



Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Rol de la homeostasis de calcio (Ca^{2+}) del Retículo Endoplasmático en
la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) durante la respuesta
sistémica adquirida (SAR) en *Arabidopsis thaliana***

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar
al grado de **Magíster en Biotecnología**.

Director de Tesis: Dra. Francisca Blanco Herrera

Co-Director de Tesis: Dr. Adrián Moreno Vilches

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Andrés Bello

Felipe Miller Lagos Meza

Centro de Biotecnología Vegetal

Plant Pathology Group

Santiago, Chile.

Diciembre, 2016.



**Universidad
Andrés Bello**

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Rol de la homeostasis de calcio (Ca^{2+}) del Retículo Endoplasmático en la
respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) durante la respuesta sistémica
adquirida (SAR) en *Arabidopsis thaliana***

FELIPE MILLER LAGOS MEZA

Esta tesis fue elaborada bajo la supervisión de la Directora de Tesis, Dra. M^a Francisca Blanco Herrera y el Co-Director de Tesis, Dr. Adrián Moreno Vilches en el Laboratorio de Patología en Plantas, Centro de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de Evaluación.

Dra. M^a Francisca Blanco
Directora de Tesis

Dr. Adrián Moreno
Co-Director de Tesis

Dra. Cecilia Gamboa
Comisión de Tesis

Dr. Rodrigo Gutierrez
Comisión de Tesis

Santiago, Chile.

2016.

*"Desde la infancia me veía obligado a concentrar mi atención más allá de mí mismo. Esto me causaba mucho sufrimiento, pero, tal y como lo veo ahora, fue una bendición disfrazada, puesto que me enseñó a **apreciar el valor inestimable de la introspección** a la hora de preservar la vida, y como modo de progresar. La presión de nuestras ocupaciones y la incesante corriente de impresiones que se vierten en nuestra conciencia a través de todas las puertas del conocimiento hacen que la existencia moderna sea arriesgada en muchos modos. La mayoría de las personas están tan absortas en la contemplación del mundo exterior que son totalmente ajenas a lo que está pasando dentro de sí mismas"*

Никола Тесла

Agradecimientos

De pequeño (ahora), quise (quiero) ser astronauta. Navegar por lo infinito y descubrir la capacidad del ser al enfrentar lo desconocido frente a la curiosidad inquietante, porque citando al gran bioquímico ruso, Isaac Asimov: *“acabemos con Sócrates, porque ya estoy harto de este invento de que no saber nada es un signo de sabiduría.”* Pero, para alcanzar el conocimiento que adquirí con este trabajo y en toda mi vida universitaria (que para efectos prácticos cerramos con esto, jajajaja), conté (cuento y de corazón deseo seguir contando) con la sabiduría, sí, sabiduría de grandísimos seres, tanto humanos como no, que me guiaron y ayudaron en esta aventura texto-científico-espacial, a los cuales procedo a dedicar las siguientes palabras:

Los primeros y únicos, mis padres, M^a Soledad (Mini-Má) y Luis; ella, una solucionadora de puzles incomparable, directa y divertida; él, un súper héroe anónimo, incansable e intolerablemente bueno para los consejos (me perdonarás Cabral, pero sí, si hay alguien tan viejo). También mi hermana, Catherine, la mejor proveedora de comida, materiales y cariño; y a ella, pequeña Luna, no puede existir mejor compañera canina para un chico como yo, simple, compleja, curiosa y sencilla, la mejor... es más fácil escribirlo para mi que decirlo... los quiero, bastante, los llevo en mi piel, como un trazado que durará lo que dure esta coraza y en mi corazón, a mi manera.

A mi profesora guía, la Dra. Blanco, por la confianza y el tiempo invertido en mi, la oportunidad que me otorgó y los apriete de tuercas que me dio, merecidos y necesarios; quien dice que la mujer no puede, es porque claramente no la conoce. Al Dr. Claudio Meneses, un hombre con la capacidad de existir en más de tres lugares al mismo tiempo, de saber conversar una cerveza, de escuchar (casi un don) y de tener un gran gusto musical. La filosofía adquiere un gusto distinto luego de conocer su visión de las cosas y su consejo siempre lleva a buen puerto. También al Dr. Moreno, por su labor de co-director y guía; por sus tips en la ejecución de experimentos y por sus tips para afrontar las situaciones cotidianas. Muchas gracias.

A mi grupo de trabajo, FB, Felipe “Jefe” Moraga, un tipo sencillo, serio al principio y pichangero a morir, un ladrón de música incomparable, pero correcto y siempre con la voluntad de aclarar una duda o compartir experiencias. A Cristian, mi inesperado “vecino”, el mejor lutier de guitarras y bajos eléctricos, fiel a sus raíces y a su tierra, un orgullo conocer a uno de los pocos PhD que saldrán de la pequeña y humilde comuna de Conchalí, no cambies nunca bro, hacen falta tipos como tú. A Begoña, Tamara, Paulina y Hernán, apañadores cuando lo necesitaba y secos para hacer sus cosas. También a gente del CBV, que aportó en mi formación y en experiencias

importantes para mi crecimiento: Alejandra, Maripi, Maca, Sebastián Boris, Bene, JP, Henry, Carlitos (un crack), Susana, Tomás y Patricio, agradecido totalmente de ustedes.

Ahora bien, conoces la cita: "*Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he subido a hombros de gigantes*"? Pues bien, he aquí los gigantes con los que he compartido y puedo decir libremente, que me siento honrado (con el pecho más que inflado) de haberlos conocido: cómo olvidar el movimiento de su pie y de su saltar en la silla que justo metía más ruido, cómo no fijarse en su polera de Pink Floyd y en sus ojos más profundos que el universo mismo... imposible. A María Jesús, filósofa de vocación, artista innata, sabiduría pura y disruptiva, andar ligero y coqueto, una mujer hecha y derecha, inteligentísima e igual de bella, ante todo, mi amiga del alma, la vida y el corazón... no es necesario indicar cuánto has hecho por mi, cuánto te adoro y cuánto hemos hecho y vivido juntos y por eso, te doy más que las gracias, tú entiendes, yo lo sé :3.

A Bombón, Burbuja y Bellota, aka, Valentina, Paola y Macarena. La primera avasalladora desde el primer día de clases, allá por el 2011 con su vestimenta ya clásica, pero renovada; su infinita capacidad por preguntarme y discutirme cuanta materia era necesaria, pero con un corazón de oro, siempre ahí, poniendo el hombro, las lucas para la chela o sacando tiempo del sombrero para poner vernos... te quiero, aunque tengas tu pulgar deforme. La segunda, una dama con todas sus letras, siempre respetuosa y afectiva, divertida, servicial y amable... puede parecer un pollito, pero es una mujer de armas tomar y capacidad enorme. Y la última y sí, no importante, Macarrones, la peor mejor amiga de la historia, aun no entiendo como la chica que llegaba cinco minutos antes de que terminara una cátedra, terminó siendo una de las amigas más leales de todas, siempre con su estilo y su tempo, con sus cosas doradas y puntiagudas, su amor a los gatos y sus gesticulaciones inolvidables... chiquillas, ustedes llegarán lejísimos. A Gabriela, por ser parte del mesón divertido, por apañar en todas, buenas y malas, por generar las discusiones científicas necesarias frente a problemas cotidianos y más aún, por ser la persona de la sonrisa eterna, del ánimo incansable y de los bailes ridículos innecesarios de ver, pero siempre presentes, por toda la fruta que te robé y bueno, por ser la compañera de laboratorio que ojalá todos pudieran tener... aunque no te guste el manjar y digas chistes, pero es que malísimos. A Maca, mi primera y hasta ahora única alumna a mi cargo; pasaste de ser una estudiante a una compañera de conversaciones hilarantes geniales. Un agrado y un honor haber sido parte de tu formación y más aún, ser amigo vuestro.

A Danna, Fernanda, Mariajesustodojuntosintilde, Verónica, Francisca y Lissette, muchas gracias por todos sus aportes, críticas, consejos, golpes, conversaciones y demases, han sido parte fundamental de este proceso y de esta parte de mi vida, espero poder continuar con eso.

Cómo no nombrar a ese guapo y coquetón bombón de chocolate llamado Cristian, un hombre completo, sincero, puro y directo, más rico que el pan con palta y más pesado que la cresta, pero aún así, el amigo que todo hombre debería tener. Hemos compartido cosas que solo dios sabe que existen, hemos recorrido caminos interminables y hemos conversado horas completas y acá seguimos, siempre dispuesto y al tanto el uno del otro... pueden pasar meses sin intercambiar palabras o saber del otro, pero cuando se da la oportunidad, es como si nunca hubiese pasado. Debo agradecerles, a ti y a Valentina, esas experiencias de compartir un viernes en nuestra banca, porque sí, es nuestra banca, digan lo que digan. Eres un crack viejo, debes saberlo, un abrazo más que apretado.

A Luis, Julio, Pipe, Matías, un grupo muy variado, pero siempre ahí, con todo. Lucho es un tipo gigante, no de tamaño, sino de ideas y capacidad, centrado y con las ideas claras, nunca tuvo problemas en agarrarme y decirme las cosas que le molestaban de mi, o de la situación en que estábamos, siempre se agradece eso. Julio es de otro planeta, no puede caerle mal a nadie porque es así, genial. Siempre la sonrisa por delante, el apañador infinito y el mejor para bailar, con su cara y sus pasos fuera de serie... qué sería de la vida sin Julio? Sencillo, nada. Pipe, un moustro de la ciencia, el ejemplo del cinetífico joven, responsable, jugado y, sobre todo, un amigo. Partimos súper extrañamente nuestra relación, pero del odio al amor, hay solo un paso (sino vea estos mismos agradecimientos, más arriba), hemos estado en cosas más difíciles de afrontar, que hasta la vida parecía fácil en ese momento, y acá estamos, sobreponiéndonos a todo y siempre apañando, con o sin cerveza y con o sin confesiones increíblemente rarísimas. Y Matías, mi conexión con la cumbiosfera y la vida sin preocupaciones, con el disfrute en una jardinera en R1, hasta conversaciones más allá de lo terrenal, un ídolo underground de aquellos, espero la alegría nunca deje tu cuerpo, como tampoco tus ganas por hacer tus cosas.

Además, agradezco a David Bowie, Jimi Hendrix, Janis Joplin, Amy Winehouse, Björk, Dalí, Julio Verne, García Márquez, Pink Floyd, Led Zeppelin, Tool, Freddy Mercury, Peggy Lee, Nina Simone, Andy Warhol, Carl Sagan, Schrödinger, Marie Curie, Valentina Tereshkova, Star Lord, Rosalind Franklin, Umbreon, Carlos Estay (porque con Estay sí, con otros, no), Mylú, al IN, Cerati, Páez, a Santiago, a Como Asesinar a Felipes, Santa Feria y a muchos más...

Finalmente, a ti, lector, por estar acá, y querer entrar a un mundo (quizás) desconocido, pero apasionante y divertido. Si yo pude lograrlo, también puedes, debes poner de ti, saber cuán valioso/a eres y el mundo será tuyo. No dejes que nadie te detenga.

Si han de parpadear, háganlo ahora...

Financiamiento

Esta tesis fue realizada en el Centro de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello y fue financiada por el proyecto Núcleo DI-590-14/N.

Índice General

Índice General	viii
Índice de Tablas	xii
Índice de Figuras	xiii
Abreviaturas	15
Resumen	18
Abstract	19
Introducción	20
1. Mecanismos de defensa frente a estrés biótico.	21
2. Rol de la señalización de Ca ²⁺ durante SAR.	22
3. Rol de Ácido Salicílico (SA) durante SAR.	23
4. Alta acumulación de proteínas PR y su relación con el estrés del Retículo Endoplasmático.	25
5. Respuesta a proteínas mal plegadas.	25
6. Establecimiento de SAR y el rol del Ca ²⁺ en UPR.	27
Hipótesis	29
Objetivos	29
Objetivo General.	29
Objetivos Específicos.	29
Materiales y Métodos.	30
1. Materiales.	30
1.1. Material Biológico.	30
1.1.1 Material Vegetal.	30
1.1.2 Cepas Bacterianas.	30
1.2 Medios de cultivo.	31
1.2.1 Medios de cultivo para plantas.	31
1.2.1.1 Medio de cultivo para crecimiento <i>in vitro</i> de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	31
1.2.1.2 Medio de cultivo para crecimiento en tierra de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	31
1.2.2 Medios de cultivo para bacterias.	31

1.3 Oligonucleótidos.	32
1.4 Enzimas, kits y reactivos comerciales.	34
1.5 Reactivos generales.	35
1.6 Programas computacionales.	35
1.7 Direcciones de internet.	35
2. Métodos.	36
2.1 Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	36
2.1.1 Crecimiento <i>in vitro</i> de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	36
2.1.2 Crecimiento en tierra de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	36
2.1.3 Crecimiento bacteriano.	37
2.2 Biología molecular.	37
2.2.1 Extracción de DNA genómico para reacciones de PCR.	37
2.2.2 Extracción de RNA total.	37
2.2.3 Síntesis de DNA complementario.	38
2.2.4 Amplificación de fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	39
2.2.5 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR en tiempo real (qRT-PCR).	40
2.2.6 Estandarización de parejas de oligonucleótidos para su utilización en ensayos de qRT-PCR.	41
2.2.7 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	41
2.2.8 Extracto de proteínas totales de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	42
2.2.9 Extracto de fluido intercelular (IWF) de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	42
2.2.10 Análisis mediante <i>Western Blot</i> .	42
2.3. Tratamiento de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	44
2.3.1 Tratamiento de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> para analizar la cinética de genes en respuesta a SA.	44
2.3.2 Infección de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con bacterias.	44
2.3.2.1 Crecimiento de bacterias para la infección.	44

2.3.2.2 Infección de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con bacterias mediante infiltración.	45
Resultados	46
1. Analizar el establecimiento de SAR en plantas silvestres y mutantes <i>aca2</i> , en respuesta a la infección con <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000 (cepa virulenta).	46
1.1 Identificación de plantas mutantes insercionales para la bomba Ca ²⁺ /ATPasa ACA2.	46
1.2. Caracterización de la respuesta sistémica adquirida (SAR) de planta mutante en la Ca ²⁺ /ATPasa ACA2 frente a infección por <i>Pst</i> .	48
2. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de SAR utilizando plantas silvestres y mutantes para la Ca ²⁺ /ATPasa ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.	50
2.1 Análisis de la cinética de inducción relativa de ACA2 durante la respuesta inmune, utilizando plantas silvestres.	50
2.2 Identificación, diseño y estandarización de oligonucleótidos para qRT-PCR de genes marcadores de SAR potencialmente regulados por la actividad de la Ca ²⁺ /ATPasa ACA2.	51
3. Análisis de la cinética de expresión de genes marcadores de UPR utilizando plantas silvestres y mutantes para la Ca ²⁺ /ATPasa ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.	56
3.1 Identificación de oligonucleótidos para qRT-PCR de genes marcadores de UPR potencialmente regulados por la actividad de la Ca ²⁺ /ATPasa ACA2.	56
4. Análisis de la proteína de secreción marcadora de SAR, utilizando plantas silvestres y mutantes para la Ca ²⁺ /ATPasa ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.	62
5. Análisis de la expresión de los genes marcadores de SAR y de genes relacionados a UPR, utilizando plantas silvestres y mutantes en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico bZIP28, bZIP60 e Ire1a/1b, en respuesta tratamientos con SA.	64

5.1 Análisis de la expresión de los genes marcadores de SAR, utilizando plantas silvestres y mutantes en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico bZIP28, bZIP60 e Ire1a/1b, en respuesta tratamientos con SA.	64
5.2 Análisis de la expresión de los genes marcadores de UPR, utilizando plantas silvestres y mutantes en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico bZIP28, bZIP60 e Ire1a/1b, en respuesta tratamientos con SA.	67
Discusión	72
Conclusiones	82
Anexos	83
Bibliografía	85

Índice de Tablas

Tabla 1. Plantas mutantes insercionales utilizadas.	31
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de mutante simple.	32
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el CDS del gen <i>ACA2</i> y el promotor del gen <i>ACA2</i> .	32
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para analizar el nivel de inducción relativa de genes por qRT-PCR.	33
Tabla 5. Condiciones de amplificación para qRT-PCR de genes marcadores de SAR y gen normalizador.	52
Tabla 6. Condiciones de amplificación para qRT-PCR de genes marcadores de UPR y de gen normalizador.	57

Índice de Figuras

Figura 1. Análisis de la cinética de acumulación del transcrito de PR1, en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> silvestres y mutantes <i>eca1</i> , <i>eca4</i> , <i>aca1</i> y <i>aca2</i> .	28
Figura 2. Identificación de plantas homocigotas mutantes <i>knock out</i> para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2.	47
Figura 3. Evaluación de la respuesta sistémica adquirida (SAR) en plantas silvestres y mutantes <i>aca2</i> .	50
Figura 4. Análisis de las veces de inducción de transcrito de ACA2 en respuesta a tratamientos con SA	51
Figura 5. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de la ruta de señalización y síntesis de SA, en respuesta a tratamientos con SA.	53
Figura 6. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de la ruta de señalización y síntesis de SA, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes <i>aca2</i> .	55
Figura 7. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de UPR, en respuesta al tratamiento inductor de SAR.	58
Figura 8. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de UPR, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes <i>aca2</i> .	61
Figura 9. La acumulación y secreción de PR1 es fuertemente afectada en plantas mutantes <i>aca2</i> .	63
Figura 10. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de la ruta de señalización y síntesis de SA, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes <i>bzip28-2</i> , <i>bzip60-2</i> e <i>ire1a/1b</i> .	65
Figura 11. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de UPR, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes <i>bzip28-2</i> , <i>bzip60-2</i> e <i>ire1a/1b</i> .	68
Figura 12. Análisis de la cinética de inducción del transcrito de la Ca^{2+} /ATPasa de RE, <i>ECA1</i> , en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes <i>aca2</i> .	74
Figura A1. Confirmación del producto de qRT-PCR. A.	83

- Figura A2. Determinación de la eficiencia del par de oligonucleótidos mediante diluciones seriadas a partir del producto de qRT-PCR. 84
- Figura B1. Gráficos de la cuantificación de Ca^{2+} citoplasmático en respuesta a distintos tratamientos inductores de estrés biótico. 84

Abreviaturas

ABA	: Ácido Abscísico
ABRC	: <i>Arabidopsis thaliana Biological Resource Center</i>
ACA	: <i>Autoinhibited Calcium ATPase</i>
avr	: Factor de avirulencia
BiP	: <i>Binding Protein</i>
BTH	: <i>Benzothiadiazole</i>
bZIP	: <i>Basic Leucine Zipper</i>
CaM	: Calmodulina
cDNA	: ADN complementario
CDS	: Secuencia codificante
CFU	: Unidades Formadoras de Colonias
CNX	: Calnexina
Col 0	: Columbia 0
CRT	: Calreticulina
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DNA	: Ácido Desoxirribonucleico
DNAg	: ADN genómico
dpi	: Días post infección
DTT	: Ditioneitol
ECA	: <i>ER Calcium ATPase</i>
EDTA	: Ácido etildiaminotetraacético
EF1-α	: Factor de elongación 1- α

ERAD	: <i>Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation</i>
ERQC	: <i>Endoplasmic-Reticulum Quality Control</i>
ET	: Etileno
ETI	: <i>Effector Triggered Immunity</i>
flg22	: flagelina 22
HA	: <i>Human influenza hemagglutinin tag</i>
hpt	: horas post tratamiento
INA	: Ácido 2,6-dicloroisonicotínico
IRE1	: <i>Inositol-Requiring Enzyme-1</i>
JA	: Ácido Jasmónico
LPS	: Lipopolisacárido
MS	: Murashige-Skoog
NahG	: Enzima salicilato hidroxilasa bacteriana
NLS	: Señal de localización nuclear
NPR1	: <i>Non expressor of PR1</i>
OD₆₀₀	: Densidad óptica a 600 nm
PAL	: Fenilalanina amonio liasa
SID2	: Isocorismato sintasa 1
PAMPs	: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
pb	: Pares de bases
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PDIL	: Proteína Disulfuro Isomerasa
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i>

PRs	: <i>Pathogenesis Related</i>
Pst	: <i>Pseudomonas syringae</i> patovar <i>tomato</i>
PTI	: <i>PAMPs Triggered Immunity</i>
pv	: patovar
qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
R	: Receptor de moléculas efectoras
RE	: Retículo Endoplasmático
RNA	: Ácido Ribonucleico
ROS	: Especies Reactivas de Oxígeno
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
SA	: Ácido Salicílico
SAR	: Resistencia Sistémica Adquirida
SDS	: Dodecilsulfato sódico
SHD	: <i>Shepherd Protein</i>
TAE	: Tampón Tris-Acetato, EDTA
T-DNA	: ADN de transferencia
TNE	: Tampón Tris-NaCl, EDTA
UPR	: <i>Unfolded Protein Response</i>
UPRE	: <i>UPR Elements</i>
WT	: <i>Wild Type</i>

Resumen

El ion calcio (Ca^{2+}) juega un rol fundamental dentro de la célula como segundo mensajero, y se ha demostrado que la homeostasis de este ion está involucrada en diversos procesos celulares, entre ellos, el establecimiento de SAR, por lo que, en este trabajo, se analizará cómo afecta al establecimiento de SAR la alteración de la dinámica de Ca^{2+} , dada entre el citoplasma y el RE, y su relación con la respuesta de UPR. Para esto, se analizó la bomba Ca^{2+} /ATPasa presente en el RE, ACA2, y el efecto de su ausencia en el establecimiento de SAR. Se utilizaron plantas silvestres y mutantes en esta bomba de Ca^{2+} para analizar el establecimiento de SAR en respuesta a la infección por *Pseudomonas syringae*, la activación y secreción de proteínas de defensa y la participación del RE y de genes de UPR, en la respuesta de defensa. Además, se compararon los resultados con plantas mutantes para los factores de transcripción activados en respuesta a estrés biótico. Estos resultados demuestran el rol central de ACA2, en la dinámica de Ca^{2+} existente entre citoplasma y RE, durante la respuesta a proteínas mal plegadas y el establecimiento de SAR en *Arabidopsis thaliana*.

Abstract

Calcium ion (Ca^{+2}) plays key roles in cells as a second messenger, and it has been demonstrated that its homeostasis is involved in several processes, among them, SAR establishment. Therefore, in this work, the way in which SAR establishment is affected by Ca^{+2} dynamics, given between the cytoplasm and RE, and its relation with UPR response, will be analyzed. For this purpose, the absence of a Ca^{+2} /ATPase pump from RE, ACA2, was analyzed during SAR establishment. Wild-type plants and mutant plants for this Calcium pump were used to analyze SAR establishment as a response to infection by *Pseudomonas syringae*, the activation and secretion of defense proteins, and the participation of RE and UPR genes in defense response. In addition, obtained results were compared with those of mutant plants for the transcription factors that are activated as a response to biotic stress. This results demonstrate the central role of ACA2 in the Ca^{+2} dynamics between cytoplasm and RE, during the Unfolded Protein Response and SAR establishment *in Arabidopsis thaliana*.

Introducción

En su ambiente natural, y dada su naturaleza sésil, las plantas están constantemente expuestas a condiciones medioambientales adversas y han tenido que desarrollar y evolucionar sofisticados mecanismos para percibir y responder a estas señales ambientales con el fin de sobrevivir y propagarse. Estos mecanismos incluyen cambios a nivel fisiológico, celular y molecular, incluyendo la reprogramación transcripcional (Blanco *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2015).

El desarrollo de una apropiada respuesta de defensa, está ligada a la interacción de múltiples componentes, que incluyen: un estallido rápido y transitorio de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático y la biosíntesis de fitohormonas tales como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA) y etileno (Bari & Jones, 2009; Pieterse *et al.*, 2012; Sierla *et al.*, 2013).

Las fitohormonas son moléculas pequeñas, esenciales para la regulación del crecimiento de la planta, su desarrollo y supervivencia. Cambios en la concentración o sensibilidad a estas hormonas pueden ser gatillados tanto bajo condiciones de estrés biótico como abiótico y mediar una gran cantidad de respuestas adaptativas. Las fitohormonas como SA, JA, ET y ABA; son pequeñas moléculas endógenas que regulan principalmente las respuestas de protección de las plantas tanto contra estrés de tipo biótico como abiótico, a través de acciones sinérgicas y antagónicas que se conocen como la señalización cruzada (Fujita *et al.*, 2006). Más aún, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ha sido propuesta como un proceso clave que es compartido entre las respuestas a estrés biótico y abiótico (Apel & Hirt, 2004; Torres & Dangl, 2005). Por otra parte, otras moléculas han sido identificadas en las vías de respuesta a estrés y señalización hormonal. Por ejemplo, la señalización por óxido nítrico (NO) y por el ion calcio (Ca^{2+}) juegan un rol fundamental en la respuesta de defensa de plantas, ya sea en los movimientos estomáticos o en la respuesta a estrés por sequía (Mahajan, 2008).

Para procesar la información percibida desde el ambiente, o la interacción con otros organismos, las plantas usan segundos mensajeros, como el ion Ca^{2+} . Un incremento en los niveles de Ca^{2+} en algún compartimento celular, actúa como señal llevando información específica, que debe ser traducida en una adecuada respuesta biológica

(Pittman & Hirschi, 2003). Muchos factores endógenos y exógenos, incluidos la variación de luz, temperatura, sequía, salinidad, fitohormonas, patógenos, o moléculas derivadas de ellos, provocan elevaciones en los niveles de Ca^{2+} en diferentes compartimentos celulares (McAinsh & Pittman, 2009). No obstante, independientemente del factor al que se ven expuestas las plantas, las respuestas que desencadenan como forma de defensa, se basan principalmente en cambios a nivel transcripcional. Esto permite mitigar el problema generando su adaptación a las nuevas condiciones de estrés ambiental o, en el caso de un estrés biótico, la capacidad de contener el daño.

En esta tesis, nos enfocaremos en la respuesta de defensa que establece la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, frente a una infección por el patógeno bacteriano hemibiótrofo, *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (O'Brien *et al.*, 2011).

1. Mecanismos de defensa frente a estrés biótico.

Las plantas están constantemente expuestas a un gran número de patógenos, los cuales basados en su estilo de infección, pueden ser divididos en dos grandes grupos: biótrosfos y necrótrosfos (Glazebrook, 2005; Mengiste, 2012; Lai & Mengiste, 2013). Los patógenos biótrosfos dependen de los nutrientes de las células vivas del hospedero, mientras que los necrótrosfos se alimentan de las células muertas; además, se ha demostrado que las plantas emplean distintas respuestas inmunes para enfrentar cada uno de dichos patógenos (Spoel & Dong, 2012; Dangl *et al.*, 2013).

La primera etapa de defensa del hospedero, frente a un patógeno hemibiótrofo, correspondiente a un patógeno que puede variar su comportamiento entre biótrosfo o necrótrosfo, a lo largo de su ciclo de vida, involucra el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógeno, denominados PAMPs; tales como flagelina bacteriana, lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Los PAMPs son reconocidos por proteínas especializadas de transmembrana de la planta, denominadas Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs; Jones & Dangl, 2006). El reconocimiento de PAMPs por PRRs gatilla una señalización río abajo que culmina en la activación de la resistencia basal, denominada Inmunidad Gatillada por PAMPs (PTI) (Schewessinger & Ronald, 2012). PTI puede ser suprimida por los patógenos, si estos codifican proteínas efectoras comúnmente conocidas como factores de avirulencia (*avr*) (Göhre & Robatzek, 2008;

Cunnac *et al.*, 2009; Caillaud *et al.*, 2012; Dangl *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2015). A este proceso se le denomina Susceptibilidad gatillada por Efector (ETS). Los factores *avr* pueden ser reconocidos por el hospedero si éste sintetiza las denominadas proteínas de Resistencia (*R*), las cuales codifican proteínas intracelulares (Jones y Dangl, 2006). Este reconocimiento *R-avr* permite el establecimiento de la denominada Inmunidad gatillada por Efector (ETI) (Bogdanove & Martin, 2000; Mackey *et al.*, 2002; Jones & Dangl, 2006; Gao *et al.*, 2015). ETI está asociada con la Muerte Celular Programada (PCD) en el sitio de la infección, y este fenómeno es denominado Respuesta Hipersensible (HR) (Holliday *et al.*, 1981; Dangl *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2015). La inducción de la respuesta local se relaciona con el transporte de señales de defensa a través de toda la planta, lo que resulta en una resistencia de amplio espectro contra segundas infecciones. Este fenómeno, conocido como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), es conservado en diversas especies de plantas y confiere una resistencia duradera frente a patógenos no relacionados entre ellos (Neuenschwander *et al.*, 1996; van Loon, 2000; Grant & Lamb, 2006; Métraux, 2013; Wendehenne *et al.*, 2014). La activación tanto de HR como SAR, requiere de la biosíntesis de SA y de ROS (Jones & Dangl, 2006).

2. Rol de la señalización de Ca²⁺ durante SAR.

El ion Ca²⁺ fue establecido como segundo mensajero esencial en numerosas vías de respuesta y representa la molécula de señalización más versátil en las plantas (Batistič & Kudla, 2012). La concentración de Ca²⁺ citosólico, [Ca²⁺]_{cyt}, es un punto de convergencia para el comienzo de distintas vías de señalización. Cada señal crea su propia firma de Ca²⁺ y ésta depende a su vez, de una fina regulación entre los influjos y eflujos que se generan tanto en la membrana plasmática, como en los diferentes compartimentos subcelulares (Pittman & Hirschi, 2003; Spalding & Harper, 2011). La [Ca²⁺]_{cyt} es 10⁴ veces menor que la presente en el apoplasto o en los organelos celulares, lo que provee un alto potencial para la entrada de calcio al citosol, donde actuará como segundo mensajero (Lecourieux *et al.*, 2006). La apertura de los canales de influjo en respuesta a algún tipo de estímulo, liberará Ca²⁺ al citosol, lo que llevará a la generación de un apogeo; mientras que los transportadores de eflujo (transportadores activos secundarios de H⁺/Ca²⁺ y Ca²⁺/ATPasa) devolverán la [Ca²⁺]_{cyt} a sus niveles normales

(McAinsh & Pittman, 2009; Bonza & De Michelis, 2011). Para sensar y decodificar la información que es representada en cada Ca^{2+} *signature*, las plantas están equipadas con un gran número de proteínas sensoras de Ca^{2+} , como Calmodulinas (CaM), Similares a Calmodulina (CML), proteínas kinasa dependiente de Ca^{2+} (CDPK) y Similares a Calcineurina B (CBL) (Batistič & Kudla, 2012; Cheval *et al.*, 2013).

Cuando la planta reconoce al patógeno, se desencadena la entrada de Ca^{2+} desde el dominio extra celular hacia el citosol. Esto genera un aumento en la concentración de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, lo que es detectado por las proteínas sensoras de Ca^{2+} , lo que, a su vez, desencadena la liberación de calcio desde organelos tales como la vacuola, el cloroplasto y el retículo endoplasmático (Knight *et al.*, 1996; van Der Luit *et al.*, 1999). Este *peak* en la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, conlleva la interacción de Calmodulina con distintos factores de transcripción, que activarán la expresión de genes de defensa (Ma, 2014; Wu *et al.*, 2014). Grant *et al.* (2000) reportaron el aumento de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ frente a la infección bacteriana de *Pseudomonas syringae* patovar *tomato*. Adicionalmente, se describe que el gen de avirulencia RMP1 facilita un rápido aumento de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, necesario para el estallido oxidativo y la muerte celular programada. De esta manera, la entrada de calcio mediada por elicitador genera cambios transitorios en la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Binet *et al.*, 2001; Lecourieux *et al.*, 2002).

Cuando la señal móvil, posiblemente el ácido azelaico (Walley *et al.*, 2013), es detectada en los tejidos distantes a la infección, también se produce la entrada de calcio al citosol de la célula, generando un aumento de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, pero ahora, la codificación de la señal se centraliza en activar la ruta de biosíntesis de SA, por la vía del Isocorismato (Vlot *et al.*, 2008).

3. Rol de Ácido Salicílico (SA) durante SAR.

El SA es una molécula señal clave en la respuesta de defensa de las plantas y en el establecimiento de la resistencia frente a la infección (Shah, 2003; Loake & Grant, 2007; Blanco-Herrera, 2009; Kumar, 2014). La importancia de esta hormona en la respuesta de defensa, ha sido demostrada genéticamente mediante la utilización de plantas mutantes en enzimas de su biosíntesis, como por ejemplo la Isocorismato Sintasa (*ICS1*, también denominada *SID2*). En estas plantas, no se observa acumulación de SA luego de una inoculación con patógenos (Nawrath & Métraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2001) y,

además, presentan una mayor susceptibilidad frente al ataque de éstos. Resultados similares se han observado con la utilización de plantas transgénicas para el gen *NahG*, que codifica para la salicilato hidroxilasa, una enzima de origen bacteriano (*Pseudomonas putida*) que hidroliza el SA, convirtiéndolo en catecol (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994).

Cuando una planta es infectada por un patógeno hemibiótrofo, comienza una cascada de señales que llevan a la síntesis de SA, proceso que puede efectuarse por dos vías distintas. Se ha descrito que la vía de los fenilpropanoides es responsable de la síntesis rápida de SA, asociada a la muerte celular a nivel local, mientras que la vía del isocorismato es la principal vía de síntesis sostenida, la cual gatilla SAR (Wildermuth *et al.*, 2001; Durrant & Dong, 2004; Chen *et al.*, 2009). Además, se ha descrito que la aplicación de SA de manera exógena, induce SAR en las plantas (White, 1979).

Río abajo de la acumulación de SA, se genera una importante reprogramación transcripcional (de Vos *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2015). Dentro de los genes de defensa cuya transcripción se activa, encontramos un importante grupo de genes que codifican para proteínas con actividad antimicrobiana y antifúngica, llamadas proteínas relacionadas con patogenicidad o *Pathogenesis Related* (PRs) (van Loon & van Strien, 1999; Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005).

Las de proteínas del tipo PR se sintetizan sólo en respuesta a ataque de patógenos y en general, corresponden a proteínas pequeñas, con actividad antimicrobiana, secretadas al apoplasto o con destinación vacuolar (Wang *et al.*, 2005).

Ha sido descrito que, frente a un ataque por patógeno, en *A. thaliana*, las principales proteínas PR secretadas corresponden a PR1, PR2 y PR5, cuya actividad anti microbiana ha sido demostrada *in vitro* (Uknes *et al.*, 1992). Durante el establecimiento de SAR, existe una acumulación masiva de estas proteínas en el apoplasto y en la vacuola con el objetivo de mitigar el ataque del patógeno, sin embargo, la actividad basal de la vía secretora de proteínas no es suficiente para cumplir con las necesidades de plegamiento que son requeridas en estas condiciones (Wang *et al.*, 2005; van Loon *et al.*, 2006).

4. Alta acumulación de proteínas PR y su relación con el estrés del Retículo Endoplasmático.

El retículo endoplasmático (RE) es el organelo encargado de la maduración inicial de proteínas, proceso fundamental para su correcto plegamiento. Aproximadamente un tercio de las proteínas de la célula son clientes de este organelo, es decir, pasan por este para ser plegadas y ensambladas hasta su conformación tridimensional final (van Loon *et al.*, 2006; Vitale & Boston, 2008; Deng *et al.*, 2013). Para el correcto plegamiento de las proteínas, se requiere de la función de numerosas proteínas chaperonas residentes en el RE, que evitan la agregación de proteínas nacientes y que permitirán que estas sigan hacia el aparato de Golgi y posteriormente hacia su destino final. Sin embargo, cuando la síntesis de proteínas se ve aumentada en respuesta a diversos estímulos, se pierde el balance existente entre la capacidad de plegamiento y la demanda de proteínas a ser plegadas, por lo que el proceso de plegamiento se ve alterado, generando estrés de retículo (Li *et al.*, 2009; Hetz, 2012; Deng *et al.*, 2013).

Esta situación es la que ocurre durante la infección de una planta por un patógeno (Moreno *et al.*, 2012). Debido a la demanda masiva de las proteínas de defensa del tipo PR y a la necesidad de un correcto plegamiento y/o modificaciones post-traduccionales que les permitan adquirir su estructura, función y destinación, es que la maquinaria secretoria de la célula, específicamente el retículo endoplasmático (RE), se ve sobrepasado. Esto genera la acumulación de proteínas que no están adquiriendo la conformación estructural y funcional necesaria (Li *et al.*, 2009).

5. Respuesta a proteínas mal plegadas.

Las células poseen un sistema de control de calidad en el RE (ERQC, *ER Quality Control*), cuya alteración causada por la acumulación de proteínas mal plegadas, gatilla la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (*Unfolded Protein Response*). La función de UPR es regular positivamente la producción de factores que promueven el plegamiento de las proteínas y la eliminación de las proteínas mal plegadas del retículo a través del sistema de degradación (ERAD, *ER associated degradation*). De esta manera, las proteínas mal plegadas son eliminadas, mediante el transporte desde

el RE hacia el citosol para una degradación vía proteosoma (Liu & Howell, 2010; Deng *et al.*, 2013).

Para mitigar el estrés de retículo, las células son capaces de activar una serie de mecanismos adaptativos que permiten detectar las alteraciones en el plegamiento de las proteínas, para lo cual se favorece la síntesis de proteínas chaperonas y otros componentes involucrados tanto en ERQC, como en ERAD (Deng *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando las células están bajo un proceso de estrés irreversible en el retículo, UPR es capaz de eliminarlas mediante el proceso de muerte celular programada, indicando que existen mecanismos que integran la información relacionada a la duración e intensidad del estímulo estresante para la planta. En este escenario, una señalización dinámica es integrada por UPR, de manera de mantener la homeostasis del retículo en un ambiente de estrés (Crosti *et al.*, 2001; Hetz, 2012).

Entre las proteínas chaperonas, cuyo papel es importante en respuesta a este fenómeno de UPR, se encuentran las proteínas del tipo *BiP*, que son proteínas residentes del RE, codificadas por tres genes, *BiP1*, *BiP2* y *BiP3*, que en conjunto asisten al correcto plegamiento de las proteínas nacientes en este organelo. Estas proteínas poseen un dominio C-terminal de unión a sustrato, el que se puede unir a las zonas hidrofóbicas de las proteínas, evitando así su posible aglomeración (Humbert *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013; Howell, 2013). Por su parte, las proteínas disulfuro-isomerasas (*PDIs*) son las responsables de la formación de puentes disulfuro y del intercambio de puentes entre los residuos de cisteína de las proteínas mal plegadas (Deng *et al.*, 2013). Otras proteínas importantes son calnexina (CNXs) y calreticulina (CRTs) que unen Ca^{2+} y, que sí reconocen una señal de mal plegamiento (que puede ser la detección de aminoácidos hidrofóbicos, que normalmente se disponen hacia adentro), retienen a las proteínas en el retículo (Iwata & Koizumi, 2012; Deng *et al.*, 2013).

Respecto a la señalización entre el lumen del RE y el núcleo, frente a condiciones de estrés generadas en respuesta al ataque por patógeno, se han descrito dos vías, la vía de IRE1 y el procesamiento de ARNm de bZIP60, y la vía de bZIP28. En la primera, se activa *IRE1* (*Inositol-requiring enzyme 1*), una enzima con actividad proteasa/ribonucleasa anclada a la membrana del RE (Cox *et al.*, 1993). Una vez activada

esta enzima, procesa al ARNm que codifica para *bZIP60* (Deng *et al.*, 2011; Nagashima *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012). Este procesamiento no convencional, en donde son escindidos 23 pares de bases, generando un cambio en el marco de lectura que elimina el dominio transmembrana, genera un factor de transcripción que irá al núcleo y regulará de manera positiva los genes que ayudarán a mitigar el estrés de retículo, como las chaperonas mencionadas anteriormente (Howell, 2013). En la segunda vía de señalización, se ha descrito que el factor de transcripción bZIP28, correspondiente a una proteína de membrana del tipo II, que presenta un único dominio de transmembrana, un dominio N- terminal, que contiene elementos de factor de transcripción (hacia el citosol) y un dominio C- terminal (hacia el lumen del RE), se encuentra retenido en la membrana del RE, mediante la acumulación de chaperonas del tipo BiP. En respuesta al estrés, las proteínas se liberan del dominio C- terminal de bZIP28 ya que son reclutadas para cumplir su función de chaperonas; por ende, este factor comienza a acumularse y es transportado al Golgi, mediante vesículas que tienen componentes del sistema COPII, y proteolizado por las enzimas *S1P* y *S2P* (Liu *et al.*, 2007). Esta modificación libera la porción activa de bZIP28, que migra al núcleo y actúa como factor de transcripción, regulando la expresión de genes relacionados a UPR (Liu *et al.*, 2007; Tajima *et al.*, 2008; Liu & Howell, 2010; Nagashima *et al.*, 2014).

6. Establecimiento de SAR y el rol del Ca^{2+} en UPR.

Los genes involucrados en el proceso UPR son fundamentales para la correcta secreción de proteínas del tipo *PR* durante el establecimiento de SAR, más aún, se ha confirmado un aumento en la síntesis de chaperonas del retículo cuando el proceso de SAR ha sido inducido (Krinke *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2012).

El Ca^{2+} juega un rol importante en esta respuesta, ya que chaperonas como Calreticulina 1, Calreticula 2 y Calnexina 1 (*CRT1*, *CRT2* y *CNX1*, respectivamente) dependen de este catión para su correcta función, por lo que es de suma importancia devolver el Ca^{2+} que se liberó del lumen del RE en respuesta al estrés, ya que, en su ausencia, no se podrá llevar a cabo el proceso de correcto plegamiento de las proteínas (Du *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2012a; Qiu *et al.*, 2012b). En este contexto, resulta interesante evaluar el papel de las Ca^{2+} /ATPasas que ingresan Ca^{2+} desde el citosol, hasta el lumen del RE, ya que de ellas

depende el ingreso de un componente importante para la activación de UPR y, por ende, el establecimiento de SAR.

En *Arabidopsis*, se han identificado cuatro Ca^{2+} /ATPasas de RE, las que corresponden a ACA1, ACA2, ECA1 y ECA4 (Hong *et al.*, 1999; Dunkley *et al.*, 2006). Datos de nuestro laboratorio, sugieren que la ausencia de ACA2 genera serios efectos en la transcripción del gen PR1 (**Figura 1**).

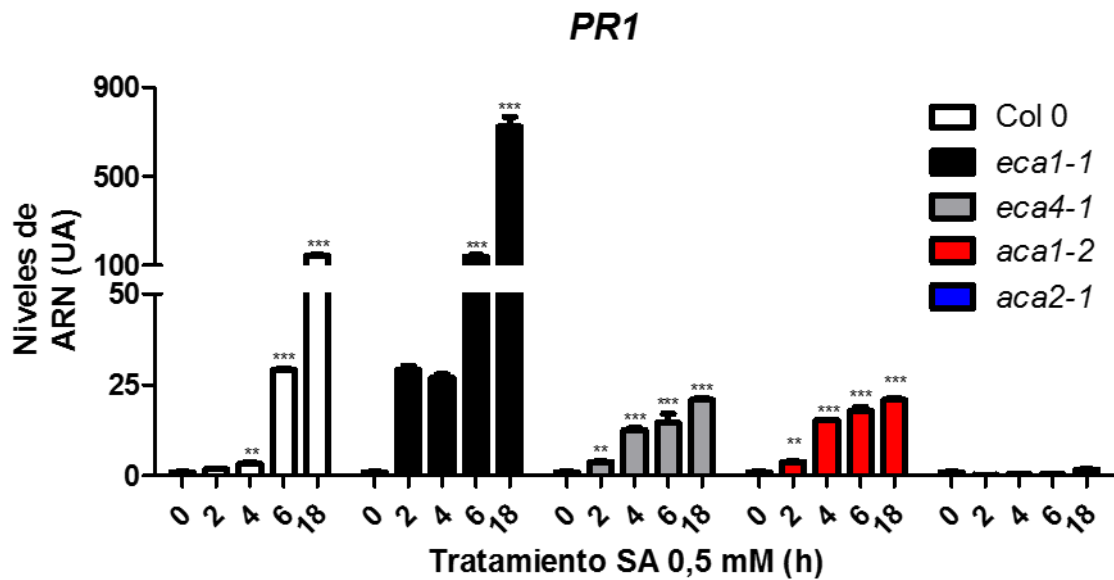


Figura 1. Análisis de la cinética de acumulación del transcrito de *PR1*, en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes *eca1*, *eca 4*, *aca1* y *aca2*. La detección del gen *PR1*, marcador de SAR, se realizó mediante qRT-PCR. Plantas de *Arabidopsis* silvestres y mutantes de 15 días de edad fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM, durante los tiempos indicados. Posteriormente, se extrajo RNA total, el cual se utilizó para sintetizar cDNA y analizar mediante qRT-PCR la acumulación relativa de *PR1*. *β-tub4*, fue utilizado como gen de expresión constitutiva. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre genotipos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA).

El resultado que se observa en la **Figura 1** sugiere que la falta de la actividad de ACA2, bomba que ingresa Ca^{2+} desde el citoplasma al lumen del RE, tendría un rol hasta ahora desconocido durante el establecimiento de SAR; relacionando así la homeostasis de Ca^{2+} del RE y, por tanto, la UPR, con la respuesta de defensa sistémica.

Hipótesis

El establecimiento de la respuesta sistémica adquirida (SAR), requiere la dinámica de Ca^{2+} dada entre el citoplasma y el RE, donde la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, tiene un rol central regulando la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos

Objetivo general.

Determinar el rol de la Ca^{2+} /ATPasa, ACA2, en el establecimiento de SAR y su relación con la expresión de los genes relacionados a UPR en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos específicos.

1. Analizar el establecimiento de SAR en plantas silvestres y mutantes en el gen ACA2, en respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000.
2. Analizar la expresión de genes marcadores de SAR en plantas silvestres y mutantes en el gen ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.
3. Analizar la secreción y síntesis de la proteína marcadora de SAR (PR1) en plantas silvestres y mutantes en el gen ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.
4. Analizar la expresión de genes relacionados a UPR utilizando plantas silvestres y mutantes en el gen ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.
5. Analizar la expresión de los genes marcadores de SAR y de genes relacionados a UPR utilizando plantas mutantes en genes de la vía de señalización de respuesta a estrés biótico *bZIP28*, *bZIP60* e *IRE1a/1b*, en respuesta a tratamientos con SA.

Materiales y Métodos

1. Materiales.

1.1. Material Biológico.

1.1.1 Material Vegetal.

En esta tesis se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (*wild type*, WT), ecotipo Columbia (Col 0); *Arabidopsis thaliana* Col 0 mutantes en la proteína NPR1 (mutante *npr1.1* donada por Xinnian Dong, *Department of Biology, Duke University*) (Cao *et al.*, 1994). Plantas de *Arabidopsis thaliana* Col 0 mutantes insercionales en los factores de transcripción bZIP28 (Liu *et al.*, 2007), bZIP60 (Deng *et al.*, 2011); en la kinasa/RNAasa IRE1a/1b (Moreno *et al.*, 2012) y en la Ca^{2+} /ATPasa de retículo ACA2 (Harper *et al.*, 1998), obtenidas del “*Arabidopsis Biological Resource Center*” (ABRC, *Ohio State University, Ohio, USA*) (**Tabla 1**).

1.1.2 Cepa Bacteriana.

En esta tesis se utilizó la siguiente cepa bacteriana, la cual forma parte del cepario del “*Plant Pathology Group*” del Centro de Biotecnología Vegetal de la Universidad Andrés Bello:

- *Pseudomonas syringae* patovar *tomato* DC 3000 (*Pst* DC3000, cepa virulenta).

1.2 Medios de cultivo.

1.2.1 Medios de cultivo para plantas.

1.2.1.1 Medio de cultivo para crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Para el crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana* se utilizó un medio de crecimiento que se compuso de 2,21 g/L de medio basal Murashige-Skoog (MS ½) (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con vitaminas, 1 %_[p/v] de sacarosa y 0,4 %_[p/v] de Phytigel™. Para su preparación primero se disolvieron las sales del medio basal MS junto con la sacarosa. Luego se ajustó pH a 5,6-5,8 con una solución KOH 1 M, se agregó el Phytigel™ y se esterilizó en autoclave.

Tabla 1. Plantas mutantes insercionales utilizadas.

Genotipo	Gen	Nombre ABRC
<i>aca2</i>	AT4G37640	SALK_082624
<i>bzip28-2</i>	AT3G10800	SALK_123659
<i>bZIP60-2</i>	AT1G42990	SAIL_283_B03
<i>ire1a/ire1b</i>	AT2G17520/AT5G24360	SALK_018112, SAIL_238_F07

1.2.1.2 Medio de cultivo para crecimiento en tierra de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Para el crecimiento en tierra de plantas de *Arabidopsis thaliana*, se utilizó el sustrato comercial Terracult® blue TC10, el que está compuesto de una mezcla de turbas de diferentes grados de descomposición más perlita.

1.2.2 Medios de cultivo para bacterias.

-Medio King's B líquido: Bacto™ peptona, 20 g/L; glicerol 100 %, 10 mL/L; K₂HPO₄, 1,5 g/L; MgSO₄ X 7H₂O, 1,5 g/L y se llevó a 1 L con H₂O destilada. Se ajustó pH a 7.2 con HCL 1M y luego se esterilizó en autoclave.

-Medio King's B sólido: al medio King's B líquido se le adicionaron 15 g/L de Bacto™ agar y se esterilizó en autoclave.

Para dejar creciendo las cepas de *Pseudomonas*, el medio King's B líquido y sólido, se suplementó con los antibióticos kanamicina 50 µg/mL y rifampicina 50 µg/mL.

-Medio LB líquido: Bacto™ Triptona, 10 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; NaCl; se llevó a 1 L con H₂O destilada y se esterilizó en autoclave.

-Medio LB sólido: al medio LB líquido se le adicionaron 15 g/L de Bacto™ agar y se esterilizó en autoclave.

1.3 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se sintetizaron en IDT[®] (Integrated DNA Technologies). En las Tablas 2, 3 y 4 se indican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en esta tesis. La Tabla 2 muestra los pares de oligonucleótidos utilizados para genotipificar las plantas simples mutantes *aca2*, además del oligonucleótido que alinea con la secuencia del *left border* de la planta mutante insercional, LBb1.3 para la línea SALK. En la Tabla 3 se pueden observar los oligonucleótidos que amplifican la región codificante del gen *ACA2* en estudio, utilizados para detectar el transcrito de este y para su clonación. Finalmente, la Tabla 4 muestra los pares de oligonucleótidos utilizados para analizar el nivel de inducción relativa de genes de interés mediante qRT-PCR, y la temperatura a la que fueron estandarizados. Los oligonucleótidos para qRT-PCR fueron utilizados a una concentración final de 250 nM.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de mutante simple.

Nombre	Secuencia nucleotídica (5' → 3')
SALK_0082624c PF	TTGCTTCTTTGTGGAGTTGA
SALK_0082624c PR	CGGTTCTGGTGCAAGGAATG
LBb1.3*	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC

* Oligonucleótido que alinea con la secuencia del *left border* del T-DNA para plantas mutantes insercionales de la línea SALK.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el CDS del gen *ACA2* y el promotor del gen *ACA2*.

Nombre	Secuencia nucleotídica (5' → 3')
ACA2-F	ATGGAGAGTTACCTAAACGAG
ACA2-R2	TCAAACGGGAATCGTCTTCA
pACA2 – F	CGGTTATATGTGCCACTATG
pACA2 – R	CTTCTTACTCCCTCTTCTTCT

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para analizar el nivel de inducción relativa de genes por qRT-PCR.

Nombre	Secuencia nucleotídica (5' → 3')	Tm (°C)
β-tub4 F	ACCTTATCCCATTCCCAAGG	55
β-tub4 R	CAGCGGATGCAGTCAAGTAA	55
ACA2 F	GGTGTGTGCTTGCAAATGTG	56
ACA2 R	GTGTTTAACGAGATAAGCTCGCG	56
BiP1/2 F	TCACTTGGGAGGTGAGGACTTT	55
BiP1/2 R	CTCACATCCCCTTCGGAGCTTA	55
CAMTA3 F	GCATGAAGTGCTGGACCAAA	57
CAMTA3 R	CTTCTTCGCCCAATGCACC	57
CNX1 F	AGAATGAGACAACGGCAACTAT	55
CNX1 R	CTGAGGACGGAGTACTT	55
CRT2 F	GATTCCCTAGCCTCGTCTC	55
CRT2 R	TCATCCTTCTTCCACTCAG	55
EDS1 F	GCGTGTGAGGAGTAGAAAACA	55
EDS1 R	TCCATTTTTCTCTCCCGTGC	55
ERdJ3b F	TCCAACAGATGACAGAGCAGGTC	58
ERdJ3b R	TGTCACAAAGTATCCCTCCCGTTC	58
ICS1 F	GGAACAGTGTCATCTGATCGTAATC	55
ICS1 R	CATTAAACTCAACCTGAGGGACTG	55
PDIL1-2 F	TGACTCCAAGGACTTCAATG	55
PDIL1-2 R	GCAGGGCTTTCAAAGAATTT	55
PR1 F	GAAAACTTAGCCTGGGGTAG	55
PR1 R	CTTCTCGTTCACATAATTCCC	55
SHD F	AACCCGAAAGCAAAGACTGAGAG	58
SHD R	TGCATTCGCGTGTAACCTTTCTTCC	58

1.4 Enzimas, kits y reactivos comerciales.

-DNAsa I, libre de RNAsa. Utilizada para tratar el RNA total previo a la síntesis de cDNA, obtenida de Thermo Scientific, Waltham, MA USA.

-Fast Evagreen® qPCR Master Mix. Utilizado como fluoróforo para la reacción de qPCR, obtenido de Biotium.

-First Strand cDNA Synthesis Kit. Para la obtención de cDNA a partir de RNA total, obtenido de Thermo Scientific, Waltham, MA USA.

-SapphireAmp Fast PCR Master Mix. Utilizada en PCR para Genotipificación de plantas simples y dobles mutantes, obtenida de Clontech Laboratories, California, USA.

-TRIzol® *Reagent*. Para la extracción de RNA total, obtenido de Life Technologies, Gaithersburg, USA.

-PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase. Utilizada para clonación de secuencias, obtenida de Agilent Technologies, Inc, California, USA.

-Platinum Taq High Fidelity. Utilizada para amplificar la región codificante de los genes en estudio, obtenida de Thermo Scientific, Waltham, MA, USA.

-Gateway® LR Clonase® Enzyme mix. Para la recombinación de vectores del sistema Gateway, obtenida de Thermo Scientific, Waltham, MA, USA.

-Bolt® Transfer Buffer, Bolt® Antioxidant, Bolt® Running Buffer y Bolt® Bis-Tris Plus 4-12% (MES). Utilizados para correr y transferir geles de proteínas, obtenidos de Life Technologies, Gaithersburg, USA.

-WesternSure® Chemiluminescent Substrates. Utilizado para revelar *Western blots* mediante quimioluminiscencia, obtenido de LI-COR, Nebraska, USA

-Goat anti-rabbit IgG-HRP. Utilizado como anticuerpo secundario, obtenido de Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA

1.5 Reactivos generales.

De Winkler, se obtuvo agua libre de nucleasas, Bacto™ peptona, Bacto™ agar, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, Tris, EDTA, metanol, NaCl, SDS y Buffer TAE 50X. De PhytoTechnology Laboratories®, se obtuvo el medio MS con vitaminas. De Merck, se obtuvo cloroformo, ácido acético, isopropanol y etanol absoluto. De Sigma, se obtuvo Ácido Salicílico y DEPC. De Thermo Scientific se obtuvo la membrana de nitrocelulosa con poros de 0,45 µm, set de dNTPs 100 mM, los antibióticos kanamicina y rifampicina, y glicerol. Además, se obtuvieron los marcadores de peso molecular para DNA, de 1 kb y 100 bp, y para proteínas SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard. De Biotium, se obtuvo el GelRed™ para la visualización de fragmentos de DNA en geles de agarosa. De Invitrogen, se obtuvo kanamicina y rifampicina. El silwet L-77 se obtuvo de OSi Specialties, USA.

1.6 Programas computacionales.

Para el procesamiento de imágenes y figuras, se utilizó Microsoft Power Point 2016. Para la captura y análisis de imágenes de *Western blot* se utilizó Image Studio Digits V4.0. Para el análisis de secuencias se utilizó Geneious 6.1.3. Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó el programa AmplifX 1.5.4. Para el análisis y procesamiento de los datos de PCR en tiempo real, se utilizó el programa Eco Study v5.0, de Illumina y Microsoft Excel 2016. Para los análisis estadísticos de los gráficos se utilizó el programa Infostat, v2013l. Finalmente, para la generación de gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0.

1.7 Direcciones de internet.

ARAPORT, *Arabidopsis Information Portal*, <https://www.araport.org/>

PlantCARE; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

Pubmed; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

TAIR, *The Arabidopsis thaliana information Resource*; <http://www.arabidopsis.org/>

Plant Systems Biology Gateway Vectors; <http://gateway.psb.ugent.be/search>

2. Métodos.

2.1 Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2.1.1 Crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

En una campana de flujo laminar se esterilizó la superficie de las semillas de *Arabidopsis thaliana*, lavando aproximadamente 50 a 100 semillas en 1 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 50%_{v/v} durante 7 minutos, con agitación constante en vórtex. Las semillas se dejaron decantar y se reemplazó la solución de hipoclorito de sodio por agua destilada estéril y se lavó con agitación constante en vórtex por 3 minutos. El lavado se repitió 3 veces para eliminar todo el remanente de cloro. Una vez esterilizadas y lavadas, las semillas se estratificaron a 4 °C en oscuridad por 48 horas en 500 µL de agua destilada estéril restante del último lavado.

Posteriormente, se sembraron las semillas en placas de Petri con medio MS sólido (Phytigel™) utilizando una micro pipeta. Las placas sembradas se mantuvieron en una cámara de crecimiento controlada a una temperatura entre 21-22 °C y fotoperíodo de luz blanca (~93 µEm²/s) día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) durante el tiempo necesario para cada ensayo).

Las plantas germinadas y crecidas en estas condiciones fueron utilizadas para distintos experimentos y tratamientos descritos en esta tesis (extracción de DNA para genotipificación, tratamientos con SA, extracción de proteínas totales y extracelulares y extracción de RNA).

2.1.2 Crecimiento en tierra de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Una vez esterilizadas las semillas como fue descrito en la sección 2.1.1 de Métodos, éstas se depositaron sobre el sustrato Terracult® previamente humedecido. Las semillas se dejaron germinar y crecer a una temperatura de 21-22 °C bajo ciclos de fotoperíodo de día largo y fueron regadas dos veces por semana.

Las plantas germinadas y crecidas en estas condiciones fueron utilizadas para realizar experimentos de infección con patógenos mediante infiltración.

2.1.3 Crecimiento bacteriano.

La cepa de *Pseudomonas syringae* DC3000 fue crecida a 28 °C con agitación constante a 250 rpm por 24 horas en medio King's B líquido, o a 28 °C por 48 horas sin agitación en medio King's B sólido. Cada una de las cepas se creció en presencia de los antibióticos de selección correspondientes.

2.2 Biología molecular.

2.2.1 Extracción de DNA genómico para reacciones de PCR.

Se tomó un trozo pequeño de hoja (3 mm²) y se colocó en un tubo de micro centrifuga de 1,5 mL que contenía 100 µL de solución de extracción TNE/SDS (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; NaCl 250 mM, EDTA 20 mM y SDS 0,5%_[p/v]). Se homogeneizó con un vástago plástico hasta generar una mezcla uniforme.

El homogeneizado se centrifugó a 13.300 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga Heraeus Pico 17 de Thermo Scientific y luego se rescató el sobrenadante. Para precipitar el DNA, se agregó al sobrenadante 100 µL de isopropanol absoluto, se mezcló por vórtex y se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante. Para lavar el DNA, se resuspendió el sedimento con 100 µL de etanol 70%_[v/v], se mezcló por vórtex 5 segundos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente, colocando el tubo en posición horizontal sobre un papel absorbente. El sedimento de DNA seco se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas, se agitó por vórtex durante 30 segundos y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Las muestras de DNA genómico obtenidas a partir de este protocolo fueron utilizadas para la genotipificación de las plantas simples mutantes, *aca2*, utilizadas en esta tesis.

2.2.2 Extracción de RNA total.

Las extracciones de RNA total de *Arabidopsis thaliana* se realizaron utilizando la solución de extracción comercial TRIzol[®], según indicaciones del fabricante. Brevemente, usando un mortero frío, se pulverizaron 100 mg de tejido con N₂ líquido (evitando su

descongelación). Una vez pulverizado completamente el contenido del mortero, este se transfirió a un tubo de micro centrífuga de 1,5 mL que contenía 1 mL de la solución de TRIzol® y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló vigorosamente en vórtex por 15 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, seguido por una centrifugación a 11.500 rpm durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada Heraeus Megafuga 16R de Thermo Scientific. La fase acuosa se transfirió a un tubo de micro centrífuga de 1,5 mL que contenía 500 µL de isopropanol absoluto, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó nuevamente a 11.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, eliminando el sobrenadante. El sedimento de RNA se lavó con 1 mL de etanol 70%_[v/v] preparado con agua tratada con DEPC, se mezcló por vórtex durante 15 segundos y se centrifugó a 9.000 rpm por 8 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante. El sedimento de RNA se secó a temperatura ambiente aproximadamente por 30 minutos, colocando el tubo invertido sobre papel absorbente. Una vez seco el RNA se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas, tratada con DEPC y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. Una vez extraído el RNA total, éste fue cuantificado utilizando el equipo Epoch. Para estimar la pureza de la muestra de RNA, se midió la razón OD₂₆₀/OD₂₈₀ que se determina mediante espectrofotometría utilizando el equipo Epoch. El RNA extraído y cuantificado de esta manera fue utilizado para la síntesis de DNA complementario, el que fue utilizado para RT-PCR y qRT-PCR.

2.2.3 Síntesis de DNA complementario.

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se trataron 2 µg de RNA total con 2 U/µg de DNasa I libre de RNAsa y 2 µL de 10X *reaction buffer* con MgCl₂ y se incubó en un termociclador Select Cyclor II de Select Bioproducts a 37 °C durante 30 minutos, en un volumen final de 20 µL. Para terminar la reacción se adicionaron 2 µL de EDTA 50 mM, seguido por una incubación a 65 °C durante 10 minutos en un termociclador. Para comprobar la ausencia de DNA se realizó un PCR de prueba con oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento del gen *EF1-α* (factor de elongación 1-α) utilizando la enzima SapphireAmp Fast PCR Master Mix de Clontech y se resolvieron las muestras en un gel de agarosa al 1,5 %_[p/v] en buffer TAE 1X.

La reacción de transcripción reversa se realizó utilizando el oligonucleótido Oligo(dT)₁₈ y 2 µg de RNA tratado con DNasa I, utilizando el sistema *First Strand cDNA Synthesis Kit* de Thermo Scientific, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA previamente tratado con DNasa I se combinó con el oligonucleótido Oligo(dT)₁₈ y se incubó a 65 °C durante cinco minutos. Luego, los tubos fueron traspasados a hielo y se les adicionaron 18 µL de una mezcla de reacción compuesta por 4 µL de 5X *reaction buffer*, 1 µL de *RiboLock RNase inhibitor* (2 U/µL), 2 µL de dNTP mix 10 mM y 2 µL de M-MuLV (20 U/µL), para cada muestra. Este mix se incubó durante 2 horas a 45 °C, seguido de una incubación a 70 °C por 10 minutos.

Con el objetivo de comprobar que la síntesis de cDNA fue efectiva, se realizó un PCR de prueba con oligonucleótidos que amplificaron un fragmento del gen *EF1-α* utilizando la enzima SapphireAmp Fast PCR Master Mix de Clontech y se procedió a resolver las muestras en un gel de agarosa al 1,5 %_[p/v] en buffer TAE 1X. Si se observaron amplificaciones para las muestras de cDNA, este se almacenó a -20 °C hasta su uso a tiempos cortos, o a -80 °C para almacenarlo durante períodos prolongados.

2.2.4 Amplificación de fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación de fragmentos de DNA se utilizó la enzima SapphireAmp Fast PCR Master Mix de Clontech en un volumen final de 10 µL según las especificaciones del fabricante. Los programas de PCR consistieron de una desnaturalización inicial de 1 minuto a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 3 etapas. Primero una desnaturalización a 98 °C por 5 segundos, seguido de una etapa de hibridación de 5 segundos a una temperatura entre 50-57 °C (dependiendo de los oligonucleótidos a utilizar) y luego una etapa de extensión a 72 °C por 10 segundos por kilobase de tamaño a amplificar. Posteriormente se realizó una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Todo esto realizado en un termociclador Select Cycler II de Select Bioproducts. El producto de PCR se mantuvo a 4 °C hasta su utilización.

Para la amplificación de fragmentos de DNA correspondientes a regiones codificantes utilizando la enzima Platinum Taq High Fidelity, se utilizó un volumen final de 20 µL según las especificaciones del fabricante. Los programas de PCR consistieron de una

desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 3 etapas. Primero una desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, seguido de una etapa de hibridación de 30 segundos a una temperatura entre 53-57 °C (dependiendo de los oligonucleótidos a utilizar) y luego una etapa de extensión a 68 °C por 1 minuto y 10 segundos. Posteriormente se realizó una etapa de extensión final a 68 °C durante 10 minutos.

2.2.5 Amplificación de fragmentos de DNA por PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Para la realización de PCR en tiempo real (qRT-PCR), se utilizó el sistema Fast Evagreen® qPCR Master Mix (Biotium), en las condiciones recomendadas por el fabricante. Cada reacción se preparó en un volumen final de 10 µL (5 µL de Fast Evagreen® qPCR Master Mix, 0.25 µL de cada oligonucleótido a una concentración de 10 µM, 3.5 µL de agua libre de nucleasas, volumen que formó parte de la mezcla de reacción, más 1 µL de cDNA molde). Los 9 µL de mezcla de reacción se agregaron a cada pocillo de la placa del equipo Eco Real-Time PCR System de Illumina, más 1 µL de cDNA molde, esto por triplicado técnico. Finalmente, la placa fue cubierta por una película adhesiva que permite el paso de luz hacia el detector del equipo Eco Real-Time PCR System de Illumina.

El programa de PCR consistió de una desnaturalización inicial del DNA a 95 °C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos, los cuales se compusieron de 3 etapas. Primero una desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, seguido de una etapa de hibridación por 15 segundos a una temperatura entre 55-58 °C (dependiendo de la pareja de oligonucleótidos a utilizar, Tabla 4), en el cual se realizó la lectura del componente quimioluminiscente de la mezcla y finalmente una extensión a 72 °C por 15 segundos. Concluidos los ciclos se generó una curva de desnaturalización que constó de una incubación inicial a 95 °C por 15 segundos, seguido de una incubación a 55 °C por 15 segundos y por último una incubación a 95 °C por 15 segundos. Entre las últimas dos incubaciones se generó una nueva lectura del componente quimioluminiscente.

Los datos obtenidos desde el equipo fueron analizados utilizando el programa Eco Study v5.0 de Illumina. Además, se utilizó el programa Microsoft Excel para análisis de ellos con la ecuación de Pfaffl (2001), para determinar el nivel de inducción relativa de los

transcritos analizados con respecto al normalizador. Finalmente, los datos obtenidos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 y el análisis estadístico fue realizado a través del programa Infostat v2013I.

Todos los ensayos de qRT-PCR mostrados en esta tesis fueron realizados de la manera previamente descrita, sin embargo, antes de utilizar las parejas de oligonucleótidos, fue necesaria su estandarización para conocer las condiciones óptimas de funcionamiento y su eficiencia de amplificación.

2.2.6 Estandarización de parejas de oligonucleótidos para su utilización en ensayos de qRT-PCR.

Para la estandarización de las parejas de oligonucleótidos, primero se amplificó un fragmento de cDNA con el sistema Fast Evagreen® qPCR Master Mix (Biotium), utilizando una pareja de oligonucleótidos. Con este producto de qPCR se pudo comprobar que los oligonucleótidos amplificaron para un único producto, a través de la visualización de la curva de desnaturalización del qRT-PCR y luego, se comprobó que este producto era del tamaño esperado, por lo que se procedió a resolver las muestras en un gel de agarosa al 1,5%_[p/v] en buffer TAE 1X (**Anexo A**).

Luego, a partir del producto de qRT-PCR obtenido en el paso anterior, se prepararon diluciones seriadas, agregando 2 µL del producto de qPCR a 18 µL de agua sin nucleasas (dilución 10⁻¹), se mezcló por vórtex y 2 µL de esa dilución se agregaron a 18 µL de agua sin nucleasas (dilución 10⁻²), se realizó esto hasta llegar a la dilución 10⁻⁹. Se utilizó de la dilución 10⁻⁴ a la 10⁻⁹ como molde para la obtención de una curva de estandarización (cuyo r² debe ser ≥ 0.995) y de esta manera, obtener la eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos, la que debe ser desde 90% hasta 105% para un óptimo funcionamiento (Pfaffl, 2001).

2.2.7 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA amplificados por las reacciones de PCR se resolvieron en geles de agarosa horizontales de 1,5%_[p/v] en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM a pH 8,0), suplementado con GelRed™ a la concentración recomendada por el fabricante. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 V (50 mA) durante 50 minutos,

utilizando como indicador de tamaño molecular el marcador de peso molecular para DNA de 1 kb o de 100 bp, de Thermo Scientific. Los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador UV y se fotografiaron utilizando una cámara Olympus NOC-5060 *wide zoom*.

2.2.8 Extracto de proteínas totales de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Los extractos de proteínas totales de *Arabidopsis thaliana* se realizaron homogeneizando la misma cantidad de tejido, previamente pesado en balanza analítica, en buffer de extracción (250 mM Tris-HCl, pH 6.8; 10% SDS; 25% glicerol; 0,1% bromofenol azul y 10% β -mercaptoetanol). El tejido se homogeneizó utilizando un vástago metálico adaptado a un taladro portátil Dremel™ modelo Minimate 762, por 20 segundos a velocidad alta (14000 rpm). Posteriormente, para denaturar las muestras, estas se calentaron por 15 minutos a 65 °C. Finalmente los extractos se centrifugaron por 2 minutos a 13000 g y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

2.2.9 Extracto de fluido intercelular (IWF) de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Los extractos de fluido intercelular de *Arabidopsis thaliana* se realizaron a partir de la misma cantidad de tejido, pesado en balanza analítica. Las plantas se infiltraron al vacío por 30 min a 20 kPa en un buffer compuesto por 100 mM Tris-HCl pH 7.8; 500 mM sacarosa; 10 mM MgCl₂; 10 mM CaCl₂; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) y 1 mM β -mercaptoetanol. Posteriormente, las muestras infiltradas fueron puestas dentro de jeringas de 5 mL sin aguja, las cuales, a su vez, fueron puestas dentro de tubos falcon de 50 mL. El fluido intercelular se recolectó centrifugando las jeringas en los tubos por 5 minutos a 1500 g a 4 °C, el fluido recolectado se mezcló en razón 1:1 con buffer de carga de proteínas (250 mM Tris-HCl, pH 6.8; 10% SDS; 25% glicerol; 0,1% bromofenol azul y 10% β -mercaptoetanol). Finalmente, para denaturar las muestras, estas se calentaron por 15 minutos a 65 °C y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

2.2.10 Análisis mediante *Western Blot*.

Los extractos de proteínas se resolvieron en geles Bolt® Bis-Tris Plus 4-12% (MES) en una cámara especial compatible con este sistema, Mini Gel Tank, obtenida de Life

Technologies, Gaithersburg, USA. Los geles se corrieron en Bolt® Running Buffer 1X por 40 minutos a 165 V utilizando como indicador de tamaño molecular el marcador de peso molecular para proteínas SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con poros de 0,45 µm en Bolt® Transfer Buffer con metanol 10%_[v/v] y Bolt® Antioxidant 0,1%_[v/v] por 1 hora a 10 V utilizando el sistema Mini Blot Module obtenido de Life Technologies, Gaithersburg, USA. Una vez terminada la transferencia, la membrana se incubó con una solución de leche descremada al 5%_[p/v] en buffer TBS-T (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,9%_[p/v] NaCl y 0,1%_[v/v] Tween 20) para bloquear por 12 horas a 4 °C. Terminado el tiempo, se descartó la solución y se reemplazó por buffer TBS-T para lavar la membrana, esta se mantuvo por 10 minutos en agitación constante a 65 rpm, seguido de dos lavados de 5 minutos. Posteriormente, se incubó en una solución de leche descremada al 2,5%_[p/v] en buffer TBS-T, con el anticuerpo primario policlonal de conejo, generado contra un péptido sintético (QDSPQDYLRVHNQARC), que corresponde al extremo amino de la proteína PR1 de *Arabidopsis thaliana*; este anticuerpo se utilizó en una dilución 1:1000 y se incubó por dos horas en agitación constante a 65 rpm. Una vez terminada la incubación, se descartó la solución y se lavó la membrana con buffer TBS-T por 10 minutos en agitación constante a 65 rpm, seguido de dos lavados de 5 minutos. Posteriormente, la membrana se incubó en una solución de leche descremada al 2,5%_[p/v] en buffer TBS-T, con el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-conejo, fusionado a *horseradish peroxidase* (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:10000 y se incubó por una hora en agitación constante a 65 rpm. Finalmente, una vez terminada la incubación se descartó la solución y se lavó la membrana con buffer TBS-T por 10 minutos en agitación constante a 65 rpm, seguido de dos lavados de 5 minutos.

Para revelar la membrana, se utilizó el sistema WesternSure® Chemiluminescent Substrates, incubando la membrada por 5 minutos con una mezcla compuesta por 1 mL WesternSure™ ECL Luminol Enhacer Solution con 1 mL WesternSure™ ECL Stable Peroxide Solution. La membrana se escaneo utilizando el equipo C-DiGit® Blot Scanner y las imágenes obtenidas se analizaron y procesaron utilizando el programa Image Studio Digits v.4.0.

Como control de carga, la membrana fue teñida con rojo Ponceau S, lavando previamente la membrana con TBS-T por 10 minutos en agitación constante a 65 rpm, seguido de dos lavados de 5 minutos y un lavado final con agua destilada. Una vez agregada la solución de rojo Ponceau S (0,1%_[p/v] Ponceau S en 5%_[v/v] ácido acético), se destiñó con agua destilada hasta observar claramente el bandeo.

2.3. Tratamiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2.3.1 Tratamiento de las plantas de *Arabidopsis thaliana* para analizar la cinética de genes en respuesta a SA.

Para analizar la cinética de activación de genes en respuesta al tratamiento con SA, se trataron plantas de *Arabidopsis thaliana* (silvestres y mutantes *aca2*, *bzip28-2*, *bZIP60-2*, *ire1a1b*) de 15 días de edad crecidas *in vitro* en medio MS ½ con PhytageI™.

Las plantas fueron depositadas en una placa Petri con medio MS ½ líquido, suplementado con SA 500 µM (Khan *et al.*, 2015) durante períodos de tiempo correspondientes a 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas para conocer la cinética de activación de los genes marcadores de defensa y de UPR.

Una vez cumplido cada tiempo de tratamiento, las plantas se pusieron suavemente sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de líquido y se congelaron 100 mg de tejido en N₂ líquido e inmediatamente fueron almacenados a -80 °C para su posterior extracción de RNA total, síntesis de cDNA y utilización para ensayos de qRT-PCR. Se utilizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

2.3.2 Infección de plantas de *Arabidopsis thaliana* con bacterias.

2.3.2.1 Crecimiento de bacterias para la infección.

Las bacterias utilizadas en esta tesis para la inoculación de *Arabidopsis thaliana* fueron *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000, bacteria virulenta). Las bacterias se cultivaron a una OD₆₀₀= 0.6-1 en medio líquido King's B suplementado con rifampicina 50 µg/mL y kanamicina 50 µg/mL a 28 °C en agitación durante 24 horas. Posteriormente las bacterias se colectaron por centrifugación y fueron resuspendidas en

5 mL de MgCl₂ 10 mM. La concentración de bacterias fue ajustada a una OD₆₀₀= 0,005 (5x10⁶ CFU/mL) u OD₆₀₀= 0,0001 (1x10⁵ CFU/mL), dependiendo el ensayo a realizar.

2.3.2.2 Infección de hojas de *Arabidopsis thaliana* con bacterias mediante infiltración.

Para caracterizar fenotípicamente el establecimiento de la respuesta sistémica adquirida (SAR), se infectaron plantas silvestres y mutantes *npr1.1* y *aca2* de cuatro a cinco semanas de edad crecidas en tierra. El genotipo mutante *npr1.1*, fue utilizado como control de hipersusceptibilidad.

Las infecciones se realizaron en hojas totalmente expandidas de *Arabidopsis thaliana* de los genotipos antes mencionados; cuatro de estas hojas fueron infiltradas por la cara abaxial (inferior) con una solución de SA 0,5 mM para gatillar el establecimiento de SAR, utilizando una jeringa de 1 mL; se utilizó H₂O destilada como control negativo. Pasadas 18 horas de la primera infiltración, hojas del tejido distal (distintas a las 4 primeras) fueron infiltradas con una solución de *Pst* DC3000 (5x10⁶ CFU/mL). Se infiltraron cuatro hojas de seis plantas distintas, dando un total de 24 hojas infiltradas por genotipo.

Posteriormente, 72 h después de la infección se recolectaron muestras de dichas hojas, para evaluar la cantidad de bacterias que se replicaron. Las hojas fueron cortadas y se sacaron seis discos de hoja por genotipo (se realizaron tres réplicas biológicas por genotipo). Una vez cortados los discos de hoja, se procedió a homogeneizar el tejido en 500 µL de MgCl₂ 10 mM utilizando un vástago plástico. De esa solución stock, se traspasaron 20 µL a un tubo con 180 µL de MgCl₂ 10 mM (dilución 1:10) de la misma manera se hizo hasta la dilución 1:1000. El día 0 post infección, se dejaron crecer 20 µL de la dilución 1:10 (de cada réplica biológica) en medio King's B sólido suplementado con rifampicina 50 µg/mL y kanamicina 50 µg/mL a 28 °C durante 48 horas. Se realizó lo mismo para la dilución 1:100 y, además, se hicieron dos réplicas técnicas por cada dilución, todo esto, por cada genotipo utilizado. Una vez transcurridas las 48 horas, se procedió a contar las unidades formadoras de colonia (CFU) en cada placa, para finalmente cuantificar las CFU presentes por cada disco de hoja infectada. Se utilizaron tres réplicas biológicas y doce réplicas técnicas.

Resultados

1. Analizar el establecimiento de SAR en plantas silvestres y mutantes *aca2*, en respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (cepa virulenta).

1.1 Identificación de plantas mutantes insercionales para la bomba Ca^{2+} /ATPasa ACA2.

Para estudiar la función de la bomba de Ca^{2+} /ATPasa ACA2; en la regulación de la respuesta de defensa, se solicitó al banco de semillas del ABRC, una línea mutante insercional descrita previamente (Harper *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2000; Curran *et al.*, 2000) (Materiales y métodos, sección 1.1.1). Una vez llegadas las semillas desde el banco de mutantes, estas fueron sembradas en medio MS ½ suplementado con el antibiótico que correspondía según el gen codificado dentro del T-DNA, en este caso, kanamicina. Posteriormente, las plantas que crecieron en el antibiótico, fueron genotipificadas mediante una reacción de PCR, con la idea de identificar plantas homocigotas para el alelo mutante (Materiales y métodos, **Tabla 2; Figura 2**).

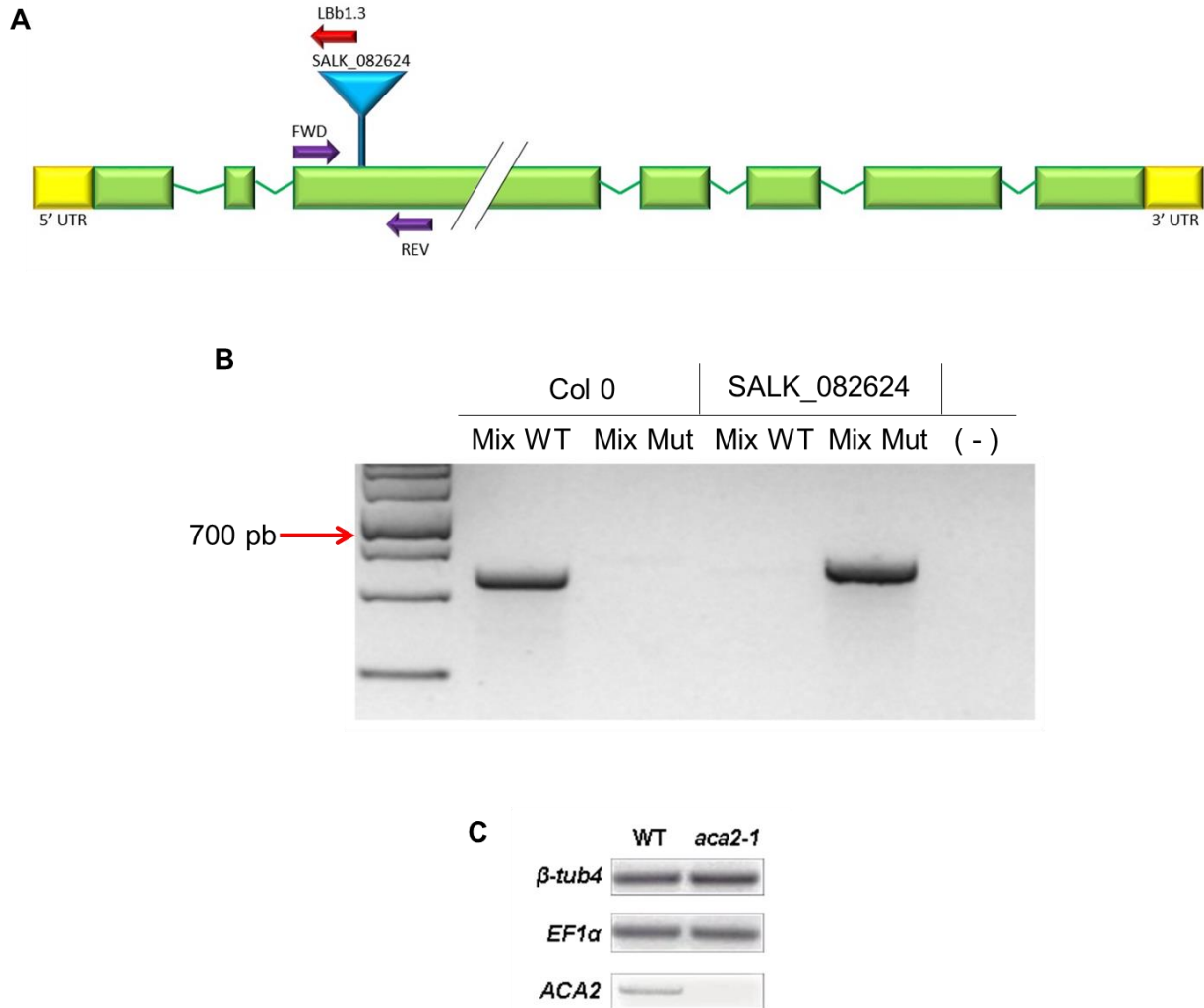


Figura 2. Identificación de plantas homocigotas mutantes *knock out* para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2. A. Modelo génico de ACA2, se muestra el sitio de inserción del T-DNA en el gen y los oligonucleótidos utilizados para genotipificar estas plantas (alelo silvestre, flechas moradas; alelo mutante, flecha roja). **B.** Genotipificación de plantas silvestres y mutantes *aca2*. Un μL de DNA genómico fue utilizado para realizar la reacción de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para el alelo silvestre (Mix WT) y para el alelo mutante (Mix Mut). Los amplicones obtenidos son cargados en un gel de agarosa al 1.5%_[p/v], se resuelve la electroforesis y las bandas de DNA son visualizadas mediante tinción con GelRed[®]. Carril 1, marcador de peso molecular de 1kb. WT corresponde al gDNA de plantas silvestres; SALK_082624 corresponde al gDNA de la planta mutante insercional *aca2*. **C.** A partir de RNA total de plantas de Arabidopsis silvestres y de la línea mutante insercional *aca2*, se sintetizó cDNA y se realizó una reacción de RT-PCR semi-cuantitativo a 25 ciclos de amplificación. Se utilizaron oligonucleótidos que amplificaran la región codificante completa del gen ACA2. La amplificación de los genes de β -tub4 y EF1 α , fueron utilizados como control.

En la **Figura 2** se observa que el tamaño esperado del amplicón para el alelo silvestre de *ACA2* tiene un tamaño de 418 bp, mientras que el amplicón generado por el par de oligonucleótidos que amplifica el alelo mutante de este gen (donde se encuentra la inserción de T-DNA), presenta un tamaño de 560 bp (**Figura 2A**). Como se observa en la **Figura 2B**, para las plantas *aca2* sólo se obtiene un amplicón del tamaño esperado, con la combinación de oligonucleótidos que amplifican el alelo mutante. La amplificación sobre DNA genómico WT se utiliza como control de amplificación del Mix WT, en cada caso. Es así que se logró identificar y aislar plantas homocigotas mutantes para la bomba Ca^{2+} /ATPasa de interés.

Luego, para determinar si las plantas identificadas como homocigotas mutantes para la Ca^{2+} /ATPasa *ACA2*, son mutantes *knock out*, se realizó un RT-PCR semi-cuantitativo a 25 ciclos. Como genes normalizadores se utilizó β -*Tubulina 4* y *EF-1 α* (**Figura 2C**). Se diseñaron oligonucleótidos que amplificaron la secuencia codificante completa (CDS) del gen *ACA2* (Materiales y métodos, **Tabla 3**). Como se observa en la **Figura 2C** (panel superior y central), el genotipo silvestre presentó una amplificación homogénea de los transcritos derivados de genes de expresión constitutiva. En el panel inferior, se observa la amplificación del transcrito derivado de *ACA2*, sólo en el cDNA proveniente de las plantas silvestres (WT), contrario a lo que se observa para el genotipo mutante (*aca2*). Estos resultados nos permiten concluir que las plantas mutantes insercionales identificadas, al ser homocigotas para la inserción de la secuencia de T-DNA, presentan la ausencia total del transcrito derivado del gen en estudio, *ACA2*.

1.2. Caracterización de la respuesta sistémica adquirida (SAR) de planta mutante en la Ca^{2+} /ATPasa *ACA2* frente a infección por *Pst*.

Como se observó en la **Figura 1**, las plantas mutantes *aca2*, presentaban una baja considerable en la acumulación del transcrito de *PR1* (gen marcador de SAR) en respuesta a tratamientos con SA. Esto permite inferir que las plantas carentes de la actividad de *ACA2*, mostrarían un efecto negativo en la respuesta de defensa sistémica de la planta. Con el objetivo de analizar si *ACA2* tenía alguna función en el establecimiento de SAR, se utilizó el protocolo de infección descrito por Durrant *et al.* (2007). Este ensayo consiste en utilizar plantas de 4 a 5 semanas de edad e infiltrar hojas

de la roseta con una solución de SA, lo que dará la señal para que se establezca SAR. Posteriormente, se analiza el crecimiento de *Pst* DC3000 (bacteria virulenta) en hojas distintas a las infiltradas inicialmente con SA (tejido sistémico). La bacteria se inoculó a una concentración de 5×10^6 CFU/mL y se tomaron muestras 3 días post infección (dpi) (Materiales y métodos, sección 2.3.2.2; **Figura 3**).

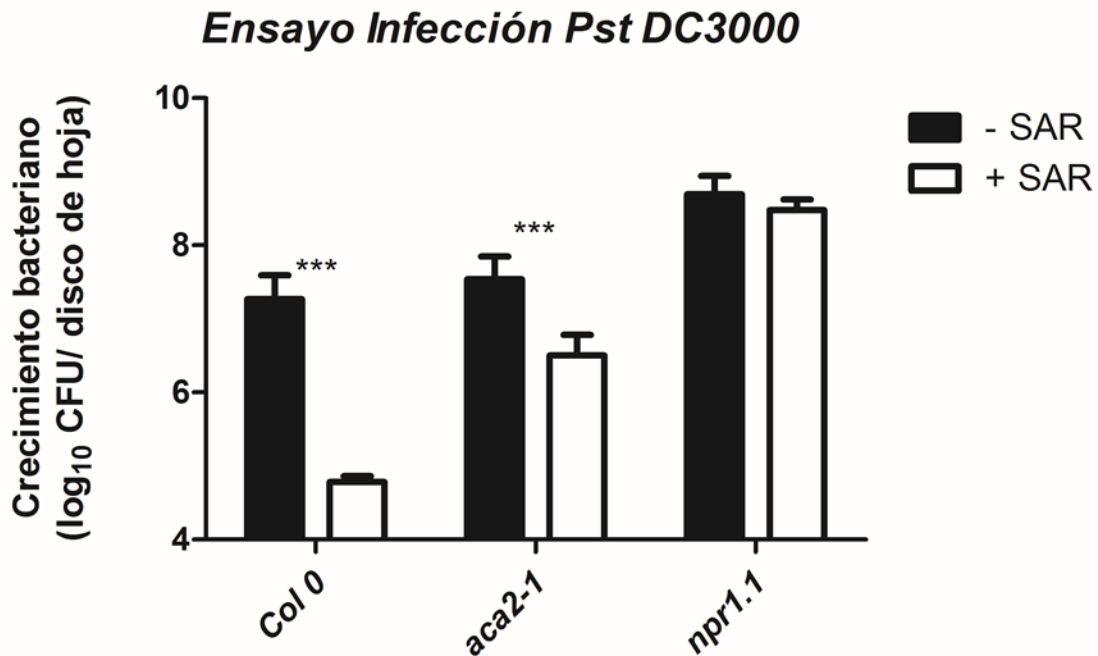


Figura 3. Evaluación de la respuesta sistémica adquirida (SAR) en plantas silvestres y mutantes *aca2*. Plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes *aca2* de cuatro semanas de edad y crecidas en tierra fueron, infiltradas con una solución de SA en 4-5 hojas basales, para gatillar el establecimiento de SAR (+SAR) o 10 mM MgCl₂ (-SAR). 18 a 24 horas después, hojas sistémicas fueron infectadas mediante infiltración, con *Pst* DC3000 a una concentración de 5×10^6 CFU/mL. El crecimiento bacteriano se cuantificó a 3 días post infección, mediante dilución seriada en el medio de selección correspondiente. El genotipo *npr1.1* fue utilizado como control de hiper susceptibilidad (Cao *et al.*, 1994). Se indica la desviación estándar de seis réplicas biológicas. Los asteriscos representan valores significativamente diferentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA; $n=12$).

Como se observa en la **Figura 3**, las plantas mutantes *aca2* presentan un SAR mucho menos eficiente que las plantas silvestres (\log_{10} CFU/disco de hoja). Las plantas mutantes *npr1-1* (Cao *et al.*, 1994) fueron utilizadas como control de hiper susceptibilidad. Por lo tanto, estos resultados permiten sugerir que la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, tendría un rol importante en el establecimiento de la respuesta de defensa sistémica contra *Pst* DC3000.

2. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de SAR utilizando plantas silvestres y mutantes para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.

2.1 Análisis de la cinética de inducción relativa de ACA2 durante la respuesta inmune, utilizando plantas silvestres.

Estudios previos publicados por Anil *et al.* (2007), mostraban que el aumento de la expresión del gen que codifica para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, incrementaba frente a estrés salino. Adicionalmente, ha sido descrito que el tratamiento exógeno con SA, gatilla el establecimiento de SAR (Cao *et al.*, 1994). Debido a que en el objetivo anterior se observó que ACA2, podría tener un rol en el establecimiento de SAR, el siguiente paso fue estudiar la cinética de expresión de esta bomba de Ca^{2+} en respuesta a tratamientos con SA. Plantas de *Arabidopsis* silvestres de 15 días de edad, fueron tratadas con SA 0,5 mM durante 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas. Los resultados de este análisis se muestran en la **Figura 4**.

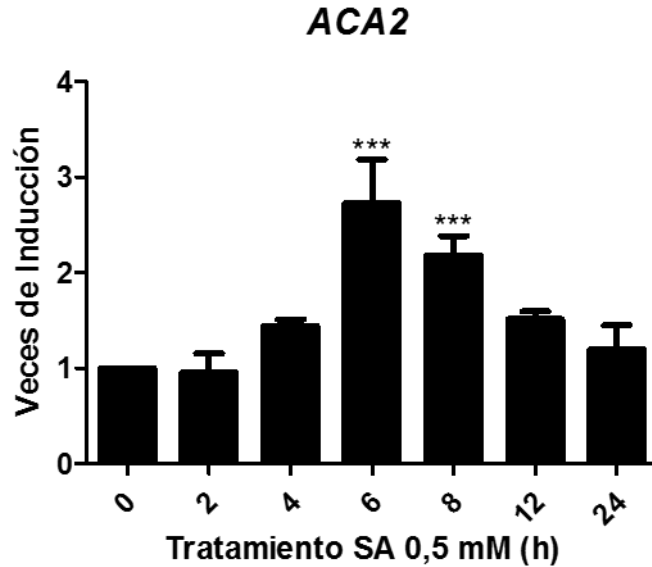


Figura 4. Análisis de la cinética de inducción de ACA2 en respuesta a tratamientos con SA. Plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col 0) de dos semanas de edad, crecidas in vitro, fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM o MS como control, durante los tiempos descritos en la figura. Las plántulas fueron congeladas y se extrajo RNA total. Un μg de RNA fue utilizado para sintetizar cDNA y mediante qRT-PCR, determinar el nivel de inducción relativa del transcrito derivado de ACA2. El nivel de inducción relativa de mRNA del gen analizado, fue graficado relativo al nivel de inducción del gen normalizador β -Tubulina 4. Los asteriscos muestran diferencias significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA).

2.2 Identificación, diseño y estandarización de oligonucleótidos para qRT-PCR de genes marcadores de SAR potencialmente regulados por la función de la Ca^{2+} /ATPasa ACA2.

Con la idea de determinar si el efecto de la ausencia de la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, afectaba a nivel de la señalización y/o biosíntesis de SA y finalmente en el establecimiento de SAR, se decidió analizar la cinética de expresión de genes marcadores de la señalización de la ruta de SA y SAR (Janda & Ruelland, 2015). Los genes cuyo perfil de inducción relativa fue analizado mediante qRT-PCR fueron: *CAMTA3*, *EDS1*, *ICS1* y *PR1*.

Tabla 5. Condiciones de amplificación para qRT-PCR de genes marcadores de SAR y gen normalizador. Nombre, número AGI y porcentaje de eficiencia de los oligonucleótidos diseñados para amplificar genes en estudio y normalizador cuya inducción relativa fue analizada.

Gen	Número AGI	Eficiencia (%)
Genes de estudio		
<i>CAMTA3</i>	AT2G22300	88,4
<i>EDS1</i>	AT3G48090	97,5
<i>ICS1</i>	AT1G74710	91,6
<i>PR1</i>	AT2G14610	94,2
Gen normalizador		
<i>β-Tubulina 4</i>	AT5G44340	93,4

Como primera etapa de este análisis se estudiaron las cinéticas de expresión en respuesta a SA en plantas silvestres. El procedimiento de estandarización de los oligonucleótidos utilizados se encuentra detallado en el **Anexo A** (Materiales y métodos, sección 2.2.6).

Una vez seleccionados y estandarizados los pares de oligonucleótidos para los genes en estudio, se realizó un análisis de la inducción de estos genes en respuesta a un tratamiento inductor clásico de SAR. Para ello, plantas de *Arabidopsis thaliana* de dos semanas de edad, fueron tratadas con SA 0,5 mM, durante 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas (Materiales y métodos, sección 2.3.1; **Figura 5**).

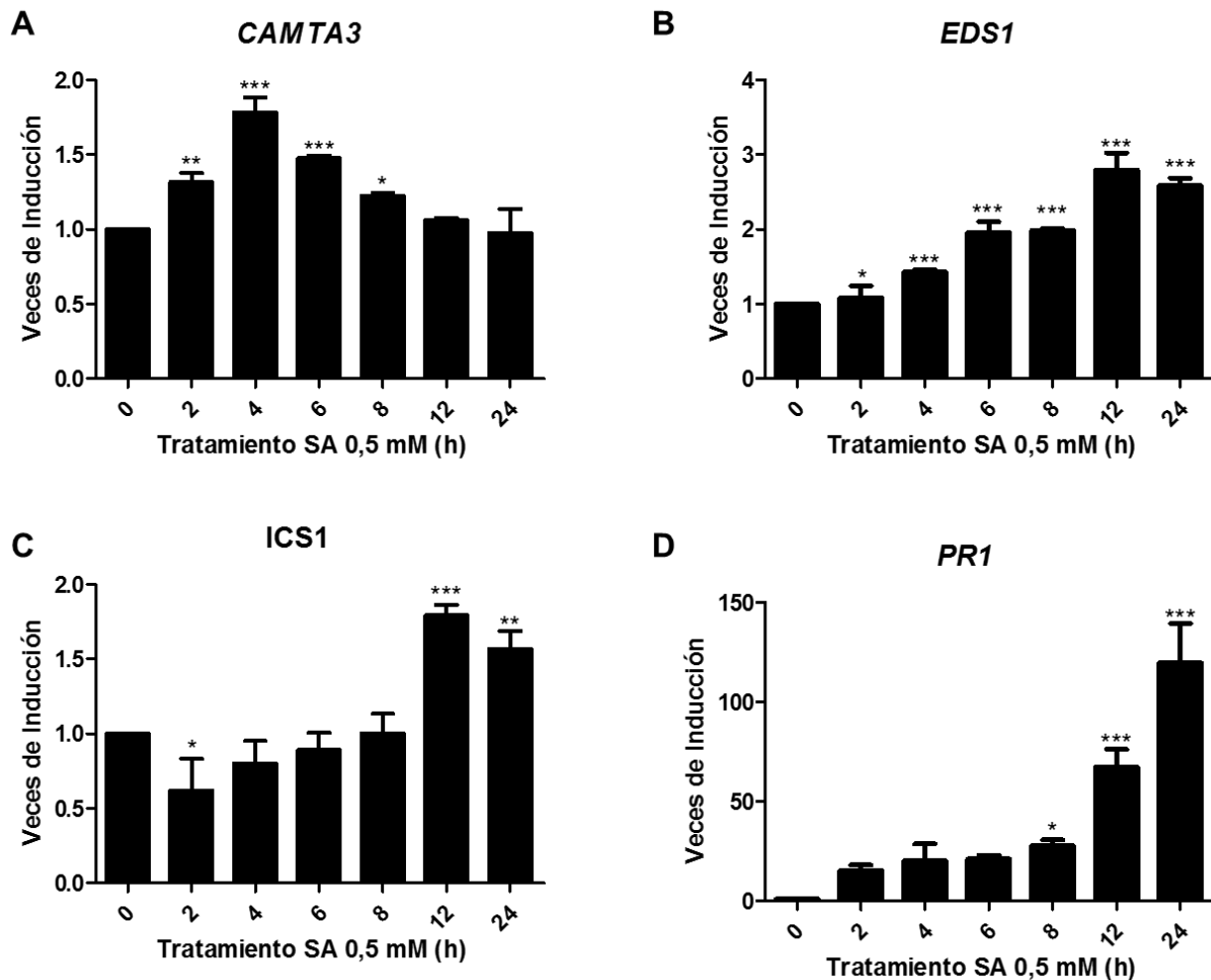


Figura 5. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de la ruta de señalización y síntesis de SA, en respuesta a tratamientos con SA. Plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col 0) de dos semanas de edad, crecidas in vitro, fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM o MS como control, durante los tiempos descritos en la figura. Las plántulas fueron congeladas y se extrajo RNA total. Un μg de RNA fue utilizado para sintetizar cDNA y mediante qRT-PCR, determinar el nivel de inducción relativa de (A) *CAMTA3*, (B) *EDS1*, (C) *ICS1* y (D) *PR1*. El nivel de inducción relativa de mRNA del gen analizado, fue graficado relativo al nivel de inducción del normalizador $\beta\text{-Tubulina 4}$. Los asteriscos muestran diferencias significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA).

En la **Figura 5A-D**, se observa la inducción de los genes involucrados en la señalización (*CAMTA 3* y *EDS1*), síntesis (*ICS1*) y respuesta a SA (*PR1*). Se observa activación temprana y transitoria de *CAMTA3*; lo que se correlaciona con la activación tardía de *EDS1* e *ICS1*. Finalmente se observa la fuerte inducción de *PR1* hacia las 24 horas de tratamiento.

Posteriormente, quisimos determinar si la ausencia de *ACA2*, tenía un efecto en la señalización y/o biosíntesis de SA, que finalmente se traduce en la ausencia de inducción de *PR1* en respuesta a SA. Para esto realizamos el mismo tipo de análisis descrito anteriormente, pero ahora utilizando, además, plantas mutantes *aca2* (**Figura 6**).

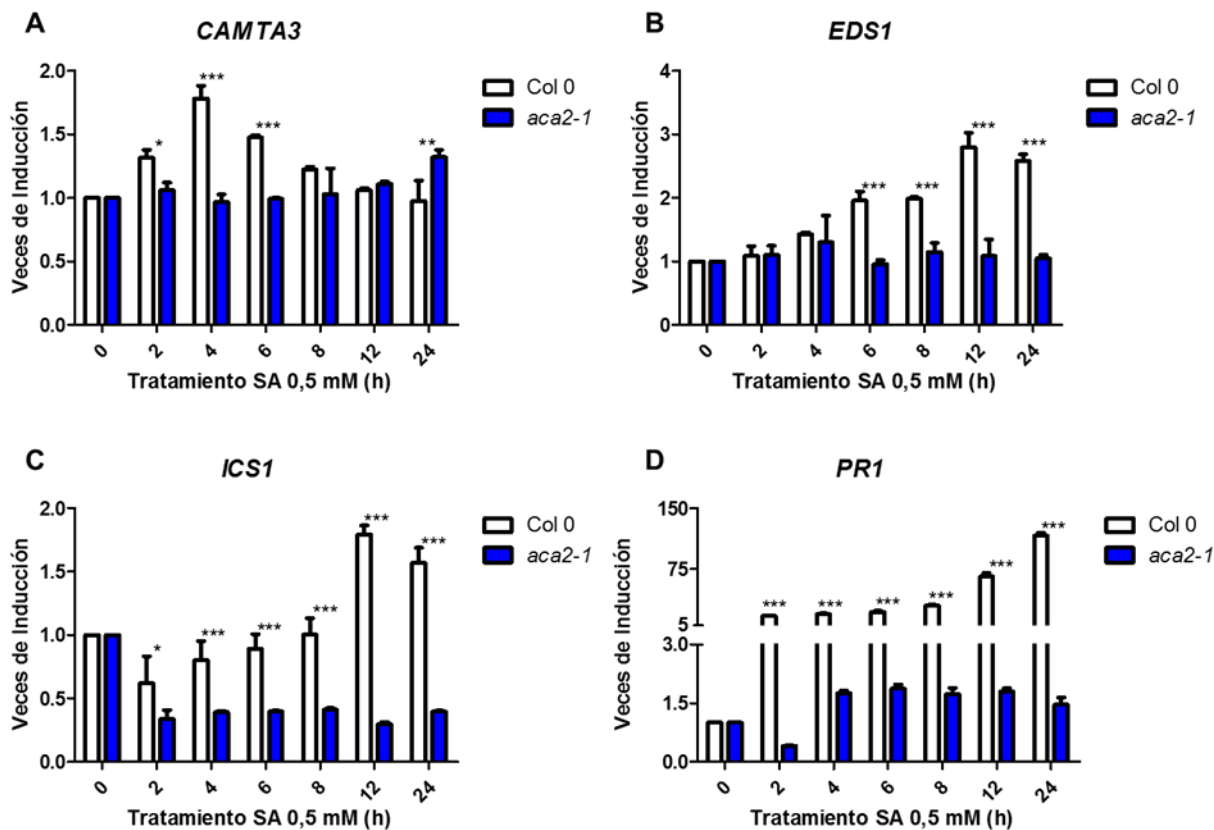


Figura 6. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de la ruta de señalización y síntesis de SA, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes *aca2*. Plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col 0, barras blancas) y mutantes *aca2* (barras azules), fueron crecidas *in vitro* por dos semanas. Las plantas fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM o MS como control, durante los tiempos descritos en la figura. Las plántulas fueron congeladas y se extrajo RNA total. Un μg de RNA fue utilizado para sintetizar cDNA y mediante qRT-PCR, determinar el nivel de inducción relativa de **(A) CAMTA3**, **(B) EDS1**, **(C) ICS1** y **(D) PR1**. El nivel de inducción relativa de mRNA del gen analizado, fue graficado relativo al nivel de inducción del normalizador $\beta\text{-Tubulina 4}$. Los asteriscos muestran diferencias significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA).

En la **Figura 6A** se observa que en plantas mutantes *aca2*, el gen *CAMTA3* no mostró un cambio significativo y aumentó levemente hacia las 24 hpt, en respuesta a tratamientos con SA, contrario a la inducción temprana y transitoria de *CAMTA3*, en plantas silvestres. De la misma forma la inducción de *EDS1* e *ICS1*, se ve fuertemente afectada en plantas mutantes *aca2* (**Figura 6B y C**). Finalmente, se observa que aun cuando se está agregando SA exógeno, *PR1* no se induce en plantas mutantes *aca2* (**Figura 6D**).

Estos resultados sugieren, que la ausencia de la actividad de la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, estaría afectando negativamente la expresión de los genes relacionados a la biosíntesis de SA y por tanto afectando la señal para que se gatille el establecimiento de la respuesta inmune sistémica.

3. Análisis de la cinética de expresión de genes marcadores de UPR utilizando plantas silvestres y mutantes para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.

3.1 Selección y análisis de genes marcadores de UPR, potencialmente regulados por la actividad de la Ca^{2+} /ATPasa ACA2.

Para validar y caracterizar la cinética de expresión de los genes marcadores de UPR potencialmente regulados por la actividad de la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, se analizaron los genes involucrados directamente en la respuesta a proteínas mal plegadas. Los oligonucleótidos para analizar estos genes ya estaban previamente diseñados y estandarizados por nuestro grupo de trabajo (Arraño, 2015). Los genes marcadores de UPR cuyo perfil de inducción relativa fue analizado son: *BiP1/2*, *CNX1*, *CRT2*, *ERdJ3b*, *PDIL1-2* y *SHD*. En la **Tabla 6** se detallan las condiciones de amplificación óptimas de cada par de oligonucleótidos que fue utilizado para análisis mediante qRT-PCR.

Tabla 6. Condiciones de amplificación para qRT-PCR de genes marcadores de UPR y de gen normalizador. Nombre, número AGI y porcentaje de eficiencia de los oligonucleótidos diseñados para amplificar genes en estudio y normalizador cuya inducción relativa fue analizada.

Gen	Número AGI	Eficiencia (%)
Genes de estudio		
<i>BiP1/2</i>	AT5G42020/AT5G28540	101,9
<i>CNX1</i>	AT5G61790	94,6
<i>CRT2</i>	AT1G09210	97,2
<i>ERdJ3b</i>	AT3G62600	81,1
<i>PDIL1-2</i>	AT1G77510	91,3
<i>SHD</i>	AT4G24190	92,5
Gen normalizador		
<i>β-Tubulina 4</i>	AT5G44340	93,4

Una vez seleccionados los genes marcadores de UPR, cuya expresión es potencialmente regulada por la Ca^{2+} /ATPasa de RE, ACA2, se realizó un análisis del perfil de expresión de estos genes en respuesta al tratamiento con SA (inductor clásico de SAR). Para ello, plantas de *Arabidopsis thaliana* WT de dos semanas de edad, fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM durante 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas (Materiales y métodos, sección 2.3.1; **Figura 7**).

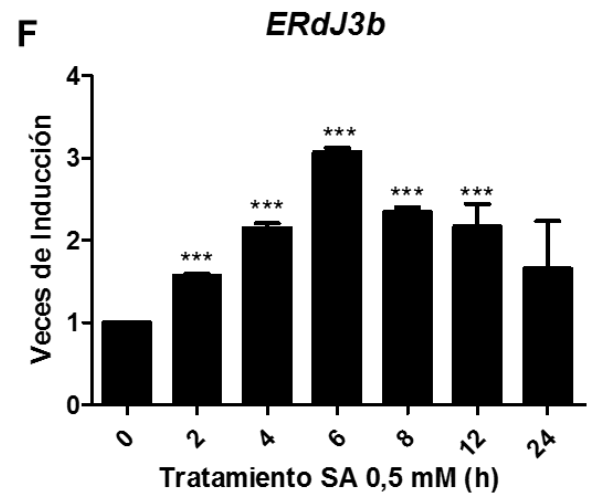
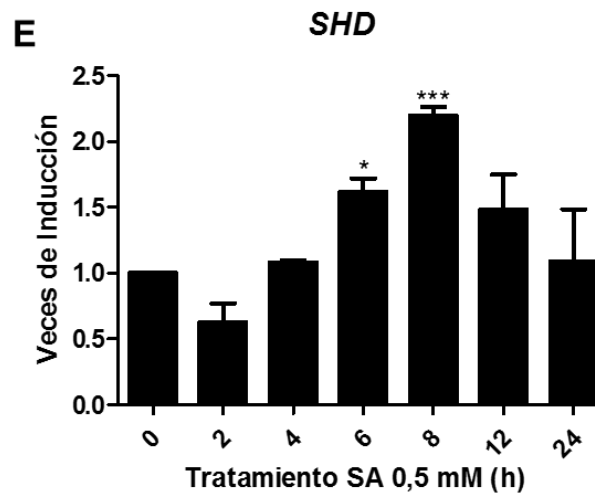
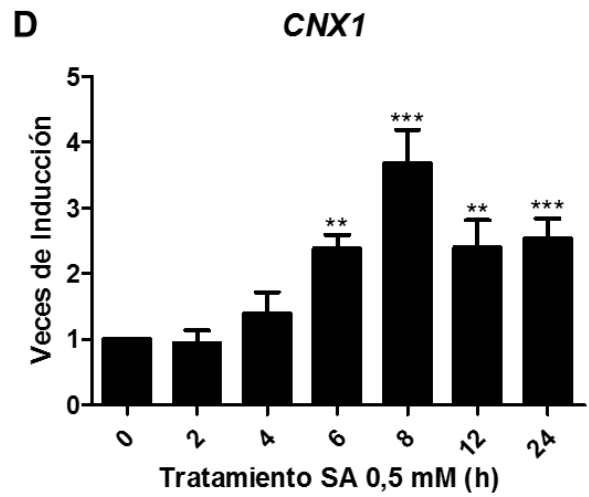
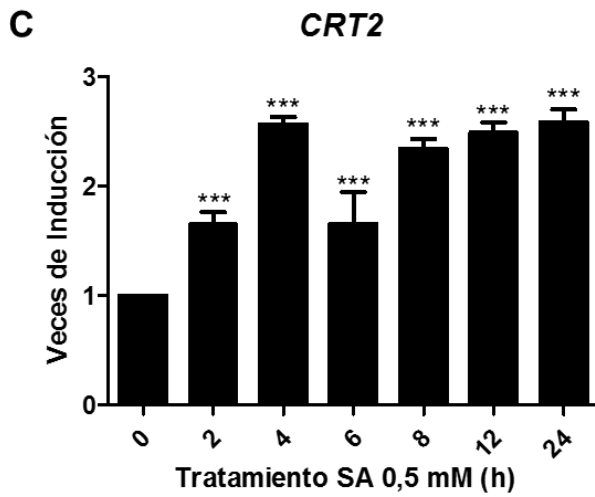
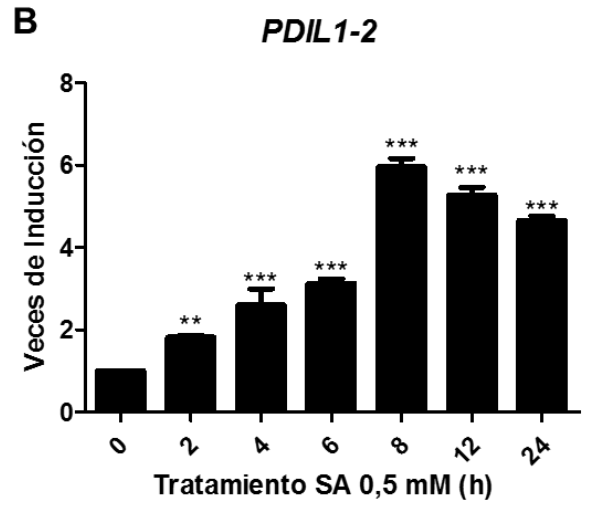
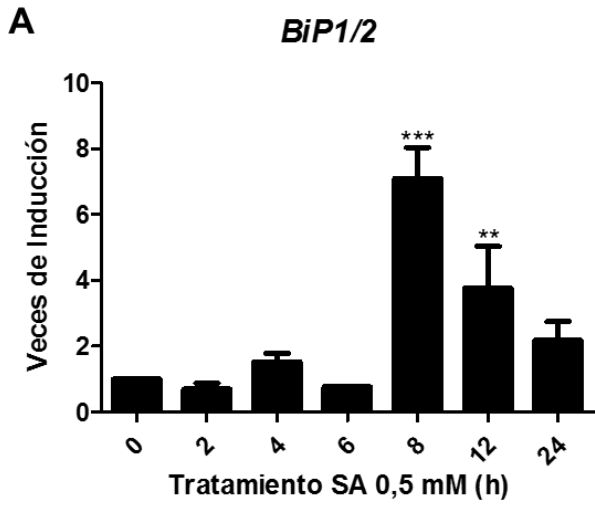


Figura 7. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de UPR, en respuesta al tratamiento inductor de SAR. Plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres fueron crecidas *in vitro* por dos semanas. Las plantas fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM o MS como control, durante los tiempos descritos en la figura. Las plántulas fueron congeladas y se extrajo RNA total. Un µg de RNA fue utilizado para sintetizar cDNA y mediante qRT-PCR, determinar el nivel de inducción relativa de (A) *BiP1/2*, (B) *PDIL1-2*, (C) *CRT2*, (D) *CNX1*, (E) *SHD* y (F) *ERdJ3b*. El nivel de inducción relativa de mRNA del gen analizado, fue graficado relativo al nivel de inducción del normalizador *β-Tubulina 4*. Los asteriscos muestran diferencias significativas (* p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; Test ANOVA).

Como se observa en la **Figura 7**, en plantas de *Arabidopsis silvestres* tratadas con SA, todos los genes marcadores de UPR presentan un incremento en la acumulación de transcritos. La cinética de inducción para *BiP1/2*, *PDIL1-2*, *SHD*, *CNX1* y *ERdJ3b*, se observa tardía y transitoria mostrando un *peak* de activación entre las 6 y 8 horas de tratamiento. En el caso del gen *CRT2*, su cinética es diferente pues presentó una inducción temprana alcanzando un máximo a las 4 hpt el que se mantiene durante todo el tiempo de análisis.

Una vez confirmados que los genes de UPR en estudio, eran activados en respuesta a tratamientos con SA, quisimos determinar si la ausencia de la actividad de la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, podría afectar la inducción de estos genes durante SAR. Para esto realizamos el mismo tipo de análisis descrito anteriormente, pero ahora utilizando, además, plantas mutantes *aca2* (**Figura 8**).

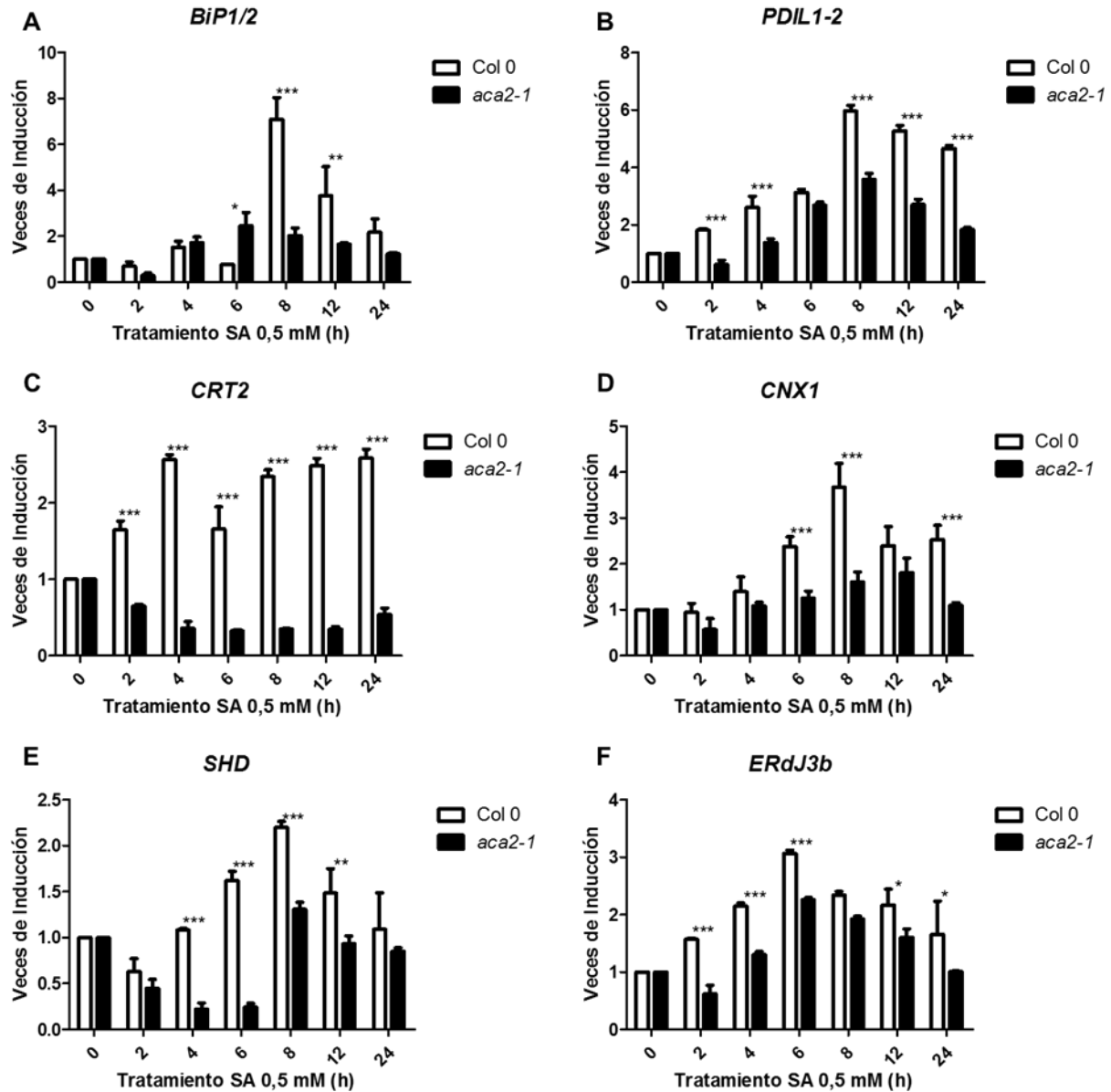


Figura 8. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de UPR, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes *aca2*. Plantas de *Arabidopsis* (Col 0, barras blancas) y mutantes *aca2* (barras negras), fueron crecidas *in vitro* por dos semanas. Posteriormente, las plantas fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM o MS como control, durante los tiempos descritos en la figura. Las plántulas fueron congeladas y se extrajo RNA total. Un μg de RNA fue utilizado para sintetizar cDNA y mediante qRT-PCR, determinar el nivel de inducción relativa de (A) *BiP1/2*, (B) *PDIL1-2*, (C) *CRT2*, (D) *CNX1*, (E) *SHD* y (F) *ERdJ3b*. El nivel de inducción relativa del transcrito del gen analizado, fue graficado relativo al nivel de inducción del normalizador $\beta\text{-Tubulina 4}$. Los asteriscos muestran diferencias significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA).

Analizando la inducción relativa de los genes de interés en plantas tratadas con SA, podemos ver en la **Figura 8** que al comparar la cinética de inducción en plantas carentes de *aca2* vs las plantas silvestres, para los genes *BIP1/2*, *PDIL1-2*, *SHD*, *CNX1* y *ERdJ3b*, se afecta la magnitud de la activación, pero no la cinética. Estos genes siguen respondiendo positivamente al tratamiento inductor de SAR, pero en una escala mucho menor.

En el caso de *CRT2* (**Figura 8C**), en plantas mutantes *aca2* se obtuvo una disminución de inducción del transcrito significativa en la totalidad del tratamiento, en comparación con plantas silvestres.

Estos resultados sugieren que, la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, y por tanto el reingreso de Ca^{2+} desde el citosol al RE, sería un evento necesario para activar la biosíntesis de SA y la respuesta de los genes de UPR residentes del RE.

4. Análisis de la proteína de secreción marcadora de SAR, utilizando plantas silvestres y mutantes para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.

Con el objetivo de correlacionar no sólo el efecto en la síntesis de *PR1* (gen marcador de SAR) si no también la acumulación y secreción de esta proteína en plantas carentes en ACA2, se analizó mediante *western blot* el comportamiento de *PR1* en respuesta a tratamientos con SA. Para este objetivo, plantas de *Arabidopsis* silvestres o mutantes *aca2*, fueron tratadas con SA 0,5 mM, a un tiempo de 8 horas, para evaluar respuesta temprana y a un tiempo de 24 horas, para evaluar respuesta tardía. Pasados los tiempos de tratamiento, se procedió a extraer proteínas totales, como también proteínas del fluido intercelular (IWF), en donde se ha descrito que *PR1* cumple con su función defensiva (van Loon L & van Strien, 1999). Los resultados de este análisis se muestran en la **Figura 9**.

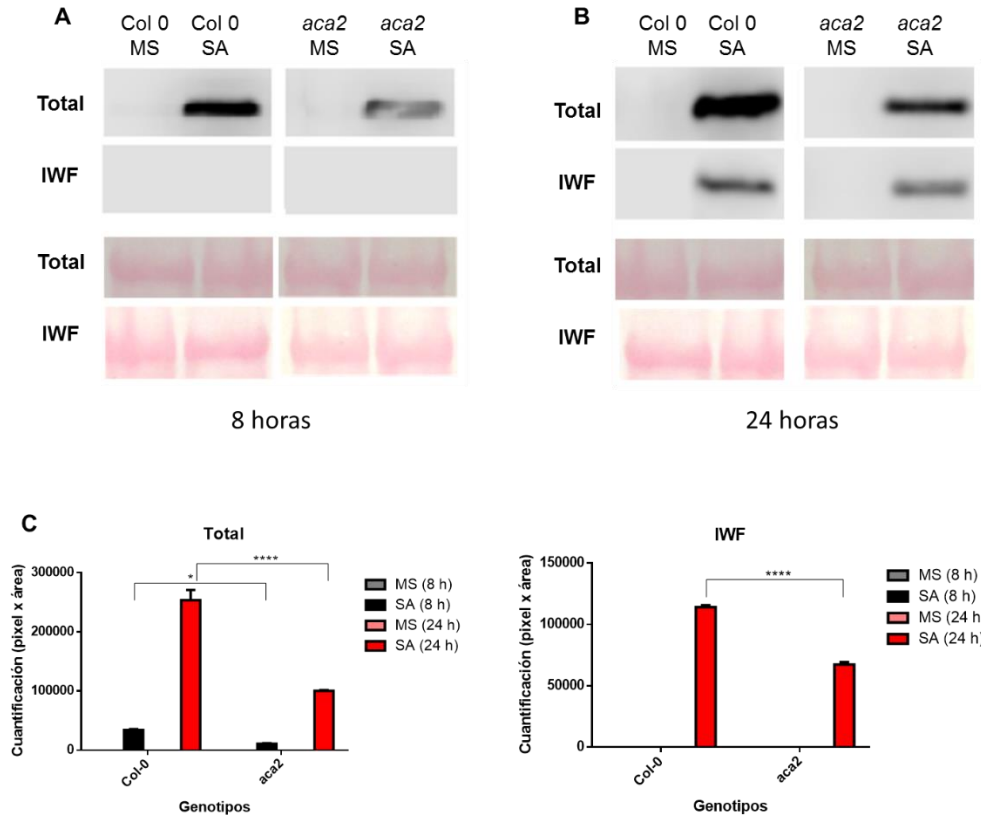


Figura 9. La acumulación y secreción de PR1 es fuertemente afectada en plantas mutantes *aca2*. La acumulación de PR1 fue comparada entre plantas de *Arabidopsis* silvestres (Col 0) y mutantes *aca2*, posterior a un tratamiento de SA 0,5 mM durante (A) 8 horas y (B) 24 horas. El fluido intercelular y las proteínas totales se extrajeron de una cantidad homogénea de plantas (0,45 g) por genotipo. La acumulación de PR1 se detectó con un anticuerpo anti-PR1. La tinción con rojo Ponceau S fue utilizada como control de carga. (C) Cuantificación mediante densitometría de la acumulación de PR1. Los asteriscos muestran diferencias significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA).

Como se observa en la **Figura 9**, la acumulación y secreción de PR1, se ve significativamente disminuída en las plantas mutantes *aca2*, en comparación a las plantas silvestres, tanto a las 8 horas (**Figura 9A**), como a las 24 horas (**Figura 9B**) de tratamiento con SA. Este resultado sugiere que el efecto negativo en el establecimiento de SAR que se observa en las plantas mutantes en *ACA2* y, por ende, la mayor susceptibilidad de estas plantas comparadas con las plantas silvestres, puede ser explicada por la disminución tanto de la acumulación y secreción de péptidos con capacidad antimicrobiana (PRs).

5. Análisis de la expresión de los genes marcadores de SAR y de genes relacionados a UPR, utilizando plantas silvestres y mutantes en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico bZIP28, bZIP60 e Ire1a/1b, en respuesta a tratamientos con SA.

5.1 Análisis de la cinética de expresión de los genes marcadores de SAR, utilizando plantas silvestres y mutantes en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico bZIP28, bZIP60 e Ire1a/1b, en respuesta a tratamientos con SA.

Con el objetivo de analizar el establecimiento de la respuesta inmune, en plantas que sí presentan la bomba de Ca^{2+} , pero que no presentan componentes involucrados en ambos brazos de la vía de señalización de respuesta a estrés de RE, es que se utilizaron plantas mutantes en el factor de transcripción bZIP28, en el factor de transcripción bZIP60 y en la proteína kinasa/ribonucleasa Ire1a/1b. Para ello, plantas de *Arabidopsis thaliana*, silvestres y mutantes, de dos semanas de edad, fueron tratadas con SA 0,5 mM. Este tratamiento inductor de SAR fue utilizado como control positivo de inducción (White, 1979). Los tratamientos fueron realizados con SA 0,5 mM a 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas (Materiales y métodos, sección 2.3.1; **Figura 10**).

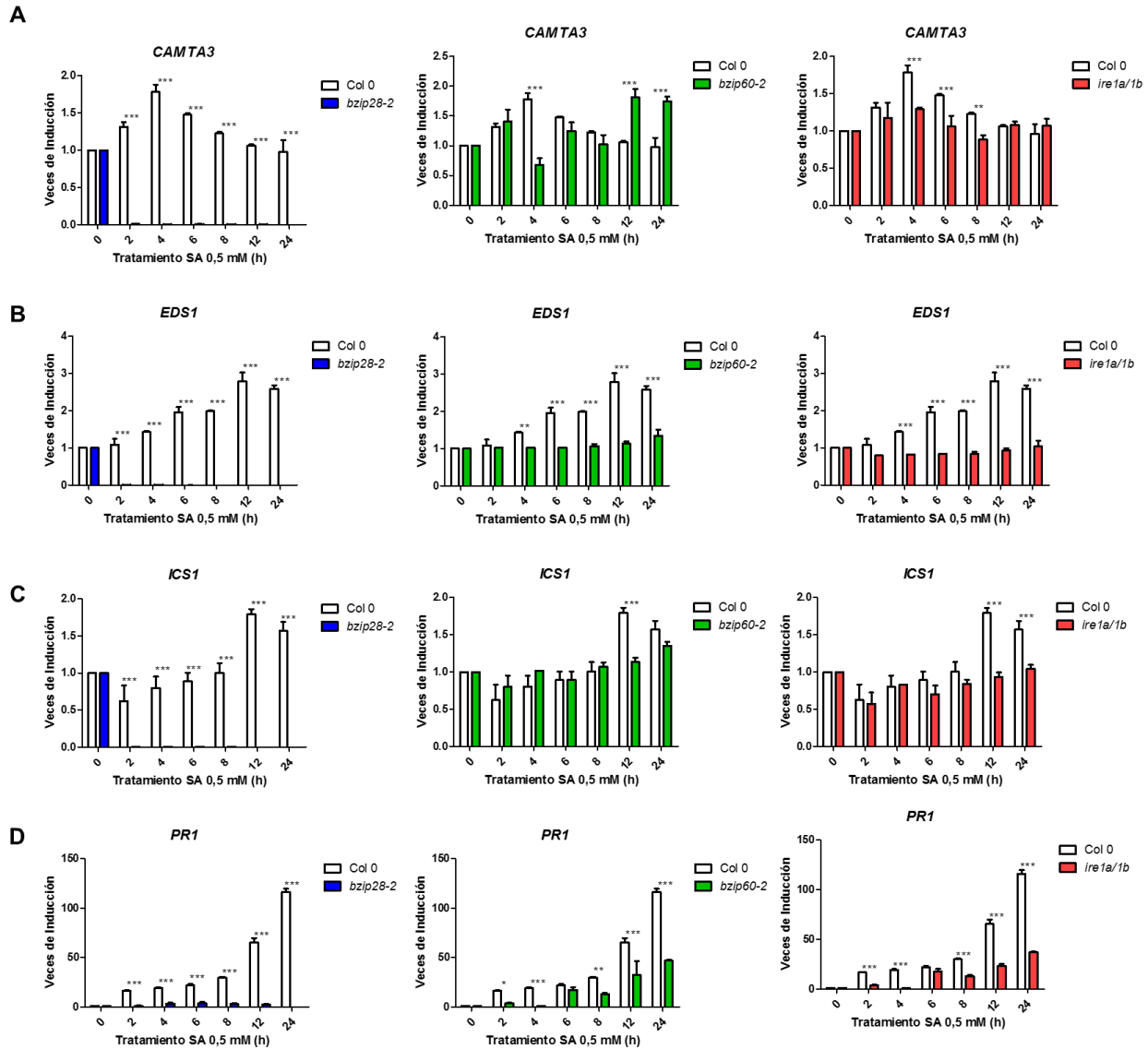


Figura 10. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de la ruta de señalización y síntesis de SA, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes *bzip28-2*, *bzip60-2* e *ire1a/1b*. Plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (WT) y mutantes (*bzip28-2*, barras azules; *bzip60-2*, barras verdes e *ire1a/1b*, barras rosas) fueron crecidas *in vitro* por dos semanas. Las plantas fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM o MS como control, durante los tiempos descritos en la figura. Las plántulas fueron congeladas y se extrajo RNA total. Un μg de RNA fue utilizado para sintetizar cDNA y mediante qRT-PCR, determinar el nivel de inducción relativa de **(A) CAMTA3**, **(B) EDS1**, **(C) ICS1** y **(D) PR1**. El nivel de inducción relativa de mRNA de cada gen analizado fue graficado relativo al nivel de inducción del normalizador $\beta\text{-Tubulina 4}$. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los datos mostrados para el mismo tiempo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA).

En este caso, analizando las veces de inducción de los genes de interés en plantas silvestres con respecto a cada planta mutante, podemos ver en la **Figura 10A** que la inducción para el gen *CAMTA3* en plantas mutantes *bzip28-2* fue nula, con respecto a plantas silvestres. Por su parte, en plantas mutantes *bzip60-2*, se observó un aumento en la inducción de transcrito a las 12 y 24 hpt con respecto a plantas silvestres; algo muy distinto a lo observado para plantas mutantes *ire1a/1b*, en donde se observó una disminución significativa de la inducción a las 4, 6 y 8 hpt. Por lo tanto, la cinética de inducción de *CAMTA3* que se observó en plantas silvestres, se vio reprimida en plantas *ire1a/1b*, mientras que en plantas *bzip60-2*, se observó una activación desde las 12 hpt; en cambio, en las plantas *bZIP28-2*, no hay inducción del gen.

La cinética de inducción del gen *EDS1* (**Figura 10B**), en plantas mutantes *bzip28-2* presentó una nula expresión del transcrito durante las 24 horas de tratamiento con respecto a plantas silvestres. Por su parte, para plantas mutantes *bzip60-2*, se observó una disminución de la inducción durante todo el tratamiento. Finalmente, para plantas mutantes *doble ire*, se observó una disminución similar a la de las plantas *bzip60-2* con respecto a plantas silvestres. Por lo tanto, la cinética de inducción tardía observada para *EDS1* en plantas silvestres no se mantuvo en plantas *bzip60-2* y *doble ire*. En el caso de plantas *bzip28-2*, observamos una nula expresión del gen.

En el caso de *ICS1* (**Figura 10C**), en plantas *bzip28-2*, tampoco se observó una inducción del gen, durante todo el tratamiento. Tanto para las plantas *bzip60-2* y *doble ire*, se observó una disminución de la inducción a partir de las 12 hpt en comparación a las plantas silvestres, pero, aun así, se observó la cinética de aumento de inducción del gen, solo que en un nivel menor.

Finalmente, el gen *PR1* (**Figura 10D**) en plantas mutantes *bzip28-2* no mostró expresión, en comparación con plantas silvestres. En plantas mutantes *bzip60-2* se observó una disminución en la inducción durante todo el tratamiento, siendo más significativa a las 12 y 24 hpt, similar las plantas mutantes *doble ire*, con respecto a los niveles observados para plantas silvestres. Por lo tanto, si bien la cinética de inducción del gen *PR1* no se vio alterada al comparar lo obtenido con las plantas silvestres, con respecto al tiempo, si existe una disminución en los niveles de inducción del gen dentro de los genotipos.

5.2 Análisis de la expresión de los genes marcadores de UPR, utilizando plantas silvestres y mutantes en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico bZIP28, bZIP60 e Ire1a/1b, en respuesta a tratamientos con SA.

Utilizando los mismos genes marcadores de UPR, anteriormente analizados y con el objetivo de analizar el fenómeno de proteínas mal plegadas durante la respuesta inmune, en plantas que sí presentan la bomba de Ca^{2+} , pero que no presentan componentes involucrados en ambos brazos de la vía de señalización de respuesta a estrés de RE, es que se utilizaron plantas mutantes en el factor de transcripción bZIP28, en el factor de transcripción bZIP60 y en la proteína quinasa/ribonucleasa Ire1a/1b. Para ello, plantas de *Arabidopsis thaliana*, silvestres y mutantes, de dos semanas de edad, fueron tratadas con SA 0,5 mM. Este tratamiento inductor de SAR fue utilizado como control positivo de inducción (White, 1979). Los tratamientos fueron realizados con SA 0,5 mM a 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas (Materiales y métodos, sección 2.3.1; **Figura 11**).

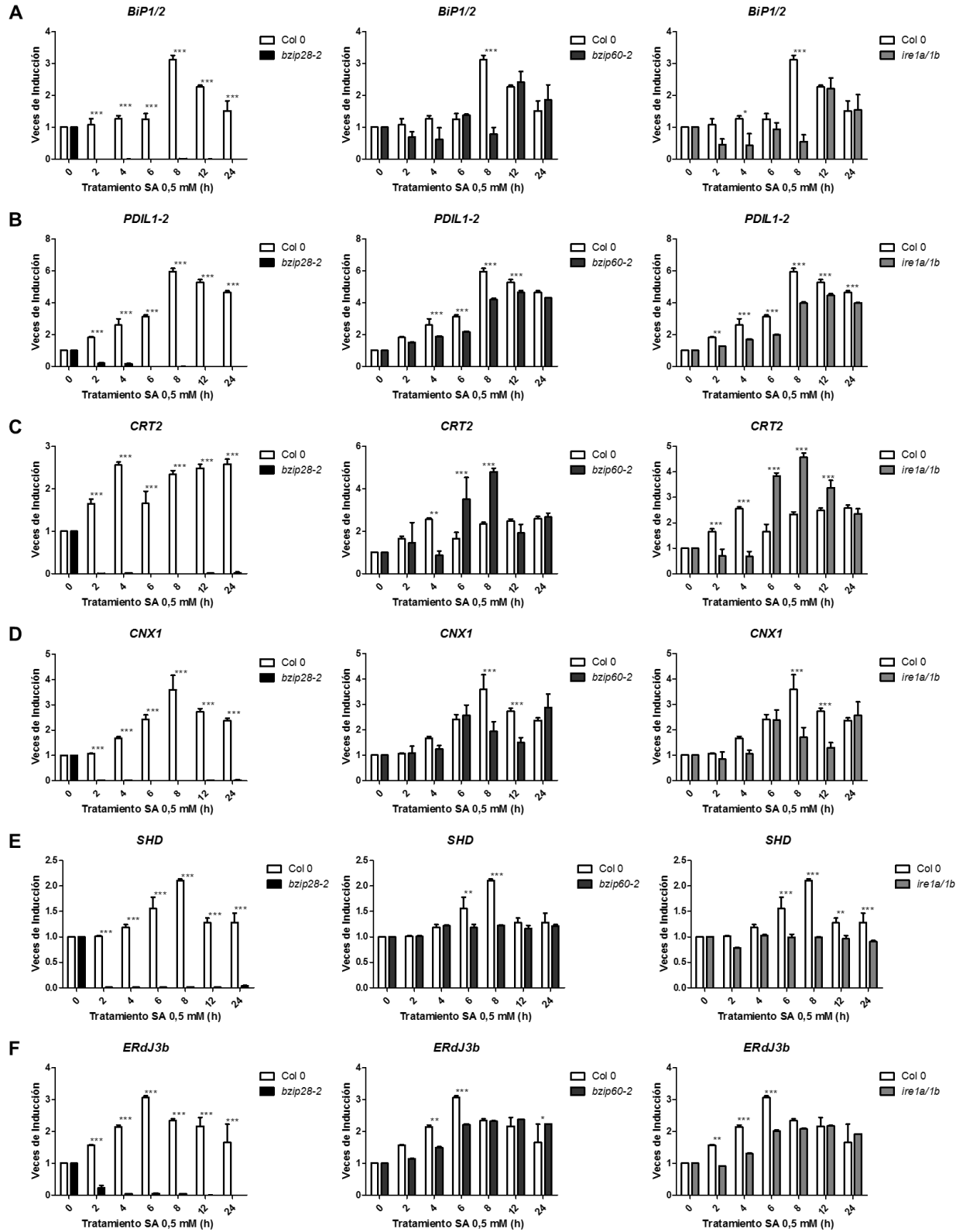


Figura 11. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de UPR, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes *bzip28-2*, *bzip60-2* e *ire1a/1b*. Plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (WT) y mutantes (*bzip28-2*, barras negras; *bzip60-2*, barras grises oscuro e *ire1a/1b*, barras grises claro) fueron crecidas *in vitro* por dos semanas. Posteriormente, las plantas fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM o MS como control, durante los tiempos descritos en la figura. Las plántulas fueron congeladas y se extrajo RNA total. Un µg de RNA fue utilizado para sintetizar cDNA y mediante qRT-PCR, determinar el nivel de inducción relativa de **(A) *BiP1/2***, **(B) *PDIL1-2***, **(C) *CRT2***, **(D) *CNX1***, **(E) *SHD*** y **(F) *ERdJ3b***. El nivel de inducción relativa de mRNA de cada gen analizado fue graficado relativo al nivel de inducción del normalizador *β-Tubulina 4*. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los datos mostrados para el mismo tiempo (* p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; Test ANOVA).

Como podemos ver en toda la Figura 11, ninguno de los genes analizados presentó inducción en el genotipo mutante *bzip28-2*. Ahora, analizando la inducción relativa de los genes de interés en plantas silvestres con respecto a cada planta mutante, podemos ver en la **Figura 11A** que la cinética de inducción relativa para el gen *BIP1/2* en plantas mutantes *bzip28-2* mostró una nula inducción del transcrito durante todo el tratamiento, con respecto a plantas silvestres. Por su parte, en plantas mutantes *bzip60-2*, se observó una disminución significativa en la inducción de transcrito a las 8 hpt, con respecto a plantas silvestres, algo muy similar a lo observado para plantas mutantes *doble ire*, en donde también se observó una disminución significativa del nivel de inducción a las 8 hpt. Por lo tanto, la cinética de inducción de *BiP1/2* que se observó en plantas silvestres, se vio reemplazada por una cinética de disminución en plantas *bzip60* y *doble ire*.

En la cinética de inducción del gen *PDIL1-2* (**Figura 11B**), para plantas mutantes *bzip60-2*, se observó una disminución de la inducción relativa a las 4, 6, 8 y 12 hpt, para luego incrementar hasta un nivel de inducción similar al de las plantas silvestres. Finalmente, para plantas mutantes *doble ire*, se observó una disminución en la inducción relativa de transcrito durante todo el tratamiento, con respecto a plantas silvestres. Por lo tanto, la cinética de inducción temprana observada para *PDIL1-2* en plantas silvestres no se observó en plantas *bzip28-2*. En el caso de plantas *bzip60-2* y *doble ire*, observamos una disminución significativa de la cinética de inducción, que fue más severo en plantas *doble ire*, ya que duró por todo el tratamiento.

En el caso de *CRT2* (**Figura 11C**), en plantas mutantes *bzip60-2*, se observó un incremento significativo a 6 y 8 hpt respecto a plantas silvestres, mientras que en plantas mutantes *doble ire*, se observó un aumento significativo en la inducción relativa del transcrito desde las 6 hpt, con respecto a plantas silvestres. Por lo tanto, en plantas *bzip28-2*, no se observó la cinética de inducción de este gen, mientras que en plantas *bzip60-2* y *doble ire*, se observó el aumento en la inducción del transcrito a partir de las 6 hpt, a pesar de presentar, ambos genotipos, una disminución significativa en los tiempos tempranos.

Al analizar el gen *CNX1* (**Figura 11D**) en plantas mutantes *bzip60-2*, se observó una disminución significativa en la inducción de transcrito a 6 y 12 hpt, respecto a plantas

silvestres. Finalmente, en plantas mutantes *doble ire* se observó una disminución significativa en la inducción relativa del transcrito a 8 y 12 hpt, en comparación con plantas silvestres. Por lo tanto, la cinética de inducción observada para este gen en plantas silvestres, se vio disminuida tanto para las plantas mutantes *bzip60-2* y *doble ire*.

En el caso del gen *SHD* (**Figura 11E**) las plantas mutantes *bzip60-2*, presentaron menor inducción relativa que se mantuvo constante durante todo el tratamiento, siendo significativamente menor a las 6 y 8 hpt, en comparación a las plantas silvestres. Finalmente, en plantas mutantes *doble ire*, también se observó una disminución en la inducción, siendo significativa a partir de las 6 hpt, en comparación a las plantas silvestres. Por lo tanto, la cinética de inducción temprana observada para *SHD*, se vio disminuida para las tres plantas mutantes, con respecto a lo observado para plantas silvestres.

Finalmente, el gen *ERdJ3b* (**Figura 11F**) en plantas mutantes *bzip60-2* se observó disminución significativa en la inducción relativa a 4 y 6 hpt, mientras que en plantas mutantes *doble ire*, se observó una disminución significativa a 2, 4 y 6 hpt, con respecto a los niveles observados para plantas silvestres. Por lo tanto, si bien la cinética de inducción temprana del gen *ERdJ3b* no se vio alterada al comparar lo obtenido entre plantas silvestres, en las mutantes *bzip60-2* y *doble ire*, existen diferencias significativas que indicaron la disminución de la inducción de este.

Estos resultados sugieren que, en distinta medida, los factores de transcripción bZIP28 y bZIP60; estarían regulando positivamente la expresión de los genes de UPR, así como los genes relacionados al proceso de respuesta inmune adquirida. Esto se observa al analizar la cinética de inducción del conjunto de genes en plantas mutantes. Indicando, por consiguiente, la importancia de la señalización mediada por Ca^{2+} como segundo mensajero.

Discusión

Las bombas de Ca^{2+} son miembros de una gran superfamilia de ATPasas del tipo P, y se pueden clasificar según su ubicación, ya sea en el RE o en membranas plasmáticas (tipo IIA y IIB, respectivamente) (Clapham, 1995). En plantas, ECA1 (también llamada ACA3) fue la primera bomba del RE en ser clonada, localizada y estudiada (Liang *et al.*, 1997). La Ca^{2+} /ATPasa ACA2 corresponde a una bomba de Ca^{2+} ubicada en la membrana del RE (Hwang *et al.*, 2000). El gen que codifica para esta proteína, corresponde al gen ACA2, cuyo número AGI es el AT4G37640. Este gen presenta una totalidad de 3965 pares de bases. Corresponde a una proteína de transmembrana de 1014 aminoácidos, dependiente de Mg^{2+} como cofactor, que al hidrolizar una molécula de ATP, permite el ingreso de átomos de Ca^{2+} desde el citosol hacia el lumen del RE, generando ADP y fosfato (Hwang *et al.*, 2000).

1. Susceptibilidad de plantas mutantes para la bomba de Ca^{2+} ACA2 frente a la infección por *Pseudomonas syringae* (Pst DC3000).

En una primera etapa de esta tesis, se demostró por primera vez el fenotipo de susceptibilidad frente a patógenos para plantas mutantes en la Ca^{2+} /ATPasa frente a una infección con un patógeno virulento. Para ello, probamos el protocolo infección que había sido descrito en el año 2007 por Durrant *et al.*, donde se reportó como una técnica de infección directa, probando el ingreso del patógeno a la planta. Utilizando esta estrategia, logramos demostrar que las plantas mutantes *aca2* no son capaces de controlar la proliferación bacteriana, en comparación con plantas silvestres, que presentan un nivel de proliferación bacteriana menor luego del tratamiento previo con SA, sugiriendo que la bomba de Ca^{2+} tendría una funcionalidad importante en la señalización y/o regulación de la respuesta de defensa de *Arabidopsis thaliana*. Por su parte, el genotipo *npr1.1*, fue utilizado como control de hiper susceptibilidad, ya que había sido descrito que plantas mutantes para este factor eran incapaces de montar SAR y de esta manera, presentan una mayor proliferación bacteriana en respuesta a una infección (Cao *et al.*, 1994).

Este resultado indica la importancia de la señalización mediada por Ca^{2+} , ya que el RE, al no tener una manera eficiente de reingresar el Ca^{2+} que salió desde el lumen hasta el citosol, no genera una señalización hacia el núcleo, para el eficiente montaje de la

respuesta inmune sistémica (SAR). Este resultado, sumado al facilitado por el doctor Costa (**Anexo B**), en donde se midió la concentración de Ca^{2+} citoplasmático utilizando una proteína recombinante fluorescente capaz de sensor los niveles de variación de este ion e indicar, mediante los niveles de intensidad de fluorescencia (Nagai *et al.*, 2004), demuestra que el Ca^{2+} que sale del retículo, no está siendo reingresado, ya que como muestra el gráfico (**Figura B1**) la cantidad de Ca^{2+} medida en el citosol se mantiene alta, luego de las 4 hpt con un patógeno avirulento (Avir), indicando que las plantas mutantes *aca2* son incapaces de reingresar el Ca^{2+} , impidiendo una correcta señalización para el montaje de defensa.

2. Análisis de la cinética de inducción de genes marcadores de SAR utilizando plantas silvestres y mutantes para la bomba de Ca^{2+} ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.

Como ya se ha mencionado, no había sido descrito que la función de la Ca^{2+} /ATPasa ACA2 tuviera un rol fundamental en la respuesta sistémica adquirida de las plantas. Es por este motivo que se quiso estudiar e identificar cual es la cinética de activación que presentan, tanto la bomba de Ca^{2+} ACA2, como algunos genes correspondientes a la ruta de activación de SAR en respuesta al ataque por patógenos. Se ha descrito que los genes *EDS1*, *ICS1* y *PR1* incrementan su inducción de manera transitoria en respuesta al ataque por un patógeno hemibiótrofo como *Pst* DC3000 (García *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013), y que el gen *CAMTA3*, de manera contraria, disminuye su inducción. Este incremento en la inducción relativa de los genes que codifican para elementos de respuesta a patógenos, también ha sido descrito tras tratamientos con SA 2 mM (Dong *et al.*, 2003).

Nuestros resultados indican que tras el tratamiento con SA 0,5 mM existe un incremento en la inducción relativa del gen que codifica para la bomba ACA2, presentando un *peak* a las 6 hpt, para luego disminuir durante el resto del tratamiento. Se ha descrito que luego de la salida de Ca^{2+} de los organelos al citosol, y de la entrada de este ion desde el apoplasto al citosol, el aumento de concentración de este segundo mensajero permite generar una cascada de fosforilaciones que, en el caso de estrés biótico, llevarán a la generación de la respuesta inmune (Ma, 2001). Además, se ha descrito que este aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ debe ser restituido, para evitar una desregulación homeostática al interior

de la célula, que lleve a una generación de respuestas innecesarias o más aún, desencadenar un tipo de estrés que lleve a la muerte celular programada (Dangl *et al.*, 1996). Para intentar restablecer esta dinámica de Ca^{2+} , es que las plantas mutantes sobreexpresan otra de las Ca^{2+} /ATPasas de retículo, ECA1, como se puede ver en la **Figura 12**; sin embargo, a pesar de esto, las plantas mutantes *aca2* no son capaces de montar SAR.

Al analizar la cinética de los genes marcadores de SAR, en plantas silvestres, podemos ver que frente a un tratamiento de SA 0,5 mM, que simula el ataque por patógeno, la expresión relativa del gen *CAMTA3* disminuye, mientras que la de los otros genes marcadores, *EDS1*, *ICS1* y *PR1* aumenta. Este resultado concuerda con lo descrito por varios autores (García *et al.*, 2010), ya que *EDS1*, proteína del cloroplasto con características similares a una lipasa, presenta actividad triglicérido lipasa, cuyo producto, permite la señalización para la activación de *ICS1*, enzima ubicada en el cloroplasto, cuya

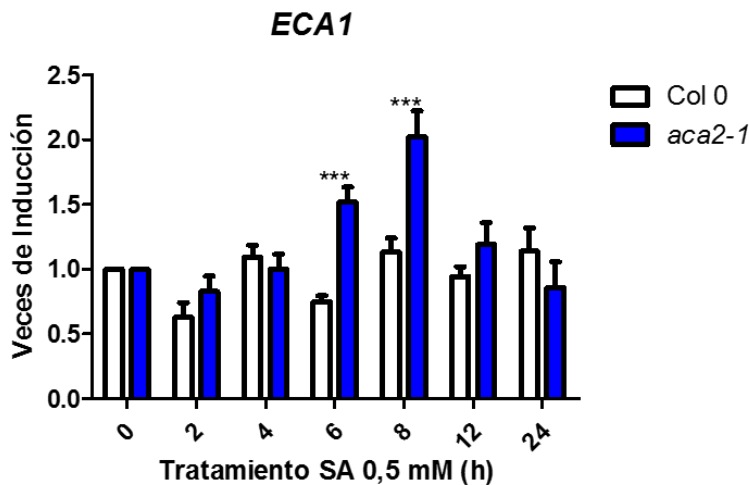


Figura 12. Análisis de la cinética de inducción del transcrito de la Ca^{2+} /ATPasa de RE, ECA1, en respuesta al tratamiento inductor de SAR, en plantas silvestres y mutantes *aca2*. Plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (Col 0, barras blancas) y mutantes *aca2* (barras azules), fueron crecidas *in vitro* por dos semanas. Las plantas fueron tratadas en MS líquido suplementado con SA 0,5 mM o MS como control, durante los tiempos descritos en la figura. Las plántulas fueron congeladas y se extrajo RNA total. Un μ g de RNA fue utilizado para sintetizar cDNA y mediante qRT-PCR, determinar el nivel de inducción relativa de *ECA1*. El nivel de inducción relativa de mRNA del gen analizado fue graficado relativo al nivel de inducción del normalizador β -*Tubulina 4*. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los datos mostrados para el mismo tiempo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Test ANOVA).

función permite la biosíntesis de SA, que luego de acumularse es transportado fuera del cloroplasto hacia el citosol, donde, posterior a su acumulación e interacción con el coactivador NPR1, permite la señalización y activación de los genes de respuesta de defensa dependientes de SA, como es el gen *PR1*. Como podemos ver en la Figura 5B, 5C y 5D, el aumento de la inducción de *EDS1* concuerda con el de *ICS1* y a su vez, con el gran aumento de la inducción de *PR1*, indicando tanto que el tratamiento con SA es capaz de activar los genes de respuesta a ataque por patógenos, como la estrecha relación de estos genes en la respuesta sistémica adquirida. Además, como muestra la Figura 5A, la inducción del gen *CAMTA3* disminuye, desde su *peak* a las 4 hpt. *CAMTA3* corresponde a un factor de transcripción que presenta un motivo de unión a Calmodulina (CaM). Está descrito que este factor de transcripción regula de manera directa reprimiendo la expresión de *EDS1*; cuando CaM viaja al núcleo y se une al sitio de unión de *CAMTA3*, de esta manera, este factor de transcripción se ubica en la secuencia promotora de *EDS1*, impidiendo su transcripción (Zhang *et al.*, 2014). El resultado obtenido para la inducción de *CAMTA3* se relaciona con lo descrito, ya que como se puede observar, la inducción de este gen fue mayor a tiempos tempranos, al contraste de *EDS1* y luego, a medida que pasó el tiempo de tratamiento, *CAMTA3* comenzó a disminuir su inducción, y *EDS1* comenzó a aumentar. Se hipotetiza que esto se debió a que la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ comenzó a disminuir y, por consiguiente, los átomos de Ca^{2+} se desprendieron de CaM y esta se liberó del factor *CAMTA3*, por ende, se dejó de reprimir la activación de *EDS1* y se permitió la activación de la respuesta inmune.

Al analizar la cinética de estos 4 genes marcadores de SAR, en la mutante *aca2* (**Figura 6**) vemos que los genes *EDS1*, *ICS1* y *PR1* no se inducen luego del tratamiento con SA, en comparación a la planta silvestre. Además, se observó que el gen *CAMTA3* presentó un aumento significativo a 24 hpt, lo que permitió hipotetizar que, al no reingresar Ca^{2+} al RE, CaM permanece unida al factor *CAMTA3*, impidiendo continua y permanentemente la transcripción de *EDS1*, y, por ende, la activación de la vía de respuesta dependiente de SA.

3. Análisis de la cinética de expresión de genes marcadores de UPR utilizando plantas silvestres y mutantes para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.

Si bien, gracias a resultados obtenidos por Arraño (2015) se ha descrito que existe un incremento en el nivel de inducción relativa de genes marcadores de UPR, durante la respuesta a un agente generador de proteínas mal plegadas, como lo es el DTT; nada se sabía acerca de la cinética de inducción de estos genes marcadores de UPR en una planta mutante para una bomba de Ca^{2+} de RE y si es posible correlacionar esta cinética con la obtenida para los genes marcadores de SAR.

Los genes seleccionados como marcadores de UPR en este trabajo, corresponden a proteínas chaperonas del Retículo Endoplasmático que asisten al correcto plegamiento y maduración de proteínas de secreción. Los genes seleccionados como marcadores de UPR fueron probados como tales, para lo que se realizaron tratamientos SA, compuesto que activa una vía de señalización asociada al ataque por patógenos, lo que favorece el estrés de retículo, dada la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen de este organelo (Martínez y Chrispeels, 2003; Deng *et al.*, 2013).

Entre las proteínas chaperonas, cuyo papel es importante en respuesta a este fenómeno, se encuentran las proteínas del tipo BiP, que son un tipo de proteínas residentes del RE, codificadas por tres genes *BiP1*, *BiP2* y *BiP3*, que en conjunto asisten al correcto plegamiento de las proteínas nacientes en este organelo. Éstas poseen un C-terminal de unión a sustrato, el que se puede unir a las zonas hidrofóbicas de las proteínas evitando su aglomeración (Humbert *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013; Howell, 2013). Otras de las proteínas cuya participación es importante en este proceso, corresponde a las proteínas disulfuro-isomerasas (PDIs) que son las responsables de la formación de puentes disulfuro y el intercambio de puentes entre los residuos de cisteína de las proteínas mal plegadas (Deng *et al.*, 2013). Existen otras proteínas chaperonas de importancia como SHD y ERdJ3b. SHD es una proteína del tipo *Heat Shock Protein* (HSP90), que participa en favorecer el correcto plegamiento de proteínas y estabilizarlas, previniendo el mal plegamiento y agregación de las proteínas que han sido plegadas de una manera parcial (Chen *et al.*, 2006). Por su parte ERdJ3b, también conocida como HSP40 o DnaJ, es una

proteína co-chaperona que se asocia directamente con las proteínas mal plegadas nacientes y evita su aglomeración hasta que las proteínas del tipo BiP llegan a este complejo y cumplen su función (Guo & Snapp, 2013; Ohta & Takaiwa, 2014).

Como ya hemos mencionado, un tratamiento con SA de manera exógena es capaz de simular un ataque por patógenos, por lo que, para defenderse, la planta incrementa la necesidad por secretar proteínas con función antimicrobiana como, por ejemplo, PR1. Dado que en el retículo se pierde el balance entre la capacidad de plegar correctamente las proteínas versus la demanda de plegamiento existente, se da paso a un estrés de retículo, proceso que va a activar UPR. Se ha descrito que el tratamiento con BTH, un análogo funcional del SA, es capaz de activar la vía de UPR y, por tanto, incrementar la inducción de las proteínas chaperonas que participan de este proceso, con el objetivo de mitigar el estrés de este organelo (Wang *et al.*, 2005).

Como vimos en la sección de resultados, en plantas silvestres todos los genes marcadores de UPR presentaron una cinética de inducción tras realizar tratamientos con SA 0,5 mM (**Figura 7**). Sin embargo, en plantas mutantes para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, el escenario es distinto a lo observado para las plantas silvestres. Como vimos en la Figura 8, se observó una disminución significativa de la inducción de los genes marcadores de UPR en plantas mutantes *aca2* en respuesta al tratamiento con SA 0,5 mM, sugiriendo que la función de esta bomba de Ca^{2+} , estaría afectando directamente la regulación de la expresión de estos genes marcadores de UPR analizados. Estos resultados nos permiten sugerir que la dinámica de señalización mediada por el ion Ca^{2+} tiene la capacidad de regular de manera positiva la expresión de estos genes en respuesta a un estrés biótico.

4. Análisis de la proteína de secreción marcadora de SAR, utilizando plantas silvestres y mutantes para la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, en respuesta a tratamientos con SA.

En base a los resultados obtenidos, se sugirió que el reingreso de Ca^{2+} era esencial para el montaje de la respuesta inmune adquirida, por lo que la mutante *aca2* tiene un efecto en la inducción de genes repuesta a patógenos y/o SA, afectando, además, la vía de inducción de genes de la maquinaria de respuesta del RE, por lo que este defecto puede

traducirse en un impacto en la maquinaria de secreción. Para probar esta hipótesis, se analizó la secreción de la proteína PR1, una proteína característica de la respuesta inmune inducible en *Arabidopsis thaliana* (van Loon & van Strien, 1999; Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Se observó una marcada reducción de la acumulación de PR1 en las plantas mutantes *aca2*, a las 8 horas de tratamiento con SA, en comparación con la de tipo salvaje (**Figura 9A**), ya que, a las 8 horas, aún no es capaz de detectar PR1 en el exterior de la célula. La secreción PR1, que se analizó a las 24 hpt, se redujo aún más en las plantas mutantes *aca2*. El análisis de los niveles totales de PR1 apoya aún más nuestra conclusión de que se requiere el reingreso de Ca^{2+} mediado por ACA2 tanto para la secreción como la expresión de proteínas relacionadas a patogénesis (**Figura 9**). Al observar estos resultados y relacionarlos con los obtenidos mediante qRT-PCR, se concluyó que al no reingresar el Ca^{2+} al retículo, no se activa la cascada de señalización para la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de SA y, por ende, a la activación de genes dependientes de esta fitohormona, como es el caso de *PR1*, de esta manera se asoció la disminución de la acumulación de PR1 en las plantas mutantes *aca2*. Si bien, en los datos de inducción relativa para PR1 en las plantas mutantes *aca2*, se mostró una disminución significativa a las 24 hpt, en el *western blot*, si se detectó esta proteína en el fluido intracelular; esto resultado puede deberse, a que la planta mutante intentó restablecer la dinámica de Ca^{2+} del RE, sobreexpresando otra Ca^{2+} /ATPasa, en este caso, ECA1 (Feng & Sze, 1998; **Figura 12**). Si bien ECA1 trata de suplir la función de la falta de ACA2, no es del todo eficiente, ya que como se observó, los niveles de PR1 acumulado y secretado siguen siendo menores que los de las plantas silvestres. Estos datos demuestran que ACA2, juegan un papel importante en la defensa de la planta mediante la señalización dependiente de Ca^{2+} durante el control de la síntesis secreción de proteínas antimicrobianas.

5. Análisis de la expresión de los genes marcadores de SAR y de genes relacionados a UPR, utilizando plantas silvestres y mutantes en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico bZIP28, bZIP60 e Ire1a/1b, en respuesta a tratamientos con SA.

Como se mencionó en la introducción, se han descrito dos vías de señalización para UPR, la vía de IRE1 y el procesamiento de ARNm de bZIP60 y la vía de bZIP28. En la primera, se activa IRE1, esta procesa al ARNm que codifica para bZIP60 y la porción activa se traduce para actuar como un factor de transcripción (Deng *et al.*, 2011; Nagashima *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012). En la segunda vía de señalización, se ha descrito que el factor de transcripción bZIP28, el cual se encuentra retenido en la membrana del RE. En respuesta al estrés, este factor comienza a acumularse y es proteolizado por las enzimas *S1P* y *S2P* (Chen *et al.*, 2010). Esta modificación libera la porción activa de bZIP28, que migra al núcleo y actúa como factor de transcripción (Liu *et al.*, 2007; Tajima *et al.*, 2008; Liu & Howell, 2010; Nagashima *et al.*, 2014). Es por eso que con el objetivo de analizar el establecimiento de la respuesta inmune en plantas que si presentan funcionalidad en las bombas de Ca^{2+} del RE, pero no en los componentes involucrados en ambas vías de señalización de RE, es que se trabajó con las mutantes, *bzip28-2*, *bzip60-2* y la doble mutante *ire1a/1b*. Como se pudo ver, al analizar los genes correspondientes a marcadores de SAR, carencia en alguno de los componentes de ambas vías de señalización conllevan a un deficiente montaje de la respuesta inmune. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Wang *et al.* (2005), para el caso de la planta mutante en bZIP28, y por Moreno *et al.* (2012), para el caso de la planta mutante *doble ire* y de la mutante en bZIP60. Los autores demostraron que estas plantas mutantes presentan una incapacidad de montar la respuesta inmune, utilizando la medición de PR1 como control de SAR positivo. En la mutante *bzip28-2*, es más drástico el efecto causado por la ausencia de este factor de transcripción en el montaje de SAR, lo cual nos llevó a hipotetizar que esta vía de señalización es la que principalmente se activa frente a estrés del tipo biótico, ya que bZIP60 se asocia a calor y a estrés inducido por agentes químicos (Parra-Rojas *et al.*, 2015) y el otro factor de transcripción asociado a estrés de RE, bZIP17, está más relacionado a estrés salino (Liu *et al.*, 2007); siendo uno de los primeros antecedentes en relacionar la respuesta a UPR con la señalización frente a estrés biótico

Ahora bien, al estudiar los genes marcadores de UPR en estas tres mutantes insercionales, se pudo determinar que una mutación en cualquiera de las vías de señalización genera una inducción significativamente menor de estos genes, en comparación a las plantas silvestres, frente a un estrés del tipo biótico. Es importante destacar la inducción del gen *CRT2* (**Figura 11C**), que codifica para una proteína chaperona dependiente de Ca^{2+} ; como se observó, es el único gen que se induce de mayor manera en las plantas mutantes *bzip60-2* y *doble ire*, desde las 6 hpt. Se hipotetiza que esta proteína chaperona también estaría reteniendo a bZIP28 en la membrana del RE en condiciones normales, cuando la concentración de Ca^{2+} se mantiene en niveles basales dentro del RE. Frente a un estrés, como ya se mencionó, el RE libera Ca^{2+} hacia el citosol, por lo que los átomos de Ca^{2+} utilizados como cofactor por CRT2, son liberados, por lo que esta enzima se acoplaría a la porción C- terminal de bZIP28, impidiendo que este factor complete su ciclo de activación. Luego, en condiciones normales, cuando reingresa el Ca^{2+} al lumen del RE, CRT2 tomaría nuevamente los átomos de Ca^{2+} y se desanclaría de bZIP28, regulando de manera positiva los genes relacionados a la respuesta de defensa mediados por este factor de transcripción. Esta hipótesis se explicaría analizando los resultados en las mutantes *bzip60-2* y *doble ire*, ya que, al no tener esta vía de señalización activa, es necesario, aumentar la expresión de genes relacionados a defensa y a UPR gatillados por estrés biótico, por lo que estas plantas sobre expresarían *CRT2* con la finalidad de bloquear la señalización/transcripción mediada por bZIP28; de esta manera, las plantas regularían UPR y no mantendrían en una activación constante los demás genes, que podrían llevar a cabo un proceso de muerte celular programada. Ha sido descrito que plantas mutantes en CRT2 son más resistentes al ataque por patógenos (Qiu *et al.*, 2012b), lo que potencia aún más esta hipótesis, ya que al no tener la forma de retener a bZIP28, se mantiene activa la transcripción de genes relacionados a defensa, permitiendo a la planta defenderse de mejor manera. Cuando analizamos la inducción de este gen en la mutante *aca2* (**Figura 8C**) vemos que presenta una significativa disminución, lo que permitió relacionar la importancia de la homeostasis de Ca^{2+} entre RE y citosol, ya que, si no se reingresa este ion, CRT2 no puede desanclarse de bZIP28, impidiendo el montaje de la respuesta

inmune, que como se pudo observar, analizando la inducción de los genes marcadores de SAR y de la secreción del péptido antimicrobiano PR1, no se llevó a cabo.

Sin embargo, para dar una resolución final, que compruebe esta hipótesis, es necesario realizar más estudios a futuro, uno de ellos, podría ser la cruce entre la mutante *aca2* con la mutante *bzip28-2*, para analizar cómo se comporta la planta, que tiene alterada tanto la dinámica de Ca^{2+} entre RE y citosol, como la vía de señalización de respuesta a estrés de RE, frente a un estrés del tipo biótico.

Conclusiones

Los análisis realizados en este trabajo, utilizando plantas simples mutantes la Ca^{2+} /ATPasa ACA2, permiten concluir que esta bomba de Ca^{2+} cumple un rol importante en la regulación, tanto de la respuesta a proteínas mal plegadas, como de la respuesta de defensa de *Arabidopsis thaliana*. Esto debido a que las plantas carentes de esta bomba que reingresa Ca^{2+} al lumen del RE, presentan una mayor proliferación del patógeno y no son capaces de montar una respuesta de defensa eficiente, frente al tratamiento de SA, inductor de la respuesta inmune adquirida.

La alteración en la inducción relativa de los transcritos que codifican para proteínas relacionadas con a SAR y a UPR, nos permite concluir la función de la Ca^{2+} /ATPasa ACA2 ejerce una regulación positiva sobre la expresión de estos genes. De manera muy interesante, la alteración más pronunciada en la inducción de los transcritos que codifican para proteínas relacionadas a SAR, observada en plantas mutantes *aca2*, nos permite concluir que la dinámica de Ca^{2+} , regulada por esta bomba, tendría un efecto en la señalización para el montaje de la respuesta inmune, ya que la ausencia de esta, se generan efectos que conllevan al déficit del montaje de la respuesta inmune, haciendo a la planta más susceptible al ataque por patógenos. Este fenómeno no se había demostrado anteriormente, por lo que con este estudio se realizó ciencia de frontera para entender de mejor manera, como la planta de *Arabidopsis thaliana* realiza el proceso de generar una respuesta inmune

Los ensayos realizados utilizando plantas mutantes en las vías de señalización de estrés de RE, permiten concluir que los factores de transcripción bZIP28 y bZIP60; tienen funciones complementarias en la regulación de la defensa de *Arabidopsis thaliana*. Todos estos antecedentes recopilados, nos permiten concluir que el establecimiento de la respuesta sistémica adquirida requiere de la dinámica de Ca^{2+} entre el RE y el citoplasma, en donde ACA2, cumple un rol central regulando la respuesta a proteínas mal plegadas en *Arabidopsis thaliana*.

Anexos

A. Estandarización de oligonucleótidos para PCR en tiempo real (qRT-PCR).

La estandarización de cada pareja de oligonucleótidos se inició con la amplificación del producto de qRT-PCR. Con esto, se generaron curvas de desnaturalización del producto para verificar que sea un producto único y luego, se comprobó que este producto fuese del tamaño esperado a través de un gel de agarosa. Una vez comprobado que el producto amplificado es el deseado, se prepararon diluciones seriadas desde la dilución 10^{-4} a la 10^{-9} y se utilizaron como molde para la obtención de una curva de estandarización y de esta manera obtener el porcentaje de eficiencia para cada reacción (**Figura A1** y **A2**). Este procedimiento fue realizado para todas las parejas de oligonucleótidos estandarizadas en este trabajo. Como ejemplo, se muestra lo obtenido para el gen *EDS1*.

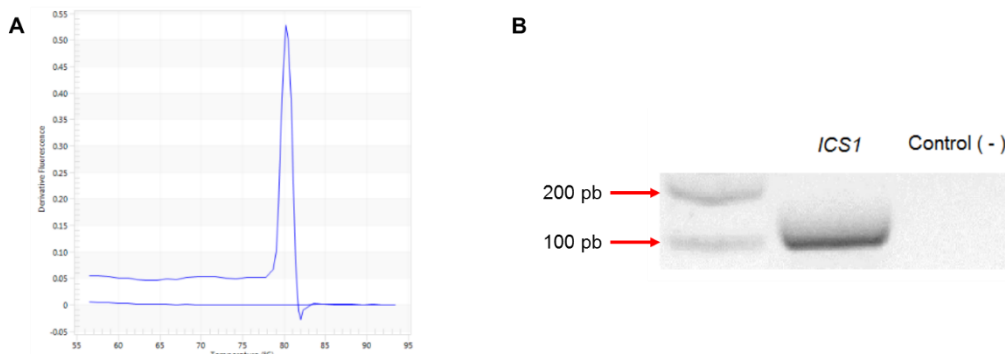


Figura A1. Confirmación del producto de qRT-PCR. **A.** Se generó una curva de desnaturalización a partir del producto de qRT-PCR previamente obtenido, incrementando gradualmente la temperatura desde 55 °C hasta 95 °C. El *peak* representa la desnaturalización del producto de amplificación, indicando que es producto único. **B.** El producto de qRT-PCR obtenido en (**A**), se resolvió en un gel de agarosa al 1,5 %_[p/v] en buffer TAE 1X para comprobar que fuese del tamaño esperado. En este caso, los oligonucleótidos utilizados para el gen *ICS1* amplificaban para un producto de 118 bp de tamaño. El marcador de peso molecular utilizado, indica las bandas correspondientes a un tamaño de 100 bp y 200 bp.

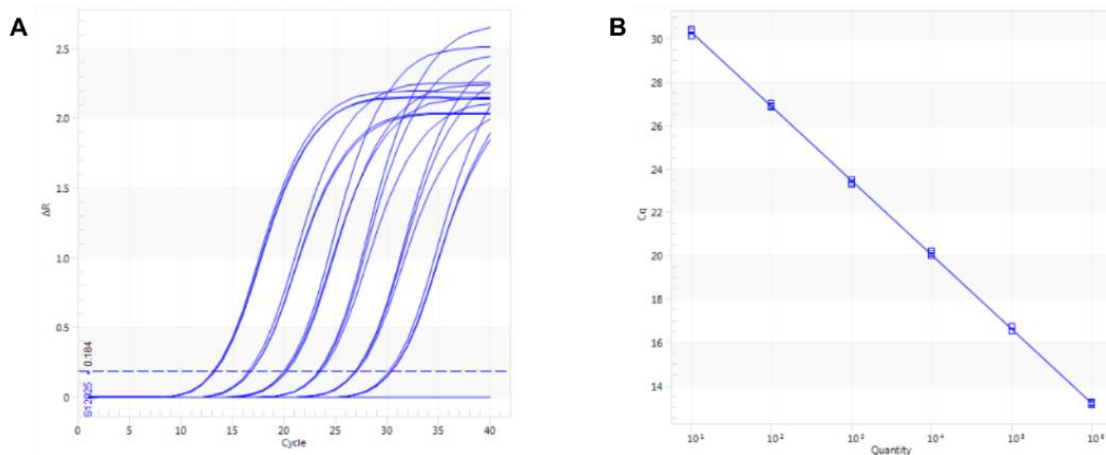


Figura A2. Determinación de la eficiencia del par de oligonucleótidos mediante diluciones seriadas a partir del producto de qRT-PCR. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 desde la dilución 10^{-4} a la 10^{-9} y se utilizaron como molde para la obtención de una curva de estandarización y de esta manera conocer la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos utilizados. Para cada punto, se realizaron tres réplicas técnicas. **A.** Gráfico de amplificación de las diluciones 10^{-4} a la 10^{-9} . **B.** Curva estándar obtenida a partir de la amplificación de las diluciones 10^{-4} a la 10^{-9} ; esta curva indica el R^2 y la eficiencia de la reacción.

B. Datos de la medición del Ca^{2+} citoplasmático, utilizando proteínas *Cameleon*, facilitados por el Dr. Alex Costa (Italia).

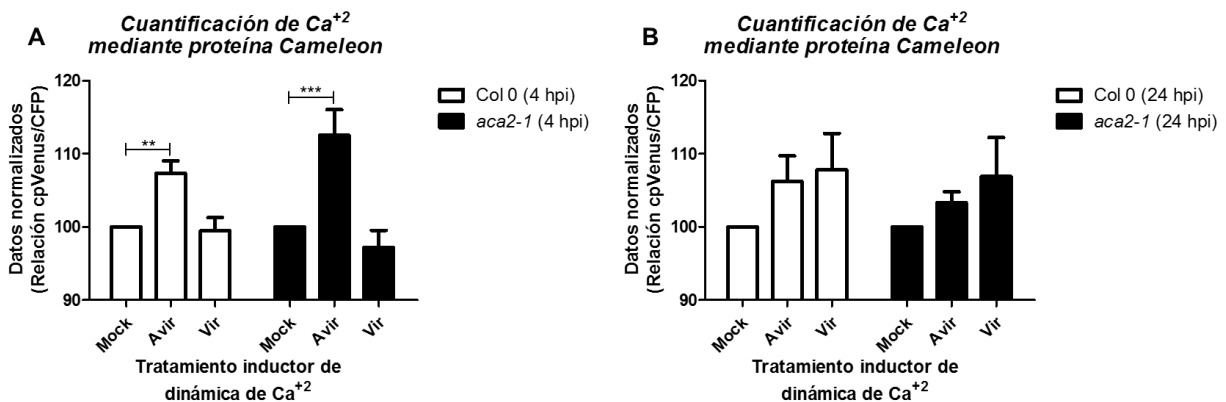


Figura B1. Gráficos de la cuantificación de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático en respuesta a distintos tratamientos inductores de estrés biótico. El gráfico muestra los niveles de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, utilizando la proteína cpVenus en plantas silvestres (barras blancas) y en plantas *aca2* (barras negras) luego de (A) 4 horas de tratamiento y (B) 24 horas de tratamiento. Los tratamientos usados fueron Mock ($MgCl_2$ 10mM), Avir (patógeno avirulento) y Vir (patógeno virulento).

Bibliografía

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 373-99.

Bari R., & Jones JD. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69: 473-488.

Batistič O., & Kudla, J. (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim Biophys Acta.* 1820: 1283-1293.

Binet, MN., et al. (2001). Disruption of Microtubular Cytoskeleton Induced by Cryptogein, an Elicitor of Hypersensitive Response in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 125: 564-572.

Blanco MF., et al. (2009). Early genomic responses to salicylic acid in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 70:79–102

Blanco-Herrera, MF. 2009. Identificación de genes de respuesta a ácido salicílico y estudio de su mecanismo de activación en *Arabidopsis thaliana*. *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

Bogdanove, AJ., y Martin, GB. (2000). Avr Pto-dependent Pto-interacting proteins and Avr Pto-interacting proteins in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 8836–8840.

Bonza, C., & De Michelis, M. (2011), The plant Ca²⁺-ATPase repertoire: biochemical features and physiological functions. *Plant Biol.* 13: 421–430.

Caillaud, M., et al. (2012). Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. *Plant J.* 69: 252–265.

Cao, H., et al. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell.* 6: 1583–1592.

Chen, B., et al. (2006). Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics.* 7: 156-175.

Chen, Z., et al. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal Behav.* 4: 493–6.

- Cheval, C., et al.** (2013) Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochim Biophys Acta.* 1833: 1766-1771.
- Clapham, D.** (1995). Calcium signaling. *Cell.* 80: 259-268.
- Cox J., et al.** (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell.* 73:1197-206.
- Crosti, P., et al.** (2001). Tunicamycin and Brefeldin A induce in plant cells a programmed cell death showing apoptotic features. *Protoplasma.* 216: 31–38.
- Cunnac, S., et al.** (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr Opin Microbiol.* 12: 53–60.
- Curran, AC., et al.** (2000). Autoinhibition of a calmodulindependent calcium pump involves a structure in the stalk that connects the transmembrane domain to the ATPase catalytic domain. *J Biol Chem.* 275: 30301–30308.
- Dangl, JL., et al.** (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell.* 8: 1793–1807.
- Dangl, JL., et al.** (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science.*341: 746–751.
- de Vos M., et al.** (2005). Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe In.* 18: 923-37.
- Delaney, TP., et al.** (1994). A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science.* 266: 1247–1250.
- Deng, Y., et al.** (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108: 7247-7252.
- Deng, Y., et al.** (2013). Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response and Its Physiological Roles in Plants. *Science.* 14: 8188-8212.
- Du, L., et al.** (2009). Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature.* 457: 1154-1159.

- Dunkley, D., et al.** (2006). Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 6518–6523.
- Durrant, WE., & Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*. 42: 185–209.
- Durrant, WE., et al.** (2007). Arabidopsis SNI1 and RAD51D regulate both gene transcription and DNA recombination during the defense response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 4223-7.
- Fang, X., et al.** (2015). Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. *Proteomics*. 15: 1525-1543.
- Fujita, M., et al.** (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*. 9: 436-442.
- Gaffney, T., et al.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. 261: 754–756.
- Gao, Q., et al.** (2015) Signal regulators of Systemic acquired resistance. *Front Plant Sci*. 6: 228.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 43: 205–227.
- Göhre, V., & Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol*. 46: 189–215.
- Grant M., & Lamb, C.** (2006). Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol*. 9: 414-420.
- Guo, F., & Snapp, EL.** (2013). ERdj3 regulates BiP occupancy in living cells. *J Cell Sci*. 126: 1429–1439.
- Harper, JF., et al.** (1998). A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem*. 273: 1099-106.
- Hetz, C.** (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13: 89–102.

Holliday, MJ., et al. (1981). Cell death patterns and accumulation of fluorescent material in the hypersensitive response of soybean leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Physiol Plant Pathol.* 18: 279–287.

Hong, B., et al. (1999). Identification of a calmodulin regulated Ca⁺²-ATPase in the endoplasmic reticulum. *Plant Phys.* 119: 1165-1175.

Howell, SH. (2013). Endoplasmic reticulum stress responses in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 64: 477–99.

Humbert, S., et al. (2012). Alteration of the bZIP60/IRE1 pathway affects plant response to ER stress in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 7: e39023.

Hwang, I., et al. (2000). A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca⁺² pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 6224-9.

Iwata, Y., & Koizumi, N. (2012). Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends Plant Sci.* 17: 720–7.

Janda, M., & Ruelland, E. (2015). Magical mystery tour: Salicylic acid signalling. *Environ Exp Bot.* 114: 117-128.

Jones, JG., & Dangl, JL. (2006). The plant immune system. *Nature.* 444: 323–329.

Khan, M., et al. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front Plant Sci.* 6: 462-479.

Kinkema, M., et al. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell.* 12: 2339–2350.

Knight, H., et al. (1996). Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell.* 8: 489-503.

Krinke, O., et al. (2007). Phosphatidylinositol 4-kinase activation is an early response to salicylic acid in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiol.* 144: 1347–59.

Kumar, D. (2014) Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science.* 228: 127-134.

- Lai, Z., & Mengiste, T.** (2013). Genetic and cellular mechanisms regulating plant responses to necrotrophic pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* 16: 505–512.
- Lecourieux, D., et al.** (2002). Analysis and Effects of Cytosolic Free Calcium Increases in Response to Elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells. *Plant Cell.* 14: 2627-2641.
- Lecourieux, D., et al.** (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* 171: 249-69.
- Li, J., et al.** (2009). Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 15973–15978.
- Liang, F., & Sze, H.** (1998). A High-Affinity Ca²⁺ Pump, ECA1, from the Endoplasmic Reticulum Is Inhibited by Cyclopiazonic Acid but Not by Thapsigargin. *Plant Physiol.* 118: 817–825.
- Liang, F., et al.** (1997). ECA1 complements yeast mutants defective in Ca²⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca²⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 8579–8584.
- Liu, J., et al.** (2007). An Endoplasmic Reticulum Stress Response in Arabidopsis Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28. *Plant Cell.* 19: 4111-4119.
- Liu, JX., & Howell, SH.** (2010). Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell.* 22: 2930–2942.
- Liu, JX., et al.** (2007). An Endoplasmic Reticulum Stress Response in Arabidopsis Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28. *Plant Cell.* 19: 4111-4119.
- Loake, G., & Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol.* 10: 466–72.
- Ma, W.** (2011). Roles of Ca²⁺ and cyclic nucleotide gated channel in plant innate immunity. *Plant Science.* 181: 342-346.

Mackey, D., et al. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1- mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*. 108: 743–754.

Mahajan, S., et al. (2008). Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem Biophys*. 471: 146-58.

Martínez, IM., & Chrispeels, MJ. (2003). Genomic analysis of the Unfolded Protein Response in *Arabidopsis thaliana* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell*. 15: 561–576.

McAinsh MR., & Pittman JK. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol*. 181:275-94.

McAinsh, MR., & Pittman, JK. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol*. 181: 275-94.

Mengiste, T. (2012). Plant immunity to necrotrophs. *Annu Rev Phytopathol*. 50: 267–294.

Métraux, JP. (2013). Systemic Acquired Resistance. In: Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2nd ed. Elsevier Inc. Washington DC, USA, Pp 627-629.

Moreno, A., et al. (2012) IRE1/bZIP60-Mediated Unfolded Protein Response Plays Distinct Roles in Plant Immunity and Abiotic Stress Responses. *Plos One*. 7: e31944.

Mou, Z., et al. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*. 113: 935–44.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum*. 15: 473-497.

Nagai, T., et al. (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 10554–10559.

Nagashima, Y., et al (2014). Exogenous Salicylic Acid Activates Two Signaling Arms of the Unfolded Protein Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 55: 1772–1778.

Nawrath, C., & Métraux, JP. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*. 11: 1393–404.

Neuenschwander, U., et al. (1996). Systemic Acquired Resistance. In: *Plant-Microbe Interactions*. 1st ed. Chapman & Hall. New York, USA, Pp 81-106.

O'Brien, HE., et al. (2011). Evolution of Plant Pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: A Genomics Perspective. *Annu Rev Phytopathol*. 49: 269-289.

Ohta, M., & Takaiwa, F. (2014). Emerging features of ER resident J-proteins in plants. *Plant Signal Behav*. 9: e28194.

Parra-Rojas, J., et al. (2015). The Dynamic of the Splicing of bZIP60 and the Proteins Encoded by the Spliced and Unspliced mRNAs Reveals Some Unique Features during the Activation of UPR in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. 10: e0122936.

Pfaffl, MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29: e45.

Pieterse, CM., et al. (2012). Hormonal modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 28:489-521.

Pittman, JK., & Hirschi, KD. (2003). Don't shoot the (second) messenger: endomembrane transporters and binding proteins modulate cytosolic Ca⁺² levels. *Curr Opin Plant Biol*.;6: 257-62.

Qiu, Y., et al. (2012a) The function of calreticulin in plant immunity. *Plant Sig & Behav*. 7: 907-910.

Qui, Y. et al. (2012b) A dual regulatory role of Arabidopsis calreticulin-2 in plant innate immunity. *Plant J*. 69: 489-500.

Schwessinger, B., & Ronald, PC. (2012). Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annu Rev Plant Biol*. 63: 451–482.

Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol*. 6:365-371

Sierla, M., et al. (2013). Apoplastic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses. *Antioxid Redox Signal.* 18:2220-39.

Spalding, EP. & Harper, JF. (2011). The ins and outs of cellular Ca⁺² transport. *Curr Opin Plant Biol.* 14:715-20

Spoel, S., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol.* 12: 89–100.

Tajima, H., et al. (2008) Identification of an Arabidopsis transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochem Biophys Res Commun.* 374: 242–247.

Torres, MA., et al. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141: 373–378.

Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 17: 147–54.

Uknes, S., et al. (1992) Acquired Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell.* 4: 645-656.

van Der Luit, AH., et al. (1999). Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 121:705-14.

van Loon, L. (2000). Systemic Induced Resistance. In: Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. 1st ed. Kluwer Academic. New York, USA, Pp 521-574.

van Loon, L., & van Strien, EA. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol.* 37:229-230.

van Loon, L., et al. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 44: 135–62.

Vitale, A. & Boston, R. (2008). Endoplasmic reticulum quality control and the unfolded protein response: insights from plants. *Traffic.* 9: 1581–1588.

Vlot, A., et al. (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol.* 11: 436-442.

Walley, JW., et al. (2013). Fatty acids and early detection of pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* 16: 520–526.

Wang, D., et al. (2005). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science.* 308: 1036–1340.

Wendehenne, D., et al. (2014). Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 20: 127–134.

White, R. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology.* 99: 410-412.

Wildermuth, MC., et al. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* 414: 562–5.

Wu, S., et al. (2014). Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science.* 228: 118-126.

Zhang, L., et al. (2014). Regulation of plant immunity through ubiquitin mediated modulation of Ca²⁺-calmodulin-AtSR1/CAMTA3 signaling. *Plant J.* 78: 269-281.