lo que comparado con el aumento generado por el exceso de calcio resulta despreciable a pesar de ser estadísticamente diferente al control.

Por lo tanto, el aplicar medio MS con exceso de calcio aumenta considerablemente la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* de la ruta del AJ. Al contrario, el aplicar una dieta deficiente en calcio no produce ningún efecto significativo en la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2*.

7.2.2 Concentración de calcio en tejido foliar

Para evaluar como los diferentes tratamientos: estándar 3mM (S), deficiencia 0mM (-), exceso 15mM (+) y la adición de metiljasmonato (MeJA) 100 μ M afectan la concentración de calcio en las hojas, se realizó la medición de calcio total en un ICP-SM para cada tratamiento utilizando un pull de 4 hojas por planta y se determinó la concentración de calcio en tejido seco

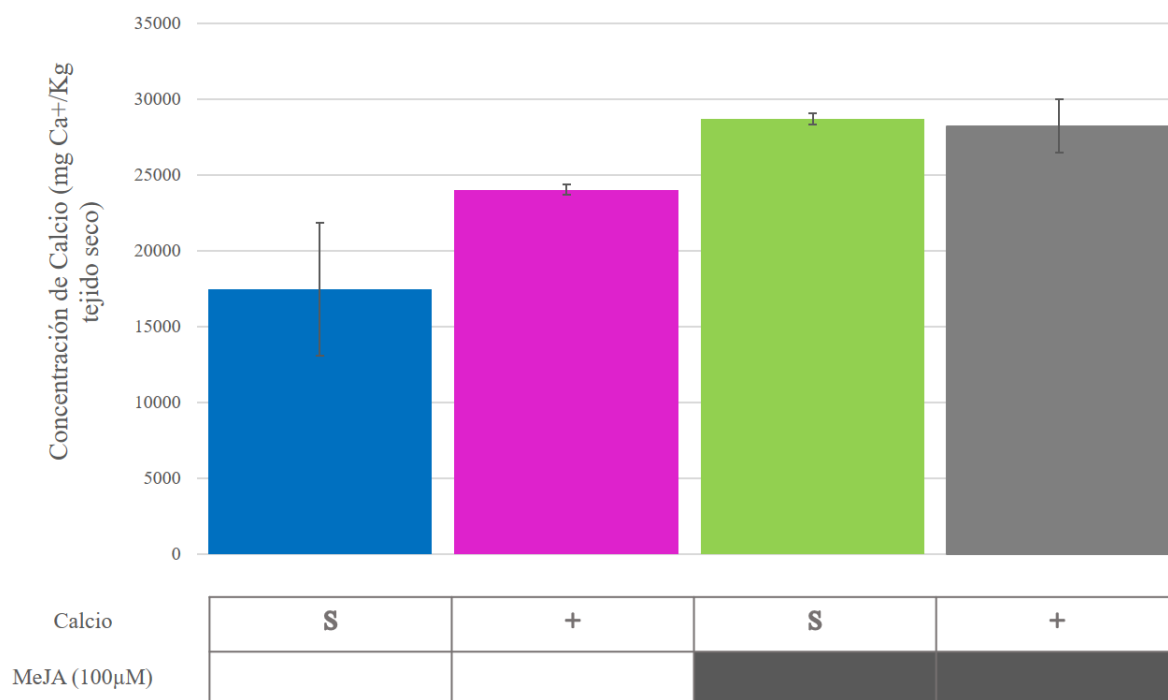


Figura 6. Determinación de la concentración de calcio total en hojas después de la aplicación de tratamientos con diferentes concentraciones de calcio

Se evaluó la concentración de calcio en tejido foliar para los tratamientos: estándar 3mM (S), exceso de calcio (+), estándar con aplicación de MeJA (100 µM) y exceso de calcio con aplicación de MeJA (100 µM). Las barras de error representan 1 desviación estándar (n=2). Un análisis de ANOVA ($\alpha=0.05$) demostró que no hay diferencias significativas entre las medias de los

Se realizó una digestión acida para liberar los minerales presentes. La concentración de calcio total se determinó con un Espectrómetro de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (Thermo Scientific) utilizando una curva de calibración de 0.1-10 ppm. La concentración final presente en la muestra se determinó con el factor de dilución de las muestras según la masa y volumen final de cada muestra.

Se determinó que aquellas muestras tratadas con medio MS una concentración estándar de calcio (3mM) poseen un rango de concentración de calcio de 17453.65 - 30676.69 mg Ca+/Kg tejido seco. Aquellas muestras tratadas con exceso de calcio (15mM) poseen un rango de 18510.58 – 32570,74 mg Ca+/Kg tejido seco. Finalmente, aquellas muestras tratadas con medio deficiente en calcio (0mM) poseen un rango de 25243.58 – 33998.23 mg Ca+/Kg tejido seco). Al realizar una prueba de ANOVA de un solo factor con un nivel de confianza de 95% en el cual se analizaron las medias de cada tratamiento, se determinó que no existen diferencias significativas de la concentración de calcio total en hojas entre tratamientos

Por lo tanto, las diferentes concentraciones de calcio aplicadas a través de la dieta durante 24h, ni la aplicación de MeJA influyen en la concentración de calcio total presente en los tejidos foliares.

7.2.3 Efecto del lavado en la expresión de genes de defensa en *A.thaliana Col-O*

Antes de aplicar los tratamientos con diferentes concentraciones de calcio, se realizó un lavado de las plantas para eliminar cualquier rasgo de nutrientes en el sustrato. Este paso adicional se realizó con el objetivo de determinar si el proceso de lavado es esencial para que se genere el efecto observado anteriormente al aplicar los tratamientos con concentración estándar (S), deficiente (-) y exceso (+) de calcio, en el cual el exceso de calcio aumenta la expresión de los genes *LOX 2* y *PDF1.2*. Se aplicaron los mismos tratamientos con concentraciones estándar (S), deficiente (-) y exceso (+) de calcio en plantas que no pasaron por el proceso de lavado y se realizó un análisis de la expresión de los genes mencionados.

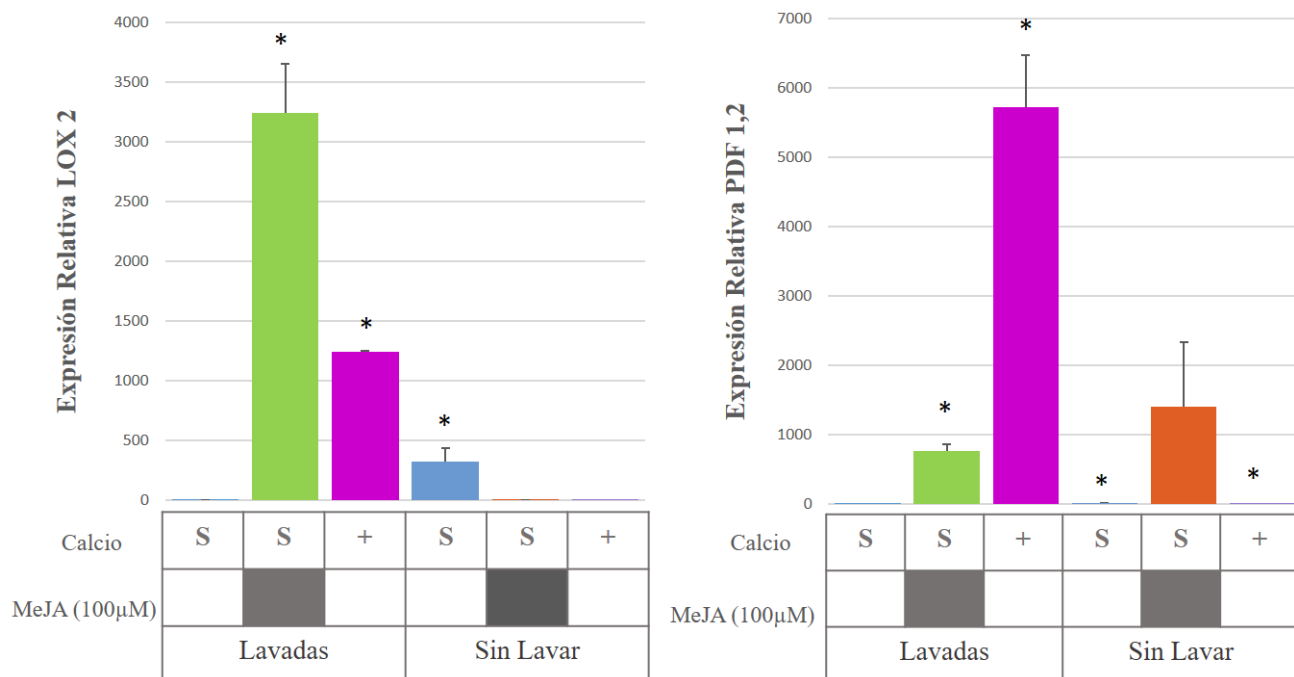


Figura 7. Expresión Relativa de los genes PDF1.2 y LOX 2 con y sin lavado

Se usaron dos concentraciones de calcio: estándar 3mM (S) y exceso 15mM (+) junto con la adición de metiljasmonato (MeJA) 100µM en dos grupos separados de plantas. El primer grupo pasó por el proceso de lavado y el segundo no. Las barras de error representan 1 desviación estándar (n=2). *diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0,05$)

En el gráfico anterior, las barras de color azul representan el control tratado únicamente con agua y medio MS con una concentración estándar de calcio (S) para las condiciones con y sin lavado. Para el gen *PDF 1.2* la expresión basal con y sin lavado es muy similar. Sin embargo, en el caso de *LOX2* la expresión basal del gen sin lavado es 300 veces mayor al control con lavado. En el caso de *PDF1.2* se observa que la expresión aumenta al aplicar el elicitor MeJA ya sea que las plantas sean lavadas o no a diferencia de *LOX2*. En este último, se observa que el no lavar reduce el efecto del elicitor. La expresión del gen en las plantas lavadas aumento 3200 veces que el control, mientras que en las plantas no lavadas la expresión

es similar a la del control. Las barras de color morado representan el tratamiento con exceso de calcio, se observa que con el lavado se reduce el efecto producido por el exceso de calcio. El gen *LOX2* aumenta su expresión 1200 veces más que el control en las plantas lavadas, mientras que en las plantas no lavadas la expresión es igual a la del control. El gen *PDF 1.2* aumenta su expresión 5600 veces más que el control con el exceso de calcio en las plantas lavadas, mientras que en las plantas no lavadas el aumento en la expresión de este gen es despreciable.

Por lo tanto, el proceso de lavado es indispensable para observar un efecto positivo en la expresión de los genes *LOX 2* y *PDF1.2* después de aplicar el tratamiento con exceso de calcio. Con estos resultados se decide realizar los siguientes experimentos aplicando el proceso de lavado.

7.2.4 Efecto de los bloqueadores de calcio en la expresión de genes de defensa en *A.thaliana Col-O*

En la literatura se han propuesto algunos compuestos capaces de bloquear el calcio como *LaCl₃* que es un bloqueador de los canales de calcio, BAPT que es un quelante de calcio impermeable a las membranas, EGTA que es también un quelante de calcio (Ranf, Eschen-Lippold, Pecher, Lee, & Scheel, 2011). Para determinar el compuesto cuyo efecto es más significativo en el bloqueo de calcio asociado a la expresión de genes de defensa, se probaron los compuestos EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) en una concentración de 100 mM (YOUNG & PADILLA, 1978) y *LaCl₃* (Cloruro de Lantano) en una concentración de 10 μ M (Ramirez, y otros, 2012). Se analizó la expresión relativa del gen PDF 1.2 frente a tratamientos con diferentes concentraciones de calcio en presencia de estos compuestos.

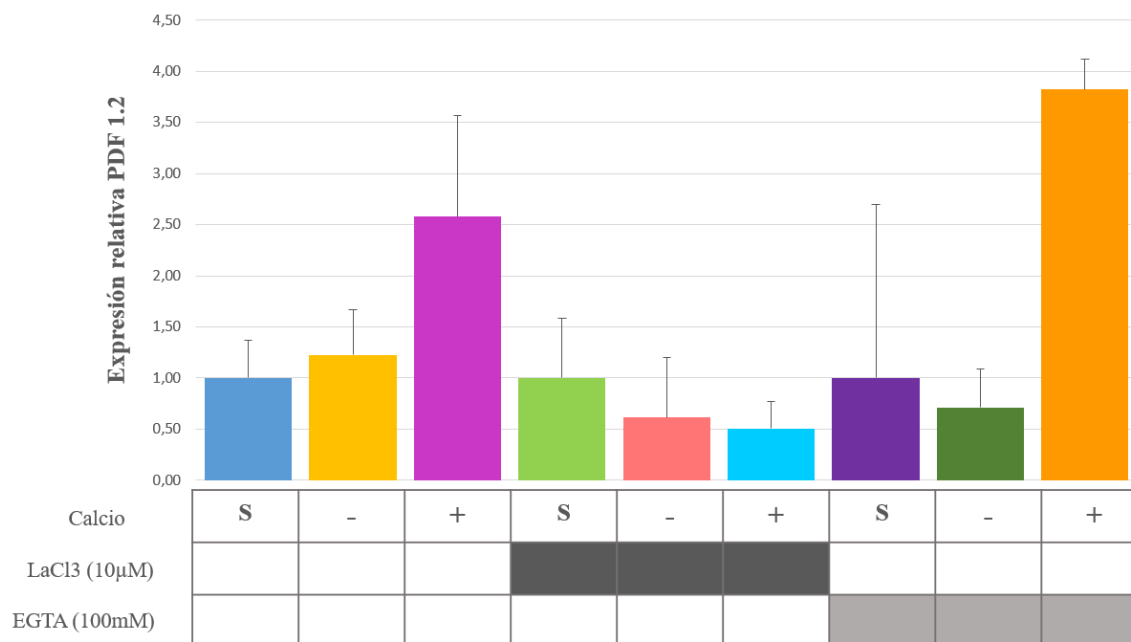


Figura 8. Efecto de bloqueadores de calcio EGTA y $LaCl_3$ en la expresión relativa del gen PDF1.2

Se usaron tres concentraciones de calcio: estándar 3mM (S), deficiencia 0mM (-), exceso 15mM (+) y la adición de dos bloqueadores de calcio EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) 100 mM y $LaCl_3$ (Cloruro de Lantano) 10 µM cada uno con uno con un mecanismo diferente para bloquear el calcio. Las barras de erros representan 1 desviación estándar (n=2).

En la gráfica anterior se compara el efecto de ambos bloqueadores sobre la expresión del gen PDF 1.2 con diferentes concentraciones (S, -, +). Se toma como referencia la expresión del gen sin la aplicación de bloqueadores. El exceso de calcio aumenta la expresión de este gen, sin embargo al aplicar $LaCl_3$ este efecto se ve suprimido, llegando su expresión a ser incluso menor a la del control. La aplicación de $LaCl_3$ muestra una tendencia a disminuir la expresión del gen PDF1.2 independientemente de la concentración de calcio aplicada en la dieta. Al contrario, al analizar el EGTA, la expresión del gen se reduce casi de forma imperceptible, incluso muestra un efecto contrario al que se esperaría en el caso del exceso de calcio aumentando la expresión del mismo. Se observa que la deficiencia de calcio (-) en ningún caso

induce la expresión del gen PDF1.2 y que los bloqueadores de calcio no tienen ningún efecto sobre la expresión del gen sometido a este tratamiento.

Por lo tanto, ya que no se observa un patrón claro del efecto que tiene el EGTA sobre la expresión del gen PDF1.2, se determina que el $LaCl_3$ es un mejor bloqueador y se decide utilizar este para futuros ensayos y evaluar su efecto sobre la expresión de los genes LOX2 y PDF1.2

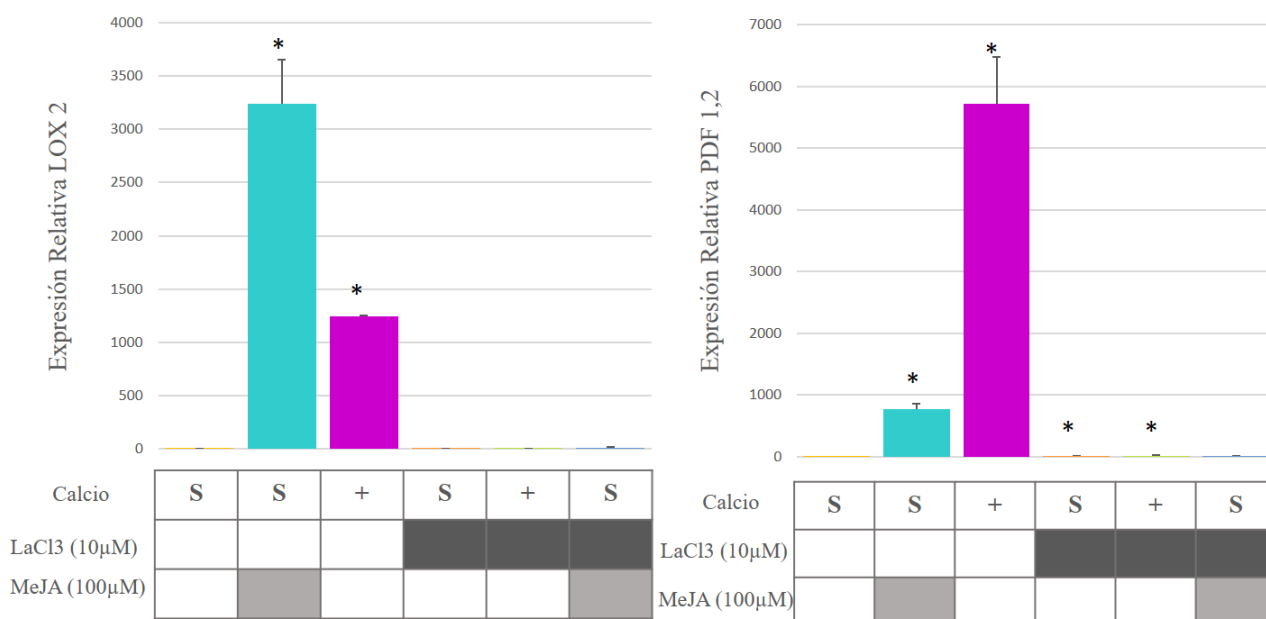


Figura 9. Efecto de $LaCl_3$ sobre la expresión relativa de LOX 2 y PDF 1.2

Se usaron dos concentraciones de calcio: estándar 3mM (S) y exceso 15mM (+), la adición de metiljasmonato (MeJA) 100uM y la adición del bloqueador de calcio $LaCl_3$ (Cloruro de Lantano) 10 µM para evaluar expresión de los genes LOX 2 y PDF1.2. Las barras de error representan 1 desviación estándar (n=2). *diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student (p<0,05).

En el gráfico anterior se compara la expresión de los genes PDF1.2 y LOX2 al aplicar el tratamiento con exceso de calcio y como esta expresión cambia con la aplicación del bloqueador de calcio $LaCl_3$. Se observa que para ambos genes la aplicación de $LaCl_3$ reduce por completo el efecto del exceso de calcio reduciendo considerablemente la expresión de los mismos. En el caso de LOX2, el exceso de calcio eleva la expresión del gen 1100 veces más

que el control, al aplicar el bloqueador la expresión del gen es estadísticamente igual a la del control. Para el mismo gen, el MeJA aumenta la expresión del gen 3200 veces más que el control, mientras que al aplicar el bloqueador esta expresión vuelve a ser estadísticamente igual al control aun en presencia del elicitador. En el caso de PDF1.2, el exceso de calcio aumenta la expresión del gen 5800 veces más que el control, al aplicar el bloqueador la expresión se eleva 10 veces más que el control, siendo este aumento despreciable en comparación a pesar de ser estadísticamente significativo al control. El MeJA aumenta la expresión de este gen 90 veces más que el control, al aplicar el bloqueador la expresión se vuelve igual a la del control. Por lo tanto, se observa que la expresión de ambos genes es reducida aun en cuando se aplica el elicitador de defensa MeJA, mostrando que el $LaCl_3$ puede ser un bloqueador general de la ruta del AJ.

7.2.5 Análisis de la expresión del gen PR1 de la ruta de AS bajo tratamientos con exceso de calcio y bloqueadores de calcio

Tras haber determinado que el tratamiento con exceso de calcio (15mM) tiene un efecto positivo en la expresión de los genes marcadores de la ruta del AJ LOX 2 y PDF1.2, y que el bloqueador de calcio $LaCl_3$ inhibe este efecto aun en presencia de un elicitador de la ruta de AJ, se buscó analizar cómo estas condiciones afectan a la ruta del AS. Para esto se evaluó la expresión del gen marcador de la ruta de AS PR1 conocida por ser antagónica a la del AJ bajo las mismas condiciones utilizando tratamientos con concentraciones estándar de calcio (3mM), tratamientos con exceso de calcio (15mM), la aplicación de MeJA y del bloqueador de calcio $LaCl_3$.

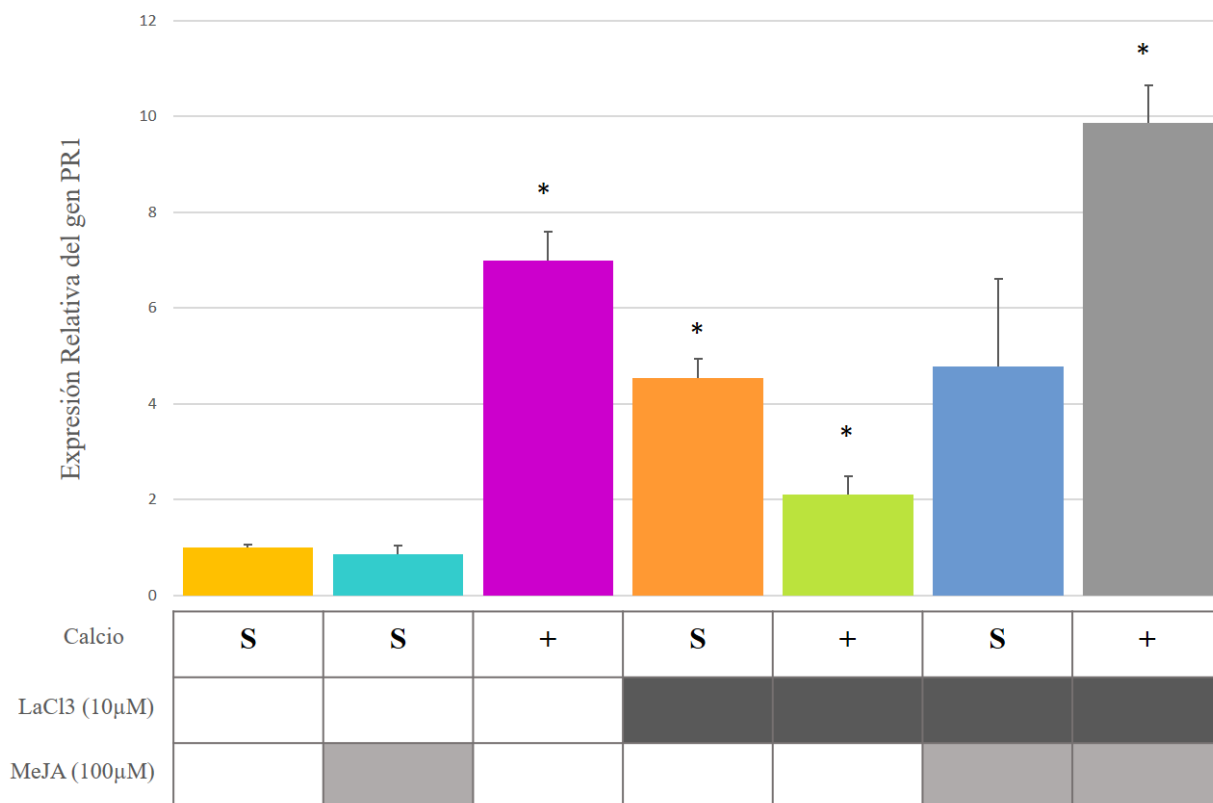


Figura 10. Expresión Relativa del gen PR1 frente a diferentes concentraciones de calcio y la aplicación de un bloqueador de calcio

Se usaron dos concentraciones de calcio: estándar 3mM (S) y exceso 15mM (+), la adición de metiljasmonato (MeJA) 100uM y la adición del bloqueador de calcio $LaCl_3$ (Cloruro de Lantano) 10 μ M para evaluar expresión de PR1. Las barras de error representan 1 desviación estándar (n=2). *diferencias significativas en comparación al control usando prueba t-Student ($p < 0,05$).

En el gráfico anterior se muestra la expresión relativa de gen PR1 siendo este un marcador de la ruta del SA, comúnmente antagónica a la ruta de AJ. Se observa una disminución en la expresión de este gen con la aplicación de MeJA y un aumento en la expresión del mismo en aquellos tratamientos en los que se ha aplicado $LaCl_3$. Este resultado contrasta con lo observado anteriormente en el presente estudio, aquellos tratamientos ($LaCl_3$) que inhibieron la expresión de genes marcadores de la ruta de AJ, promueven la expresión de la ruta de AS. Sin embargo, se observa un efecto concordante entre ambas rutas al aplicar el tratamiento con

exceso de calcio. Se observa un aumento en la expresión del gen PR1 siendo este efecto similar a lo observado en los genes PDF1.2 Y LOX2. Se determinó que la mayor expresión de PR1 este gen se da al aplicar el tratamiento con exceso de calcio, $LaCl_3$ y MeJA. Por lo tanto, se confirma el antagonismo de las rutas de AS y AJ al observar que las condiciones que inhiben la expresión de genes marcadores de la ruta de AJ, promueven la expresión de genes marcadores de AS. Sin embargo, se observa un efecto positivo para ambas rutas al aplicar un tratamiento con exceso de calcio indicando una posible activación simultánea.

DISCUSIONES

8.1 El exceso de calcio induce la expresión de los genes *LOX 2* y *PDF1.2* mediante cambios en la concentración de calcio circulante en el protoplasto.

Para los estudios de expresión génica se utilizó un análisis de expresión relativa. Para determinar cómo cambia la expresión de los genes *LOX 2* y *PDF 1.2* frente a diferentes concentraciones de calcio. Se comparó su expresión con un gen normalizador. En este caso se utilizó el gen *UBC-10* que es uno de los 5 genes poliubiquitina presentes en *A.thaliana*. Este gen codifica una proteína ubiquitina altamente conservada de 76 aminoácidos que se une a otras proteínas marcándolas para su posterior degradación en el proteosoma. Este gen tiene repeticiones en tándem de 228 pb que codifican un monómero de la proteína UBIQUITINA-10 cada uno. Se ha encontrado en casi todos los eucariotas (Callis, Carpenter, Sun, & Vierstrat, 1995). Al ser un gen vital para el funcionamiento celular, se utiliza como gen normalizador conociendo que la expresión de este gen permanece estable en todos los tejidos de la planta y bajo condiciones cambiantes del ambiente. Se ha establecido que para estudios en *A.thaliana* *UBC-10* presenta una muy buena estabilidad y por lo tanto permite obtener resultados validos en estudios de expresión relativa de genes (Czechowski, Stitt, Altmann, Udvardi, & Scheible, 2005).

En la **Figura 5** se muestra el análisis de expresión relativa de los genes *LOX2* y *PDF1.2* luego de la aplicación de dietas con diferentes concentraciones de calcio. Para estos tratamientos, se utilizó un control interno tratado con medio MS con una concentración estándar de calcio de 3mM y un control positivo de la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* al cual se aplicó MeJA (100 μ M) como elicitador de la ruta de AJ (Venegas, 2013). Se determinó que la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* aumenta 5000 y 1000 veces respectivamente en relación al control con este tratamiento. Siendo estos genes marcadores de la ruta de AJ, esta respuesta coincide con lo que se esperaba observar. Por otro lado, se observa que al aplicar el

tratamiento con exceso de calcio con una concentración de 15mM, la expresión de ambos genes aumenta considerablemente en relación al control. En el caso de *LOX 2*, la expresión del gen bajo este tratamiento aumenta 1000 veces en comparación al control. En el caso de *PDF1.2* la expresión relativa bajo el tratamiento de exceso de calcio es 80000 veces mayor al control y. Por lo tanto, el efecto positivo del exceso de calcio para la expresión de ambos genes es evidente. Para entender la razón por la cual se observa este efecto, se debe tomar en cuenta que el calcio cumple varios roles fundamentales dentro de la célula, y uno de ellos es actuar como segundo mensajero celular (Barker & Pilbeam, 2006). Dentro de las rutas de señalización de las plantas, se ha demostrado que después del reconocimiento de PAMPs, se genera un flujo de calcio hacia la célula y que este flujo es capaz de codificar señales específicas según la duración, amplitud, frecuencia y distribución espacial. Estas señales son decodificadas por las proteínas de unión al calcio como las calmodulinas y factores de transcripción unidos a calmodulinas dependientes de calcio que desencadenan en la expresión de genes de defensa (Dodd, Kudla, & Sanders, 2010). Thor y Peiter (2014) demostraron que los picos intracelulares de calcio tienen un perfil diferente cuando se generan como respuesta a la presencia de un patógeno o a un organismo simbiótico. En el mismo estudio se demostró que en el caso de la respuesta frente a patógenos, se necesitaba una fuente de calcio extracelular además de la liberación de calcio intracelular posiblemente mediada por el flujo de calcio extracelular para generar la respuesta. Otros estudios han encontrado resultados similares demostrando que el paso del calcio presente en el apoplasto a través de la membrana es indispensable para activar la señal de respuesta por cambios en la concentración citoplasmática de calcio (Ranf, Eschen-Lippold, Pecher, Lee, & Scheel, 2011). Por lo tanto, las plantas se alimentan del medio proporcionado con las diferentes cantidades de calcio y estos nutrientes fluyen a través del xilema ya sea por la vía del apoplasto o simplasto esparciéndose por toda la planta (Barker & Pilbeam, 2006). Es posible que la aplicación del tratamiento con exceso de calcio simule las

condiciones necesarias para activar las rutas de defensa de la planta contra patógenos. Esta activación puede darse a través de cambios en la concentración intracelular de calcio provocados por la alta concentración de calcio extracelular que fluye a través de la xilema al absorber este tratamiento. El calcio entra en la célula generando el flujo de calcio y picos de calcio identificados como señales citoplasmáticas que pueden desencadenar la activación de la defensa. Promoviendo así la expresión de estos genes de defensa.

A partir de lo anterior, y para determinar cómo las diferentes concentraciones de calcio suministradas en los tratamientos afectan la concentración de calcio en las plantas se analizó la concentración de calcio foliar. En la **Figura 6** se observa la concentración de calcio total en tejido foliar para cada tratamiento con diferentes concentraciones de calcio. Se observa que no existen diferencias significativas entre tratamientos aun cuando se ha aplicado tratamientos con exceso de calcio. Esto se debe a que el método utilizado para la medición determina la concentración total de calcio presente en las hojas. Este macronutriente es de vital importancia y el tercero más abundante en los tejidos de la mayor parte de especies. Su gran importancia radica, entre otros aspectos, en que sirve de sostén para las paredes celulares y por lo tanto para la estabilidad celular (Elmer & Datnoff, 2014). Al cumplir este rol, se encuentran grandes cantidades de calcio total en las hojas. Se ha demostrado que el 60% del calcio en las hojas está asociado a la pared celular, el 7% a las membranas y aproximadamente el 33% a la fracción soluble (Rahman & Punja, 2007). Por lo tanto, los pequeños cambios celulares, cuyas concentraciones de calcio varían en unidades de micromoles no podrían ser percibidos con este método de detección, ya que no aportarían un aumento significativo a la cantidad de calcio total en la hoja.

Por otro lado, ya que las grandes cantidades de calcio se encuentran formando parte de la estructura de la planta, las 24 h de aplicación del tratamiento no resultarían suficientes para que este calcio pase a formar parte de esta estructura y por lo tanto cambiar su concentración total.

Rios, et al (2012) encontraron resultados que respaldan lo anterior. Se realizó un estudio para determinar la distribución del calcio en las hojas y como la aplicación de fuentes de calcio exógeno durante el desarrollo de la planta afecta la concentración total de calcio en *Brassica rapa* perteneciente a la misma familia que *A.thaliana*. Se utilizó también ICP-MS para determinar de la concentración de calcio total. Se determinó que al aplicar $CaCl_2$ en altas concentraciones, se cambia la concentración de calcio total presente en hojas si este se aplica desde el inicio de la etapa de desarrollo de 21 días de la planta. Incluso se observa una mejor resistencia a estrés de tipo biótico.

8.1.1 Realizar un lavado previo a la aplicación de tratamientos es necesario para observar un cambio significativo en la expresión de genes de defensa

Previo a la aplicación de tratamientos, se realizó un proceso de lavado de nutrientes en las plantas en el que se eliminan los rastros de nutrientes del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las plantas utilizando agua destilada. Con este paso se busca eliminar cualquier rastro de calcio presente en el sustrato para homogenizar las condiciones iniciales de cada planta en estudio. En la **Figura 7** se muestra la diferencia en la expresión relativa de los genes *LOX2* y *PDF1.2* en grupos de plantas que han sido sometidas a un lavado previo a la aplicación de los tratamientos con diferentes concentraciones de calcio y aquellas que no han sido sometidas al lavado. Se observa que el no lavar las plantas reduce el efecto positivo observado con el tratamiento con exceso de calcio en la expresión de los genes *LOX2* y *PDF 1.2*. Por lo tanto, se determina que el lavado es necesario para observar el efecto positivo del tratamiento con exceso de calcio en la expresión de los genes *LOX 2* y *PDF 1.2*. Estos resultados concuerdan con lo expuesto anteriormente acerca de cómo el tratamiento con exceso de calcio puede inducir la expresión de estos genes. Al realizar el lavado, cambian las concentraciones de calcio circulante a través de la xilema en los días en los que se lleva acabo el lavado. Al aplicar los tratamientos después de tres días de lavado, las plantas absorben los nutrientes

rápidamente y la concentración de calcio circulante cambia. Como se mencionó, un cambio en la concentración extracelular de calcio puede generar un flujo al interior de la célula, simulando picos de calcio como los descritos por Thor y Peiter (2014) que desencadenan señales citoplasmáticas que llevan a la expresión de genes de defensa. Ahora bien, en la misma figura se observa que el tratamiento con una concentración estándar no produce un efecto similar a pesar de que con él también se aumentaría la cantidad de calcio circulante después de realizar los lavados. Esto puede explicarse ya que las señales citoplasmáticas que generan la defensa son muy específicas. Es posible que la concentración de calcio circulante obtenida del tratamiento estándar no sea suficiente para simular estas señales. Por ejemplo, se ha demostrado que como respuesta al estímulo de la flagelina 22 se producen dos picos de aumento en la concentración de calcio citoplasmático de aproximadamente $0.27 \mu\text{M}$ en *Arabidopsis* (Ranf, Eschen-Lippold, Pecher, Lee, & Scheel, 2011).

8.1.2 Bloquear los canales de calcio en la membrana celular reduce la expresión de genes de defensa

Para corroborar lo expuesto anteriormente, se decidió emplear bloqueadores de calcio y evaluar su efecto en la expresión de los genes en estudio (*LOX 2 Y PDF1.2*). En la literatura se han reportado dos mecanismos por los cuales se puede bloquear el calcio a nivel celular que son los quelantes como EGTA, EDTA y BAPT y los bloqueadores de canales como el *LaCl₃*.

En la **Figura 8** se muestra la comparación del efecto de dos bloqueadores de calcio EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) 100 mM y *LaCl₃* (Cloruro de Lantano) 10 μM sobre la expresión del gen *PDF1.2*. Se observó que, en presencia del bloqueador *LaCl₃*, el tratamiento con exceso de calcio no fue capaz de aumentar la expresión del gen *PDF 1.2* como se observó anteriormente. Sin embargo, se observa también que EGTA no tiene un efecto significativo reduciendo la expresión del gen *PDF1.2* aun cuando este también es un bloqueador de calcio. La razón de estas diferencias observadas radica en el mecanismo de acción de ambos

bloqueadores. Los resultados hallados en esta sección concuerdan también con la hipótesis de que el tratamiento con exceso de calcio genera un cambio en la contracción extracelular de calcio que fluye al interior de la célula a través de la membrana generando un cambio en la concentración de calcio intracelular capaz de desencadenar la señalización que induzca la defensa. El flujo de calcio a través de la membrana es indispensable para iniciar la señalización, y el $LaCl_3$ es un bloqueador de los canales de calcio presentes en la membrana plasmática (SHARMA, SHARMA, & RAI, 1992). Por lo tanto, la aplicación de este bloqueador no permitirá que se dé el flujo de calcio hacia el citoplasma de la célula y por ende no se genera la señal que induzca la defensa. Un estudio relacionado realizado por Xu y Heath (1998) presenta resultados similares demostrado que la aplicación de $LaCl_3$ a través de la raíz 24 h antes de la inoculación con un patógeno, inhibe el incremento en la concentración de calcio citoplasmático observado en células no tratadas con el bloqueador durante el ataque del patógeno.

A diferencia del $LaCl_3$, el EGTA es un quelante extracelular de calcio y se conoce que no entra en célula (Xu & Heath, 1998). Se ha descrito también que este quelante tiene una gran afinidad por el ion Ca^{+2} , sin embargo cierta proporción de este puede unirse también al ion Mg^{+2} que es muy similar (Rios, y otros, 2012). Resulta evidente que este quelante del calcio no produzca el mismo efecto que el $LaCl_3$ ya que este atrapa el calcio extracelular y se encuentra únicamente fuera de la célula. Por lo tanto, este no bloquea los canales de entrada del calcio a la célula. Se debe tomar en cuenta que al quelar el calcio, una molécula de EGTA interactúa con un máximo de dos iones de calcio formando el quelato (YOUNG & PADILLA, 1978). En consecuencia, es posible que la concentración utilizada de calcio en el tratamiento con exceso de calcio tenga una cantidad de calcio mucho mayor a la que el EGTA 100 mM puede quelar. Ya que los canales de calcio no están bloqueados, el calcio que no ha sido quelado puede entrar en la célula y generar la señal por los mecanismos descritos anteriormente.

Una vez definido el mejor bloqueador es el $LaCl_3$, se estudió su efecto en la expresión de los genes LOX 2 y PDF1.2 incluyendo en esta ocasión controles con el elicitor de estos genes MeJA (100 μ M). En la **Figura 9** se muestra el efecto de aplicar este bloqueador de calcio antes de los tratamientos con diferentes concentraciones de calcio en la expresión de los genes LOX2 y PDF 1.2. Se aplicó $LaCl_3$ 10 μ M 24 h antes de aplicar los tratamientos con diferentes concentraciones de calcio. Se observó que, en presencia del bloqueador, el tratamiento con exceso de calcio no fue capaz de aumentar la expresión del gen *LOX 2* ni *PDF 1.2* como se observó anteriormente. Al aplicar el bloqueador con exceso de calcio, la expresión se redujo 9000 veces en comparación a su contraparte sin bloqueador. Se utilizó la aplicación de MeJA como control positivo de la expresión de estos genes y se observó que en ausencia de $LaCl_3$ este elicitor aumenta la expresión de los genes LOX2 y PDF1.2. 32000 y 9000 veces más que el control respectivamente. Sin embargo, la aplicación de $LaCl_3$ inhibe el efecto del elicitor reduciendo la expresión de los genes al nivel del control en el caso de LOX2 y a 9 veces más que el control en el caso de PDF1.2. Por lo tanto, se corrobora la idea establecida anteriormente acerca del mecanismo por el cual el exceso de calcio aumenta la expresión de LOX2 y PDF1.2.

8.2 Antagonismo entre rutas de AS y AJ

Finalmente, conociendo que el tratamiento con exceso de calcio aumenta la expresión de los genes LOX2 y PDF 1.2 marcadores de la ruta de AJ y que el $LaCl_3$ reduce su expresión, se decidió evaluar el efecto de estos mismos factores en la ruta del AS que es antagónica a la del AJ. Como se observa en la **Figura 10** de acuerdo a lo esperado, la expresión relativa de PR1 disminuye al aplicar MeJA (100 μ M). Se observa que en todos los tratamientos en los que se aplicó $LaCl_3$, la expresión del gen PR1 aumentó significativamente. Conociendo la relación antagónica de ambas rutas resulta lógico que los tratamientos que provocaron una disminución de la expresión de los genes marcadores de la ruta del AJ provoquen un aumento en la expresión del gen marcador de la ruta de AS. Se observa un efecto interesante en cuanto a los tratamientos

con exceso de calcio, al igual que en los genes *LOX 2* y *PDF1.2*, se observa un aumento en la expresión del gen *PR1* al ser sometido a este tratamiento, incluso se observa un aumento aún mayor en la expresión del gen al aplicar $LaCl_3$ y un exceso de calcio. A pesar de que la mayor parte de la literatura establece el antagonismo entre estas rutas, algunos autores han reportado observar un sinergismo entre estas cuando existen bajas concentraciones de estas AS y AJ (Li, Brader, & Palva, 2004). En la misma figura, se observa que el aumento en la expresión de *PR1* no es tan alto como el de *LOX 2* o *PDF 1.2* pero es significativo. Existen varios reportes de cómo las rutas del AS y AJ convergen una con otra mediante moléculas involucradas en su interacción como *NPR1* y el factor de transcripción *WRKY70AS* que mantienen el antagonismo. Se conoce también que las rutas AJ, y ET interactúan entre sí en varios nodos de las cascadas de señalización para regular la respuesta de las plantas a patógenos (Vivek, Pratibha, & Prakash, 2016). Es importante recordar que la técnica de RT-qPCR que se utilizó para los análisis expuestos, se basa en la cantidad inicial de copias de ARNm de una secuencia específica presentes en una muestra en un momento y bajo condiciones determinadas (Roth, 2002). Es decir, el aumento en la expresión del gen *PR1*, no necesariamente significa que la respuesta se está generando más allá del nivel transcripcional. Debido a esto, no se puede afirmar que ambas rutas se activen y expresen mutuamente en un fenotipo en el cual se muestre resistencia a patógenos biótrofos y necrótrofos al mismo tiempo. Para determinar si esto es posible sería necesario un análisis más allá de la transcripción de los genes, se podría realizar una medición cuantitativa de los productos finales para los que codifican los genes. En el caso de *PDF1.2* se podría cuantificar las defensinas con actividad antibiótica, para *LOX2* la actividad de la lipoxigenasa 2 y para *PR1* la proteína PR (Corné, León, Van der Ent, & Van Wees, 2009). Un análisis final para demostrar verdaderamente la activación de cualquiera de las dos rutas (o de ambas de ser el caso) como resultado de la aplicación de los tratamientos, sería analizar el fenotipo en campo. Es decir, realizando una inoculación con un patógeno

biótrofo y otro necrótrofo y evaluar a cuál de los dos se presenta resistencia y cual sensibilidad. En este caso se esperaría que si se activa la ruta de AJ la planta presente resistencia al patógeno necrótrofo. Si por el contrario, se activaría la ruta de AS, se esperaría ver resistencia al patógeno biótrofo (Bari & Jones, 2009). En el caso de que ambas rutas estén activadas se observaría resistencia a ambos patógenos, lo que resulta poco probable.

CONCLUSIONES

- La aplicación de una dieta con calcio cinco veces mayor que el estándar (15mM) aumenta la expresión de genes marcadores de la ruta del Ácido Jasmonico *LOX 2* y *PDF1.2* en *A.thaliana*
- La aplicación de una dieta rica en calcio (15mM) aumenta la expresión de genes de *LOX 2* y *PDF1.2* posiblemente simulando los cambios en la concentración citoplasmática de calcio natural observa como respuesta a la presencia de patógenos.
- La aplicación de una dieta deficiente en calcio (0 mM) no producen ningún efecto en la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* con respecto al control.
- La concentración de calcio total presente el tejido foliar no cambia significativamente con la aplicación de los tratamientos con exceso de calcio (15mM), estándar (3mM) y deficiencia (0 mM).
- Realizar un proceso de lavado de nutrientes previo a la aplicación del tratamiento con exceso de calcio, es necesario para observar su efecto positivo en la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2*.
- La aplicación de *La Cl₃* como bloqueador de canales de transporte de calcio celulares evita la expresión de *LOX2* y *PDF1.2* aun en presencia de un elicitor de la ruta del Ácido Jasmónico.
- Los tratamientos que incluyen *La Cl₃* y que inhiben la expresión de genes marcadores de la ruta del Ácido Jásmonico, promueven la expresión del gen *PRI* de la ruta del Ácido Salicílico.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un análisis con mayor cobertura de los transcritos generados bajo las condiciones estudiadas como la secuenciación del transcriptoma entero para clonación al Azar (RNA-Seq) para entender mejor que cambios se están dando en la planta bajo las condiciones estudiadas en especial bajo el tratamiento con exceso de calcio.
- Se recomienda una comprobación del fenotipo esperado tras la activación de la ruta del AJ, siendo este una planta resistente a patógenos necrótrofos y susceptible a biótrofos.
- Para determinar si el aumento en la expresión del gen PR1 es significativo en cuanto a la activación de la ruta de AS, se recomienda un análisis de los productos finales de los genes involucrados en este estudio.
- Se recomienda una comprobación del fenotipo que se esperaría observar en caso de que el exceso de calcio activará significativamente ambas rutas con bioensayos involucrando patógenos biótrofos y necrótrofos.

Bibliografía

- Bari, R., & Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*, 69(4), 473–488. doi:10.1007/s11103-008-9435-0
- Barker, A., & Pilbeam, D. (2006). *Handbook of Plant Nutrition*. London, Boca Ratón: Taylor and Francis Group.
- Barraza, F., Schreck, E., Leveque, T., Uzu, G., Lopez, F., Ruales, J., . . . Maurice, L. (2107). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *ELSEVIER*, 0269-7491. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080
- Callis, J., Carpenter, T., Sun, C., & Vierstrat, R. (Februaty de 1995). Structure and Evolution of Genes Encoding Polyubiquitin and Ubiquitin-Like. *Genetics Society of America*, 139, 921-939.
- Corné, M., León, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. (May de 2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308-316.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M., & Scheible, W. (September de 2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139, 5-17. doi:https://doi.org/10.1104/pp.105.063743
- Datnoff, L. E., Elmer, W. H., & Huber, D. M. (2007). *Mineral Nutrition and Plant Disease*. (L. E. Datnoff, W. H. Elmer, & D. M. Huber, Edits.) St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press).
- De Vos, M. (2005). Signal Signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Plant Microbiome Interaction*, 18, 923-937.

- De Vos, M., Van Oosten, V., Van Poecke, R., Van Pelt, J., Pozo, M., Mueller, M., . . . Pieterse, C. (2005). Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 923–937. doi:doi:10.1094/MPMI-18-0923.
- Dekkers, B., Willems, L., Bassel, G., van Bolderen-Veldkamp, R. P., Ligterink, W., Hilhorst, H., & Bentsink, L. (January de 2012). Identification of Reference Genes for RT–qPCR Expression Analysis in Arabidopsis and Tomato Seeds. *Plant and Cell Physiology*, 53(1), 28–37. doi:https://doi.org/10.1093/pcp/pcr113
- Dodd, A., Kudla, J., & Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 593–620.
- Eastwood, W. (2002). Calcium's Role In Plant Nutrition. *Fluid Journal*, 1-3.|
- El Oirdi, M., El Rahman, T., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M., & Daayf, F. (2011). Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell*, 23, 2405-2421.
- Elmer, W., & Datnoff, L. (2014). Mineral Nutrition and Suppression of Plant Disease. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 4, 231-243. doi: 10.1016/B978-0-444-52512-3.00251-5
- Gamalero, E., & Glick, B. (2012). Ethylene and abiotic stress tolerance in plants;. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change.*, 395-412.
- GED, O. (2013). Speak, freind, and enter:signalling system that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Review Microbiology*, 11, 252-263.
- Guangyou, D., Nils, C., Jens, S., Dirk, W., & Oliver, E. (March de 2013). The Metabolic Interplay between Plants and Phytopathogens. *Metabolites*, 3(1), 1–23. doi:10.3390/metabo3010001

- Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., van Wuytswinkel, O., Bellini, C., & Gutierrez, L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J. Exp. Bot.*, *60*, 487-493.
- Jun Cao, K. S.-B. (2011). Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nature Genetics*, volume 43, pages 956–963.
- Kamphuis, L. G., Hane, J. K., Nelson, M. N., Gao, L., & Atkins, C. A. (January de 2015). Transcriptome sequencing of different narrow-leafed lupin tissue types provides a comprehensive uni-gene assembly and extensive gene-based molecular markers. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(1), 14-25. doi:doi: 10.1111/pbi.12229
- Koornneef, M., & Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, *61*: 909-921.
- León-Reyes, A., Spoel, S., De Lange, E., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S., Pieterse, C. (2009). Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in crosstalk between salicylate and jasmonate signaling pathway. *Plant Physiology*, *149*, 1797-1809.
- Li, J., Brader, G., & Palva, E. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, *16*(2), 319–31.
- Li-Na, D., Guo-Xing, Y., Rui-Ying, Y., Jun, C., & Yang, Z. (January de 2016). Investigating interactions of salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways in monocots wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *93*, 67-74.
doi://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.01.002
- Livak, K. J. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*, *25*, 402-408.
doi:doi:10.1006/meth.2001.1262

- Loake, G., & Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, 10(5), 466–472. doi:10.1016/j.pbi.2007.08.008
- Marshner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants* (2nd ed.). London: Academic Press.
- Meyerowitz, E., & Pruitt, R. (2014). Arabidopsis thaliana and Plant Molecular Genetics. *SCIENCE*, 1214-1218.
- Nürnberg, T., & Kemmerling, B. (2009). Pathogen associated molecular patterns(PAMP)and PAMP-triggered immunity. *Annual Plant Review*, 34, 16-47.
- Oerke, O. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144, 31–43. doi:doi:10.1017/S0021859605005708
- Rahman, M., & Punja, Z. (2007). Calcium and Plant Disease. En L. Datnoff, W. Elemer, & D. Huber (Edits.), *Mineral Nutrition and Plant Disease* (págs. 79-93).
- Ramirez, M., Trejo, L. I., Gomez, F. C., Castillo, A. M., Hernandez, I., & Hernández, E. (2012). BIOACUMULACIÓN DE POTASIO, CALCIO Y LANTANO EN TULIPÁN. *Terra Latinoamericana*(30), 229-238.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., & Scheel, D. (10 de June de 2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant Journal*, 68(1), 100-113. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04671.x
- Rios, J., O'Lochlainn, S., Devonshire, J., Graham, N., Hammond, J., King, G., . . . Broadley, M. (2012). Distribution of calcium (Ca) and magnesium (Mg) in the leaves of Brassica rapa under varying exogenous Ca and Mg supply. *Annals of Botany*, 109, 1081–1089. doi:doi:10.1093/aob/mcs029
- Roth, C. (2002). Quantifying Gene Expression. *Molecular Biology*, 4, 93-100.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, 14, S401-S417.

- Sarfraz, H., Tariq, S., Muhammad, S., Muhammad, A., & Azeem, K. (2009). Chapter 5 Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. *ELSEVIER*, 159-200.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *nature ecology and evolution*, 1-13. doi:<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- SHARMA, S., SHARMA, S., & RAI, V. (1992). The Effect of EGTA, Calcium Channel Blockers (Lanthanum Chloride and Nifedipine) and their Interaction with Abscisic Acid on Seed Germination of Brassica juncea cv. RLM-198. *Annals of Botany*, 70, 295-299.
- Thor, K., & Peiter, E. (2014). Cytosolic calcium signals elicited by the pathogen-associated molecular pattern flg22 in stomatal guard cells are of an oscillatory nature. *New Phytologist*, 204, 873-881.
- Turner, J. G., Ellis, C., & Devoto, A. (2002). The Jasmonate Signal Pathway. 153-165. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M., Rodenburg, N., Pauwels, L., . . . Pieterse, C. (2013). Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCO11-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *The Plant Cell*, 25(2), 744-761. doi:10.1105/tpc.112.108548
- van Loon, L., Rep, M., & Pieterse, C. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44, 135–162. doi:doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
- Venegas, J. J. (2013). EVALUACIÓN DE INDUCTORES DE RESISTENCIA, PARA EL CONTROL DE LEPIDÓPTEROS Y TOLERANCIA A ESTRÉS HÍDRICO EN

BRÓCOLI (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Y EN *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Universidad Central del Ecuador.

Vivek, V., Pratibha, R., & Prakash, K. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *Plant Biology*, 16:86.

Wei, J., van Loon, J., Gols, R., Menzel, T., Li, N., & Kang. (2014). Reciprocal crosstalk between jasmonate and salicylate defence-signalling pathways modulates plant volatile emission and herbivore host-selection behaviour. *J. Exp. Bot*, 65, 3289-3298.

White, P., & Broadley, M. (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*(92), 487-511.

doi:10.1093/aob/mcg 164

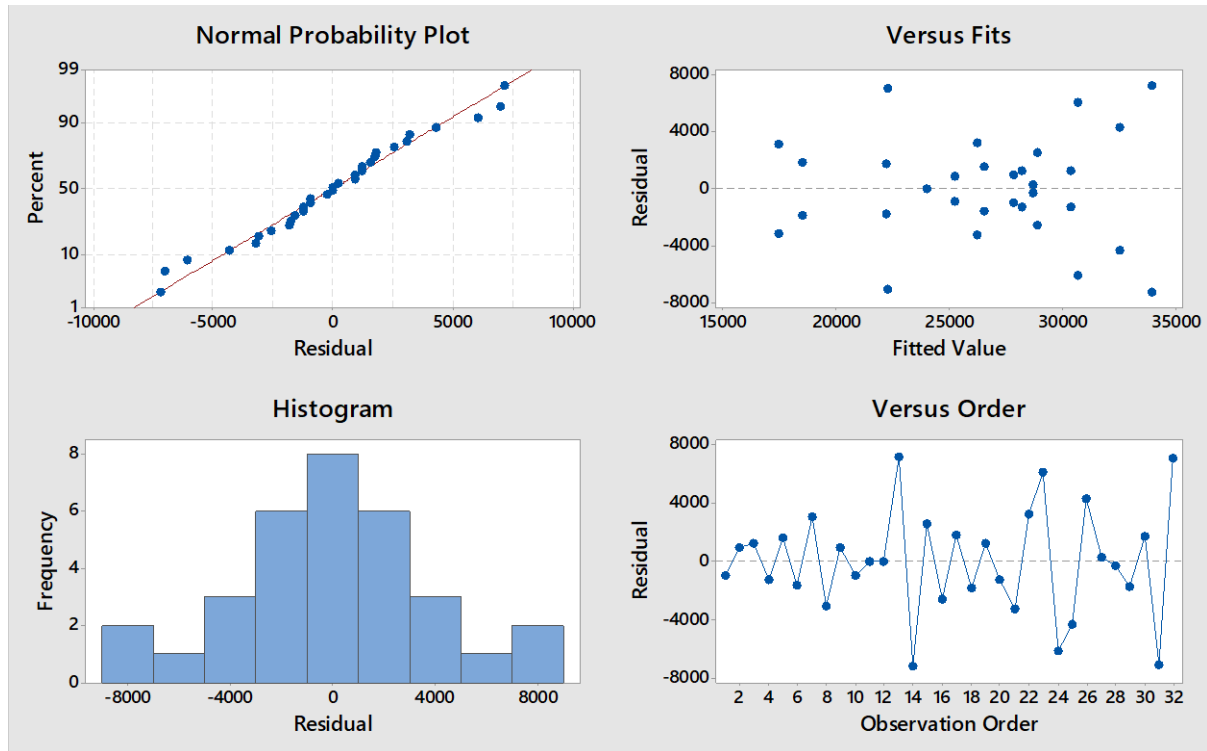
Xu, H., & Heath, M. (April de 1998). Role of Calcium in Signal Transduction during the Hypersensitive Response Caused by Basidiospore-Derived Infection of the Cowpea Rust Fungus. *The Plant Cell*, 10, 585–597.

YOUNG, K., & PADILLA, G. (1978). Determination of Free Ca Ion Concentrations with an Ion-Selective Electrode in the Presence of Chelating Agents in Comparison with Calculated Values. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 89, 521-528.

Zhan, J., Thrall, P. H., & Burdon, J. J. (2014). Achieving sustainable plant disease management through evolutionary principles. *Trends Plant Sci*, 19, 570–575.

ANEXOS

Anexo 1. ANOVA para medicion de calcio en tejido foliar



Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Muestra_1	15	662491495	44166100	1,80	0,127
Error	16	392340926	24521308		
Total	31	1054832422			

Anexo 2. Prueba de Tukey para medición de calcio en tejido foliar

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Muestra_1	N	Mean	Grouping
7	2	33998	A
13	2	32571	A
12	2	30677	A
10	2	30398	A
8	2	28922	A
14	2	28698	A
2	2	28215	A
1	2	27849	A
3	2	26548	A
11	2	26251	A
5	2	25244	A
6	2	24001	A
16	2	22254	A
15	2	22200	A
9	2	18511	A
4	2	17454	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Anexo 3. Datos obtenidos para la expresión de PDF1.2

PDF 1,2		Promedio de Expresión	DS	Significancia	valor p
Lavado	3mM	1,138	0,769		
	15mM	5718,048	754,496	si	0,009
	0 mM	25,738	3,271	si	0,009
	3mM+MeJa	763,164	96,99	si	0,008
	15mM+ MeJa	13,548	1	si	0
	0mM+ MeJa	11,48	11,61	no	0,35
	3mM+La	12,712	2,41	si	0,021
	15mM+ La	14,588	3,12	si	0,025
	3mM+La+MeJa	8,646	6,8	no	0,253
Sin Lavar	3mM	5,657	0,055	si	0,001
	15mM	6,25	1,068	si	0,02
	3mM +MeJA	1395,67	942,666	no	1,172
	15mM+MeJA	48,168	0	si	0

Anexo 4. Datos obtenidos para la expresión de LOX2

LOX 2		P Expresión	SD	valor p	Significacia
Lavado	MS(control)	1,086	0,600		
	Ca+	1243,343	6,094	0,000	si
	Ca-	1,097	1,238	0,942	no
	MS+MeJa	3237,915	411,506	0,008	si
	Ca+ MeJa	0,518	0,174	0,180	no
	Ca- MeJa	0,522	0,132	0,168	no
	MS+La	0,300	0,042	0,080	no
	Ca+ La	0,470	0,005	0,125	no
	MS+La+MeJa	8,646	6,800	0,253	no
Sin Lavar	MS	328,220	105,880	0,049	si
	Ca+	0,089	0,057	0,614	no
	MS+MeJa	0,302	0,083	0,085	no
	Ca+ +MeJa	0,009	0,000	0,043	si

Anexo 5. Datos obtenidos para la expresión de PRI

PR1	Promedio de expresión	DS	Valor P	Significacia
3mM	1,001	0,059		
3mM+MeJA	0,848	0,186	0,0383	no
15mM	6,978	0,615	0,005	si
3mM+La	4,526	0,421	0,007	si
15mM+La	2,103	0,389	0,027	si
3mM+La+MeJa	4,773	1,825	0,1	si
15mM+La+MeJA	9,864	0,773	0,004	si