



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA VSP2, LOX2, PR1 Y
PDF1.2 EN ARABIDOPSIS THALIANA (L) HEYNH, FRENTE A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE CALCIO.

AUTORA

Daniela Gutiérrez Ramírez

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA *VSP2*, *LOX2*, *PR1* Y
PDF1.2 EN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L) HEYNH, FRENTE A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE CALCIO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el Título de Ingeniera en Biotecnología

Docente guía

M.Sc Fernando Rivas Romero

Autora

Daniela Gutiérrez Ramírez

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Ing. Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CI: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Fabio Marcelo Idrovo Espín

Doctor en ciencias (Ciencias Biológicas: Biotecnología)

CI: 1705952255

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”

Antonio León-Reyes

Doctor en ciencias (Ciencias Biológicas: Biotecnología)

CI: 1712519246

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Daniela Gutiérrez Ramírez

CI: 1002415634

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Antonio León, por guiarme y enseñarme durante este trabajo. Al laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ. A Noelia Barriga, Darío Ramírez y compañeros del laboratorio por su apoyo y amistad. A mi profesor guía Fernando Rivas, por brindarme sus conocimientos y enseñarme a lo largo de este proceso. A Daniela, Priscila y Salomé, por acompañarme durante toda mi carrera darme su amistad. A Sebastián, por darme todo su amor y ser mi compañero.

DEDICATORIA

A mi padre agradezco y admiro todas sus enseñanzas y amor, toda su sabiduría y conocimiento se quedara en mí. A mi madre por haberme traído al mundo, por cuidarme, por pensar en mí, por enseñarme las cosas simples de la vida.

Gracias por darme todo su apoyo en todas las etapas de mi vida y enseñarme el camino correcto, estoy orgullosa de haberlos escogido.

RESUMEN

La respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos ocurre cuando se inicia el reconocimiento de moléculas efectoras de los patógenos, necrotróficos o biotróficos. Esto influye en la activación de la defensa de las plantas sea esta basal la cual es mediada por la PAMP o resistencia sistémica adquirida (SAR) que da a la planta una protección debido a una infección secundaria que esta ha sufrido. *Arabidopsis thaliana* es una planta modelo muy utilizada en técnicas moleculares. En el presente trabajo se analizaron los genes de defensa de las que influyen en las rutas del SA (*PR1*) y JA (*LOX2*, *VSP2* y *PDF1.2*), para ello se cultivaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0, con medio nutritivo Hoagland por siete semanas. Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada por una semana y se les suministro los diferentes medios nutritivos (Murashigue & Skoog y Hoagland) con diferentes tratamientos (agua destilada, medio optimo, medio optimo sin calcio (-Ca), medio optimo con exceso de calcio (+Ca 5X). Se utilizaron 5 plantas de *Arabidopsis* para cada tratamiento, se recolectaron las plantas 24 horas y siete días después de aplicadas los tratamientos y se extrajo el RNA de toda la planta, se eliminó el DNA contaminante con la enzima Dnasa y el RNA se usó como molde para la síntesis de cDNA, posteriormente se usó como templado para la qPCR en tiempo real. El análisis de expresión génica se realizó aplicando el método de Livak. Se pudo determinar que los medios nutritivos MS y Hoagland inducen las rutas de defensa del SA y JA a las 24 horas de aplicada la dieta, pero siete días después existe un antagonismo entre los genes *LOX2* y *PR1* con los dos medios nutritivos. En el tratamiento con medio nutritivo MS (exceso de calcio), tuvo una mayor expresión en los genes *LOX2* y *PDF1.2* dependientes de la ruta del JA. Una deficiencia de calcio influye en la supresión de los genes de defensa. Finalmente se escogió la dieta MS para suministrarla al mutante *coi1-21* el cual dio resultados favorables ya que se inhibió los genes de respuesta de la ruta de JA y se elevó el gen *PR1* el cual es dependiente de la SAR.

ABSTRACT

Plant response occurs when recognition of pathogen, necrotrophic or biotrophic effector molecules begins. This has influence activating plant defense, which can be basal defense mediated by PAMP or acquired systemic resistance (SAR), that gives the plant a protection to a secondary infection that it has been suffered. *Arabidopsis thaliana* is a model plant that is widely used in molecular techniques. In the present work, the defense genes of the SA (*PR1*) and JA (*LOX2*, *VSP2* and *PDF1.2*) were analyzed. *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants were cultured with Hoagland nutrient medium for seven weeks and then the plants were washed with distilled water for one week, then the culture mediums (Murashige & Skoog and Hoagland) were supplied with different treatments (distilled water, culture medium, culture medium without calcium, culture medium with excess of calcium (+Ca) 5X). The plants were collected 24 hours and seven days after the diets were applied, and the RNA was extracted from the whole plant. The contaminating DNA was removed with the enzyme Dnase and the RNA were used as a template for cDNA synthesis, subsequently used as a template for real time qPCR. Gene expression analysis was performed using the Livak method. It was determined that the nutritional media MS and Hoagland induce the defense pathways of SA and JA within 24 hours of diet, but seven days later there is an antagonism between the *LOX2* and *PR1* genes with the two nutrient media. In treatment with nutrient medium MS (excess calcium), it had a greater expression in the *LOX2* and *PDF1.2* genes dependent of the JA pathway. A calcium deficiency influences the suppression of the defense genes. Finally, the MS diet was chosen to supply *coi1-21* mutant which gave favorable results because it inhibits JA response genes and *PR1* gene which is dependent of SAR was expressed.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Objetivo general.....	5
1.4 Objetivos específicos	5
1.5 Justificación	6
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> (L) Heynh : generalidades y taxonomía.....	7
2.1.1 Estructura y su ciclo de vida	8
2.2 Características moleculares de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L) Heynh	10
2.3 Línea mutante de <i>Arabidopsis thaliana</i> , genes de defensa y genes PR.....	12
2.4 Medios nutritivos	16
2.4.1 Hoagland	16
2.4.2 Murashige & Skoog.....	17
2.5 Nutrición en plantas	17
2.5.1 Estrés nutricional de las plantas	18
2.6 Calcio.....	19
2.7 Actores hormonales en la defensa vegetal	23
2.8 Hormonas vegetales	24
2.8.1 Ácido jasmónico.....	24
2.8.2 Ácido Salicílico.....	26
2.9 Sistema inmune de las plantas	27
2.9.1 Interacción planta-patógeno:	31
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	31

3.1 Variables dependientes	32
3.2 Variables independientes:.....	32
3.3 Diagrama de flujo.....	33
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS:	34
4.1 Población y muestra	34
4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos y evaluación estadística de los resultados:.....	34
4.2.2 Extracción de RNA	36
4.2.3 Geles de agarosa	37
4.2.4 Tratamiento con DNase I, Amplification Grade (INVITROGEN)	37
4.2.5 Transcripción reversa cDNA.....	37
4.2.6 q RTPCR	38
4.3 Evaluación estadística de los resultados	39
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	40
5.1 Análisis preliminar de la expresión génica en Col-0.....	40
5.2 Análisis de la expresión génica con la línea mutante <i>coi1-21</i>	47
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:.....	50
6.1 Conclusiones:	50
6.2 Recomendaciones	50
REFERENCIAS.....	52
ANEXOS	70

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las plantas al ser organismos inmóviles deben generar distintos mecanismos frente a diferentes tipos de estrés, esto ha permitido a las plantas desarrollar capacidades de defensa. Algunos estudios han demostrado la relación que tienen las diferentes rutas hormonales y el impacto que estas tienen sobre la susceptibilidad y resistencia de la planta frente a diferentes patógenos. Cuando se acumula ácido salicílico se activan varios mecanismos de defensa hacia patógenos biotróficos como lo son *Pseudomonas syringae* y *Peronospora parasítica* (Kacharoo y Kachroo, 2009, pp. 154-155), mientras que los patógenos hemibiotróficos también dependen del SA los cuales combinan la forma biotrófica y necrotrófica como *Phytophthora infestans* (Wiermer, Feys, Parker, 2005, pp. 283-285).

Contrariamente el ácido salicílico (SA) tiene un efecto negativo sobre las defensas frente a los patógenos necrotróficos y algunos insectos herbívoros (Kacharoo y Kachroo, 2009, pp. 255-256). Por otro lado, cuando se acumula el ácido jasmónico (JA) la defensa de la planta resulta ser más eficiente contra los patógenos necrotróficos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola* (Acosta y Farmer, 2010, pp.3-5).

Arabidopsis thaliana, es considerada un organismo modelo debido a todos los aportes que se han hecho en investigaciones relacionadas a su biología molecular y a su genética (Hulten, 2006, pp. 8-9). Esta planta es muy versátil ya que es pequeña, requiere poco espacio, no necesita condiciones especiales de temperatura y humedad, y es relativamente sencillo realizar investigaciones. Aparte de esto, su genoma está completamente secuenciado y posee aproximadamente 25500 genes (Somerville y Koornnef, 2002, pp 17-20).

La línea Col-0 es de tipo silvestre y no tiene ningún tipo de mutación evidente. Existen líneas derivadas de *Arabidopsis thaliana* que tienen mutaciones puntuales,

las cuales se utilizan para el estudio de diversas rutas implicadas en la señalización de defensa; la línea mutante *coi1-21* codifica la proteína COI-1 asociada con el JA con la F-box modificada, por ende, esta línea presenta una baja respuesta del JA (TAIR, 2016).

Las fitohormonas como el ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y el etileno (ET) juegan un rol fundamental en las rutas bioquímicas de señalización de defensa de las plantas regulando la expresión de genes PR (*Pathogenesis related proteins*) (Leon-Reyes, Van der Does, De Lange, Delker, Wasternack y Van Wees, 2010, pp. 2-4)

Los genes PR son proteínas ácidas que intervienen en la inhibición del crecimiento y detienen la multiplicación de los patógenos (Boller y Meins, 1992, pp 43-47). A estos genes se les clasifica dependiendo de la secuencia de aminoácidos que poseen, actividad enzimática, actividad biológica y la relación serológica (Pieterse y Van Loon, 1999, pp. 284-290). La expresión de los genes *PR1* y *PR2* se produce debido a que existe una alteración en el estado redox del citosol y se produce una inactivación oligomérica de la proteína *Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1)* (Verhage, Van Wees y Pieterse, 2010, pp. 537-540). El JA en cambio deriva de los lípidos de la membrana de los cloroplastos, y este es percibido por el receptor *Coronatine insensitive 1 (COI-1)*. El factor de transcripción *MYC2 (bHLH)* hélice-bucle-hélice, tiene un papel importante en la regulación del JA y también participa en vía de señalización del ácido abscísico (ABA) (Liu, Staswick, y Avramova, 2016, pp. 45-50). El gen *MYC2* pertenece al subgrupo de genes de memoria (Ding Liu, Virlouve, Riethoven, Fromm, y Avramova, 2013, 560-561), es encargado de regular un conjunto de genes entre los cuales se encuentran *VSP2* y *LOX2*, mientras que los factores de transcripción *ERF1* y *ORA59* son regulados por el gen *PDF1,2* el cual forma parte de la ruta del JA y ET (Figura 7), (Leon-Reyes, *et al* , 2010, pp. 4-5).

El gen *VSP2* posee una actividad fosfatasa ácida en presencia de cationes divalentes (Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}), el gen responde al ácido abscísico, ácido jasmónico, sal, deficiencia de agua y heridas (Van Loon, 2009, pp. 136-138). El gen *PDF1.2* codifica una defensina dependiente de ácido jasmónico y etileno; se expresa al tener contacto con el patógeno fúngico (*Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola*) (Boller y Meins, 1992, pp 45-48). El gen *LOX2* es necesario para la acumulación de ácido jasmónico y requiere para la síntesis inducida por lesión de ácido jasmónico (JA) en hojas. La expresión del gen *PR1* es sensible a ácido salicílico y se induce en respuesta a una variedad de patógenos, es muy usado como marcador molecular para saber si ocurrió una respuesta de la SAR (Leon-Reyes, *et al*, 2010, pp. 4-5).

El calcio es un macronutriente esencial que juega un papel muy importante en la estabilidad de la pared celular y el desarrollo de las nuevas células (Zimmermann, Nurnberger, Frachisse, Wirtz, Guern y Hedrich, 1997, pp. 42-46). Este elemento ayuda en la formación de microtúbulos que se encuentran en el aparato del huso mitótico durante la división celular (Lawrence, Wade y Don, 2005, pp. 76-79). El calcio también es regulador de procesos secretores como la formación de mucílago y la síntesis de calosa, que se producen en respuesta a lesiones mecánicas o plagas. (Lawrence *et al.*, 2005, pp 78). Existen algunos estudios en donde se demuestran que el calcio tiene un papel muy importante en la disminución de los síntomas de algunas enfermedades, y cumple la función de ser un segundo mensajero como transductor de señales e interviniendo en numerosos procesos fisiológicos, además de activar la expresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas de resistencia (Lawrence *et al.*, 2005, pp. 79). La deficiencia de calcio promueve la actividad poligalacturonasa, la cual cataliza la matriz pectato de la pared celular. Esto permite la fuga de solutos orgánicos e inorgánicos a través de la bicapa lipídica. Como resultado de esto se ponen en riesgo los procesos metabólicos formación de tejidos y por consiguiente la expresión génica (Lawrence *et al.*, 2005, pp 79).

Análisis moleculares mediante pruebas histoquímicas han demostrado que un exceso de calcio en plantas de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh activa la expresión del gen *PDF1.2*, por lo tanto se activa la defensa contra infección de patógenos necrotróficos (Borja, 2014, pp. 40-43).

1.2 Planteamiento del problema

Desde el siglo XIX se han incrementado el uso de tecnologías y la demanda de alimentos ha aumentado debido al crecimiento exponencial de la población.

Se estima que la población mundial aumentará más de un tercio de la población actual para el 2050. La agricultura se considera una de las actividades más importantes para los seres humanos ya que provee de alimentos y materias primas a toda la población (FAO, 2009). La aplicación de pesticidas ha sido una práctica muy frecuente en los últimos años ya que es una solución a muchos problemas, pero la necesidad de mejorar el medio ambiente y la salud pública conlleva al desarrollo de nuevas estrategias e investigaciones.

El uso excesivo de pesticidas en la agricultura ha ocasionado daños al ecosistema, alterando la composición de los alimentos y dañando el suelo, esto afecta la salud de los consumidores y de los agricultores (FAO, 2009).

Las plantas interactúan con patógenos y plagas que contienen diferentes factores de virulencia para producir enfermedades (Huber, 2007, pp. 111-114). Algunos estudios realizados han demostrado que cuando existe una gran cantidad de patógenos en el ecosistema de la planta, estas activan un mecanismo de defensa llamado Resistencia Sistémica Inducida (ISR), este mecanismo activa un conjunto de genes, algunos de los cuales codifican defensinas con actividad microbiana (Pieterse, Van der Does, Leon-Reyes, y Zamidoudis, 2012, pp 53-55).

La nutrición de las plantas determina su resistencia, estructura morfológica, histológica y susceptibilidad frente a patógenos. Muchas de las interacciones de los minerales tienen un rol importante en la defensa de las plantas que pueden verse afectadas si estas se encuentran en diferentes concentraciones (Horsfall y Cowling, 1980, pp 14-18).

Los elementos minerales se involucran de manera directa en los mecanismos de defensa de las plantas, ya que estos son componentes integrales de las células, enzimas, sustratos, transportadores de electrones, inhibidores y reguladores del metabolismo celular (Horsfall, 1980, pp 14-16).

El calcio tiene un papel fundamental en el crecimiento celular, estabilidad y resistencia de la membrana. Este genera señales de respuesta a diversos factores ambientales como el frío, salinidad, sequedad y mecanismos de estrés (Dobermann y Fairhurst, 2000, pp. 175-179).

Los ensayos con medios nutritivos en *Arabidopsis thaliana* pueden dar un gran aporte a la ciencia ya que se elaboran modelos de naturaleza predictiva de la defensa innata de las plantas frente a diversos patógenos, lo cual conlleva a mejorar el rendimiento de los cultivos. Esta investigación puede dar un gran aporte para entender de mejor manera que efectos tiene el calcio en las distintas rutas de defensa (SA y JA) y así suministrando una correcta nutrición a las plantas se puede evitar el uso excesivo de agroquímicos.

1.3 Objetivo general

Evaluar la expresión de genes de defensa *VSP2*, *LOX2*, *PR1* Y *PDF1.2* en *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh, frente a diferentes medios nutritivos y concentraciones de calcio.

1.4 Objetivos específicos

Determinar el mejor medio nutritivo para la inducción de la expresión génica en los genes *PDF1.2*, *VSP2*, *LOX2*, *PR1* en la línea Col-0.

Comparar la expresión de los genes *PDF1.2*, *VSP2*, *LOX2*, *PR1* en una línea mutante de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh.

1.5 Justificación

Las plantas viven en ambientes complejos en la cual interactúan con diferentes organismos como insectos herbívoros, patógenos fúngicos y simbiosis con otros organismos (Verhage, Van Wees & Pieterse, 2010, pp, 537-539).

El incremento en el uso de pesticidas ha aumentado la resistencia de las plagas. Esto afecta al ecosistema en donde habitan plantas, animales y seres humanos. La aplicación de pesticidas ha sido una práctica muy frecuente en los últimos años ya que son una solución a muchos problemas, pero la necesidad de mejorar el medio ambiente y la salud pública conlleva al desarrollo de nuevas estrategias e investigaciones.

La resistencia es una característica genética que permite a los patógenos sobrevivir a altas dosis de plaguicida. La teoría (Flor, 1942, pp. 45-51), de gen por gen se refiere a que cada gen condiciona la enfermedad en el huésped existe un gen específico en el patógeno atacante. La resistencia a enfermedades pueden ser de carácter mono génico o poli génico, la monogénica se determina por un solo gen mientras que la poligénica se determina por varios genes (Flor, 1942, pp. 45-51).

Arabidopsis thaliana (L) Heynh es considerada un organismo modelo a nivel internacional (Pieterse, 2009, pp. 308-313). Esto se debe gracias a su corto periodo de reproducción, tamaño, alta producción de semillas viables, genoma pequeño y secuenciado; disponible en bases de datos. Es por esto que esta planta es la adecuada para hacer modelamiento en estudios de nutrición vegetal e interacción planta patógeno.

Ensayos dan indicios de que el calcio es un macronutriente muy importante en la defensa de las plantas frente a patógenos y que con una correcta nutrición de los cultivos se podría evitar el uso excesivo de agroquímicos.

Por lo tanto este estudio se basa en encontrar una relación entre el efecto de la nutrición vegetal sobre la inducción de los genes de defensa para poder elaborar un modelo predictivo sobre qué ocurre con las rutas del SA y JA al suministrar nutrientes a la planta con un exceso de calcio 5X. Con los resultados de esta investigación se pueden desarrollar nuevas fórmulas para brindar una correcta nutrición a las plantas, y así éstas mediante mecanismos propios se puedan defender de los patógenos que puedan afectar su crecimiento.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh : generalidades y taxonomía

Se considera un organismo modelo a cualquier organismo que sea efectivo para realizar experimentaciones y que se puedan obtener conclusiones aplicables a otras especies (Hartwell, Hood, Godberg, Reynolds, Silver, y Veres, 2008, pp. 89-92). *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh (Tabla 1) es el primer candidato en el reino Plantae, ya que posee una serie de características que la hacen apta para la investigación científica (Venegas, 2013, pp. 12-15). Esta planta es parte de los organismos modelos eucarióticos, ya que tiene algunas características favorables como el rápido crecimiento, floración y producción de semillas. Puede producir de 10.000 a 40.000 por planta, la temperatura adecuada para su crecimiento es de 22-26°C. Gracias a todas sus características, se puede cultivar sin condiciones específicas para su crecimiento.

Tabla 1

Clasificación taxonómica *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Brassicaceae
Género	<i>Arabidopsis</i> Heynh
Especie	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh

Tomado de (USDA, 2012).

2.1.1 Estructura y su ciclo de vida

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh es una angiosperma, dicotiledónea perteneciente a la familia de las Brasicáceas. Esta familia se conforma por 200 géneros y 2000 especies, muchas de estas tienen importancia económica. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh es una planta herbácea, que tiene un ciclo de vida característico de las plantas con flores (Somerville y Koornneef, 2002, pp. 76-79). Su desarrollo vegetativo empieza a partir de la germinación, posteriormente las estructuras aéreas se desarrollan con las hojas verdaderas que tienen forma de roseta, las hojas tienen una longitud de hasta 2 cm de largo y 0.5 cm de ancho (Passardi, Dobias, Valério, Guimil, Penel y Dunand, 2007, pp.87-99).



Figura 1. Col-0 Arabidopsis thaliana.

La segunda etapa es la fase reproductiva, la cual se da a partir del tallo basal de la roseta del que emerge un tallo floral que tiene una altura de 10 y 30 cm. También posee tallos florales secundarios que poseen hojas caulinares más pequeñas que las principales; cada una de estas desarrolla inflorescencias secundarias y terminales con flores en racimo. Las flores producen pedúnculos de los frutos maduros los cuales estarán separados entre ellos. Las flores son hermafroditas y tienen unos 0.5 cm de diámetro; poseen cuatro pétalos blancos, cuatro sépalos y seis estambres (O'kane y Al-Shehbaz, 1997, pp. 45-48).



Figura 2. Arabidopsis thaliana en la naturaleza.

Tomado de In botanical mood, 2016.

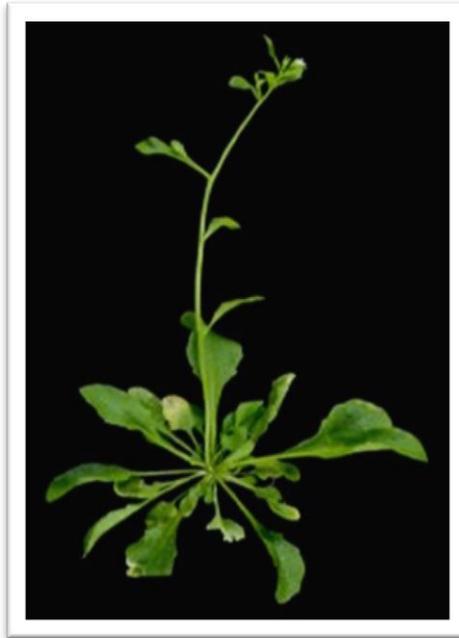


Figura 3. *Arabidopsis thaliana* en fase floral.

Tomado de Siddiqui Lab, s.f.

2.2 Características moleculares de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh

El genoma de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh está compuesto por 125Mb, es uno de los genomas más pequeños en el reino Plantae (The Arabidopsis genome initiative, 2000). Su genoma fue totalmente secuenciado en el año 2000 (The Arabidopsis genome initiative, 2000, pp 45-50). Contiene cinco cromosomas, sus genes son similares a otras plantas. El DNA nuclear de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh está compuesto por cinco cromosomas (Figura 4) (Hartwell; etal, 2008, pp. 89-90). Gracias a la secuenciación de todo su genoma *Arabidopsis thaliana* es un excelente modelo para el análisis genético y molecular (The Arabidopsis genome initiative, 2000, pp 48-50).

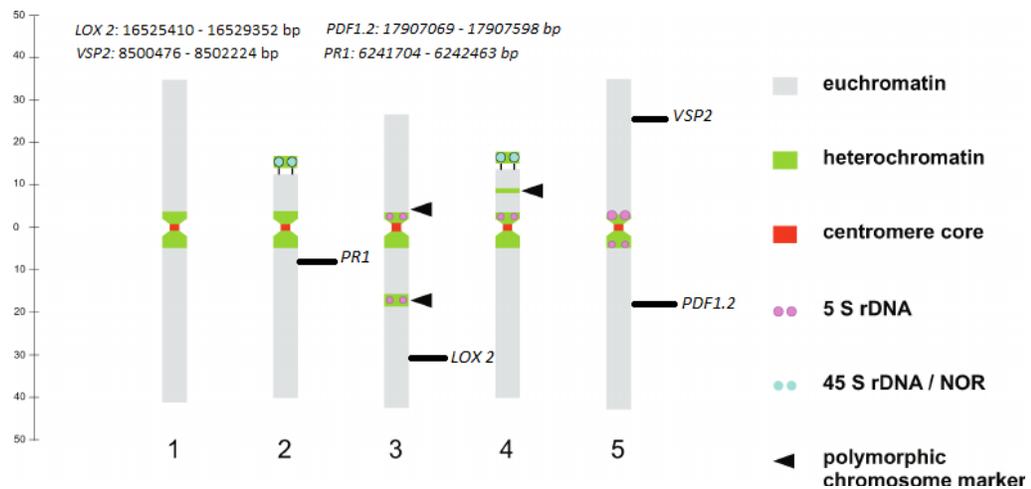


Figura 4. Cromosomas de *Arabidopsis thaliana*, con los genes a evaluar.

Adaptado de (ncbi, 2003).

Gracias a todas sus características (Figura 5) se han realizado mutagénesis directa para generar líneas mutantes y así se puede conocer la alteración de un gen en concreto (Becerra, 2006). Se puede transformar genéticamente con *Agrobacterium tumefaciens* (Hartwell; etal, 2008).

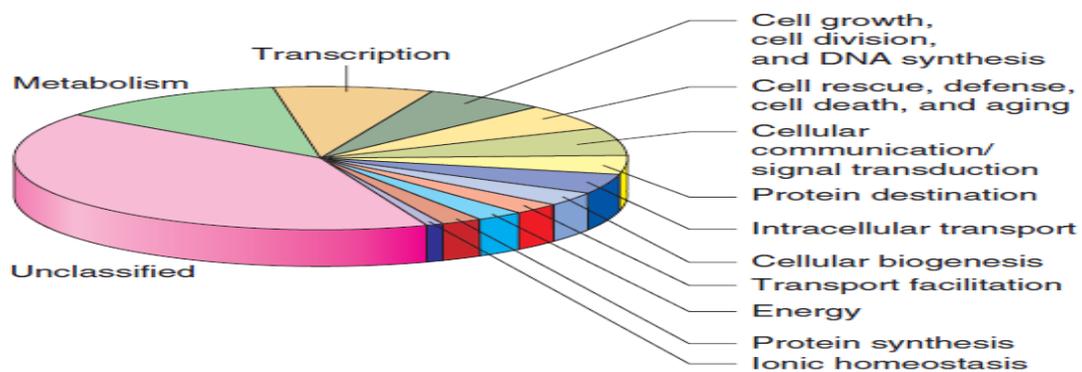


Figura 5. Análisis funcional de los genes de *Arabidopsis thaliana* (L).

Tomado de (twirpx, 2008).

2.3 Línea mutante de *Arabidopsis thaliana*, genes de defensa y genes PR

La línea Col-0 es tipo silvestre y no tiene ningún tipo de mutación evidente. Derivadas de esta existen varias líneas mutantes para el estudio de diversas rutas implicadas en la señalización de defensa; El SA altera el estado *redox* del citosol, y esto conlleva a la inactivación oligomérica de la proteína *Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1)* y se convierte a su forma monomérica activa. Esto ocasiona la expresión en los genes de defensa *PR1* y *PR2* (Verhage, Van Wees y Pieterse, 2010, pp. 537-540).

El JA se deriva de los lípidos de la membrana de los cloroplastos, y este es percibido por el receptor *Coronatine insensitive 1 (COI-1)*. Esta es una proteína F-BOX y forma parte de la ligasa ubiquitina E3 del complejo de degradación *SCF/COI1*. Este degrada mediante ubiquitinación a la proteína jasmonato Zim-domain (JAZ); este complejo forma parte del complejo receptor del JA el cual suprime los factores de transcripción de los genes *MYC2*, *ERF1* y *ORA59* (Figura 6) El gen *MYC2* es encargado de regular un conjunto de genes entre los cuales se encuentran *VSP2* y *LOX2*, mientras que *ERF1* y *ORA59* son regulados por el gen *PDF1,2* (Leon-Reyes, et al , 2010, pp 5-7).

Los genes PR (*Pathogenesis related proteins*) son proteínas ácidas que intervienen en la inhibición del crecimiento y detienen la multiplicación de los patógenos. Los genes PR son regulados por el desarrollo de la planta (Boller y Meins, 1992). A estos genes se les clasifica dependiendo de la secuencia de aminoácidos que poseen, actividad enzimática, actividad biológica y la relación serológica (Pieterse y Van Loon, 1999, pp 284-290). Aplicaciones exógenas de SA dan como resultado la acumulación de proteínas PR y en la activación de SAR. (Iris, Pennickx, Eggermont, Franky, Terras, Bart, Thomma, De Samblanx, Métraux, Mannes y Broekaer, 1996, pp 65-78). Según Wang la expresión de los genes PR activa la respuesta sistémica adquirida (SAR), su estudio demostró que el gen *NPR1* también controla la expresión de genes que controlan la secreción de

proteína, la regulación de estos genes es esencial para la (SAR), debido a que estas mutaciones disminuyen la secreción de proteínas PR, lo que da como resultado una reducción en la resistencia (Wang, Weaver, Kesarwani y Dong, 2005, pp. 145-153). *NPR1* se encarga de regular la respuesta del SA y JA (Grant y Lamb, 2006, pp. 199-210).

El gen *VSP2* posee una actividad fosfatasa ácida en presencia de cationes divalentes (Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}), el gen responde al ácido abscísico, ácido jasmónico, sal, deficiencia de agua y heridas (Van Loon, 2009, pp. 136-138). Algunos estudios han demostrado que los genes VSP son inducidos por estrés ambiental, heridas, tratamientos con metil jasmonato (MeJA), coronatina y sucrosa (Utsugi, Sakamoto, Murata y Motoyoshi, 1998, pp. 145-159). *A. thaliana* acumula más VSP mRNAs en las flores que en cualquier otro órgano (Utsugi, et al., 1998, pp. 342-349).

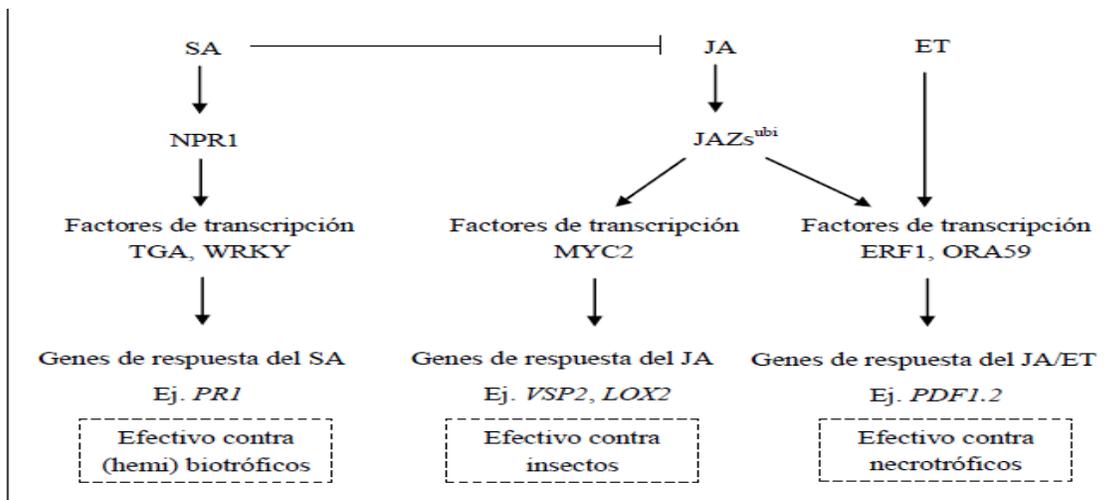
El gen *PDF1.2* codifica una defensina dependiente de ácido jasmónico y etileno; se expresa al tener contacto con el patógeno fúngico (Boller y Meins, 1992, pp. 342-349). Este no se expresa frente a los tratamientos de ácido salicílico pero si presenta respuesta al etileno o metil-jasmonato (Glazebrook et al., 1997, pp. 56-63).

Las lipooxigenasas son enzimas que catalizan la oxigenación de los ácidos grasos polinsaturados para formar ácidos grasos HPOs. Las plantas poseen distintas isoformas de LOX, esto probablemente se debe a que las plantas emplean una ruta biosintética para la formación de compuestos bio activos que tienen una función en tejidos y tiempo definidos (Mochizuki, Sugimoto, Koeduka y Matsui, 2016, pp. 79-86).

LOX cataliza la conversión de ácido linoleico a ácido 13-hidroperoxilinoico. Se han identificado dos genes *AtLox1* y *AtLox2* de *Arabidopsis thaliana* que se expresan en hojas, raíces, inflorescencias y semillas jóvenes. El gen *AtLox2* mRNA, se ha expresado mayormente en hojas e inflorescencias. La reducción de

la expresión de *AtLox2* no causa cambios físicos en el crecimiento de la planta (Creelman y Mulpuri, 2002, pp. 153-162). El gen *LOX2* es necesario para la acumulación de ácido jasmónico y requiere para la síntesis inducida por lesión de ácido jasmónico (JA) en hojas, es esencial para la formación de ácido jásmonico cuando ocurre alguna herida (Bannenberg, Martinez, Hamberg, y Castresana, 2009, pp. 243-254). Este gen es parte de los genes (LOXs), los cuales se encargan de catalizar la oxigenación de los ácidos grasos. La transcripción del gen *LOX2* se da gracias a la respuesta del JA (Figura 6) (Bell, Creelman y Mullet, 1995, pp. 342-253).

Se sabe que los genes *VSP2* y el *LOX2* son controlados por el factor de transcripción *MYC2* (figura 6). La diferencia entre estos es que el gen *LOX2* codifica una lipooxygenasa que cataliza la oxigenación de los ácidos grasos polinsaturados formándose compuestos bioactivos. Además estos compuestos tienen una función en tejidos definidos (Mochizuki, Sugimoto, Koeduka y Matsui, 2016, 82-85), mientras que el gen *VSP2* tiene una actividad fosfatasa ácida y una actividad frente al ataque de insectos. La función de cada gen puede estar relacionada con el nivel de expresión ya que se localizan en diferentes tejidos.



Abreviaturas: SA, ácido salicílico; JA, ácido jasmónico; ET, etileno; NPR1, proteína *nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*; $JAZs^{ubi}$, ubiquitinación de la proteína JAZ; TGA, WRKY, MYC2, ERF1, ORA59, factores de transcripción; *PR1*, *VSP2*, *LOX2*, *PDF1.2*, genes marcadores de defensa.

Figura 6. vías metabólicas de la inducción de resistencia.

Tomado de (Venegas, 2013 pp. 34).

El gen *CO11* (*Coronatine Insensitive 1*) codifica una proteína que actúa como receptor en la ruta del jasmonato (Van Loon, 2009, pp. 136-138). El mutante *coi1-21* es insensible al JA/MeJA ya que codifica una proteína con repeticiones de leucina y esto ocasiona que se degenere la F-box. Un solo aminoácido modificado suprime la formación de los complejos SCF(CO11) (Ellis y Turner, 2002; Van Loon, 2009; (Xin, Feys, James, Nieto-Rostro y Turner, 1998; TAIR, 2016). Algunos mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn han sido modificados para tener características específicas (Bari y Jones, 2008, pp 135-139). Esta línea inactiva las respuestas metabólicas que tienen que ver con la respuesta a ácido jasmónico en respuesta un factor de virulencia llamado coronatina (COR), la cual es una fitotoxina producida por *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* PG4180 (Van Loon, 2009, pp. 140-150). La línea *coi1-21* es un mutante de *coi1* que posee sensibilidad reducida al jasmonato/MeJA (Van Loon, 2009, pp. 146-155).

2.4 Medios nutritivos

Los medios nutritivos se utilizan para cultivar especies en medios artificiales y así poder tener condiciones controladas (Conn *et al*; 2013). (Conn, Hocking, Dayod, Xu, Athman, A. Hederson, S. Aukett, L. Conn, V. Shearer, Fuentes, Tyerman, y Gilliam, 2013, pp 54-70). La nutrición vegetal es un factor muy importante para la agricultura, este se refiere al suministro, absorción, disponibilidad, translocación y la utilización de la materia orgánica (Fageria, 2009, pp. 111-114).

La regulación del crecimiento en las plantas ocurre en dos fases: la célula y el organelo (Feng, Lindner, Robbins y Dinneny 2016, pp. 342). En el cultivo hidropónico se utilizan este tipo de soluciones ya que contienen los nutrientes esenciales para los cultivos y los cuales tienen un mejor rendimiento. Un medio de cultivo debe estar compuesto macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, fuentes de carbono y reguladores de crecimiento (Saad y Elshahed, 2012, pp. 312-313). Entre los elementos más importantes se encuentran el nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio, hierro, boro, manganeso, cobre y zinc (Saad y Elshahed, 2012. pp. 312-313). De acuerdo con la asociación internacional de fisiología vegetal los elementos que se encuentran en concentraciones mayores a 0.5 mM^{-1} están categorizados como macroelementos y los elementos con concentraciones menores a 0.5 mM^{-1} se consideran microelementos. Estos de deben tener propiedades químicas adecuadas como la alcalinidad, acidificación y características osmótica (Murashige y Skoog, 1962, pp. 184-193) Las características nutricionales pueden variar dependiendo de la especie.

2.4.1 Hoagland

La solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950, pp 23-24), es un medio nutritivo que se utiliza para medios hidropónicos y es una de las soluciones más utilizadas en el campo de la ciencia.

Las investigaciones que se han podido realizar en cuanto a la nutrición vegetal con medio nutritivo Hoagland han sido variadas. Se han podido determinar los elementos más importantes para la nutrición vegetal que son usados en cultivo hidropónico. Desde la creación del medio nutritivo Hoagland se han podido realizar una variedad de investigaciones para resolver problemas como la tolerancia a la salinidad y a los metales pesados. (Forde, Harper y Kochian, 2004, pp. 136-143).

Este medio de cultivo brinda a la planta una dosis adecuada de nutrientes tanto como macronutrientes y micronutrientes. Se utiliza mucho para ensayos con tomate y pimiento (Hoagland y Arnon, 1950, pp. 25-28).

2.4.2 Murashige & Skoog

Este medio de cultivo es utilizado en laboratorios para realizar cultivos celulares. Fue creado por dos científicos Murashige & Skoog (Tabla 3) con el objetivo de crear un regulador de crecimiento para las plantas (Daton, Iqbal y Turner, 1983, pp. 312-313). Está compuesto por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, sales orgánicas, azúcares y reguladores de crecimiento (Murashige y Skoog, 1962, pp.184-185). El compuesto más importante de la solución es el nitrógeno que está compuesto por nitrato de amonio en este caso. Cuando la fuente de nitrógeno es suplementada de forma individual, afecta de forma negativa al crecimiento y a la generación de metabolitos (Ertola, 1994, pp. 111).

2.5 Nutrición en plantas

Los nutrientes minerales son aplicados a los cultivos para aumentar su rendimiento y calidad para distintos fines como lo son la agricultura, horticultura y aplicaciones ambientales. La nutrición de las plantas determina su tamaño y resistencia frente a distintos patógenos. Los minerales son una de las más importantes líneas de defensa para las plantas (Figura 7), (Huber y Haneklaus, 2007, pp. 121-125).

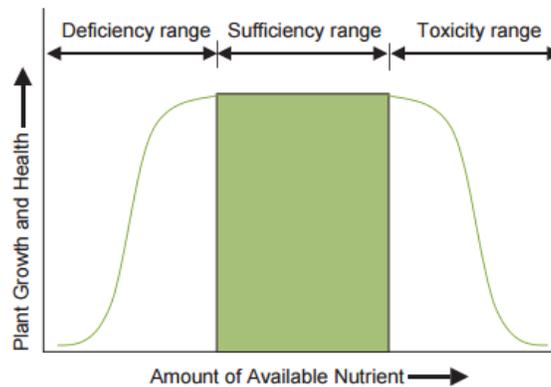


Figura 7. Relación entre el crecimiento de la planta y la cantidad de nutrientes.

Tomado de (Brady y Weil, 2002, pp. 43).

2.5.1 Estrés nutricional de las plantas

En muchos lugares del mundo existen los monocultivos y la aplicación de pesticidas es necesaria ya que las condiciones metabólicas de las plantas han cambiado debido al exceso o deficiencia de nutrientes (Barker y Pilbeam, 2015, pp. 31-39). Esto genera un grave problema ya que se necesita una gran cantidad de energía y recursos, entre los más utilizados se encuentran el nitrógeno y el fósforo (U.S. Geological Survey, 2016, pp. 3). Las concentraciones de los diferentes macro y micro nutrientes varían dependiendo de la especie, debido a esto es muy importante el efecto de acumulación de minerales en los diferentes cultivos (Barker y Pilbeam, 2015, pp. 21-25).

El primer paso para el diagnóstico de estrés se puede predecir observando el funcionamiento y rendimiento de la planta. El estrés nutricional de las plantas se puede identificar de tres maneras: 1) análisis del suelo, 2) análisis de la planta, 3) observaciones visuales. Las primeras dos maneras de identificación son cuantitativas y la última es cualitativa (McCauley, Jones y Jacobsen, 2011, pp. 243-256).

La deficiencia ocurre debido a que algunos nutrientes esenciales no están disponibles para la planta y afecta sus condiciones y crecimiento y de defensa frente a los patógenos. Las deficiencias más comunes son las de nitrógeno (N), fósforo (P) y calcio (Ca) (McCauley, *et al.*, 2011, pp. 257).

Existen cinco categorías para determinar síntomas afectados por deficiencia de nutrientes: 1) retraso en el crecimiento, 2) clorosis foliar, 3) clorosis intervenal, 4) coloración rojo-púrpura 5) necrosis (McCauley, *et al.*, 2011, pp. 258).

2.6 Calcio

El calcio es un macronutriente esencial en las plantas (Steinhorst y Kudla, 2013, pp. 64-67). Los cambios en las concentraciones intracelulares del calcio controlan diversos procesos en los animales, plantas y levaduras. Una de sus funciones principales es actuar como mensajero intracelular en su forma iónica (Ca^{2+}) y también forma parte de la pared celular y membranas (Kudla, Batistic y Kenji, 2010, pp. 142-145). La concentración basal en el citosol de las plantas es de aproximadamente 100-200 nM (Knight, 2000, pp 54-55). Otras funciones del calcio en las plantas están relacionadas con el alargamiento celular, regulación estomática, procesos metabólicos, fortalecimiento de la pared celular, protección a las plantas contra el estrés de temperaturas altas, y protección a las plantas contra enfermedades entre otras. Existen algunos factores que afectan la disponibilidad del calcio en las plantas, como el pH del suelo, la capacidad de intercambio catiónico o la existencia de iones competidores como el sodio (Na^+), potasio (K^+) o magnesio (Mg^{+2}) (Steinhorst y Kudla, 2013, pp. 88-89).

La movilidad del calcio se lleva a cabo en el xilema, y se realiza en conjunto con ayuda del agua; por lo tanto la absorción del calcio está relacionada con la tasa de transpiración de las plantas y los síntomas aparecen principalmente en las hojas jóvenes (White y Broadley, 2003, pp. 87-90). Cuando existen condiciones de humedad alta, frío o bajas tasas de transpiración se puede originar una deficiencia

de calcio. Otro factor que puede influir en la absorción del calcio es la salinidad del suelo, ya que disminuye la absorción del agua (McAinsh y Pittman, 2009, pp. 90).

El calcio al ser un elemento esencial tiene un rol elusivo en las plantas. Uno de los roles más importantes del calcio es en la pared celular, la cual juega un papel esencial en la reticulación de residuos ácidos de pectina (McAinsh y Pittman, 2009, pp. 54). Otra función está en la membrana celular, en donde si hay un nivel bajo de calcio, aumenta la permeabilidad de la membrana. (Hepler, 2005, pp. 75).

Cuando existe un estrés biótico como choque térmico, enfriamiento, sequía o salinidad, se da un incremento en la concentración del calcio en el medio intracelular. Por lo tanto, el calcio que se encuentra en el citosol actúa como un punto de convergencia para interactuar con diferentes señales (Bowler y Eluhr, 2000, pp. 47-48). La homeostasis de calcio intracelular se encuentra modulada por las respuestas que la planta tiene frente a los patógenos (Bowler y Eluhr, 2000, pp. 49). Se sabe que el calcio es un posible mediador del SA, reportes indican que el calcio es esencial para el correcto funcionamiento del SA, en el proceso de defensa de las plantas (Kawano y Furuichi, 2007, pp. 11-13).

Cuando existe un aumento en la concentración citosólica del calcio pueden ocurrir diversos tipos de respuestas; se dice que una elevada concentración de calcio puede actuar iniciando un proceso de señalización, codificando información específica ya que la célula tiene diversos mecanismos para incrementar la concentración de calcio citoplasmático gracias a la respuesta de las proteínas (Whalley y Knight, 2012, pp. 53-55).

Los niveles adecuados de calcio para el crecimiento de las plantas en su hábitat natural son de 0.1 al 5 % de su peso seco (McAinsh y Pittman, 2009, pp. 243-245). La deficiencia de calcio es muy rara en la naturaleza, pero puede ocurrir en suelos con baja saturación de compuestos básicos o altos niveles de deposición ácida (White y Broadley, 2003, pp.). Todo lo contrario ocurre en la agricultura, en donde la deficiencia de calcio afecta la productividad de los cultivos. Esto ocurre debido a

que el calcio no puede movilizarse de los tejidos viejos hacia los nuevos mediante el floema, dando como resultado el movimiento de calcio, el cual es dependiente de la transpiración (White y Broadley, 2003, pp. 90-91).

Se ha observado también que los niveles bajos de calcio pueden verse asociados con la deficiencia de hierro. Esto incluye síntomas como crecimiento limitado de las raíces, necrosis de las hojas, debilidad de la pared celular, entre otras. Se han determinado dos aspectos importantes que tiene el calcio en las plantas: el primero es la estabilidad de la pared celular, en donde el calcio tiene un rol en el entrecruzamiento de los residuos acídicos de pectina; y el segundo es el sistema de la membrana celular, en donde niveles bajos de calcio incrementan la permeabilidad de la membrana plasmática (Hepler, 2005, pp. 77).

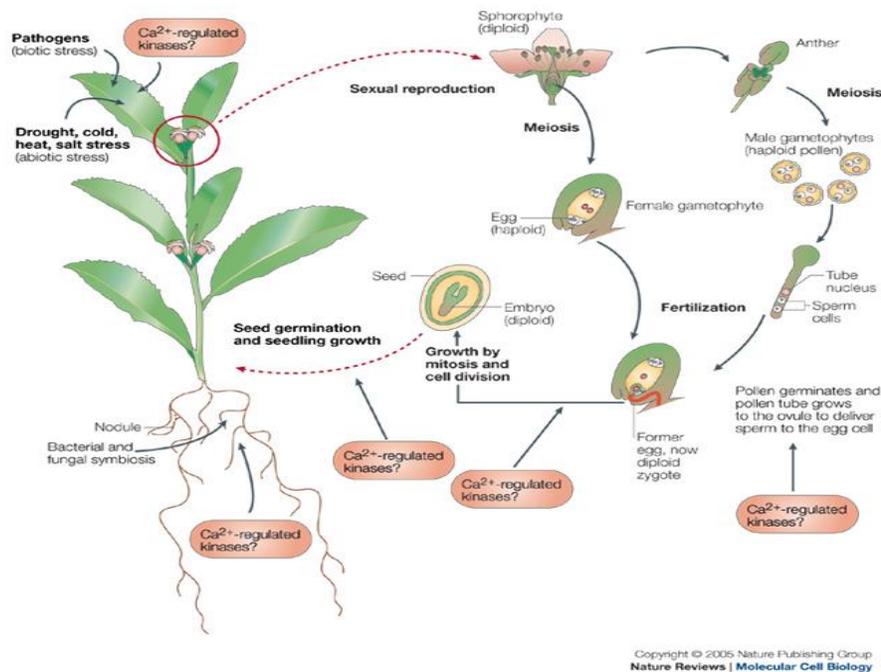


Figura 8. Funciones biológicas del calcio (Ca^{2+}), proteínas reguladoras de kinasas durante el ciclo de vida de la planta.

Tomado de (nature, 2005).

Estudios indican que el calcio y las especies reactivas de oxígeno, tienen en respuesta al estrés biótico y abiótico (Gilroy, Suzuji, Miller, Choi, Toyota, Devireddy y Mittler, 2014, pp.12-15).

La homeostasis del calcio se mantiene gracias a proteínas de extrusión (ATPasas) y anti portadores de calcio. Esto se debe a que el calcio es toxico para la células eucarióticas, en concentraciones entre rangos de (50-100nM) (Bowler y Fluhr, 2000, pp. 50).

El calcio posee un conjunto de sensores de proteínas que ayudan a detectar y decodificar información (Batistič y Kudla, 2011, pp. 85-90). Este conjunto de proteínas se denomina “*EF hands*”, que es un dominio de proteínas que está representado por las familias: calmodulina (CaM), “*calmodulin-like protein*” (CML), proteínas dependientes de kinasas (CDPK) (Figura 8) y calcineurina B (CBL). Todas estas familias de proteínas tienen la función de reconocer las señales en respuesta a la concentración de calcio y al efecto del mismo (Beneloujaephajri, Costa, L' Haridon, Métraux y Binda, 2013, pp. 145-150).

Se han establecido parámetros específicos en donde el calcio tiene afinidad a determinada concentración celular y sub celular; pero aún no se ha determinado la regulación de las proteínas implicadas en estos mecanismos (Batistič y Kudla, 2011, pp. 89-91)

Las señales de transducción del calcio se dan en los siguientes pasos: 1) Los receptores de la membrana reciben señales 2) Se da la generación de mensajeros secundarios 3) Se realiza la fosforilación/ desfosforilación de proteínas que dan como resultado las señales para los factores de transcripción que regulan los genes y finalmente 4) tolerancia al estrés para la adaptación de la planta y otras respuesta fenotípicas (Batistič y Kudla, 2011, pp. 92).

Según Beneloujaephajri y colaboradores (2013, pp.165), el calcio es un mensajero celular que efectúa señales si existe una lesión y se acumula en el citosol después

de haberse producido alguna lesión. Lo cual conlleva a cambios transitorios en las concentraciones de calcio, seguida de la activación de ROS y cambios en la oxidación celular.

2.7 Actores hormonales en la defensa vegetal

Las plantas al contrario de los animales no pueden escapar de diversos factores ambientales como lo son el estrés osmótico, sequia, salinidad, bajas temperaturas, altas temperaturas, inundaciones, falta de nutrientes, exceso de metales pesados y radiación. (Ballare, 2014, pp. 325-326). Este estrés abiótico en las plantas da como resultado la producción de hormonas vegetales y metabolitos secundarios (figura 9) (Marshper, 2012, pp.75-77). Estas intervienen en el proceso de crecimiento de las plantas y generan señales para que éstas se puedan defender de los patógenos y diversos factores ambientales (Khan, Nazar, Iqbal, Anjum, 2012, pp. 99-101). Las hormonas vegetales juegan un papel importante en la regulación de los procesos metabólicos, debido a que se producen respuestas a factores bióticos o abióticos (Pieterse et al, 2012, 56-58). Se han identificado diversos procesos en los cuales están implicados algunos componentes como lo son el ácido salicílico (SA), ácido jasmonico (JA) y el etileno (ET) (Bary y Jones, 2008, pp. 89-97)

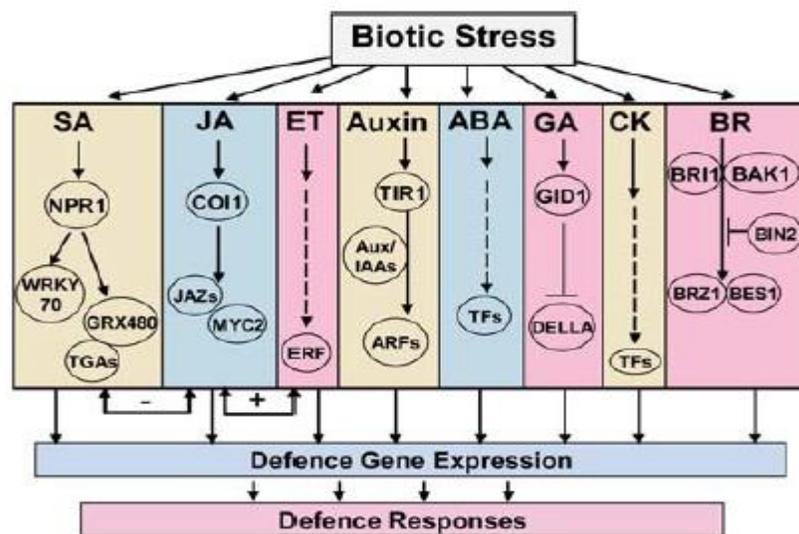


Figura 9. Reguladores hormonales que están envueltos en la señalización después de un estrés biótico.

Tomado de (ScienceDirect, 2008).

Se han reportado que las rutas de defensa de SA y JA son antagonistas (Figura 10) (Espoel, *et al*, 2003, pp. 157-159) (Lorenzo y Solano, 2005, pp. 213-215)

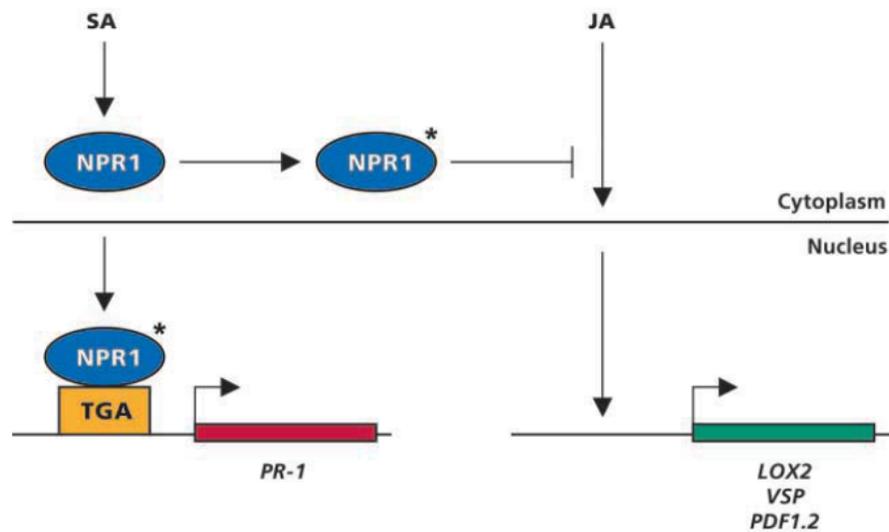


Figura 10. Antagonismo entre el SA y JA.

Tomado de (ncbi, 2003).

2.8 Hormonas vegetales

2.8.1 Ácido jasmónico

El ácido jasmónico (figura 11) es parte de los jasmonatos, los cuales son ciclopentanonas que aumentan sus niveles gracias a las perturbaciones mecánicas, ataques de patógenos o infecciones. Se sabe que los jasmonatos actúan con mecanismos de defensa frente a diferentes tipos de estrés y patógenos. Este es un metil-éster que está regulado por la vía metabólica de los

jasmonatos que se genera a partir de ácido α -linoleico (Pieterse *et al*, 2012, pp. 59-61); también se regula gracias a los estímulos externos y a la expresión de genes (Khan *et al*, 2012, pp. 102-103). El JA puede ser metabolizado a metil jasmonato (MeJA), debido a la actividad de JA carboximetil transferasa (JMT) (Pieterse *et al*, 2012, pp. 55-58); Gracias a mutantes de *Arabidopsis* se ha comprobado el requerimiento que tienen las plantas para poder sobrevivir a ataques de insectos y patógenos, así como para otras funciones metabólicas (Cruz, Melgarejo y Romero 2009, pp. 232-234).

Las concentraciones de JA en las plantas varían a la función, tejido y estímulos externos (Jordán y Casaretto, 2006, pp. 65-67). Concentraciones mayores a 50 μ M inducen la senescencia en cultivos celulares. El JA influye en varios aspectos del crecimiento y desarrollo, este puede influenciar en la senescencia e inhibir la germinación (Creelman y Mullet, 1995, pp. 242-243). La senescencia incluye la pérdida de clorofila, degradación de proteínas en los cloroplastos como la ribulosa, bifosfato carboxilasa, y la acumulación de nuevas proteínas (Creelman & Mullet, 1995, pp. 243-244). Los niveles más altos de JA en tejidos de plantas se han reportado en flores y tejidos reproductores; mientras que los niveles más bajos se han encontrado en raíces y hojas maduras. La oxigenación de α -LeA es la primera etapa para la biosíntesis del JA (Wasternack y Hause, 2013, pp. 143-146). El oxígeno es introducido en la posición C-13 por una lipooxigenasa. Según Glauser, (2009, pp. 32-34). *LOX2* es responsable de la formación de JA después de una lesión.

Los tres compuestos principales en la señalización del ácido jasmonico han sido (*COI1*) insensible a la coronatina, jamonato resistente (*JAR1*) y jasmonato insensitivo (*1MYC2*) (Bari y Jones, 2008, pp. 138-140). Los cambios en la expresión de los genes son inducidos por concentraciones nanomolares y micromolares del JA/JAMe. Los jasmonatos derivan del ácido linoleico en un proceso lipooxigenasa dependiente (Turner, Ellis y Devoto, 2002, pp. 75-79).

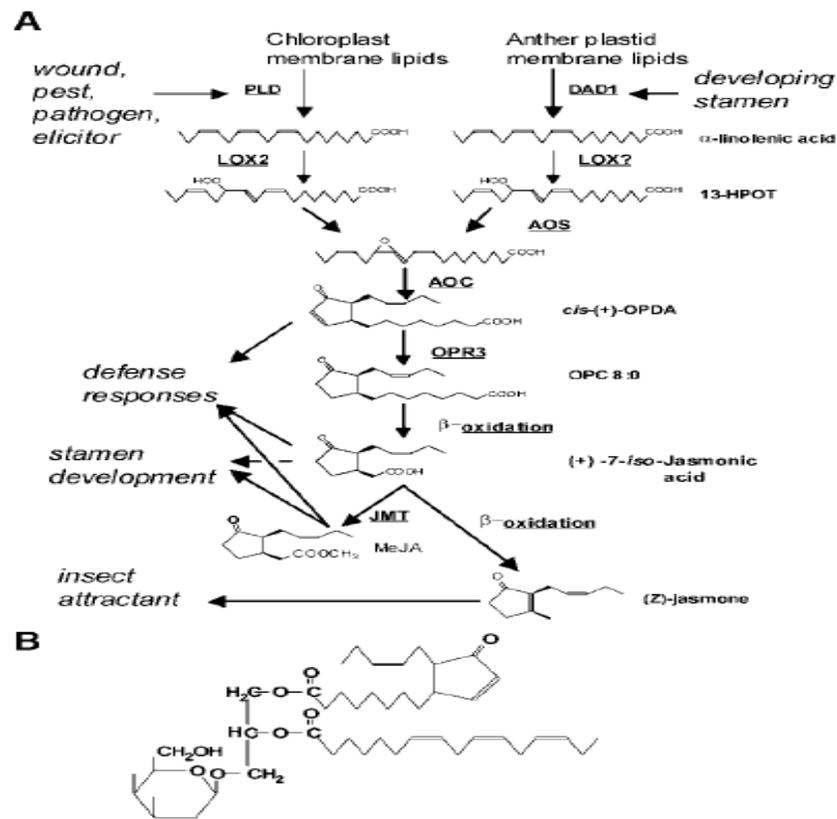


Figura 11. Ruta biosintética del JA.

Tomado de (plantcell, 2002).

2.8.2 Ácido Salicílico

El ácido salicílico (SA) es una molécula de señalización que se encuentra de manera natural en las plantas y está implicada en la respuesta al ataque de diferentes patógenos.

El ácido salicílico (SA), es un compuesto fenólico derivado de la fenilalanina. Es un compuesto de origen lipídico y actúa como molécula señal que se encargan de dar señales a la planta mediante diversas situaciones de estrés (sequía, salinidad, patógenos, plagas y heridas). El SA es un importante regulador de crecimiento en

las plantas ya que afecta los procesos fisiológicos (Jordán y Casaretto, 2006, pp. 131-134).

El SA es un metabolito primario sintetizado de ruta metabólica del corismato mediante dos distintas vías: fenilalanina amonio liasa (PAL) e isocorismato sintasa (ICS/SID2) (Pieterse, Van der Does, Zamiousdis, León-Reyes y Van Wees, 2012, pp.). Otros estudios proponen que el SA puede ser producido por la ruta del shikimato (Kawano y Furiuchi, 2007). Se dice que el ácido salicílico (SA), puede ser el responsable de dar origen a la muerte celular que se produce por la respuesta hipersensible (HR), SAR o expresión de genes de defensa (Cruz *et al*, 2009).

2.9 Sistema inmune de las plantas

Las respuestas metabólicas son producidas por cambios en los niveles fosfatos, azúcares u otros metabólicos. Estas respuestas se realizan para controlar el crecimiento y la distribución de los estomas. Entre los mensajeros más importantes para mediar la comunicación de las células se encuentran las señales eléctricas, moléculas de RNA, distintos compuestos volátiles como el metil jasmonato, diferentes tipos de péptidos y proteínas, reguladores de crecimiento como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), auxinas y ácido abscísico (Gilroy, Suzuji, Miller, Choi, Toyota, Devireddy y Mittler, 2014).

Las plantas tienen la capacidad de activar rutas metabólicas de defensa dependiendo del tipo de patógeno por las que se ven afectadas (Figura 9). El ácido jasmonico (JA) y el etileno (ET) dan respuesta al ataque de patógenos necrotróficos y el ácido salicílico es activado mediante la respuesta la patógenos biotróficos (León-Reyes *et al*, 2010). Los mecanismos de respuesta que son responsables en el reconocimiento y respuesta se ven envueltos entrecruzamiento de tres rutas metabólicas: JA, ET Y SA. Distintos elicitores son los responsables de la defensa entre estos se encuentran los carbohidratos polímeros,

glicopeptidos, glicoproteínas (Thakur y Singh, 2013). Después de la infección y la activación del elicitor este transmite señales y se da la producción de especies reactivas de oxígeno (AOS), fitoalexinas, compuestos fenólicos, depósitos de calosa, enzimas y proteínas PR, AOS permite que se dé una respuesta hipersensible (HR) en plantas que ya sido afectadas por el patógeno para posteriormente activar la respuesta sistémica adquirida (SAR) (Thakur y Singh, 2013).

Las plantas están expuestas a diversos tipos de factores estos pueden ser bióticos o abióticos. La activación de la defensa por parte de las plantas se da por mecanismos de reconocimiento en la cual la planta determina la presencia del patógeno (figura 13). Algunas sustancias como proteínas, carbohidratos y hormonas actúan como inductores (Jones y Dangl, 2006). Algunos estudios han demostrado que las plantas son resistentes a diversos tipos de estrés. Las plantas responden frente a los patógenos usando el sistema inmune innato el cual se diferencia en dos ramas (Figura 8) (Perochon, Aldon, Philippe y Ranty, 2011). La primera reconoce receptores transmembrana (PRR, Pattern recognition receptors) y responde a diversos tipos de microbios, estas moléculas se conocen como “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns), estos inducen a la expresión de genes de defensa y la segunda responde a patógenos con factores de virulencia (Jones y Dangl, 2006). Estos se encuentran en el patógeno e inducen las respuestas de defensa de las plantas mediante los genes *R* de resistencia. Los genes *Avr* son moléculas que los patógenos expresan y ayudan a que ocurra la infección, que puede variar desde microbios hasta efectores patogénicos. Con estas interacciones se da origen a señales que conllevan a la expresión de genes asociados a la defensa vegetal (Madriz, 2002).

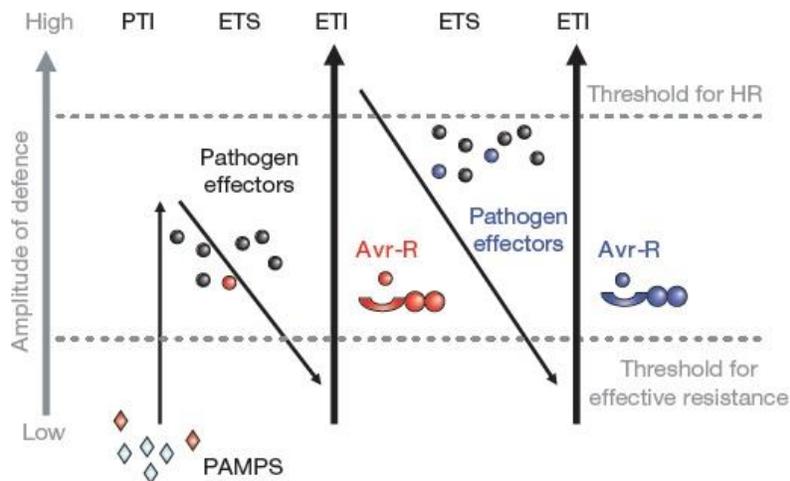


Figura 12. Modelo del sistema inmune de las plantas.

Tomado de (nature, 2006).

La activación de la defensa inicia en el reconocimiento por parte de la planta hacia las moléculas efectoras de los patógenos. La resistencia basal se da por el reconocimiento de los PAMP (Figura 12). La resistencia sistémica adquirida (SAR) da una protección debido a una infección secundaria que ha tenido la planta, es decir la primera vez que la planta fue atacada genera una resistencia para protegerse ante una segunda infección (Steinhorst y Kudla, 2013, pp 165). Existen dos etapas: la primera consiste en la inducción que brindan las defensas a las células cercanas que se encuentran en donde se realizó el ataque del patógeno y la segunda es la inducción de las defensas de los tejidos que se encuentran lejos del foco de infección. Este tipo de respuesta se caracteriza por acumular proteínas tipo PR y reguladores de crecimiento (JA y SA) a nivel local y sistémico (Durrant y Dong, 2004, pp 342). Este indica que el análisis de los genes PR es un indicador de SAR. Los estudios en SAR inducidos con SA se han realizado en mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Grant y Lamb, 2006, pp, 121).

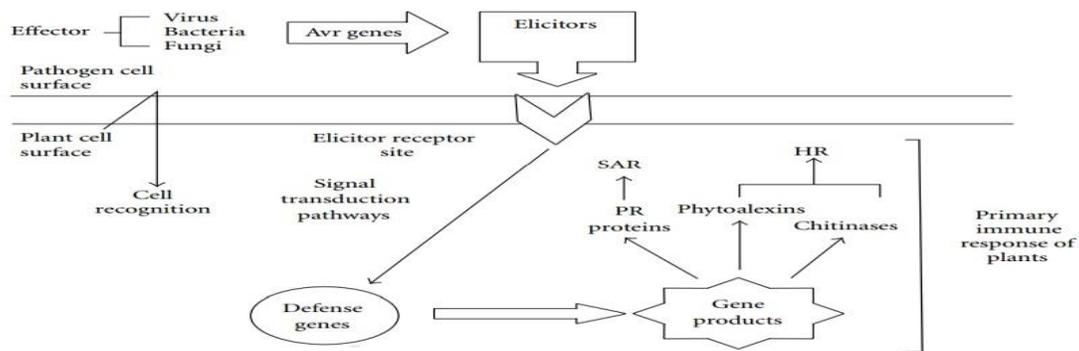


Figura 13. Respuesta inmune primaria de la planta en la interacción planta-patógeno.

Tomado de (ncbi, 2013).

La SAR puede ser inducida con una variedad de tratamientos incluyendo a patógenos (bacterias, virus y hongos) y sustancias químicas (*acidbenzolar-S-methyl*, ASM); está es mediada por el ácido salicílico (Thakur y Singh, 2013).

La resistencia inducida (IR) es un tipo de defensa que activa la expresión de los genes y cambios metabólicos que ocurren cuando la planta se ve enfrenta a algún tipo de estrés (Madriz, 2002, pp. 187). La capacidad de defensa de la planta aumenta cuando esta se encuentra estimulada frente a un patógeno se llama resistencia inducida (IR) (Van Loon *et al.*, 1998, pp 321-322). La IR es un mecanismo que influye en cambios en el metabolismo que es provocada por la expresión diferencial de genes (Hutcheson, 1998, pp. 111). Esta respuesta requiere de algunas fitohormonas como el ácido jasmónico (JA) y etileno, (ET). La IR le da la capacidad a la planta de resistir futuros ataques de patógenos, insectos o condiciones ambientales extremas (Pieterse *et al.*, 2012, pp 54-59). El tratamiento con diferentes agentes como compuestos sintéticos, extractos de plantas pueden inducir a la resistencia local y sistémica. ISR se da como resultado de procesos de colonización de rizobacterias, jasmonatos y etileno.

La respuesta sistémica adquirida (SAR) se activa debido a las defensas basales. Esta también requiere de la acumulación del (SA) a nivel local y sistémico y la expresión de los genes *PR*. (Grant y Lamb, 2006, pp. 65-68).

2.9.1 Interacción planta-patógeno:

Las plantas se encuentran en constante contacto con diferentes organismos, estos pueden ser benéficos o patógenos; estas se ven afectadas por muchas enfermedades infecciosas que son causadas por patógenos, entre estos pueden estar los hongos, virus, bacterias y nematodos (Castelló, 2008, pp. 89-93). Se conoce que los mecanismos de defensa no solo son inducidos por barreras físicas como el cierre de estomas, mecanismos de lignificación y oclusión de haces vasculares, sino que la planta también produce compuestos antimicrobianos y proteínas relacionadas con la defensa. Se genera una respuesta hipersensible (RH) y se incrementa la actividad de peroxidasas y se provoca la muerte celular en la zona donde ha atacado el patógeno (Casassola, Soares, Martinelli, Ferrari y Ávila, 2013, pp. 98-111). Las plantas normalmente se encuentran sanas gracias a estos mecanismos, sin embargo la especificidad que tienen las interacciones planta-patógeno dependen mucho del genotipo del mismo y de la planta. Debido a que muchas especies de cultivos han sido modificadas genéticamente, nuevas razas de patógenos específicas han aparecido para cada cultivar (Madriz, 2002, pp. 142). El grado de patogenicidad se puede definir dependiendo del grado de daño que puede causar la enfermedad (Horsfall y Cowling 1980, pp. 15).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

Para el experimento se cultivaron 40 plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 por cada repetición con dos medios nutritivos (Murashige & Skoog y Hoagland) con sus diferentes tratamientos (Agua, Medio nutritivo, medio nutritivo sin calcio (-Ca), Medio nutritivo con exceso de calcio (5X) (+Ca) (Tabla 2). Se realizaron dos repeticiones biológicas y dos repeticiones científicas.

Tabla 2.

Experimento con la línea Col-0 para elegir el mejor medio nutritivo. Se realizará un control agua destilada, y se suministrarán los medios nutritivos Murashige & Skoog y Hoagland con sus distintos tratamiento. MS, MS(-Ca), MS (+Ca) y HA, HA (-Ca), HA (+Ca).

Tratamientos con Murashige & Skoog				Tratamientos con Hoagland			
Control Agua	MS	MS (-Ca)	MS(+Ca)	Control Agua	HA	HA (-Ca)	HA (+Ca)
5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas
5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas	5 plantas

Para la evaluación de los datos se realizaron los cálculos con método de Livak (Livak, 2001, pp. 172), el cual es un factor cuantificable. Se realizó un promedio entre las dos repeticiones para determinar el error mediante gráficos y posteriormente se eligió el mejor medio nutritivo para aplicarlo a la línea mutante *coi1-21*. Finalmente se analizarán los datos con el test de Shapiro-Wilk para determinar si los datos tienen una distribución normal y elegirá una prueba estadística no paramétrica para su análisis.

3.1 Variables dependientes

Delta delta cq de los genes (*PR1*, *LOX2*, *VSP2* y *PDF1.2*)

3.2 Variables independientes:

Medio nutritivo (Murashige & Skoog y Hoagland)

Tratamientos (agua, dieta óptima, dieta óptima sin calcio, dieta óptima con exceso de calcio 5X), ver en anexos 1-6.

Días de recolección (24 horas y siete días).

3.3 Diagrama de flujo

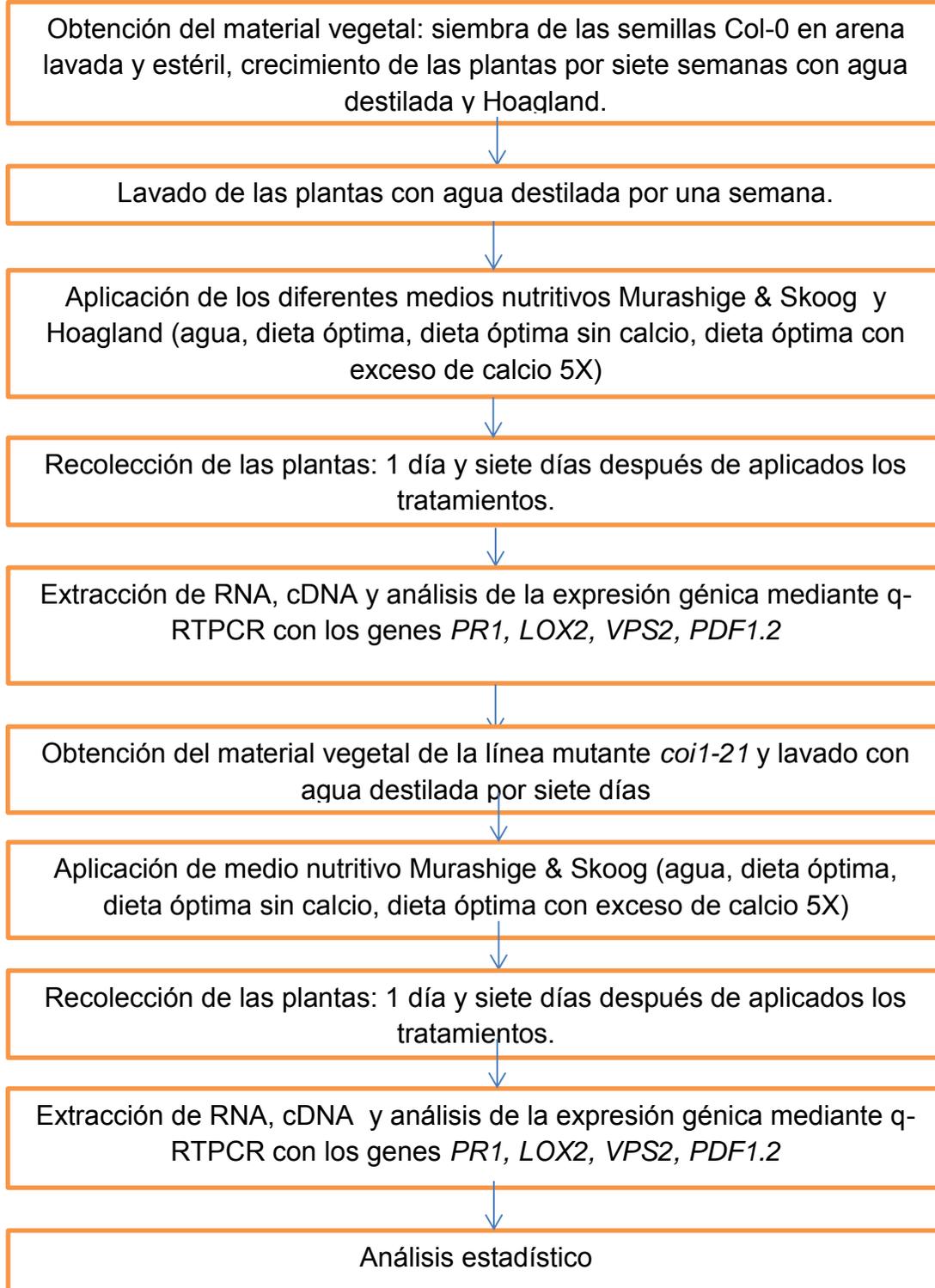


Figura 14. Diagrama de flujo del proceso experimental.

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS:

4.1 Población y muestra

Se utilizó la especie *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh Col-0, la cual es de tipo silvestre. Para esta etapa se cultivaron 80 plantas para cada repetición con un periodo de crecimiento de siete semanas. La primera repetición se dividía en 40 plantas (Tabla 2 y figura 15) para aplicar los diferentes medios nutritivos (Murashige & Skoog y Hoagland) con sus diferentes tratamientos (agua destilada, medio nutritivo, medio nutritivo sin calcio (-Ca), medio nutritivo con exceso de calcio 5X (+Ca)) (Figura 15), se recolectaron 40 plantas 1 día después de aplicados los medios nutritivos, luego se recolectaron las otras 40 después de 7 días. Después de haber realizado las dos repeticiones se procedió a sembrar la línea mutante *coi1-21*, se sembraron 20 plantas para cada repetición y se procedió a realizar a aplicar el medio nutritivo MS con los distintos tratamientos.



Figura 15. Tratamientos con Murashige &Skoog y Hoagland.

4.2 Materiales y métodos para la obtención de los datos y evaluación estadística de los resultados:

Las plantas fueron cultivadas en vasos de 3 onzas, se usó arena de río a la cual se le dio un lavado previo con agua destilada y se la autoclavo. Después de esto

se midió la conductividad para comprobar que esta no sea alta y el experimento sea factible. Para la siembra de las semillas Col-0, se colocaron las 80 semillas en dos vasos de plástico y estuvieron 3 días a 4°C, luego de eso comenzó la germinación de las plantas y fueron trasplantadas al día 15. Por consiguiente las plantas crecieron 5 semanas más, a la séptima semana se realizó por 7 días un lavado con agua destilada y se midió la conductividad la cual debía ser menor a 200 μS y se procedió a suministrar los tratamientos, finalmente se procedió a obtener el material vegetal para su análisis.

Se realizaron dos medios nutritivos (Murashige & Skoog y Hoagland), en las cuales se realizarán cuatro controles diferentes (Sin nutrientes (agua destilada), medio nutritivo óptimo, medio nutritivo con deficiencia total de calcio (-Ca) y medio nutritivo con exceso de calcio 5X (+Ca), (ver anexos 1-6). Para la aplicación de los tratamientos se lavaron las plantas por una semana con agua destilada y se midió su conductividad (tabla 3). Luego se procedió a ajustar el pH de los tratamientos a 6.5.

Tabla 3.

Conductividad de los tratamientos.

Tratamiento	Conductividad
Agua destilada	0.5 μS
MS	3.850 μS
MS (-Ca)	3.430 μS
MS (+Ca)	3,450 μS
HA	1.259 Ms
HA (-Ca)	3.590 μS
HA (+Ca)	3.900 μS

4.2.2 Extracción de RNA

Se tomaron 5 plantas por cada tratamiento y molieron las plantas completas de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh con nitrógeno líquido hasta llegar a un polvo muy fino. Se transfirió el polvo congelado a un tubo *Eppendorf* pre-enfriado hasta llenar el tubo hasta más de la mitad, se añadió 650 μ L de tampón de extracción (calentado a 50 ° C para disolver el SDS). Posteriormente se añadió 0,5 ml de fenol/cloroformo / alcohol isoamílico en la campana de extracción y se colocó en el vórtex por 30 segundos. Se centrifugo durante 3 minutos a 14 000 rpm a 4 °C en y se transfirió la fase acuosa (fase superior) a un nuevo tubo *Eppendorf*, sin tomar nada de la interfase. Se desechó la fase de fenol (fase inferior) en el contenedor de residuos de fenol y el tubo en el recipiente de residuos sólidos fenol. Se añadió de nuevo 0,5 mL de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico y se agito enérgicamente. Luego se centrifugo durante 3 minutos a 14 000 rpm y a 4°C. Se transfirió la fase acuosa (fase superior) a un nuevo tubo *Eppendorf* y se añadió 0,5 mL de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1) y se agito enérgicamente luego se centrifugo durante 1 minuto a 14 000 rpm a 4°C. Después de la centrifugación, la fase acuosa debe ser clara. Posteriormente se transfirió la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo *Eppendorf* y se añadió 1/3 volumen de LiCl 8M (aprox. 150 μ l). Se desechó la fase inferior en el contenedor de residuos de fenol, se mezcló bien y se incubó a 20 ° C durante toda la noche o un fin de semana. Al día siguiente se centrifugo durante 20 minutos a 14 000 rpm a 4 C °, se eliminó el sobrenadante y se añadió 0,5 mL de etanol al 70% (-20 ° C) y se mezcló suavemente para lavar luego se centrifugo durante 1 minuto a 14 000 rpm a 4 ° C. Se eliminó el sobrenadante incluyendo también las pequeñas gotitas en el lado del tubo. Se dejó boca abajo el tubo para que el etanol se evapore (aprox. se demora en evaporarse 15 minutos). Se añadió 400 μ L de Agua MiliQ o Agua PCR y mantuvo en hielo o a 4°C durante al menos 0.5-1 hora para permitir que el sedimento de ARN se hidrate. Se disolvió el precipitado de ARN por vórtex. Luego se añadió 40 μ l de NaAc (Acetato de sodio) pH 5,2 y 1 ml de etanol al 96% (-20 ° C) y se incubó

por lo menos 20 minutos a -80°C o 60 minutos a -20°C (recomendable 60 minutos a -80°C). Posteriormente se centrifugo durante 4 minutos a 14 000 rpm a 4°C ; se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 400 μL de etanol al 70% (-20°C). Posteriormente se centrifugo durante 3 minutos a 14 000 rpm a 4°C . Se secó el pellet brevemente en la SpeedVac ADN durante 1 minuto o dejar boca abajo el tubo para que el etanol se evapore (aprox. se demora en evaporarse 15 minutos). Finalmente se disolvió el precipitado en 25 μL de H_2O MQ o H_2O PCR y se determinó la concentración en el nanodrop y se realizaron los respectivos cálculos para tener la concentración de (1 μg) de cada muestra de RNA.

4.2.3 Geles de agarosa

Se colocó 1.2 gramos de agarosa y 60 ml de TAE 1 X, se dejó hervir y posteriormente se dejó enfriar para colocar 2 μL de SYBER SAFE y se dejó gelatinizar. Finalmente se cargó el gel con cada una de las muestras y se dejó correr por 50 minutos a 80 voltios, 200 de corriente, 200 watts en el equipo ZOOM® Dual Power (ANEXO 8).

4.2.4 Tratamiento con DNase I, Amplification Grade (INVITROGEN)

Se colocó 1 μL de RNA (1 μg), 1 μL de DNase I, Amp Grade (100 U) y 1 μL de 10X DNase I Reaction Buffer (1000 μL), luego se aforo hasta llegar a 10 μL con agua PCR y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocó 1 μL de EDTA (200 μL). y se colocó en el termociclador MULTIGENE (LabNet) por 10 min a 65°C y se guardó a -80°C

4.2.5 Transcripción reversa cDNA.

Se utilizó es Reverse Transcription System de Promega. Primero se colocó 1 μL de RNA (1 μg), 1 μL de Oligo(dT)15 Primer (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 3 μL de Nuclease-Free Water, posteriormente se mezcló en el vortex y se puso los tubos en el

termociclador MULTIGENE (LabNet) a 70 °C por cinco minutos, luego se puso en el racket frio por 5 minutos, se centrifugó por 10 segundos y se guardó a 4°C.

Para la preparación del súper mix se tomaron los valores mostrados en la tabla 4. Luego de preparar de súper mix se colocó 15 µL a cada una de las muestras que se realizaron anteriormente. Posteriormente se colocó en el termociclador las muestras a 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora y 70°C por 15 minutos.

Tabla 4.

Super mix para reacción de cDNA

Reactivo	Cantidad µL
Buffer 5X	4 µL
MgCl ₂ , 25Mm	3 µL
dNTP Mixture	1 µL
Recombinant RNasin®	0,5 µL
AMV Reverse Transcriptase	1 µL
Agua (nucleotide free).	5.5 µL
Total	15 µL

4.2.6 q RTPCR

Se realizó con master mix por cada primer y se colocaron los siguientes valores por cada reacción (tabla 5) se colocaron las muestra en el PRIMEQ (Desnaturalización: 95°C por 10 minutos; Amplificación: 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 30 seg; Tm: 60°C-95°C). Y se analizaron los datos con el programa QuantaSoft Software de Biorad. Finamente se calculó en valor de delta delta cq con el método de Livak (Livak, 2001, pp. 172). Se utilizó el gen UBI-10 como gen constitutivo (Ver anexo 8).

Tabla 5.

Concentraciones de reactivos por cada reacción.

Reactivo	Cantidad μL
SsoFast™ EvaGreen® Supermix	7,5 μL
Foward primer	0,45 μL
Reverse primer	0,45 MI
Agua PCR	5,1 μL
Cdna	1,5 MI
Total	15 MI

4.3 Evaluación estadística de los resultados

La evaluación estadística de los resultados se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se determinará de esta manera si los datos tienen diferencias significativas entre grupos ((Agua, MS, MS (-Ca) y MS (+Ca)) y (Agua, HA, HA (-Ca) y HA (+Ca)). Se escogerá uno de los dos medios nutritivos para aplicación de la línea mutante. Se realizó el test de Shapiro-Wilk el cual se utiliza para determinar si una población presenta una distribución normal, este contiene dos hipótesis: H_0 : Los datos tienen una distribución normal; H_1 : Los datos no se ajustan a una distribución normal. (Rial y Varela, 2008, 65-67).

El test de Kruskal-Wallis es una prueba no paramétrica que determina los datos provenientes de la misma población. Si el valor de significancia es < 0.05 se acepta la hipótesis nula, si es menor se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no tienen una distribución normal. Tiene dos hipótesis: H_0 : no hay diferencias significativas entre los grupos. H_1 : Hay diferencias entre los grupos (Yarnold y Soltysik, 2013, pp. 342-345).

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1 Análisis preliminar de la expresión génica en Col-0.

La expresión de los genes de defensa nos permite comprender los procesos que ocurren en las plantas que están relacionados con la tolerancia y el estrés frente a diferentes situaciones que pueden afectarlas. Gracias a los estudios con plantas de *Arabidopsis thaliana* se pueden elaborar modelos de naturaleza predictiva que nos permiten entender mejor el manejo adecuado de los cultivos. La nutrición vegetal es un factor muy importante para la agricultura, este se refiere al suministro, absorción, disponibilidad, translocación y la utilización de la materia orgánica (Fageria, 2009, pp.111-114).

Los Figura 16 indica que los todos los genes tuvieron expresión con una dieta optima frente al control agua al día uno y al día siete. Los datos indican una dieta sin calcio vs la dieta óptima tiene una disminución a las 24 horas menos en el gen *LOX2*, siete días; *PR1*, siete días; *PDF1.2* siete días (figura 16, B). Por otro lado se observa que con MS (+Ca) la expresión de los genes *LOX 2* y *PDF1.2* aumenta a las 24 horas (Figura 15, B y D) y se mantiene la expresión solo en el gen *PDF1.2* mientras que con el gen *LOX2* disminuye, hay una diferencia significativa en la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* con MS (+Ca) vs los otros tratamientos. Se puede observar que a los siete días la expresión de los genes de defensa aumenta en el gen *PR1* y disminuye en el gen *LOX2*, esto demuestra un efecto antagónico entre los genes. En cuando al gen *VSP2* a las 24 horas la expresión de los tres tratamientos es igual menos con la dieta optima, al contrario a los siete días de aplicada la dieta los tratamientos con MS, MS (-Ca) y MS (+Ca) la expresión aumenta.

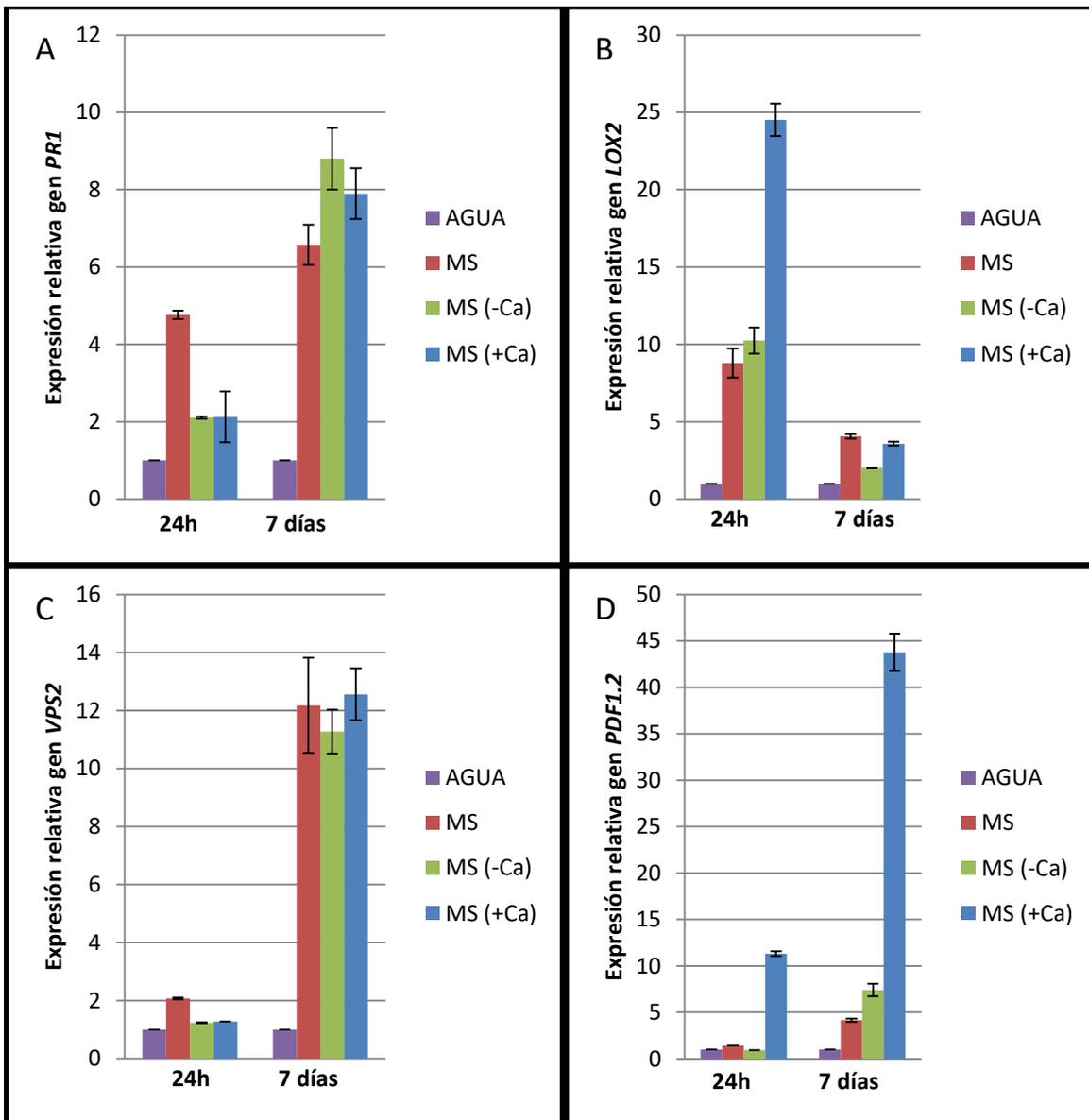


Figura 16. Expresión relativa de los genes.

(A): *PR1*, (B): *LOX2*, (C): *VSP2*, (D): *PDF1.2* con medio nutritivo Murashigue & Skoog (MS). Agua, MS(Murashige & Skoog), MS (-Ca): Murashige & Skoog sin calcio, MS (+Ca): Murashige & Skoog con exceso de calcio 5X).

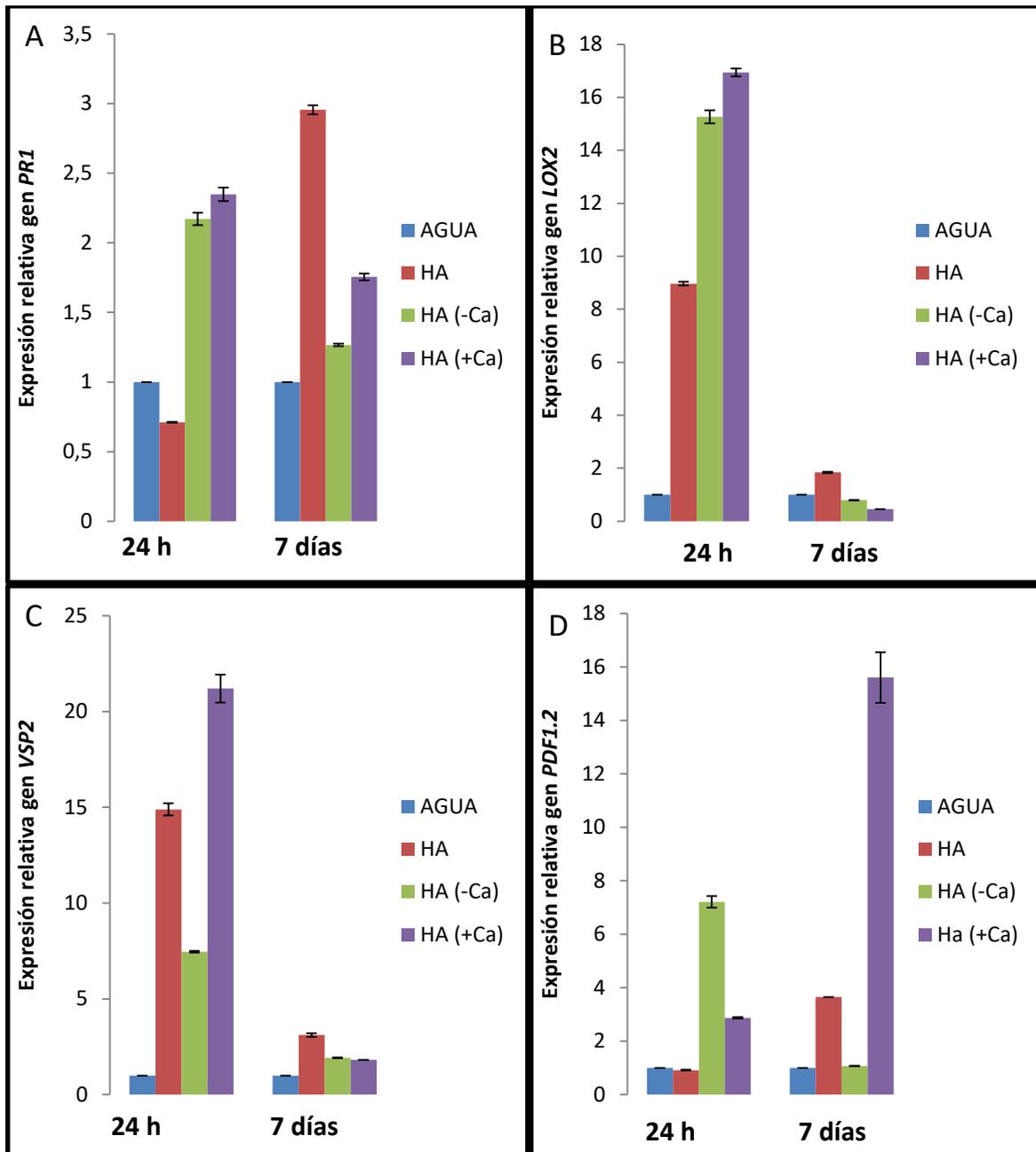


Figura 17. Expresión relativa de los genes

(A): *PR1*, (B): *LOX2*, (C): *VSP2*, (D): *PDF1.2* con medio nutritivo Hoagland (HA). Agua, HA: hoagland, HA (-Ca): Hoagland sin calcio, HA (+Ca): Hoagland exceso de calcio 5X.

La Figura 17 nos indica que existe una expresión con el cambio de agua a dieta nutritiva en todos los genes a las 24 horas y siete días, menos en el gen *PR1* y *PDF1.2* a las 24 horas. Se puede observar que con dieta sin calcio también existe una expresión esto sucede en todos los genes a 24 horas y siete días. Con una dieta con exceso de calcio en todos los genes existe una expresión menos en el gen *LOX2* a los siete días. Se puede observar un efecto antagónico entre el gen *PR1* y el *LOX2* a los siete días de aplicada la dieta al igual que en la dieta MS. El gen *VSP2* tuvo una expresión con un tratamiento con exceso de calcio a las 24 horas. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis dio como resultado que los datos no tienen diferencias significativas entre los grupos. Se determinó como tratamiento para la inducción de los genes defensa la dieta nutritiva MS ya que se observó que con el tratamiento de calcio 5X se observa una mayor expresión.

Se puede observar que la aplicación una dieta rica en nutrientes sea esta Murashige & Skoog o Hoagland induce a las rutas del JA y SA (Figura 16 y Figura 17) se ve una expresión con la dieta óptima y dieta sin calcio, pero la expresión aumenta con la aplicación de esta misma dieta con exceso de calcio 5X. Esto se pudo comprobar debido a que se efectuó la expresión de los genes marcadores de la rutas del SA y JA independientemente de la dieta utilizada a las 24 horas.

La expresión del gen *LOX2* se dio en la dieta de Murashige & Skoog con exceso de calcio 5X, este gen es muy importante ya que es un intermediario en la producción de JA (Bell *et al*, 1995). Al acumularse JA, este da una protección a la planta ya que se activa la resistencia sistémica inducida (ISR). Esta depende de los reguladores de crecimiento JA y ET. Se puede observar una gran diferencia en el gen *LOX2*, dieta MS (figura 16, B). Comparando la expresión de los demás genes a las 24 horas y siete días, se observa que en el gen *LOX2* a las 24 horas aumentó y a los siete días disminuyó. Hay evidencia que el gen *LOX2* está implicado en la formación de compuestos volátiles (GLVs), aparte de participar en

la formación del JA. Los *GLV* son aldehídos alifáticos de seis carbonos y ésteres, que poseen una actividad antimicrobiana y se utilizan como línea directa de defensa contra patógenos que intentan atacar a la planta. (Mochizuki, Sugimoto, Koeduka y Matsui, 2016, pp.82-85).

La expresión de los genes *PDF1.2* y *LOX2* con una dieta de exceso de calcio 5X con las dos dietas nutritivas (figura 16 y figura 17), confirman que existe una inducción en la ruta de defensa del JA. Según (Borja, 2013, pp. 42-43) un tratamiento con exceso nutricional de calcio induce a la expresión del gen *PDF1.2* en la línea Col-0 y una deficiencia de calcio suprime la expresión. Se pudo comprobar esta afirmación ya que un exceso de calcio induce la activación de la ruta del JA a través de sus genes marcadores *PDF1.2* y *LOX2*. Esto da un indicio de que con la aplicación de un medio de cultivo con exceso de calcio (5X) las plantas son capaces de resistir a una infección mediada por patógenos necrotróficos como *Alternaria* spp o *Botrytis cinerea*.

Los genes *LOX2* y *VSP2* los cuales están implicados en la formación del JA, se expresaron de distinta manera frente un medio nutritivo con exceso de calcio (5X). Se sabe que estos genes están controlados por el mismo factor de transcripción *MYC2*, y debido a que el gen *VSP2* tiene su función en tejidos definidos mientras que el *LOX2* forma compuestos bioactivos en todos los tejidos (Mochizuki, Sugimoto, Koeduka y Matsui, 2016, pp 82-85). Debido a esto la función de cada gen puede estar relacionada con el nivel de expresión ya que se localizan en diferentes tejidos.

Por otro lado, el SA tiene un rol muy importante en la defensa de las plantas ya que existe una respuesta frente al ataque de patógenos biotróficos y hemibiotróficos, y es ahí donde se activa del gen *PR1* y desencadena la SAR (Verhage *et al*, 2010, pp. 537-540) Según Spoel y colaboradores (2003, pp. 157-159), el SA se acumula después de la infección del patógeno, como resultado de esto se produce la expresión de la proteína NPR1, la cual se localiza en el núcleo e

interactúa con los factores de transcripción TGA, dando como resultado la activación de los genes *PR*. Como ya se sabe, estas proteínas intervienen en la inhibición del crecimiento y detienen la multiplicación de patógenos; estudios han demostrado que aplicaciones exógenas de SA dan como resultado la acumulación de las proteínas *PR* y la activación de la SAR (Iris et al, 1996, pp 65-78). Este mecanismo afecta la expresión de los genes de respuesta al JA. Esto sólo se pudo comprobar con el análisis del gen *LOX2* con las dos dietas nutritivas a los siete días de aplicación. Esto nos lleva a intuir que el efecto antagónico se produce cuando ya han pasado varios días desde la aplicación del medio nutritivo. Se sabe que el proceso que el proceso de señalización antagónica entre el SA y el JA dependen den parcialmente de NPR1, SSI2, MAPK4 y de los factores de transcripción WRKY (Ballaré, 2011, pp 131).

Con estos resultados, se evidencia la activación del gen *PR1* con la aplicación de las dos dietas nutritivas, aunque no se evidencia una diferencia significativa con los diferentes tratamientos. Esto indica que el calcio no afectó a la expresión del gen *PR1*, pero una dieta rica en nutrientes si es influyente en la expresión y por ende podría tratarse de una activación de la SAR.

En una dieta sin calcio no se expresan los genes *LOX2* ni *PDF1.2*, como en la dieta con exceso de calcio (Figura 16, grafico B y D), lo cual indica que la deficiencia en calcio de la dieta afecta el funcionamiento de la membrana celular, permitiendo la fuga de solutos orgánicos e inorgánicos a través de la bicapa lipídica. Esto pone en riesgo los procesos metabólicos de la planta y por ende la expresión genética (Lawrence et al, 2005, pp. 76-79).

Se puede observar que la aplicación de una dieta rica en nutrientes sea esta Murashige & Skoog o Hoagland, induce la activación de las rutas del JA y SA (Figura 16 y Figura 17). Se puede observar una expresión con la dieta óptima y con la dieta sin calcio, aunque esta aumenta con la aplicación de esta misma

dieta, pero con exceso de calcio. Esto se pudo comprobar debido a que se evidenció la expresión de los genes marcadores de la rutas del SA y JA.

Se ha demostrado que las rutas metabólicas del SA y JA actúan conjuntamente (Pieterse, Ton y Van Loon, 2001, pp. 45-46). Este mecanismo provee a la planta una mejor defensa contra el patógeno invasor. Un estudio llevado a cabo por Van Wees, y colaboradores (2000, pp. 54-55), demostró que las plantas que expresan SAR e ISR independientemente, tienen una reducción relativa de los síntomas entre en 40-60%, mientras que esta reducción se aumenta cuando ISR y SAR se expresan simultáneamente. En este estudio se concluyó que las plantas son capaces de activar respuestas de defensa dependientes de las rutas del SA, JA y etileno al mismo tiempo, sin tener efectos antagonistas y protegiéndose de los patógenos con la activación simultanea de la ISR y SAR, lo cual puede mejorar el control de la enfermedad. Según Van der Does y colaboradores, el efecto antagónico del SA sobre el JA afecta en las funciones de transcripción de genes en el complejo *SCFCO11-JAZ*, además encontraron que la GCC-box es suficiente para la activación la ruta del JA y la supresión de la SAR y sugieren que el entrecruzamiento de las rutas de defensa SA/JA es mediada por la acumulación de ORA59. Según Moya, plantas de *Arabidopsis thaliana* con una dieta de exceso de calcio, presentaron una activación en los genes *PR-1* y *LOX2*. También se pudo observar una ligera activación con una dieta sin calcio.

Con estos resultados se ha demostrado que cuando una planta pasa de estar sin nutrientes por una semana y se le suministran nutrientes los genes que están involucrados en la formación del JA y SA se expresan. Lo mismo ocurre con un medio nutritivo con exceso de calcio, pero la expresión de los genes *LOX2* y *PDF1.2* es mayor. Esto afirma a (Knight, 2002, pp 54-55) el cual dice que el calcio es un macronutriente muy importante en la defensa de la planta frente a factores abióticos y bióticos, este también contribuye en el desarrollo de nuevas células, formación de la pared celular, síntesis de calosa, transductor de señales y existe evidencia fuerte de que activa genes que están involucrados en la síntesis de

proteínas de resistencia (Lawrence *et al*, 2005, pp. 76-79). Por lo tanto se confirma con esta investigación que el calcio es un elemento influyente en la expresión de los genes de defensa.

5.2 Análisis de la expresión génica con la línea mutante *coi1-21*

Los resultados del mutante *coi1-21* (figura 18) indican que la aplicación de una dieta nutritiva expresa los genes de defensa independientemente de si esta tiene los nutrientes óptimos, una dieta sin calcio o un exceso de calcio (5X). Se puede ver que en los genes dependientes de la ruta del JA existe una expresión menor que con los tratamientos con una dieta optima y una dieta sin calcio. Por otro lado se observa que la expresión del gen *PR1* existe una expresión con los tres tratamientos pero éste aumenta con un exceso de calcio. En el anexo 9 se puede observar la comparación entre la expresión relativa del gen *PR1* entre la línea Col-0 y *coi1-21*, se observa que la expresión en la línea col-0 es mayor a *coi1-21* en el tratamiento MS, mientras que MS (+Ca), aumenta en *coi1-21*. También se puede ver que con un tratamiento MS(-Ca).

En el anexo 10 y 12, con el tratamiento MS (+Ca) se puede observar que los genes *LOX2* y *PDF1.2* no tienen expresión alguna en la línea *coi1-21* y en Col-0 el gen *LOX2* el delta delta cq es de 100 y en *PDF1.2* es de 26. Este resultado comprueba resultados obtenidos con la línea silvestre Col-0, ya que en este ensayo la aplicación de una dieta nutritiva no afecta la expresión génica de los genes dependientes de JA. Esto se puede afirmar, ya que la línea *coi1-21* posee sensibilidad reducida al ácido jasmónico JA (He, Yijian, Hubert, Tornero y Dangl, 2012, pp 65-69), (Van Loon, 2009, pp. 135-140).

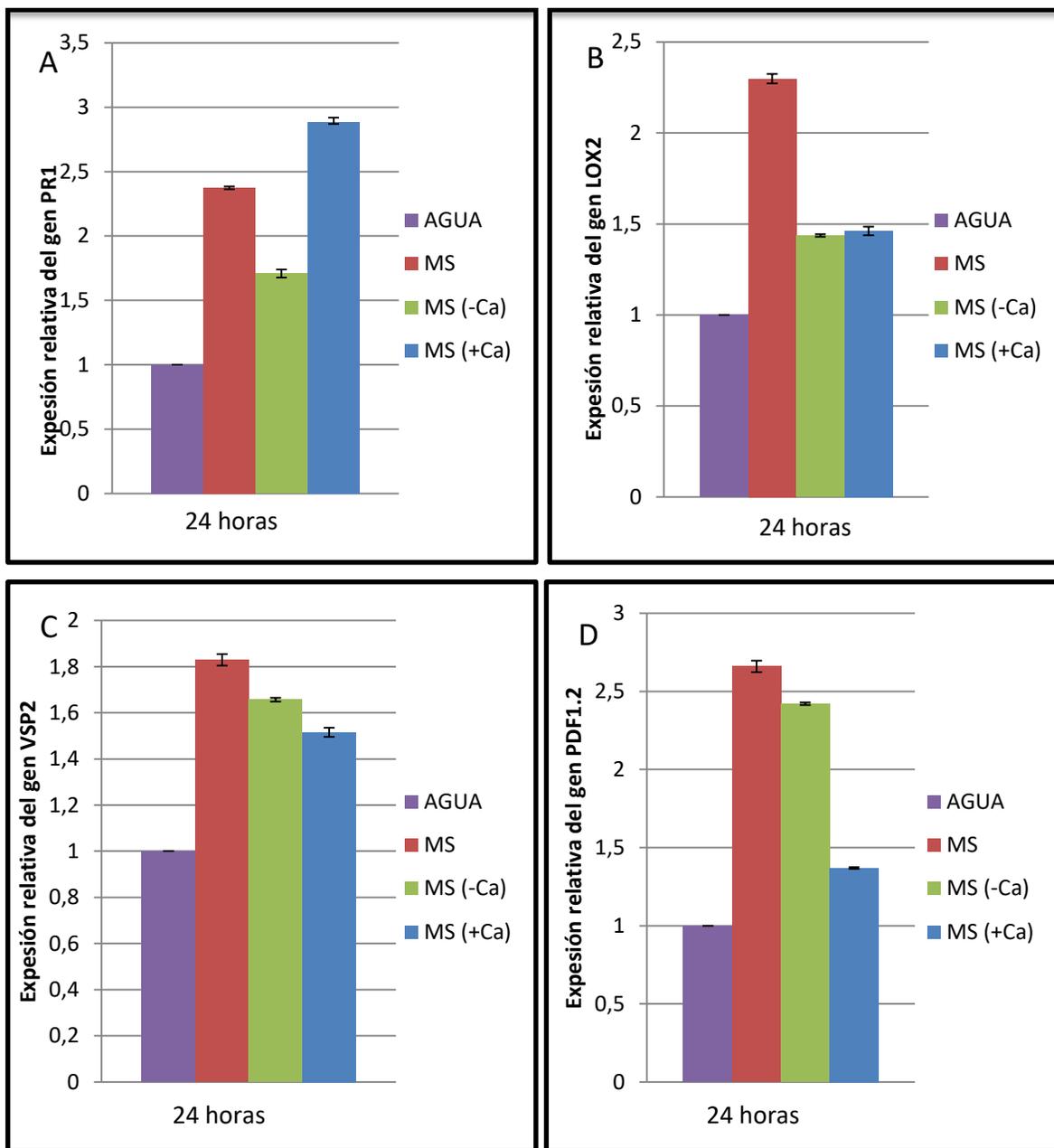


Figura 18. Análisis de la expresión relativa de los genes

(A): *PR1*, *LOX2*, *VSP2*, *PDF1.2* en la línea mutante *coi1-21* con una dieta Murashige & Skoog a las 24 horas.

5.3 Análisis estadístico

Al realizarse la prueba de normalidad con el test de Shapiro-wilk en la línea Col-0 y en la línea mutante *coi1-21* con las distintas dietas utilizadas, dio como resultado la aceptación de la hipótesis alternativa es decir que los valores obtenidos en el experimento no se ajustan a una distribución normal. Por lo tanto se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

La prueba de Kruskal-Wallis dio como valor de significancia < 0.05 , para todos los ensayos realizados con sus distintos tratamientos en la línea Col-0 (24 horas y siete días) y el mutante *coi1-21* (24 horas y siete días) por lo tanto se aceptó la hipótesis nula la cual afirma que no hay diferencias significativas y los diferentes tratamientos son estadísticamente significativos. Los valores que arrojó el análisis de datos en la q-RTPCR son datos confiables.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

6.1 Conclusiones:

La nutrición induce a expresión de los genes de defensa de las rutas del JA y SA, eso quiere decir que existió una activación de la SAR e ISR independientemente del medio nutritivo que se suministre, por otro lado el tiempo exposición de 24 horas del medio nutritivo aumenta la expresión de los genes de defensa en todos los tratamientos.

Una dieta sin calcio con medio nutritivo MS disminuye la expresión de los genes de defensa *PR1*, *VSP2*, *PDF1.2*, mientras que una dieta con calcio aumenta la expresión del gen *LOX 2* a las 24 horas con las dos dietas nutritivas y el gen *PDF1.2* tuvo más expresión que todos los genes con medios nutritivos MS y Hoagland a las 24 horas y a los siete días. La aplicación de nutrientes a las plantas dio como resultado una expresión de los genes de defensa pero en calcio potencia esta expresión.

Existe un antagonismo entre las rutas metabólicas SA y JA siete días después de aplicados los medios nutritivos. El medio nutritivo MS fue el que dio mejores resultados ya que se ve mejor la diferencia de la expresión génica en *Arabidopsis thaliana*.

La línea mutante *coi1-21*, dio resultados favorables ya que la ruta de defensa del JA se vio suprimida.

6.2 Recomendaciones

Analizar más líneas mutantes como *ein2* o líneas mutantes que tengan mutaciones en los transportadores de calcio.

Realizar un ensayo con el gen *PR4* el cual está relacionado con la ruta del ET.

Realizar más repeticiones biológicas.

Utilizar otro gen constitutivo.

Realizar una prueba con ácido salicílico en el mutante *coi1-21*.

Medir los niveles de calcio en las plantas.

Realizar ensayos con *Botritis* spp en qRT-PCR.

REFERENCIAS

- Acosta, I. Farmer, E. (2010). *Jasmonates. The Arabidopsis Book*. Recuperado el 5 de agosto del 2016 de: doi:10.1199/tab.0129
- Andolfo, G. Ercolano, M. (2015). Plant Innate Immunity Multicomponent Model. Recuperado el: 1 de febrero del 2016 de doi: 10.3389/fpls.2015.00987
- Applied Biosystems. (sf). *Real-time PCR handbook*. Recuperado el 6 de junio del 2016 de: <http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>
- Ballare, L. (2014). Light regulation of plant defense. *Annu Rev Plant Biol*, 65 (Vol.), 335–363. Recuperado el: 6 de junio del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24471835>
- Ballaré, L. (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals, 16 (Vol.), 249-257. Recuperado el: 8 de junio del 2016 de: [http://www.cell.com/trends/plantscience/abstract/S13601385\(10\)002542?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138510002542%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/trends/plantscience/abstract/S13601385(10)002542?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138510002542%3Fshowall%3Dtrue).
- Barker, A. Pilbeam, D. (2015). *The hand book of Plant Nutrition*. Recuperado el 4 de julio del 2016 de: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Plant-Nutrition-Second-Edition/Barker-Pilbeam/p/book/9781439881972>
- Batistič, O. Kudla, J. (2011). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *ELSEVIER*. 1283-1293. Recuperado el 2 de abril del 2016 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030441651100256X>

- Bari, R. Jones, J. (2008). Role of plant hormones in plant defense responses. 69 (Vol.). 473-488. Recuperado el 14 de marzo del 2017 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030441651100256X>
- Becerra, C. (2006). *Genes implicados en el desarrollo de la semilla de Arabidopsos thaliana (L.): Caracterización de los genes AtAnkTm*. Recuperado del 2 de febrero del 2016 de: <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2006/tdx-0809106-110441/cbb1de1.pdf>
- Beneloujaephajri, E. Costa, A. L' Haridon, F. Métraux, J. Binda, M. (2013). Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on a burst of calcium. *Plant biology*. 13, (Vol.). 160. Recuperado el 5 de junio del 2016 de: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-13-160>
- Bannenberg, G. Martinez, M. Hamberg, M y Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabiodpsis thaliana*. Springer. Recuperado el 17 de marzo del 2016 de doi: 10.1007/s11745-008-3245-7
- Bell, E. Creelman, R. Mullet, J. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. 92 (Vol.), 1211–1223. Doi: 10.1105/tpc.9.7.1211
- Boller , T., y Meins, F. (1992). *Genes involved in plant defense*. Recuperado el 8 de marzo del 2016. doi: 10.1007/978-3-7091-6684-0
- Bowler, C. Eluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. Recuperado el 8 de marzo del 2016 de: doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01628-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01628-9)

- Borja, L. (2014). Análisis de la expresión genética de *Arabidopsis thaliana* (L) frente a un exceso y deficiencia de Calcio mediante la valoración de la actividad B-glucoronidase (GUS) y retro transcripción (RT-PCR). Sangolqui, Ecuador: Universidad De Las Fuerzas Armadas.
- Casassola, A. Sandra, P. Soares, M. Martinelli, J. Ferrari, M. D' Avila, M. (2013). Gene Expression: A review on Methods for the Study of Defense-Related Gene Differential Expression in Plants. Recuperado el 1 de septiembre del 2016 de: https://www.researchgate.net/publication/259591906_Gene_Expression_A_Review_on_Methods_for_the_Study_of_Defense-Related_Gene_Differential_Expression_in_Plants
- Castelló, M. (2008). Identificación y caracterización de la familia de factores DBP, nuevos reguladores de la expresión génica en las plantas. Tesis Doctoral. Recuperado el 10 de agosto del 2016 de <http://digital.csic.es/handle/10261/26034>
- Creelman, R. Mulpuri, R. (2002). The Oxylipin Pathway in Arabidopsis, the Arabidopsis Book. Recuperado el 13 de febrero del 2016 de doi:10.1199/tab.0012
- Creelman, R. Mullet, J. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. Recuperado el 15 de Octubre del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41895/>
- Conn, S. Hocking, B. Dayod, M. Xu, B. Athman, A. Hederson, S. Aukett, L. Conn, V. Shearer, M. Fuentes, S. Tyerman, S y Gilliam, M. (2013). Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. Recuperado el 4 de

octubre del 2016 de
<https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-9-4>

Cruz, M. Melgarejo, L. Romero, M. (2009). Fitohormonas. Recuperado el 19 mayo del 2016 de http://www.bdigital.unal.edu.co/8545/2/02_Preliminares.pdf

Dangl, J. y Jones, J. (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Recuperado el 20 de mayo del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459065>

Daton, C. Iqbal, K. Turner, A. (1983). Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. Recuperado el 23 de febrero del 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.13993054.1983.tb02771.x/abstract>

Dicke, M. Van Loon, J. (2014). Chemical Ecology of Phytohormones: How Plants Integrate Responses to Complex and Dynamic Environments. Recuperado el 12 de enero del 2016 de https://www.researchgate.net/publication/264055448_Chemical_Ecology_of_Phytohormones_How_Plants_Integrate_Responses_to_Complex_and_Dynamic_Environments

Ding Y. Liu, N. Virlouve, L. Riethoven, L. Fromm, M y Avramova, Z. (2013). Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. Recuperado el 30 de mayo del 2016 de: <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-13-229>

Dobón, A. (2010). Interacción de LRA5 con genes asociados a defensa en *Arabidopsis*. Tesis. Recuperado el 11 de febrero del 2016 de <http://digital.csic.es/handle/10261/29203>

- Dobermann, A. Fairhurst, T. (2000). Nutrient Disorders & Nutrient Management Rice. Recuperado el 16 de abril del 2016 de http://books.irri.org/9810427425_content.pdf
- Durrant, W. Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. Recuperado el 3 de abril del 2016 de http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=phyto
- Ellis, C. Turner, J. (2002). A conditionally fertile coi1 allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seed and young seedlings. Recuperado el 10 de abril del 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00425-002-0787-4>
- Ertola, R. Yantorno, C. Mignone, A. (1994). Medios de fermentación. Monografía. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA. Recuperado el 29 de junio del 2016 de: <http://www.biologia.edu.ar/microind/medios.htm>.
- Fageria, N. (2009). The use of nutrients in crop plants. Recuperado el 22 de febrero del 2016 de <https://www.crcpress.com/The-Use-of-Nutrients-in-Crop-Plants/Fageria/p/book/9781420075106>
- FAO, (2012). Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas. Recuperado el 6 de marzo del 2016 de: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/FAO_RMG_SP.pdf.
- FAO. (2009). La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Recuperado el 6 de marzo del 2016 de:

http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf.

- Feng, W. Lindner, H. Robbins, N. Dinneny, J. (2016). Growing Out of Stress: The Role of Cell- and Organ-scale Growth Control in Plant Water-stress Responses. Recuperado el 4 de noviembre del 2016 de <http://www.plantcell.org/content/28/8/1769.full>
- Flor, H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. Recuperado el 1 de diciembre del 2016 de <https://science.report/pub/650194>
- Forde, B. Harper, J y Kochian, L. (2004). Focus on Plant Nutrition. Plant Physiology. Recuperado el 22 de abril del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC523309/>
- Gilroy, S. Suzuki, N. Miller, G. Choi, W. Toyota, M. Devireddy, A. Mittler, R. (2014). A tidal wave of signals calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. Recuperado el 28 de febrero del 2016 de [http://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S13601385\(14\)00174-5](http://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S13601385(14)00174-5)
- Glauser ,G. Dubugnon ,L. Mousavi,S. Rudaz, S. Wolfender, J. Farmer, E. (2009) Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded Arabidopsis. Recuperado el 14 de marzo del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2787311/>
- Glazebrook, J. Rogers, E y Ausubel, F. (1997). Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. Recuperado el 4 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9442907>
- Grant, M. y Lamb, C. (2006). Systemic immunity. Recuperado el 14 de Agosto del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753329>

- Goni, R. Garcia, P. Sylvain, F. (2009). The qPCR data statistical analysis. Integromic SL. Recuperado el 21 de abril del 2016 de <http://www.gene-quantification.de/integromics-qpcr-statistics-white-paper.pdf>
- Harper, J y Harmon, A. (2005). Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. Recuperado el 14 de marzo del 2016 de [doi:10.1038/nrm1679](https://doi.org/10.1038/nrm1679)
- Hartwell, L. Hood, L. Godberg, M. Reynolds, A. Silver, L y Veres, R. (2008). GENETICS, From genes to genomes. Recuperado el 10 de mayo del 2016 de <http://www.twirpx.com/file/662611/>
- He, Yijian, Chung, E. Hubert, D. Tornero, P. Dangl, J. (2012). Specific Missense Alleles of the Arabidopsis Jasmonic Acid Co-Receptor COI1 Regulate Innate Immune Recuperado el 21 de mayo del 2016 de [doi:10.1371/journal.pgen.1003018](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003018)
- Hernández, J. (2012). Estudio del desarrollo radical del cultivo del trigo (*Triticum aestivum* L. var. TRIUNFO F2004). Tesis de licenciatura. Recuperado el 4 de junio del 2016 de www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/1090
- Hepler, P. (2005). Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. Recuperado el 28 de agosto del 2016 de <http://www.plantcell.org/content/17/8/2142.full>
- Horsfall, J., y Cowling, E. (1980). Plant disease. Recuperado el 30 de septiembre del 2016 de [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=OQf3Jj_ubWoC&oi=fdf&pg=PA1&dq=Horsfall,+J.,+y+Cowling,+E.+\(1980\).+Plant+disease.&ots=kCbgCakrpz&sig=DHpDu34b4PeKXxXxFMQIDBNVeHU#v=onepage&q=Horsfall%2C%20J.%2C%20y%20Cowling%2C%20E.%20\(1980\).%20Plant%20disease.&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=OQf3Jj_ubWoC&oi=fdf&pg=PA1&dq=Horsfall,+J.,+y+Cowling,+E.+(1980).+Plant+disease.&ots=kCbgCakrpz&sig=DHpDu34b4PeKXxXxFMQIDBNVeHU#v=onepage&q=Horsfall%2C%20J.%2C%20y%20Cowling%2C%20E.%20(1980).%20Plant%20disease.&f=false)

Hoagland, D, Arnon, D. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. Recuperado el 1 de febrero del 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=S7dBAQAAIAAJ&pg=RA17PA7&dq=The+waterculture+method+for+growing+plants+without+soil.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj738OKj7jSAhUL62MKHVITBugQ6AEIKzAC#v=onepage&q=The%20waterculture%20method%20for%20growing%20plants%20without%20soil.&f=false>

Huber, D., y Haneklaus, S. (2007). Managing Nutrition to control plant diseases.

Hulten, M., Pelsler, M., Van Loon, E., Pieterse, C., y Ton, J. (2006). *Cost and benefits of priming for defense in Arabidopsis*. *Plant Biology*, 103(4).

Hutcheson, S. (1998). Current concepts of active defense in plants. Recuperado el 13 de julio del 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=fhPx90lpoAQC&q=Current+concepts+of+active+defense+in+plants.&dq=Current+concepts+of+active+defense+in+plants.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiiuY3FkLjSAhWEJiYKHYa5BsIQ6AEIGzAA>

In botanical mood, (2016). *Arabidopsis thaliana*. Recuperado el 8 de diciembre del 2016 de <https://inbotanicalmood.wordpress.com/tag/arabidopsis-thaliana/>

Iris A., Penninckx, M, Eggermont, K, Franky, R. Terras, G. Bart, P. Thomma, G. De Samblanx A., Métraux, J. Mannes, J. and Broekaer, W. (1996). Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defense Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. Recuperado el 5 de julio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC161354/>

Jones, J. Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*. Recuperado el 10 de marzo del 2016 de doi:10.1038.

- Jordán, M. Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. Recuperado el 4 de agosto del 2016 de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Etileno,aba,jasmonico,brasino,.pdf>
- Kachroo, A. and Kachroo, P. (2009). Fatty Acid-derived signals in plant defense. Recuperado el 2 de febrero del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400642>
- Kawano, T. Furiuchi, T. (2007). Salicylic acid as a defense-related plant hormone. Roles of oxidative and Calcium signaling paths in salicylic acid biology. Recuperado el 24 de abril del 2016 de doi: 10.1007/1-4020-5184-0_10
- Khan, N. Nazar, R. Iqbal, N. Anjum, N. (2012). Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants. Recuperado el 6 de abril del 2016 de doi: 10.1007/978-3-642-25829-9
- Knight, G. (2000). Calcium Signaling during Abiotic Stress in Plants. Recuperado el 27 de febrero del 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769608627072>
- Koornneef, M. Fransz, P. y Hong, H. (2003). Cytogenetic tools for *Arabidopsis thaliana*. Recuperado el 7 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769286>
- Kudla, J. Batistic, O. Kenji, H. (2010). Calcium Signals: The lead Currency of Plant Information Processing. Recuperado el 18 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2861448/>
- Kubista, M. Andrade, J. Bengsston, M. Foorotan, M. Jonák, J. Lind, K. Sindelka, R. Sjöback, R. Sjögreen, B. Stömbon, L. Sthahlberg, A. Zoric, N. (2006).

The real-time polymerase chain reaction. Recuperado 23 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460794>

Laurie-Berry, N. Joardan, V. Street, I. Kunkel, B. (2006). *The Arabidopsis thaliana JASMONATE INSENSITIVE 1 Gene Is Required for Suppression of Salicylic Acid-Dependent Defenses During Infection by Pseudomonas syringae*. Recuperado el 3 de julio del 2016 de doi:10.1094/MPMI-19-0789

Lawrence, D., Wade, E., y Don, H. (2005). Mineral Nutrition and Plant Disease. Recuperado el 8 de abril del 2016 de <http://www.apsnet.org/apsstore/shopapspress/Pages/43467.aspx>

Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S., y otros. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. Recuperado el 3 de febrero del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839007>

Liu, N. Staswick, P. y Avramova, Z. (2016). Memory responses of jasmonic acid-associated *Arabidopsis* genes to a repeated dehydration stress. *Plant, Cell & Environment*. Recuperado el 25 de febrero del 2017 de doi: 10.1111/pce.12806.

Livak, K., Schmittgen, T.(2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. Recuperado el 5 de septiembre el 2016 de doi: 10.1006/meth.2001.1262

Lodish, H. Berk, A. Matsudaira, P. Kaiser, C. Krieger, M. Scott, M. Zipursky, S y Darnell, J. (2006). *Biología Celular y Molecular*. (5 ta Edición, pp 34-103). Madrid-España.

- Lorenzo, O. Solano, R. (2005). Señalización del Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. Recuperado el 5 de febrero del 2016 de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Jasmonico.pdf>
- Madriz, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Recuperado el 6 de abril del 2016 de Madriz, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno.
- Marschner, P. (2012). Mineral Nutrition of Higher Plants. Recuperado el 7 de abril del 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124735422>
- McCauley, A. Jones, C. y Jacobsen, J. (2011). Plant Nutrient Functions and Deficiency and Toxicity Symptoms. Recuperado el 24 de julio del 2016 de http://msuextension.org/publications/AgandNaturalResources/4449/4449_9.pdf
- McCormack, E. Braam, J. (2003). Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. Recuperado el 5 de febrero del 2016 de doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00845.x
- Mochizuki, S. Sugimoto, K, Koeduka, T. Matsui, K. (2016). Arabidopsis lipoxygenase 2 is essential for formation of Green leaf volatiles and five-carbon volatiles. Recuperado el 4 de abril del 2016 de doi: 10.1002/1873-3468.12133.
- Moya, S. (2012). Análisis de la expresión de genes de defensa (*PR*) frente a un estrés nutricional mediante la prueba histoquímica β -glucuronidase (*GUS*) en *Arabidopsis thaliana*. ESPE. Sangolqui, Ecuador.
- Murashige, T. Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Recuperado el 5 de febrero del

2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract>

- Passardi, F. Dobias, J. Valério, L. Guimil, S. Penel, C. y Dunand, C. (2007). Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. Recuperado el 19 de febrero del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904792>
- Perochon, A. Aldon, D. Philippe, J. Ranty, B. (2011). Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. Recuperado el 27 de mayo del 2016 de doi: 10.1016/j.biochi.2011.07.012
- Pieterse, C. Ton, J. and Van Loon, L. (2001). Cross-talk between plant defence signalling pathways: Boost or burden? Recuperado el 25 de mayo del 2016 de https://www.researchgate.net/publication/27691007_Cross-talk_between_plant_defence_signalling_pathways_Boost_or_burden
- Pieterse, C., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., y Wees, S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Recuperado el 29 de marzo del 2016 de <http://www.nature.com/nchembio/journal/v5/n5/abs/nchembio.164.html>
- Pieterse, C. Van der Does, D. Zamiousdis, C. León-Reyes, A. Van Wees, S. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. Recuperado el 16 de mayo del 2016 de doi: 092910-154055.
- Pieterse, C., & Van Loon, L. (1999). Salicylic-acid independent plant defense pathways. Recuperado el 5 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10234273>
- Reddy, A. Ali, Gul, Celesnik, H y Day, I. (2011). Coping with Stresses: Roles of Calcium-and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression. Recuperado el 14 de abril del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642548>

- Riveros, A. (2010). Inducción de Resistencia en plantas. Interacción: planta-patógeno. Universidad del Tolima. Ibagué. Recuperado el 15 de marzo del 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=RyQwYtnw220C&pg=PP1&lpg=PP1&dq=Inducci%C3%B3n+de+Resistencia+en+plantas.+Interacci%C3%B3n:+plantapat%C3%B3geno.++Universidad+del+Tolima.+Ibagu%C3%A9.+TolimaColombia.&source=bl&ots=AGIM5y5gVI&sig=dxEOO3dzEx7gcw_VcCEfdeeQzYw&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjSkJ_Bp7jSAhVE1GMKHfPdCW4Q6AEIGDAA#v=onepage&q=Inducci%C3%B3n%20de%20Resistencia%20en%20plantas.%20Interacci%C3%B3n%3A%20plantapat%C3%B3geno.%20%20Universidad%20del%20Tolima.%20Ibagu%C3%A9.%20Tolima-Colombia.&f=false
- Rial, A. Varela, J. (2008). Estadística práctica para la investigación en ciencias de la salud. (Primera edición) Coruña-España: NETBIBLO, S. L. Recuperado el 16 de febrero del 2016 de: https://books.google.es/books?id=5KdXV7lxHIEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Rudd, J. Frankling-Tong, V. (1999). Calcium signaling in plants. Recuperado el 27 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2633903/>
- Saad, A y Elshahed, A. (2012). Plant Tissue Culture Media. Recuperado el 13 de abril del 2016 de <http://dx.doi.org/10.5772/50569>
- Siddiqui Lab. (SN). *Arabidopsis thaliana*. Recuperado el 27 de noviembre del 2016 de <http://www.ccmb.res.in/staff/imran/Resources.html>
- Spoel, S. Koornneef, A. Claessens, S, Korzelius, J. Van Pelt, A. Mueller, M. Buchala, A. Métraux, J. Brown, R. Kazan, C. Van Loon, L. Xinnian Dong, and Pieterse, C. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between

Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. Recuperado el 15 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615947>

Somerville, A. Koornneef. (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. Recuperado el 2 de mayo del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415318>

Staswick, P. Yuen, G y Lehman, C. (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. Recuperado el 25 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9807813>

Steinhorst, L. Kudla, J. (2013). Calcium and Reactive Oxygen Species Rule the Waves of Signaling. Recuperado el 14 de mayo del 2016 de <http://www.plantphysiol.org/content/163/2/471.full>

TAIR. (2016). *Arabidopsis*. Recuperado el: 7 de noviembre del 2016 de: <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=502824213&type=pollyallele>

Thakur, M. Singh, B. (2013). Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. Recuperado el 27 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4393000/>

The Arabidopsis genome initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Recuperado el 18 de noviembre del 2016 de <http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6814/full/408796a0.html>

Thermocientific. (2016). NanoDrop 1000 & 8000. Recuperado el 11 de noviembre del 2016 de <http://www.nanodrop.com/Library/T009->

NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf

Trewanas, A. (1985). Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development. Recuperado el 15 de agosto del 2016 de <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-4613-2177-4>

Turner, J. Ellis, C. Devoto, A. (2002). The Jasmonate Signal Pathway. Recuperado el 26 de agosto del 2016 de http://www.plantcell.org/content/14/suppl_1/S153.full

USDA (Departamento de Agricultura, US). (2012). Plants profile: Broccoli. Natural Resources Conservation Service. Recuperado el 15 de Abril del 2016 de: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ARABI>

U.S Geological Survey. (2013). Mineral commodity summaries, United States Geological Survey. Recuperado el 15 de Agosto del 2016 de: <http://minerals.usgs.gov/minerals>

Utsugi, S. Sakamoto, W. Murata, M. Motoyoshi, F. (1998). *Arabidopsis thaliana* vegetativo storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. Recuperado el 27 de agosto del 2016 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006072014605>

Van der Does, D. Leon-Reyes, A. Koornneef, A. Van Verk, M. Rodenburg, N. Pauwels, L. Goossens, A. Körbes, A. Memelink, J. Ritsema, T. Van Wees, S. y Pieterse, C. (2013). Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCOI1-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. Recuperado el 14 de mayo del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435661>

- Van Loon, L. (2009). Plant Innate Immunity. Recuperado el 23 de agosto del 2016 de https://www.bookdepository.com/Plant-Innate-Immunity-L-C-van-Loon/9780123748348?ref=bd_recs_1_1
- Van Loon, L. Bakker, P. Pieterse, C. (1998). Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria. Recuperado el 31 de agosto del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012509>
- Van Wees, S. De Swart, E. Van Pelt, J. Van Loon, L. Pieterse, C. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Recuperado el 24 de mayo del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27013/>
- Venegas, J. (2013). *Evaluación de inductores de resistencia, para el control de lepidópteros y tolerancia a estrés hídrico en brócoli (Brassica oleracea L. var. Itálica) y en Arabidopsis thaliana (L.)* Heynh. Universidad San Francisco de Quito. Cumbayá. Pichincha.
- Verhage, A. Van Wees & S. Pieterse, C. (2010). Plant Immunity: It's the Hormones Talking, But What Do They Say? Recuperado el 30 de abril del 2016 de <http://www.plantphysiol.org/content/154/2/536.full>
- Vorwerk, S. Schiff, C. Santamaria, M. Koh, S. Nishimura, M. Vogel, J. Somerville, C. Somerville, S. (2007). EDR2 negatively regulates salicylic acid-based defenses and cell death during powdery mildew inductions of *Arabidopsis thaliana*. Recuperado el 16 de agosto del 2016 de doi: 10.1186/1471-2229-7-35.
- Wang, D. Weaver, N. Kesarwani, M. Dong, X. (2005). Induction of Protein Secretory Pathway Is Required for Systemic Acquired Resistance. Recuperado el 14 de abril del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890886>

- Wiermer, M. Feys, B. y Parker, J. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. Recuperado el 14 de septiembre del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939664>
- Whalley, H. Knight, M. (2012). Calcium signatures are decoded by plants to give specific gene responses. Recuperado el 26 de mayo del 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.12087/pdf>
- Walters, D. Ratsep, J. y Havis, N. (2013). Controlling crop diseases using induce resistance challenges for the future. Recuperado el 26 de julio del 2016 de <https://academic.oup.com/jxb/article/64/5/1263/632461/Controlling-crop-diseases-using-induced-resistance>
- Wasternack, C. Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. Recuperado el 14 de julio del 2016 de doi: :10.1093/aob/mct067.
- White, P. Broadley, M. (2003). Calcium in plants. Recuperado el 25 de julio del 2016 de <https://academic.oup.com/aob/article/92/4/487/222903/Calcium-inPlants>
- Wong, M y Medrano, J. (2005), Real-time PCR for mRNA quantitation, Biotechniques. Recuperado el 17 de noviembre del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16060372>
- Yarnold, P. Soltysik, R. (2013). Optimal Data Analysis: A General Statistical Analysis Paradigm. Recuperado el 4 de septiembre del 2016 de <https://odajournal.com/2013/09/19/optimal-data-analysis-a-general-statistical-analysis-paradigm/>
- Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., y otros. (1997). Receptor mediated activation of a plant Ca(2+)-permeable

ion channel involved in pathogen defense. Recuperado el 15 de junio del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20162/>

ANEXOS

TABLAS

ANEXO 1: Solución óptima Murashige & Skoog

Dieta optima	Elementos	g/L	Solución stock: 2XMACRO, HIERRO 100X, MICRO 200x	DE 400 mL
Macros	NH₄NO₃	1,65	3,3	
	KNO₃	1,9	3,8	
	CaCl₂.2H₂O	0,44	0,88	200
	MgSO₄.7H₂O	0,37	0,74	
	KH₂PO₄	0,205	0,41	
Micros	MnSO₄.H₂O	0,022	4,4	
	ZnSO₄.7H₂O	0,0086	1,72	
	H₃BO₃	0,0062	1,24	
	KI	0,00083	0,166	2
	Na₂MoO₄.2H₂O	0,00025	0,05	
	CuSO₄.5H₂O	2,5000E-05	0,005	
	CoCl₂.6H₂O	0,000025	0,005	
Hierro	FeSO₄.7H₂O	0,0278	2,78	4
	Na₂EDTA.H₂O	0,03724	3,724	

ANEXO 2: Solución sin calcio Murashige & Skoog

Dieta con deficiencia de calcio	Elementos	g/L	Solución stock: 2XMACRO, HIERRO 100X, MICRO 200x	Solución de 400 ml
Macros	NH ₄ NO ₃	1,8	3,6	
	KCl	0,4	0,8	
	KNO ₃	1,5	3	
	Ca(OH) ₂	0	0	200
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0	0	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37	0,74	
	KH ₂ PO ₄	0,205	0,41	
	Micros	MnSO ₄ .H ₂ O	0,022	4,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O		0,0086	1,72	
H ₃ BO ₃		0,0062	1,24	
KI		0,00083	0,166	2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		0,00025	0,05	
CuSO ₄ .5H ₂ O		0,000025	0,005	
CoCl ₂ .6H ₂ O		0,000025	0,005	
Hierro	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,027	2,7	4
	Na ₂ EDTA.H ₂ O	0,03724	3,724	

ANEXO 3 : Solución con exceso de Calcio Murashige &Skoog

Dieta con exceso de calcio 5X	Elementos	Para preparar 1 litro	Solución stock: 2XMACRO, HIERRO 100X, MICRO 200x	DE 400 mL 5X
Macros	NH ₄ NO ₃	1,61	3,22	
	KCl	0	0	
	KNO ₃	2,021	4,042	
	Ca(OH) ₂	0,371	0,742	200
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4	0,8	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37	0,74	
	KH ₂ PO ₄	0,205	0,41	
Micros	MnSO ₄ .H ₂ O	0,022	4,4	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0086	1,72	
	H ₃ BO ₃	0,0062	1,24	2
	KI	0,00083	0,166	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,00025	0,05	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2,50E-06	0,0005	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,000025	0,005	
Hierro	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,027	2,7	4
	Na ₂ EDTA.H ₂ O	0,03724	3,724	

ANEXO 4: Solución óptima Hoagland

Dieta optima	Elementos	Concentración de las soluciones madres (gr/L)	Para preparar la solución	Solución 1 L
Macros	2M KNO ₃	202	2,5	0,505
	2M Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O (0.5)L	236	2,5	1,18
	Hierro quelado C ₁₀ H ₁₃ FeN ₂ O ₈	15	1	0,015
	2M MgSO ₄ ·7 H ₂ O	493	1	0,493
	1M NH ₄ NO ₃	80	1	0,08
	1M KHPO ₄ (Ph to 6.0 con 3MKOH)	136	0,5	0,068
	Micros	H ₃ BO ₃	2,86	
MnCl ₂ · 4H ₂ O		1,81		0,000905
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		0,22	0,5	0,00011
CuSO ₄		0,051		0,0000255
H ₃ MoO ₄ · H ₂ O or Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		0,09		0,000045
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		0,12		0,00006

ANEXO 5: Solución sin calcio Hoagland

Dieta con deficiencia de calcio	Elementos	Concentracion de las soluciones madres (gr/L)	Para preparar la solución de 1 Lito	g/L
Macros	2M KNO3	202	2,5	0,505
	2M Ca(NO3)2x4h20 (0.5)L	236	0	0
	Hierro quelado	15	1	0,015
	2M MgSO4x7 H2O	493	1	0,493
	1M NH4NO3	80	1	0,08
	HNO3	50	12	0,6
	1M KHPO4 (Ph to 6.0 con 3MKOH)	136	0,5	0,136
Micros	H3BO3	2,86		0,00143
	MnCl2 x 4H2O	1,81		0,000905
	ZnSO4 X7h20	0,22	0,5	0,00011
	CuSO4	0,051		0,0000255
	H3MoO4 x H2O or Na2MoO4 Xh20	0,09		0,000045
	Na2MoO4 Xh20	0,12		0,00006

ANEXO 6: Dieta con exceso de calcio 5X Hoagland.

Dieta con exceso de calcio	Elementos	Concentración de las soluciones madres (gr/L)	Para preparar la solución	Solución 1L
Macros	2M KNO3	202	2,5	0,505
	2M Ca(NO3)2x4h2O (0.5)L	236	2,5	1,18
	Hierro quelado C10H13FeN2O8	15	1	0,015
	2M MgSO4x7 H2O	493	1	0,493
	1M NH4NO3	90	1	0,09
	Ca(OH)2 50 mL Stock	50	15	1,5
	1M KHPO4 (Ph to 6.0 con 3MKOH)	136	0,5	0,136
Micros	H3BO3	2,86		0,00143
	MnCl2 x 4H2O	1,81		0,000905
	ZnSO4 X7h2O	0,22	0,5	0,00011
	CuSO4	0,051		0,0000255
	H3MoO4 x H2O or Na2MoO4 Xh2O	0,09		0,000045
	Na2MoO4 Xh2O	0,12		0,00006

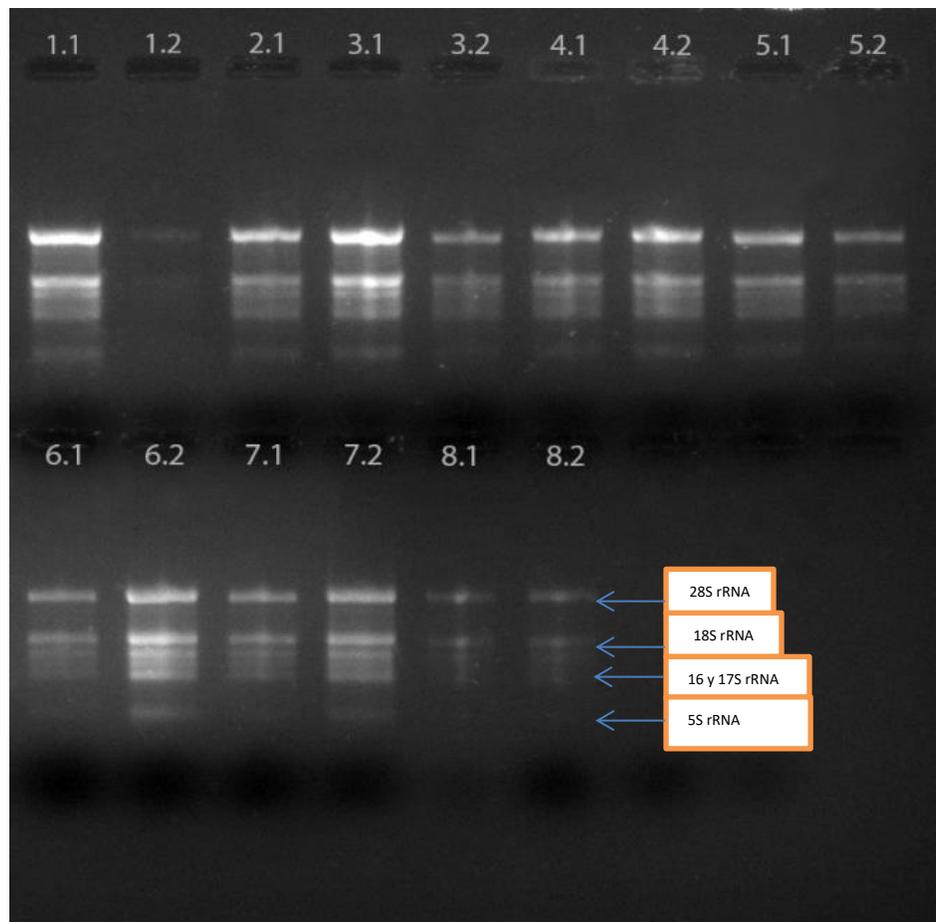
ANEXO 7: Primers utilizados en la q RTPCR

Locus	Genes	Primers
AT5G44420	PDF1.2	Forward: CGAGAAGCCAAGTGGGACAT Reverse: TCCATGTTTGGCTCCTTCAA
AT2G14610	PR1	Forward: CTCGGAGCTACGCAGAACA Reverse: TTCTCGCTAACCCACATGTTCA
AT3G45140	LOX 2	Forward: CGGAACATAGGCCACGGAGA Reverse: TGAGGTGACCCATGCAATCG
AT5G24780	VSP2	Forward: ACAAGGGGACAATGCGATGA

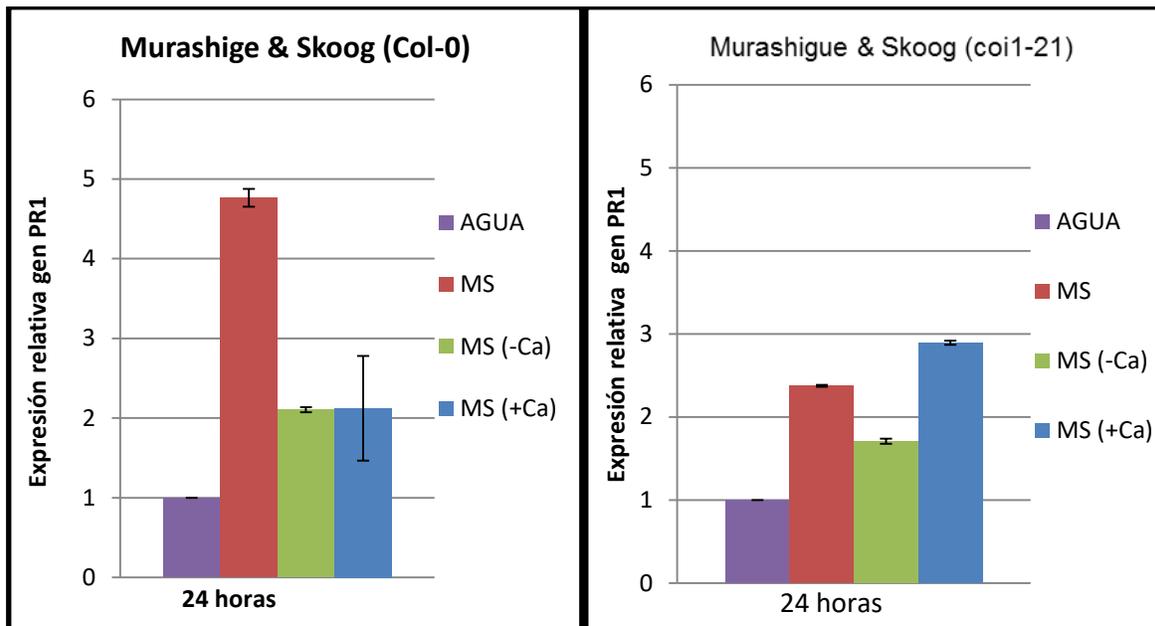
		Reverse: TGGGCTGATTTGGTTGAGGA
AT4G05320	<i>UBI 10</i>	Forward: GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAG Reverse: AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT

ANEXO 8: Extracción de RNA.

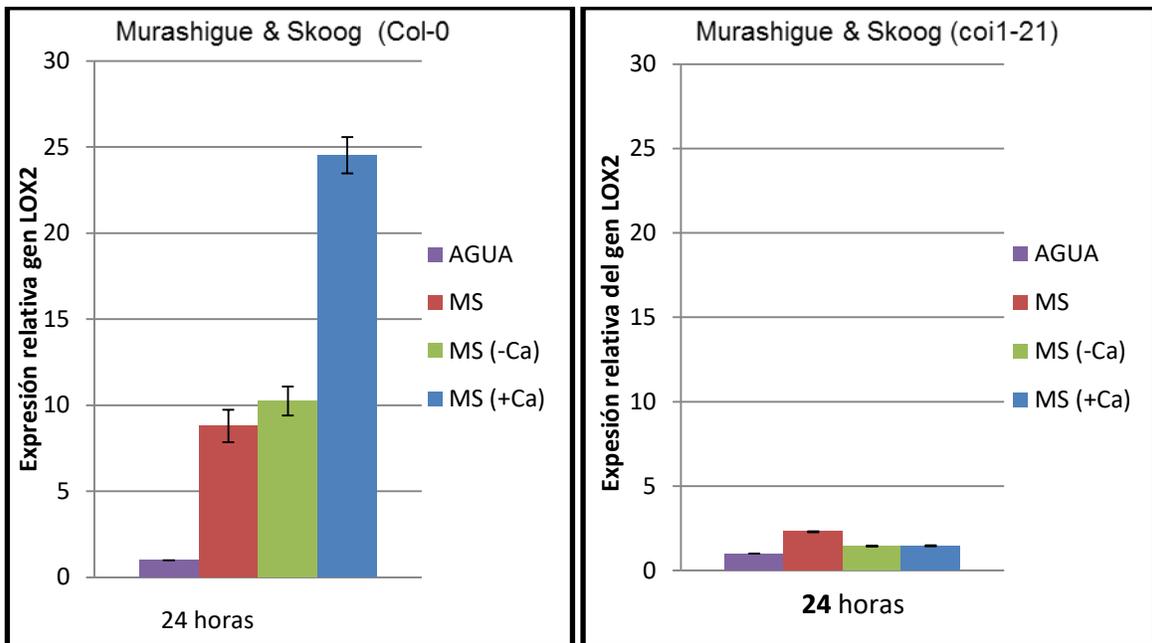
Segunda repetición Murashigue & Skoog y Hoagland 24 horas. 1.1 y 1.2 (Agua destilada), 2.1 (MS dieta optima), 3.1 y 3.2 (MS sin calcio), 4.1 y 4.2 (MS exceso de calcio 5X), 5.1 y 5.2 (Agua destilada), 6.1 y 6.2 (Hoagland dieta optima), 7.1 y 7.2 (Hoagland sin calcio), 8.1 y 8.2 (Hoagland exceso de calcio).



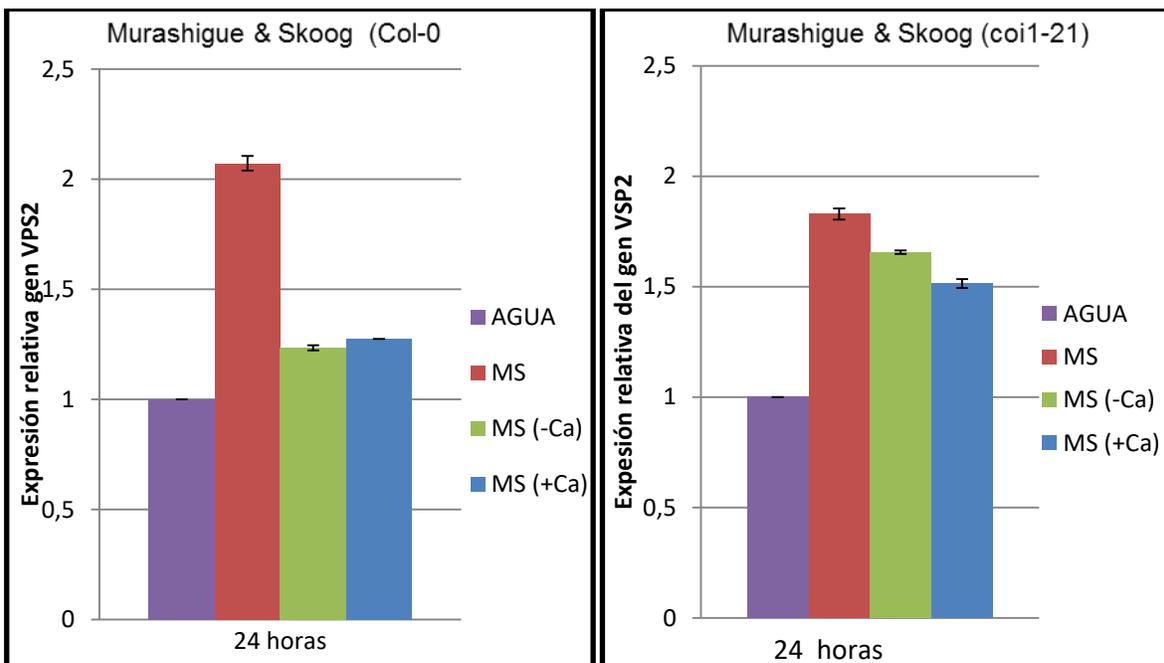
ANEXO 9: Comparación de la expresión génica del gen *PR1* entre Col-0 y el mutante *coi1-21*.



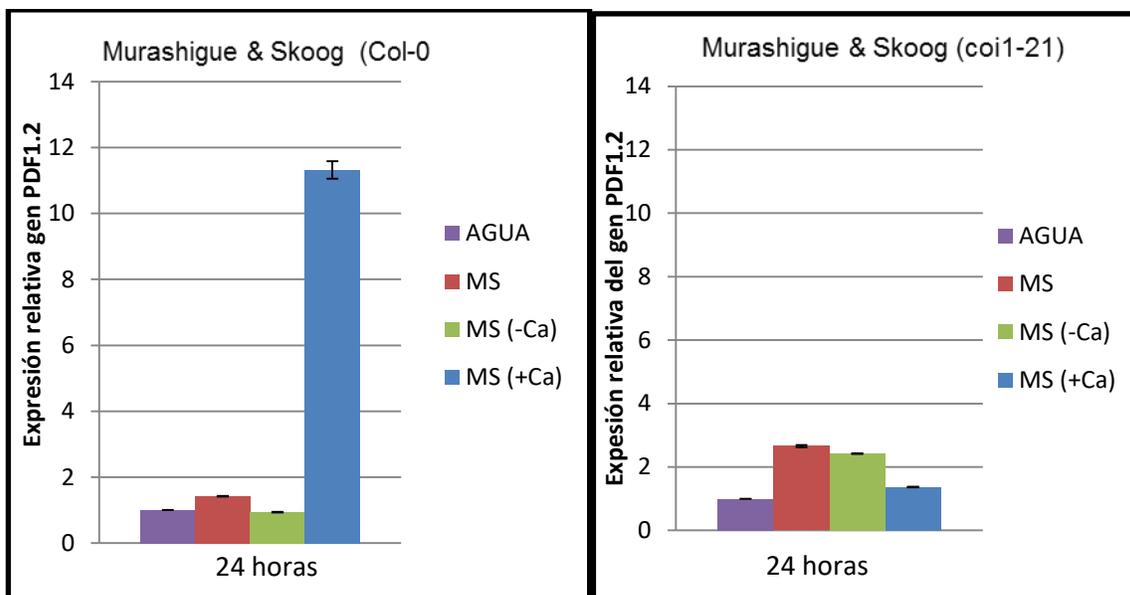
ANEXO 10: Comparación de la expresión génica del gen *LOX2* entre Col-0 y el mutante *coi1-21*.



ANEXO 11: Comparación de la expresión génica del gen *VSP2* entre Col-0 y el mutante *coi1-21*.



ANEXO 12: Comparación de la expresión génica del gen *PDF1.2* entre Col-0 y el mutante *coi1-21*.



ANEXO 13

Soluciones

La extracción de RNA tampón (100 ml)
0,35 M glicina
0,048 M de NaOH
0,34 M NaCl
0,04 M EDTA
4% SDS (añadir tras autoclave)

fenol / cloroformo / alcohol isoamílico [25:24:1 v / v]

cloroformo / alcohol isoamílico [24:1 v / v]

8 M LiCl (100 ml) 33,91 gr LiCl (calor para disolver)

3 M NaAc pH 5,2 (500 ml) 204,1 g NaAc.3H₂O: ajustar el pH con ácido acético glacial

ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico

SA: Ácido salicílico

JA: Ácido jasmónico

NPR1: *NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN*

COI1: *CORONATINE INSENSITIVE 1*

COR: coronatina

NPR1: arabidopsis nonexpresser of pr genes 1

COR: coronatine

MYC2: JASMONATE INSENSITIVE 1

ET: etileno

VSP2: *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2*

LOX2: *LIPOXYGENASE 2*

ERF1: ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1

ORA59: *OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF 59*

PDF1,2: *PLANT DEFENSIN 1.2*

PR1: *PATHOGENESIS-RELATED GENE 1*

PR2: *PATHOGENESIS-RELATED GENE 2*

JAZ: jasmonate zim domain

HPOs: ácidos grasos

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

Avr: genes de virulencia

SAR: Respuesta sistémica adquirida.

HR: respuesta hipersensible

EF hands: proteínas de tipo hélice-bucle-hélice

CaM: calmodulina

CML: *calmodulin-like protein*

CDPK: proteínas dependientes de kinasas

CBL: calcineurina B

ROS: Especies reactivas de oxígeno:

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

MS: Murashigue & Skoog

GLVs: Compuestos volátiles en hojas verdes.

