



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ADN
COMPLEMENTARIO QUE CODIFICA PARA UN
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA
WRKY EN *Citrus sinensis***

Tesis que presenta
ALEJANDRA VERA AGUILAR

**Opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS**
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
Agosto 2014







RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: "Clonación y caracterización de un ADN complementario que codifica para un factor de transcripción de la familia WRKY en *Citrus sinensis*", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría (CICY) y el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís (IPICYT); dentro de la opción Biotecnología perteneciente al programa de posgrado en Ciencias Biológicas de este centro; y así mismo se realizó una estancia en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Atentamente

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Alejandra Vera Aguilar

AGRADECIMIENTOS:

A mi asesor el Dr. Santy Peraza Echeverría por la oportunidad para realizar este proyecto, por su confianza, paciencia, apoyo, enseñanzas y sobre todo por su gran amistad y comprensión, cualidades que han permitido mi desarrollo profesional y personal. En especial porque siempre ha estado al pendiente de mí tanto en lo profesional como lo personal.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por darme la oportunidad y confianza de trabajar en su laboratorio, por su paciencia y comprensión en todo momento.

A la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia por su apoyo, comprensión, enseñanzas, y amistad.

Al comité tutorial integrado por el Dr. Santy Peraza Echeverría, el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia por los comentarios, sugerencias y el apoyo que me han brindado.

A mi comité de revisión de tesis, a la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, al Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, y al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado. Por dedicar parte de su tiempo para la revisión de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de la beca No 326491de maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C (CICY), por permitirme desarrollar este proyecto.

Al financiamiento del proyecto Fiscales No. 103900017 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. para la realización de este proyecto.

A la Unidad de Biotecnología y al laboratorio de Cultivos Tropicales por el espacio y equipos proporcionados.

Al M.C Miguel Ángel Vallejo Reyna, por todo su apoyo, enseñanzas, comprensión, paciencia y amistad.

A la M.C. Merly Adilene Martín Cocom por su ayuda en la en las técnicas de transformación de tabaco, al igual por su gran amistad, apoyo y paciencia.

A la M.C. Ángeles Guadalupe Mayorga López, por todas sus enseñanzas, paciencia y apoyo en la realización de este proyecto.

Al M.C. Luis Ernesto Osuna Rosales por su apoyo técnico en la realización de la clonación del ADNc.

A la Q.B.A. Ileana Borges Argáez, por su apoyo técnico en el laboratorio, sus enseñanzas, paciencia y amistad.

A la M.C. Paty Contreras Pool por su apoyo técnico en el formato de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de micro algas y cultivos tropicales: Merly, Miguel Ángel, Ángeles, Ernesto, Paty, Maru, Melissa, Rodrigo, Any, Maggie, Shirley, Daniela; y a la técnico Ileana Borgues, por todo su apoyo, comprensión, paciencia y amistad que me han dado, sobre todo en esas situaciones difíciles.

Al Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología (IPICYT) por las instalaciones prestadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas a cargo del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

A la M.C. Luzmila González por la guía, apoyo, enseñanzas, paciencia, comprensión y amistad que tuvo conmigo.

A la M.C. Mayra J. Esparza Araiza por la guía, apoyo, enseñanzas, paciencia, comprensión y amistad que tuvo conmigo.

A la Q.F.B. Elvira Hernández Elvira por su apoyo, enseñanzas y sobre todo paciencia.

A la Q.F.B. Rosalba Castillo por todo su apoyo, disponibilidad y enseñanzas que tuvo conmigo.

A la M.C. Ana Luz Romero García por su apoyo técnico en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (IPICYT) Tere, Lucy, Mayra, Anita, Benita, Hugo, Karla, Lula, por su apoyo, comprensión y amistad. Al personal técnico del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas: Rosy Castillo, Doña Rosy, Salvador Ambriz, por su apoyo. Y al personal técnico del LANBAMA: Verónica Zarate y Eivira Hernández Rico.

Y a mis amigos del IPICYT: Tere, Paty, Cinthia, Ángel y Jazmín por hacer de mi estancia en San Luis Potosí una aventura muy agradable y divertida, al compartir los buenos y malos momentos.

DEDICATORIAS:

A Dios por haberme permitido vivir y aprender de esta etapa de mi vida y llenarme de tantas bendiciones.

A mi Mamá, la Sra. Vilma Aguilar Rivera, por todo su apoyo incondicional, entrega y amor para conmigo, porque siempre está ahí cuando la necesito; sin todo ello no sería posible mi avance profesional y personal. Te amo mamá!!!

A mi Tío Noé Aguilar Rivera, por todos los consejos de vida, por esos tips profesionales y personales y porque siempre puedo contar contigo. Te amo mucho!!!

A Héctor Fernando Cabrera Barragán, porque sin tu apoyo, amor y comprensión no habría podido mantenerme fuerte ante situaciones difíciles durante esta etapa de mi vida. Gracias por tu amor que siempre ha estado presente en mí, en especial por que la distancia nos hizo comprender muchas cosas, apreciar otras y crecer como personas. Te amo!!!

A la familia Cabrera Barragán: Don Sergio Cabrera Miranda, Rosa María Barragán de Cabrera y Marilyn Cabrera Barragán; porque siempre están ahí apoyándome, dándome su cariño y por estar al pendiente de mí en todo momento, y considerarme parte de la familia. Los amoooo!!!

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales, porque realizar una maestría no es de un solo estudiante, sino también de aquellas personas que nos ayudan y apoyan en nuestras dudas o preguntas por muy simples que sean, por ese tiempo que me dieron, por aquellas alegrías, y las tristezas y por toda esa convivencia.

Los quiero!!!

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I.....	9
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	9
1.1.1 Importancia de la citricultura.....	10
1.1.2 Importancia Mundial.....	11
1.1.3 Importancia Nacional	11
1.1.4 Importancia de la Naranja dulce (<i>Citrus sinensis</i>).....	12
1.1.5 Problemática de la producción de cítricos.....	14
1.1.6 Biotecnología aplicada a cítricos	16
1.1.7 Mecanismos moleculares de resistencia a patógenos en las plantas.....	17
1.1.9 Factores de Transcripción (FT) y su función en la resistencia a patógenos	22
1.1.11 Factores de Transcripción (FT) WRKY	24
1.1.12 Estructura y clasificación de los Factores de Transcripción WRKY	25
1.1.13 Origen de los Genes WRKY: su origen en Eucariotas y su expansión en plantas	30
1.1.14 Función de los Factores de Transcripción (FT) WRKY en la resistencia contra patógenos.....	32
1.1.15 AtWRKY18	36
1.2 HIPÓTESIS.....	39
1.3 OBJETIVOS.....	39
1.3.1 Objetivo General	39

1.3.2 Objetivos Específicos.....	39
1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	40
1.5 BIBLIOGRAFÍA.....	41
CAPÍTULO II.....	47
CARACTERIZACIÓN <i>IN SILICO</i> DE UN HOMÓLOGO A <i>AtWRKY18</i> EN <i>C. sinensis</i>	47
2.1 INTRODUCCIÓN.....	47
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
2.2.1 Aislamiento <i>in silico</i> de una secuencia homóloga a <i>AtWRKY18</i> en <i>Citrus sinensis</i>	50
2.2.2 Obtención de marcos de lectura abierto y diseño de oligonucleótidos.....	50
2.2.3 Alineamiento múltiple de secuencias.....	51
2.2.4 Análisis filogenético.....	51
2.2.5 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de la secuencia CsWRKY18 de <i>Citrus sinensis</i>	52
2.3 RESULTADOS.....	53
2.3.1 Identificación de una secuencia homóloga a <i>AtWRKY18</i> en <i>Citrus sinensis</i>	53
2.3.2 Obtención de marco de lectura abierto y diseño de oligonucleótidos.....	54
2.3.3 Alineamiento múltiple de secuencias de proteínas.....	56
2.3.4 Análisis filogenético.....	57
2.3.5 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de la secuencia CsWRKY18 de <i>Citrus sinensis</i>	58
2.4 DISCUSIÓN.....	59
2.5 BIBLIOGRAFÍA.....	62
CAPÍTULO III.....	69
Clonación del ADN complementario de un homólogo de <i>AtWRKY18</i> en <i>C. sinensis</i> y generación de una construcción de expresión para transformar a la planta modelo de tabaco.....	69
3.1 INTRODUCCIÓN.....	69
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
3.2.1. Material Vegetal.....	71

3.2.2 Extracción de ARN y ADN	71
3.2.3 Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría	72
3.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa utilizando como plantilla ADN genómico	72
3.2.5 Síntesis de ADN complementario.....	73
3.2.6 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) 74	
3.2.7 Clonación del ADNc de <i>CsWRKY18</i> en el vector pGEM-TEasy	75
3.2.8 Secuenciación.....	76
3.2.9 Transformación de <i>Escherichia coli</i> con los plásmidos pCAMBIA 2200::35S::NOS y pGEMTEasy::CsWRKY18	77
3.2.10 Extracción del plásmido.....	77
3.2.11 Digestión de los plásmidos con enzimas de restricción <i>SacI</i> y <i>SalI</i>	77
3.2.12 Purificación de la banda de <i>CsWRKY18</i>	78
3.2.13 Ligación del ADNc de <i>CsWRKY18</i> a pCAMBIA 2200::35S::NOS	78
3.2.14 Transformación de <i>Escherichia coli</i> con la construcción (pCCsWRKY18) 79	
3.2.15 Doble digestión de (pCCsWRKY18) con las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i>	80
3.2.16 PCR para comprobar que las colonias se transformaron con la construcción (pCCsWRKY18)	80
3.2.17 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	80
3.2.18 PCR para la comprobación de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	81
3.2.19 Transformación de tabaco con pCCsWRKY18 mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	82
3.2.20 Extracción de ácidos nucleicos de tabaco	83
3.2.21 Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría	84
3.2.22 Detección por PCR de la presencia del transgén <i>CsWRKY18</i> en plantas de tabaco transformadas con el plásmido pCCsWRKY18.....	84
3.3 RESULTADOS.....	85
3.3.1 Extracción de ARN y ADN	85
3.3.2 Amplificación por PCR de un homólogo de <i>AtWRKY18</i> en.....	85

<i>Citrus sinensis</i>	85
3.3.3 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) 86	
3.3.4 Clonación del gen <i>CsWRKY18</i> (ADNc) en el vector pGEM-TEasy.....	87
3.3.5 Secuenciación.....	88
3.3.6 Elaboración de la construcción pCAMBIA2200::35S:: <i>CsWRKY18</i> ::NOS	90
3.3.7 Verificación de la clonación del plásmido pCAMBIA2200::35S:: <i>CsWRKY18</i> ::NOS por análisis de restricción.	91
3.3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> conteniendo la construcción pCCsWRKY18	92
3.3.9 Transformación de tabaco con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> conteniendo la construcción pCCsWRKY18.....	93
3.3.10 Evaluación de la presencia del transgén en plantas de la generación T0 de tabaco.....	94
3.4 DISCUSIÓN	96
3.5 BIBLIOGRAFÍA.....	99
CAPÍTULO IV	103
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	103
4.1 CONCLUSIONES.....	103
4.2 PERSPECTIVAS	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Producción mundial de cítricos (FAO, 2008).	11
Figura 1. 2 Importancia de la citricultura en México (Fuente: IICA, 2010; Delgadillo-Villanueva, 2010). MDP: Millones De Pesos. MDD: Millones De Dólares.	12
Figura 1. 3 Producción mundial de <i>Citrus sinensis</i> (FAOSTAT, 2010).	13
Figura 1. 4 Superficie sembrada de <i>Citrus sinensis</i> en México (SAGARPA, 2008).	13
Figura 1. 5 Producción de <i>Citrus sinensis</i> en México (SAGARA, 2008).	14
Figura 1. 6 Situación actual de Huanglongbing (HLB) (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, 2011).	15
Figura 1. 7 Modelo de evolución de la resistencia a bacteriana en las plantas. a) Reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores tipo cinasas (RLRs), que generan una cascada de señalización de cinasas hasta activar Factores de Transcripción tipo WRKY, que activan la inmunidad dirigida por PAMPs; b) El patógeno desarrolla proteínas efectoras que suprimen la ruta de señalización por cinasas; c) El hospedero desarrolla proteínas R que reconocen los efectores y activan la respuesta inmune; d) Los efectores mutan y evaden el reconocimiento de las proteínas R para bloquear nuevamente la activación del sistema inmune de las plantas (Modificada de Bent y Mackey; 2007).	19
Figura 1. 8 Representación esquemática de las diferentes respuestas a patógenos de las plantas. La respuesta hipersensible genera necrosis en la zona afectada, seguido de la producción de ácido salicílico (SA) que es una molécula esencial para la activación del SAR para la producción de PR y finalmente ISR que es activada por microorganismos benéficos y que viaja a través del sistema vascular de la planta para activar de manera sistémica la inmunidad en la planta (Modificada de Pieterse <i>et al.</i> , 2009).	20
Figura 1. 9 Interacción entre las diferentes rutas de señalización reguladas por fitohormonas durante la respuesta de las plantas al ataque de patógenos. Se ha visto que patógenos como <i>Pseudomonas syringae</i> producen proteínas efectoras (Coronatina, HopI1 y AvrRpt2) que suprimen la respuesta de defensa de las plantas. Las rutas de señalización activadas por ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno	

representan los principales mecanismos bioquímicos para activar los genes de defensa. Las barras “ ” representan efectos negativos, mientras que las líneas punteadas con estrellas representan efectos positivos (Imagen tomada y modificada de Pieterse <i>et al.</i> , 2009).	22
Figura 1. 10 Clasificación de las proteínas WRKY, y su dominio altamente conservado (Eulgem <i>et al.</i> , 2000).	26
Figura 1. 11 Clasificación de miembros de la familia WRKY de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Eulgem <i>et al.</i> , 2000).	27
Figura 1. 12 Estructura de WRKY4-C (4 hojas beta plegadas) Yamasaki <i>et al.</i> , 2005. 28	
Figura 1. 13 Alineamiento de la secuencia del dominio WRKY de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Yamasaki <i>et al.</i> , 2005).	28
Figura 1. 14 Árbol filogenético del alineamiento de las secuencias del dominio WRKY de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ver figura anterior) (Yamasaki <i>et al.</i> , 2005).	29
Figura 1. 15 Estructura molecular de WRKY4-C (Yamasaki <i>et al.</i> , 2005).	30
Figura 1. 16 Genes WRKY del grupo I en eucariotas. (a) Representación esquemática de la proteína WRKY del grupo I y la deducción de las secuencias de aminoácidos de los dominios WRKY WRKY amino y carboxil-terminal de <i>Arabidopsis thaliana</i> (At), <i>Physcomitrella patens</i> (Pp), <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Cr), <i>Giardia lamblia</i> (Gl) y <i>Dictyostelium discoideum</i> (Dd). Los residuos de aminoácidos altamente conservados se remarcen en las cajas negras. Los asteriscos marcan las cisteínas e histidinas invariables, las cuales se requieren para formar el motivo dedo de zinc. Las flechas indican las posiciones de los intrones dentro del dominio WRKY de los genes respectivos. (b) La distribución de los genes está representada en una filogenia esquemática de los correspondientes grupos eucariotas. La distribución de los genes WRKY está representada en letras negras y en cajas color durazno (Ülker y Somssich, 2004).	32
Figura 1. 17 Sobre expresión de las construcciones <i>AtWRKY18</i> , donde se puede observar la construcción 35S-W18 (arriba) (la secuencia completa del ADNc <i>AtWRKY18</i> colocada entre el promotor y terminador del virus del mosaico de la coliflor 35S) y la construcción 35S-W18Δ (abajo) (la secuencia 3´no traducida de <i>AtWRKY18</i> es eliminada) (Chen y Chen, 2002).	37

Figura 1. 18 Sobreexpresión de <i>AtWRKY18</i> aumentan la resistencia a <i>Pseudomonas syringae</i> . Wt (Planta sin transformar); W18Δ-1 (Plantas transformadas con promotor 35S y sin el 3'UTR de <i>AtWRKY18</i>); W18-5; y W18-4 (dos líneas transgénicas transformadas con promotor y terminador 35S); (Chen y Chen, 2002).	37
Figura 1. 19 Expresión de genes <i>PR</i> en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que sobre-expresan a <i>AtWRKY18</i> (Chen y Chen, 2002).	38
Figura 2. 1 Identificación de un homólogo de <i>AtWRKY18</i> en el genoma de <i>C. sinensis</i> (Phytozome, 2011).	53
Figura 2. 2 Marco de lectura abierto de la secuencia <i>CsWRKY18</i>	55
Figura 2. 3 Alineamiento de la secuencia <i>CsWRKY18</i> con las secuencias de algunos WRKYs y algunas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Alineamiento clustal X en el que se muestran las similitudes que comparte la proteína <i>CsWRKY18</i> con otras proteínas WRKY. Se resalta el dominio WRKY y los residuos de cisteína (C) e histidina (H) correspondientes al motivo zinc-finger, los cuales hacen contacto con el ADN en las cajas W.	56
Figura 2. 4 Árbol filogenético de <i>CsWRKY18</i> con otras secuencias homólogas.	57
Figura 2. 5 Análisis de la estructura tridimensional del dominio WRKY. A) Estructura del dominio <i>WRKY4</i> descrita por Yamasaki <i>et al.</i> , 2005. B) y C) Estructura del dominio WRKY de la secuencia <i>CsWRKY18</i> , en ambas estructuras se pueden observar 4 estructuras β-plegadas y con la unión al ADN de residuos (Cisteína-Histidina) localizados en la cadena β-1 y β-4.	58
Figura 3. 1 Esquema del vector de clonación pGEM®-T Easy.	75
Figura 3. 2 Vector binario pCAMBIA2200. Este vector contiene el gen <i>nptII</i> que codifica la proteína neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico de kanamicina y el gen <i>cat</i> que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa que confiere resistencia a cloranfenicol. La expresión del gen <i>nptII</i> está regulada por el promotor constitutivo CaMV35S.	79
Figura 3. 3 Electroforesis de ARN y ADN del tejido de <i>C. sinensis</i> . La extracción de ARN y ADN se realizó mediante el protocolo LEIT PHYTOPURE ILUSTRA.	85
Figura 3. 4 Amplificación por PCR de la región codificante de un homólogo del gen <i>AtWRKY18</i> de <i>C. sinensis</i> utilizando ADN genómico como plantilla. Carril 1, amplicón	

obtenido (1,475 pb) con oligonucleótidos que flanquean el codón de inicio y término de la traducción de la secuencia de estudio, estos iniciadores también se utilizarán en ensayos de RT-PCR para amplificar el marco de lectura abierto completo del gen de estudio; Carril 2, amplicón obtenido (242 pb) con oligonucleótidos que flanquean un exón interno de la secuencia homóloga a AtWRKY18, estos iniciadores también se utilizarán en ensayos de RT-PCR cuantitativa. M, marcador de peso molecular 2-Log (New England Biolabs).....	86
Figura 3. 5 Reacción de RT-PCR utilizando ADNc como plantilla.....	87
Figura 3. 6 Fragmento purificado de CsWRKY18 a partir de ADNc (966 pb) con el High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) previo a la clonación.....	87
Figura 3. 7 Digestión de 4 clonas del vector pGEM-T Easy con la enzima de restricción EcoRI para liberar los insertos correspondientes a CsWRKY18 de ADNc (966pb). La banda de 3,015pb corresponde al vector pGEM-T Easy.....	88
Figura 3. 8 Alineamiento de la ORF predicha <i>in silico</i> (Phytozome) y del ADNc (este trabajo) de CsWRKY18.....	89
Figura 3. 9 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a las secuencias CsWRKY18 a partir de ADNc (778) y CsWRKY18 <i>in silico</i>	90
Figura 3. 10 Digestión de CsWRKY18 y pCAMBIA2200::35S::NOS con las enzimas de restricción ScaI y SalI.....	91
Figura 3. 11 Representación del cassette de expresión de CsWRKY18 con el promotor 35S y el terminador NOS con sus sitios de restricción.....	92
Figura 3. 12 Digestión con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. Donde se observan dos bandas correspondientes a las 2 colonias transformadas (corridas por duplicado) (Carriles 1-4) con la construcción (pCCsWRKY18)(~1824pb), y la banda correspondiente a pCAMBIA2200 (8894pb).....	92
Figura 3. 13 Gel de agarosa al 1% del PCR de colonia de <i>A. tumefaciens</i> . En el carril 1 y 2 se observa la banda correspondiente a la amplificación del gen CsWRKY18 con una banda esperada de 966 pb.....	93
Figura 3. 14 Transformación de tabaco con <i>A. tumefaciens</i> . A) Explantes transformados con el gen CsWRKY18 de 21 días de edad.....	94

Figura 3. 15 Controles de explantes sin transformar. A) Control de regeneración sin antibióticos. B) Control de regeneración con timentina (150mg/L). C) Control negativo con timentina (150mg/L) y kanamicina (100mg/L). 94

Figura 3. 16 Análisis de PCR de las siete líneas transgénicas de la T0 de tabaco. Utilizando a la WT como control negativo de la transformación. 95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. 1 Factores de transcripción asociados con la defensa a patógenos en *Arabidopsis thaliana* (Eulgem, 2005). 24

Cuadro 1. 2 Genes WRKY que se inducen en respuesta a diferentes inductores. At *Arabidopsis thaliana*, Bn *Brassica napus*, Ca *Capsicum annum*, Fa *Fragaria x ananassa*, Hv *Hordeum vulgare*, Lp *Lycopersicon peruvianum*, Lt *Larrea tridentate*, Na *Nicotiana attenuata*, Os *Oryza sativa*, Osi *Oryza sativa indica*, Pc *Petroselinum crispum*, Pt *Populus tremula x Populus alba*, Sc *Solanum chacoense*, SUSIBA *sugar signalingin barley*, St *Solanum tuberosum*, Tc *Thlaspi caerulescens,tobacco (Nicotiana tabacum)*, TIZZ TMV-induced leucine zipper zinc-finger, Vv *Vitis vinifera*, WIZZ wound-induced leucine zipper zinc finger (Agarwal et al., 2011). 33

Cuadro 2. 1 Resultados de la búsqueda de la secuencia homóloga a *AtWRKY18* en el genoma de *C. sinensis*. Utilizando la base de datos Phytozome. Se reporta el primer resultado. 53

Cuadro 3. 1 Amplificación de ADNg de *CsWRKY18*. 72

Cuadro 3. 2 Mix: Mezcla de reacción para amplificación del ADN. 73

Cuadro 3. 3 Amplificación de ADNc en el gen homólogo *CsWRKY18*. 74

Cuadro 3. 4 Medios de cultivo para la transformación de tabaco con *A. tumefaciens* (Clemente, 2006). 83

RESUMEN

La citricultura representa una actividad agrícola de suma importancia a nivel mundial por su importancia económica de producción, alto valor nutricional, importación y exportación a gran escala y la generación de millones empleos. La naranja dulce (*Citrus sinensis*) representa al cítrico más importante en cuanto a su producción, comercialización, importación y exportación y valor nutricional. México es el cuarto productor a nivel mundial de cítricos y el quinto lugar en producción de naranja dulce. La citricultura se ve amenazada por enfermedades ocasionadas por fitopatógenos que ponen en peligro la producción del cultivo. Las enfermedades más devastadoras que atacan a los cítricos son la cancrrosis de los cítricos, causada por la bacteria *Xanthomonas citri*, y el Huanglongbing (HLB). La disponibilidad pública de la secuencia genómica de la naranja dulce nos brinda la oportunidad de estudiar los genes involucrados en la resistencia a enfermedades y la oportunidad de mejorar genéticamente a este cultivo. Dentro de los genes involucrados en la resistencia de la planta, se encuentran los factores de transcripción (FT) de la familia WRKY, los cuales juegan un papel muy importante en regular la expresión de genes de defensa. El gen *AtWRKY18* de *Arabidopsis thaliana* funciona como un regulador positivo de la expresión de genes de defensa y su sobre-expresión en *Arabidopsis* conduce al aumento en la tolerancia contra la bacteria *Pseudomonas syringae*. El objetivo de la presente tesis fue clonar y caracterizar el ADN complementario de un homólogo del gen *AtWRKY18* de *A. thaliana* en el genoma de *C. sinensis*. Así como elaborar una construcción de expresión para transformar a la planta modelo tabaco con la finalidad de evaluar la función de este gen en la resistencia a patógenos en trabajos posteriores. Mediante la utilización de la secuencia *AtWRKY18* de *Arabidopsis* se logró aislar una secuencia homóloga en el genoma secuenciado de *C. sinensis*, la cual nombramos como *CsWRKY18*. El análisis estructural y filogenético de esta secuencia mostró que pertenece a la clase IIa de la familia WRKY. En base a esta secuencia se diseñaron oligonucleótidos específicos para aislar por RT-PCR el correspondiente marco de lectura abierto completo del ADN complementario. Esta secuencia se clonó en un vector de expresión y con dicha construcción se transformaron explantes de hoja de tabaco. Posteriormente se evaluó por PCR la presencia del transgén en la generación T0 de las plantas transgénicas. Los resultados de este trabajo abren la posibilidad de generar resistencia a las enfermedades de origen bacteriano que más afectan al cultivo de la naranja dulce.

ABSTRACT

Sweet orange (*Citrus sinensis*) fruit is highly popular worldwide and commercially cultivated for its flavor and nutritional value. Mexico is the fifth largest producer of sweet orange in the world. The citrus agroindustry is greatly affected by diseases caused pathogens that reduce production, eventually causing death of the infected trees, with substantial economic impact. Today, the most devastating diseases of sweet orange and other Citrus cultivars are citrus canker and Huanglongbing (HLB) caused by the bacteria *Xanthomonas citri* and *Candidatus Liberibacter*, respectively.

The public availability of the complete genome sequence of sweet orange (www.phytozome.org) offers for the first time the opportunity to study its entire set of genes involved in disease resistance and also the opportunity to genetically improve this crop. Among the genes involved in disease resistance, the transcription factors (TF) play a crucial role in the positive and negative regulation of defense gene expression. Although discovered relatively recently, the WRKY TFs are becoming one of the best-characterized classes of plant TFs. Previous studies have demonstrated that WRKY TFs participate in various biotic stress responses. The *AtWRKY18* gene of *A. thaliana* serves as a positive regulator of pathogenesis related (PR) genes involved in disease resistance. Overexpression of *AtWRKY18* in *Arabidopsis* enhances disease resistance against that bacterium *Pseudomonas syringae*. Therefore this gene represents an interesting candidate to develop bacterial resistance in citrus. The aim of this study was to isolate and characterize the cDNA of an *AtWRKY18* homologue in *Citrus sinensis* and to transform tobacco with an expression cassette harboring this cDNA in order to perform functional analyses in future studies. By using a combination of bioinformatic analysis and RT-PCR, we isolate the full open reading frame of an *AtWRKY18* homologue from *Citrus sinensis* that we named as *CsWRKY18*. The structural and phylogenetic analyses showed that this sequence belongs to the class IIa of the WRKY family. The *CsWRKY18* cDNA sequence was cloned in the expression vector pCAMBIA2200 and the final construct was used to transform tobacco leaf explants. The presence of the transgene was detected by PCR in seven tobacco plants of the generation T0. The results of this research open the possibility to gain insights into the role of *CsWRKY18* in bacterial resistance and also to generating resistance to the most devastating bacterial diseases of sweet orange.

INTRODUCCIÓN

Los cítricos forman parte de los cultivos tropicales más importantes a nivel mundial. Su cultivo genera miles de empleos que benefician a millones de personas. La importación y exportación de la fruta es a gran escala a nivel mundial y su importancia en el mercado por su valor nutricional es altamente apreciado (SAGARPA, 2011).

Los cítricos representan el 22% de la producción mundial de frutas y los países del hemisferio norte, son los principales productores y consumidores, con una producción mundial del 70 al 80%; el resto se produce y se consume en el hemisferio sur. México es considerado el cuarto productor de cítricos en el mundo; cuenta con aproximadamente 549 mil hectáreas de cítricos distribuidas en 23 estados del territorio nacional que producen 7 millones de toneladas anuales con un valor superior a los 10.206 millones de pesos, en beneficio de 67 mil productores. Esta actividad genera 70 mil empleos directos y unos 250 mil indirectos (SIAP, 2006; Alemán *et al*; 2007; Trujillo *et al*; 2008; FAO, 2008; Dirección General de Fomento a la Agricultura, 2009; IICA, 2010; Delgadillo, 2010; SAGARPA, 2010). La naranja dulce (*Citrus sinensis*) representa al cítrico más importante en cuanto a la producción, comercialización, importación, exportación y valor nutricional. La naranja representa el 75 % total de cítricos en todo el mundo en cuanto a producción de frutas. México es el cuarto productor a nivel mundial de cítricos y el quinto lugar en producción de naranja dulce (FAOSTAT, 2010; FAO, 2011; Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, SAGARPA, 2011). Al igual que otros cultivos, los cítricos son susceptibles al ataque de patógenos, los cuales generan enfermedades de difícil control, tal es el caso de la cancrrosis de los cítricos causada por *Xanthomonas citri* y el Huanglongbing (HLB) (Knighten *et al*; 2005; Polek *et al*; 2007), que es causada por bacterias del género *Candidatus Liberibacter* (Hocquellet *et al*; 1999; Sechler *et al*; 2009; Sánchez, 2010; Delgadillo, 2010). El HLB es considerada, con toda razón, como la enfermedad más devastadora de los cítricos, pero puede añadirse también que es la más mimética, ya que se confunde con deficiencias minerales (Knighten *et al*; 2005; Polek *et al*; 2007), se dispersa con mucha rapidez antes de mostrar síntomas masivos y destruye totalmente las plantaciones en períodos cortos de tiempo (Floyd y Krass, 2006; García, 2007; Robles, 2008; Delgadillo, 2010). Dicha enfermedad es responsable de millones de pérdidas de la producción a nivel mundial, y el impacto para México podría ser devastador debido a la importancia de la citricultura en la agricultura nacional.

Las plantas se defienden del ataque de patógenos utilizando mecanismos de defensa tanto físicos como bioquímicos, los cuales pueden ser constitutivos o inducibles. Estas defensas permiten que la planta resista el ataque de patógenos y como consecuencia pueda sobrevivir. Cuando estos mecanismos de defensa fallan, el patógeno es capaz de infectar, colonizar y reproducirse en la planta ocasionando los síntomas de una enfermedad (Agrios, 2005). A nivel molecular, las plantas cuentan con dos tipos de inmunidad que les confiere resistencia a los patógenos, el primer tipo de inmunidad se le conoce como inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y que se abrevia como PTI (por sus siglas en inglés). En este tipo de inmunidad la célula de la planta detecta mediante receptores de membrana a moléculas del patógeno que presentan características muy conservadas como por ejemplo la proteína flagelina que está presente en los flagelos de muchos microbios. El reconocimiento de la flagelina por parte de los receptores de membrana propicia a que se active una cascada de señalización mediada por proteínas cinasas, lo que conduce a que se active el PTI. Por otro lado, los patógenos a través de la co-evolución con sus huéspedes han desarrollado proteínas conocidas como efectoras cuya función va a ser interferir algún punto de la cascada de señalización del PTI propiciando que no se active la maquinaria de defensa de la planta, haciendo que ésta se vuelva susceptible a dicho patógeno (Chisholm *et al*; 2006). Para contrarrestar esta respuesta del patógeno, la planta ha desarrollado otro tipo de inmunidad conocida como inmunidad activada por efectores ó ETI (por sus siglas en inglés), en la cual las proteínas efectoras del patógeno van a ser detectadas por proteínas de la planta conocidas como proteínas R (resistencia), este reconocimiento por parte de las proteínas R conduce a una de las respuestas de resistencia más extremas que usa la planta, la respuesta hipersensible, la cual es un tipo de muerte celular programada que ocurre en el sitio de invasión del patógeno que asegura la completa destrucción del mismo; esta respuesta es local, sin embargo, puede activar una segunda respuesta de resistencia conocida como resistencia sistémica adquirida o SAR (por sus siglas en inglés) la cual depende del incremento de la fitohormona ácido salicílico (SA) y del cofactor de transcripción NPR1 (Chisholm *et al*; 2006). El SAR es una respuesta de defensa que se propaga del sitio de ataque al resto de la planta haciendo que la planta quede inmune no solamente al patógeno que desencadenó dicha respuesta sino a otros patógenos potenciales, de tal forma esta resistencia es de amplio espectro. Para la activación de los genes de defensa del PTI y ETI es necesario la participación de factores de transcripción quienes van a ser responsables de regular la expresión de los genes de defensa, también conocidos

como PR (pathogenesis related). Existen varias familias de factores de transcripción involucrados en la defensa tal es el caso de los genes *ERF*, *TGA*, *MYB*, *Whirly* y *WRKY* (Eulgem, 2005). Los WRKY han recibido mucha atención en los últimos años debido a su participación preferencial hacia la resistencia al estrés biótico. Varios de los genes WRKY funcionan como reguladores positivos o negativos de la expresión de genes de defensa. Entre los WRKY que funcionan como reguladores positivos se encuentran el gen *AtWRKY18* de *Arabidopsis thaliana*, cuya expresión se induce en respuesta a la acumulación de ácido salicílico y la actividad de NPR1 (Chen y Chen 2002; Eulgem y Somssich 2007; Wang *et al*; 2006). De manera interesante, la sobre-expresión de *AtWRKY18* en *Arabidopsis* conduce a un aumento en la tolerancia contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Chen y Chen 2002). Dicho descubrimiento hace que se estimule la búsqueda y caracterización de secuencias homólogas a WRKY en cultivo tropicales.

La reciente publicación de la secuencia genómica de la naranja dulce en la base de datos del Phytozome (www.phytozome.com) ofrece múltiples oportunidades para clonar y estudiar de manera sistemática a todos los genes involucrados en la resistencia al estrés biótico, incluidos los homólogos de genes WRKY, dicha investigación seguramente beneficiará el mejoramiento genético de este cultivo para desarrollar resistencia contra los patógenos que más afectan su producción.

El objetivo de la presente tesis fue clonar y caracterizar el ADN complementario de un homólogo del gen *AtWRKY18* de *A. thaliana* en el genoma de *C. sinensis*. Así como elaborar una construcción de expresión para transformar a la planta modelo tabaco con la finalidad de evaluar la función de este gen en la resistencia a patógenos.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático (Singh y Rajam, 2009). Desde entonces hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones debidas a la selección natural y a hibridaciones tanto naturales como producidas por el hombre. La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen se debió fundamentalmente a los grandes movimientos migratorios: conquistas de Alejandro Magno, expansión del Islam, cruzadas, descubrimiento de América, etc. (Plan Rector Sistema Nacional Cítricos, 2005).

Mutaciones espontáneas han dado origen a numerosas variedades de naranjas que actualmente conocemos (Singh y Rajam, 2009; SAGARPA, 2012).

Los cítricos son un cultivo de hojas perennes y muy sensibles a las fluctuaciones de temperatura. Requieren de temperaturas cálidas para el crecimiento y maduración de la fruta, lo cual conduce a la rápida cosecha. Requieren de abundante sol, de 6 a 7 horas, y una temperatura de 30 °C durante el día y 20 °C durante la noche para su crecimiento óptimo (SAGARPA, 2012). Los árboles de cítricos requieren de un rico y rápido drenaje de suelo franco arenosos con un pH de 6 a 7, y su crecimiento se ve afectado por la alcalinidad y salinidad en el suelo. Los árboles de cítricos no necesitan alta humedad, especialmente durante la temporada de floración, y el exceso de agua es perjudicial para su crecimiento, ya que induce el crecimiento de hongos y patógenos de la raíz. Al igual que el exceso de agua, las heladas de igual manera afectan el desarrollo óptimo de los cítricos, generalmente los cítricos no son resistentes a heladas (SAGARPA, 2012). Las limas y limones son especialmente sensibles al frío, mientras que los híbridos de cítricos como mandarinas, tangeros y naranja trifoliada son más resistentes al frío.

El nitrógeno es el elemento clave en los requerimientos nutricionales de los cítricos para asegurar el crecimiento sano de los árboles y los frutos, el cual debe estar presente en mayor cantidad en el suelo y/o fertilizantes. El nitrógeno es seguido por el magnesio y el calcio con rastros de zinc, magnesio y cobre (Singh y Rajam, 2009).

La fruta de los cítricos es de gran importancia comercial, ya que no solo se consume fresca, sino en jugo y mermeladas. La cáscaras de cítricos también tienen igual importancia y se utiliza como alimento para el ganado, en perfumerías, panaderías y en la industria de jabón (SAGARPA, 2012). Los aceites esenciales obtenidos a partir de hojas de cítricos son utilizados para la industria cosmética, perfumera e insecticida. El aceite de limón es ampliamente utilizado en ceras para muebles. De los cítricos se han obtenido sustancias de gran aplicación tecnológica como el ácido cítrico. Los cítricos también se han utilizado en la preparación de muchos medicamentos, más que otras plantas, y son efectivos en decenas de enfermedades que van desde el dolor de muelas, diarrea, estreñimiento, insomnio, vómitos hasta en la reducción de la presión arterial (Singh y Rajam, 2009).

1.1.1 Importancia de la citricultura

Los cítricos pertenecen al género *Citrus*, de la familia de las Rutáceas, comprende 40 géneros y 1,300 especies en todo el mundo, es uno de los cultivos tropicales más importantes en cuanto a economía por su gran producción anual, generación de empleos, importación y exportación y alto valor nutricional. Es un cultivo perenne de larga vida y se cultiva en más de 100 países de todo el mundo. El cultivo de cítricos se cree que originalmente se inició en China y el sureste asiático, donde se ha cultivado por más de 400 años (Singh y Rajam, 2009). En la actualidad, los cítricos son producidos en zonas subtropicales y tropicales, pero sus frutas son parte de la vida de cada día de millones de personas alrededor del mundo (Plan Rector Sistema Nacional Cítricos, 2005).

Los cítricos están estrechamente relacionados con otros géneros importantes de la familia Rutáceas - *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus* y *Eremocitrus*.

Las principales especies de cítricos en importancia económica son: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (naranja dulce), *C. reticulata* Blanco (mandarina), *C. paradisi* Mac. f. (pomelo), *C. limón* (L.) Burm.f. (limón), *C. aurantifolia* (Christm) Swing. (Lima), *C. aurantium* (L.) (Naranja agria) y *C. grandis* (L.) Osbeck (pomelo). Entre los principales híbridos de los cítricos tenemos: Citrange (naranja trifoliada X naranja dulce), citrumelo (naranja trifoliada X pomelo), Tángor (naranja dulce X mandarina) y tangelo (mandarina X pomelo). La naranja dulce (*Citrus sinensis*) representa por sí sola el 75% total de cítricos en todo el mundo en cuanto a producción de frutas, seguido de la mandarina, el pomelo y el limón (Singh y Rajam, 2009).

1.1.2 Importancia Mundial

A nivel mundial el cultivo de los cítricos es una actividad agrícola sumamente apreciada por la importancia económica de producción que representa, alto valor nutricional, importación y exportación a gran escala y la generación de millones de empleos que se genera de esta actividad. Los cítricos representan el 22% de la producción mundial de frutas y los países del hemisferio norte son los principales productores y consumidores, con un intervalo de 70 al 80% de la producción mundial, el resto se produce y se consume en el hemisferio sur. El principal productor a nivel mundial es china con un 25% de la producción total, seguido en orden decreciente, Brasil con el 22% de la producción, EEUU con el 16% de la producción, y México en el cuarto lugar con el 9% de la producción total mundial (**Figura 1.1**) (FAO, 2008).

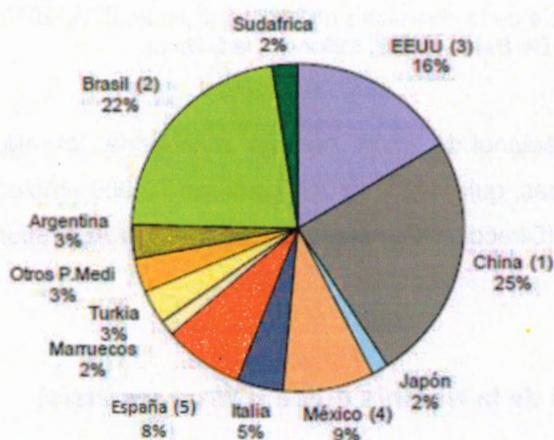


Figura 1. 1 Producción mundial de cítricos (FAO, 2008).

1.1.3 Importancia Nacional

En México se cultivan alrededor de 549 mil ha de cítricos (**Figura 1.2**) con una producción de siete millones de toneladas de fruta (naranjas, limones, mandarinas y toronjas) por año (Ruíz *et al*; 2005; Trujillo *et al*; 2008; IICA, 2010; Delgadillo, 2010). México ocupa el 4o lugar en producción de cítricos a nivel mundial, la superficie cultivada con cítricos está distribuida en 23 Entidades Federativas, con un valor de la producción superior a 10,206 millones de pesos (SIAP, 2006; IICA, 2010; Delgadillo, 2010). Es una actividad redituable desde el punto de vista económico, ecológico y social.

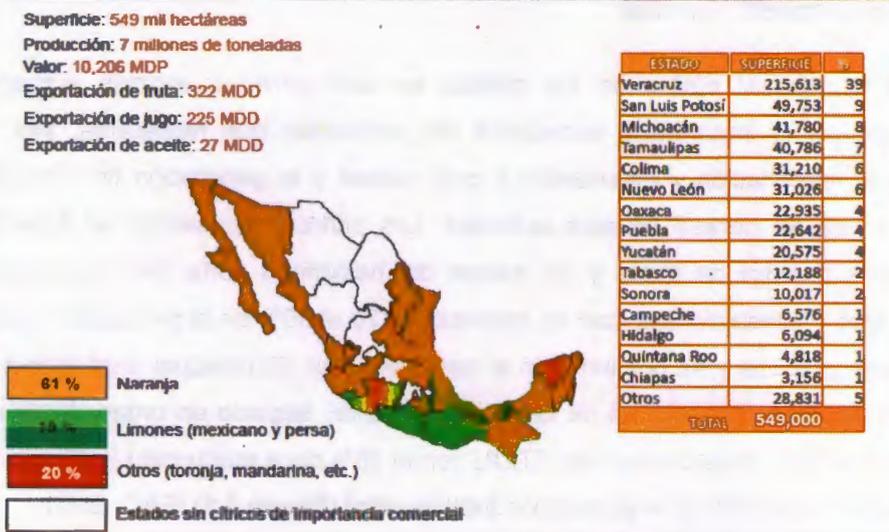


Figura 1. 2 Importancia de la citricultura en México (Fuente: IICA, 2010; Delgadillo-Villanueva, 2010). MDP: Millones De Pesos. MDD: Millones De Dólares.

En la producción nacional de limón, naranja, mandarina, toronja y lima participan 67 mil familias mexicanas, quienes, a su vez, generan 70,000 empleos directos y 250,000 empleos indirectos (Dirección General de Fomento a la Agricultura, 2009; SAGARPA, 2010).

1.1.4 Importancia de la Naranja dulce (*Citrus sinensis*)

Dentro de las especies de cítricos la más importante a nivel mundial es la naranja, seguida por las mandarinas y tangerinas, para proseguir con los limones y limas y, finalmente, las toronjas y pomelos. La naranja es sin duda una de las frutas más demandadas a nivel mundial, gracias a sus propiedades tanto en su consumo en fresco como para la elaboración de jugo y otros productos derivados. Sus características nutricionales ayudan al fortalecimiento de las defensas del organismo, debido a su contenido de vitaminas C, B1, B2, B3, B5, B6 y E; sales minerales, ácidos orgánicos, pectina, componentes que fortalecen a la circulación y propiedades anticancerígenas. La cáscara y la flor se utilizan para la elaboración de medicina naturista para la bronquitis (Plan Rector Sistema Nacional Cítricos, 2005).

A nivel mundial México ocupa el quinto lugar en producción de naranja dulce (Figura 1.3) con una producción mayor de los 4 millones de toneladas (Figura 1.3) (FAOSTAT, 2010; FAO, 2011; Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, SAGARPA; 2011).

Posición	Región	Producción (1000\$ Int)	Producción (T)
1	Brasil	3693604	19112300
2	Estados Unidos de América	1445343	7478830
3	India	1211360	6266100
4	China	966925	5003289
5	México	783009	4051630
6	España	602964	3120000
7	Egipto	464016	2401020
8	Italia	462593	2393660
9	Indonesia	392829	2032670
10	Turquía	330567	1710500
11	Pakistán	296023	1542100
12	Irán (República Islámica del)	290431	1502820
13	Sudáfrica	273477	1415090
14	Marruecos	164114	849197
15	Argentina	161077	833486
16	Grecia	148808	770000
17	Argelia	143010	740000
18	Viet Nam	140962	729400
19	República Árabe Siria	129270	668900
20	Ghana	107470	556100

Figura 1. 3 Producción mundial de Citrus sinensis (FAOSTAT, 2010).

A nivel nacional, los estados con mayor superficie sembrada de naranja son, en orden de importancia, Veracruz con el 44.3% seguido de San Luis Potosí con el 12.6% y en tercer lugar Tamaulipas con el 9.9% (Figura 1.4) (SAGARPA, 2008; Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados, 2011).

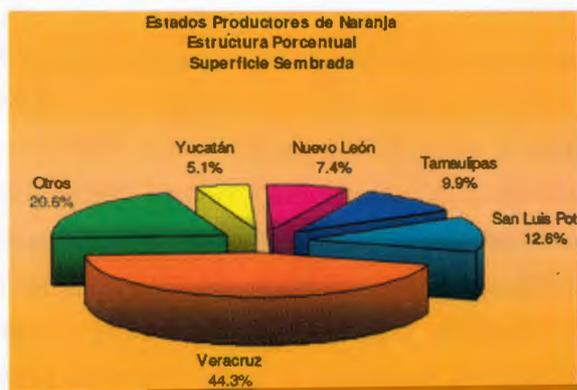


Figura 1. 4 Superficie sembrada de Citrus sinensis en México (SAGARPA, 2008).

Los principales estados productores de naranja dulce en cuanto al volumen son en orden de importancia: Veracruz con un volumen promedio durante el periodo de 1.9 millones de toneladas que representa una participación del casi el 50% de la producción nacional, San Luis Potosí con 11.5% y Tamaulipas con 8.5% (Figura 1.5) (SAGARPA, 2008).



Figura 1. 5 Producción de *Citrus sinensis* en México (SAGARA, 2008).

1.1.5 Problemática de la producción de cítricos

El cultivo de los cítricos se ve amenazado por plagas y enfermedades que afectan de manera negativa su producción y comercialización. Dentro de las enfermedades más devastadoras que afectan a los cítricos se encuentran la cancrrosis de los cítricos, causada por la bacteria *Xanthomonas citri* y el Huanglonbing (HLB) causada por la bacteria Gram negativa *Candidatus Liberibacter spp* (Hocquellet *et al*; 1999; Knighten *et al*; 2005; Polek *et al*; 2007; Sechler *et al*; 2009; Sánchez, 2010; Delgadillo, 2010).

El HLB es considerada como una de las peores enfermedades que afectan a los cítricos en el mundo debido a la gravedad de los síntomas, y la rapidez con la que se propaga la enfermedad, y además, porque todas las especies y variedades son susceptibles (Floyd y Krass, 2006; García, 2007; Robles, 2008). El HLB ha ocasionado la muerte de millones de árboles de cítricos en diversas regiones del mundo: Asia 53 millones, África 10 millones, Brasil 3 millones, y EUA 450 mil (Da Graça, 2008; Briansky *et al.*, 2007, Civerolo, 2009; Delgadillo, 2010). México cuenta con aproximadamente 158 millones de árboles de cítricos, los cuales están en riesgo. Esta enfermedad representa una amenaza seria, debido a que puede afectar gravemente las 526 mil ha. Establecidas con cítricos, distribuidas en 23 Entidades Federativas, lo que representa una producción de 6.7 millones de toneladas anuales, con un valor de \$8,050 millones de pesos (SIAP, 2006). Si este problema fitosanitario continúa se espera que la producción nacional perdería un millón de toneladas (14%), al año de establecido el patógeno, 1.7 millones (24%) a los tres años y 2.7 millones (38%) a los 5 años. En cuanto al empleo, se perderían 12.2 millones de jornales a los 3 años de establecido el patógeno y 19.3 millones a los 5 años. Con respecto a la materia prima para la agroindustria, se reduciría de 5.95 a 3.18 millones de toneladas de cítricos

dulces (naranja, mandarina y toronja) a los 5 años de establecido el patógeno. En cuanto a la generación de divisas, los cítricos dulces dejarían de ingresar divisas hasta por 106 millones de dólares y los cítricos agrios hasta por 51 millones, a los 5 años de establecido el patógeno (IICA, 2010).

En agosto de 2011 se realizó la exploración y monitoreo preventivo en 20 estados citrícolas del país; de los cuales ocho presentaron casos positivos a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Jalisco, Nayarit, Sinaloa y Yucatán); obteniendo para este mes un acumulado de 10 estados con presencia de esta enfermedad (**Figura 1.6**). La exploración se realizó en 97 municipios de los cuales 28 cuentan con detecciones, de estas detecciones 22 municipios son en material vegetal y 13 en psílidos infectivos distribuidos en huertas comerciales y áreas urbanas (traspacios) obteniéndose para el mes de agosto de 2011 un acumulado al mes de 135 municipios (Tapia, 2009; Norma Oficial Mexicana de Emergencia, 2009; Civerolo, 2009; Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, 2011).



Figura 1. 6 Situación actual de Huanglongbing (HLB) (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, 2011).

Dichas enfermedades han sido combatidas combinando varias estrategias, como los son el control del vector; en el caso del HLB, con bactericidas a base de cobre, capacitación y barreras aéreas; pero el uso de bactericidas a largo plazo puede ser más perjudicial que beneficioso, ya que puede afectar al suelo. Actualmente las alternativas de control no han sido suficientes y se ha empezado a buscar nuevas

alternativas de control (a nivel molecular) a dichas enfermedades (Bransky *et al*; 2007, Da Graça 2008; Civerolo, 2009; Delgadillo, 2010).

1.1.6 Biotecnología aplicada a cítricos

La biotecnología es una actividad multidisciplinaria de investigación científica que permite el estudio y la manipulación de sistemas biológicos con la finalidad de facilitar la solución a problemas biológicos (Campbell *et al*; 2002; Gurr y Rushton, 2005). La manipulación genética de los cultivares de cítricos a través de técnicas convencionales es siempre una tarea difícil para los fitomejoradores, ya que presentan varias limitaciones biológicas como un largo período juvenil, alta heterocigosidad, la incompatibilidad sexual, poliembriónia y gran tamaño de las plantas que dificultan enormemente el mejoramiento genético. Es por ello que se han realizado varios intentos para mejorar los cítricos mediante el uso de diversas técnicas de cultivo *in vitro*. Los cítricos son ampliamente conocidos por su obstinación a la transformación y el enraizamiento posterior, esto podría deberse a las diferentes respuestas fisiológicas de los diferentes genotipos de las técnicas de cultivo, pero la investigación constante ha llevado al establecimiento de protocolos mejorados para asegurar la producción de plantas transformadas de manera uniforme, aunque con una eficiencia relativamente baja, dependiendo del genotipo (Yu *et al*; 2002; Singh y Rajam, 2009).

Uno de los mayores avances biotecnológicos son Citrange Carrizo y lima Rangpur que son los patrones más utilizados en la actualidad debido a su gran vigor y vitalidad. Lima Rangpur es tolerante a la salinidad, a pHs altos y tolerante al Virus de la Tristeza en Cítricos (VTC), por lo que se utiliza en las zonas áridas e infestadas de VTC, mientras que Citrange Carrizo es tolerante a *Phytophthora* y se utiliza en áreas donde la podredumbre de raíz causada por *Phytophthora* es común (Yu *et al*; 2002; Singh y Rajam, 2009).

En la industria de cítricos de España y California, el 90% de los injertos se realizan utilizando como patrón citrange con el objetivo de aumentar la producción en las variedades de fruta de importancia comercial, tales como la naranja dulce, mandarina, pomelo, etc. El uso de citrange en cultivo de tejidos es muy beneficioso, ya que es uno de los genotipos más regenerables seguido por Swinglecitrumelo (Singh y Rajam, 2009). Las técnicas biotecnológicas disponibles, tales como cultivos de células y tejidos y la ingeniería genética pueden ayudar a resolver los problemas relacionados con la biología reproductiva de los cítricos, resistencia a enfermedades y adversidades

climáticas y de suelo (deficiencia y excesos nutricionales) (Yu *et al*; 2002; Singh y Rajam, 2009, SAGARPA, 2012).

Actualmente, la citricultura depende en gran medida de la disponibilidad de patrones, la mejora de su calidad, la alta productividad, la gran eficiencia en el combate de enfermedades y las diversas condiciones climáticas; los cuales son factores de primera necesidad para el éxito del cultivo; estos factores se pueden alcanzar a gran escala a través de la hibridación somática mediante el aumento de los porta injertos híbridos alotetraploide que combinan las características deseables de las diferentes especies. Mediante la producción de híbridos somáticos se enriquecen de gran manera el germoplasma de cítricos para su uso futuro (Singh y Rajam, 2009, SAGARPA, 2012). La crioconservación de los cultivares de importancia agronómica es la respuesta más prometedora para la conservación de germoplasma ante los peligros biológicos y climáticos. El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido realizar mapas de ligamiento del genoma de los cítricos y se dispone de marcadores de ADN asociados a caracteres de interés, pudiendo ser útiles en la realización de una selección temprana de la progenie con los caracteres deseados en programas de mejora clásica. De cualquier modo, el número de marcadores asociados a genes de interés sigue siendo aún muy escaso en citricultura (Singh y Rajam, 2009). Actualmente las investigaciones van dirigidas a la introducción de genes de posible interés agronómico en distintas especies de cítricos, como es el caso de la sobreexpresión del gen *NPR1* de *Arabidopsis* en cítricos que especie, el cual aumenta la resistencia a la cancrrosis de los cítricos (Zhang *et al*; 2010). Es importante señalar que el estandarizar protocolos de transformación y regeneración de alta eficiencia, es el punto clave para que la manipulación genética (incorporación de genes deseados en los genotipos) tenga éxito, de manera que se combatan los principales problemas a que se enfrentan los cítricos.

1.1.7 Mecanismos moleculares de resistencia a patógenos en las plantas

Los patógenos son responsables de gran parte de la disminución en la producción agrícola en el trópico y su combate se realiza básicamente mediante métodos químicos. Sin embargo, las plantas también son capaces de reaccionar y defenderse por sí solas, ya que están en contacto con un sin número de condiciones ambientales y deben manifestar adaptaciones para sobrevivir en condiciones de estrés y ataques por patógenos, utilizando una serie de mecanismos naturales (Madriz, 2002; Vallejo,

2010). Las plantas, como los animales han ido evolucionando y adquiriendo inmunidad para contrarrestar ataques por patógenos microbianos. Las plantas, a diferencia de los animales no poseen células especializadas para la protección contra patógenos invasores. En lugar de eso, cada célula de la planta debe ser capaz de percibir a los agentes patógenos y desarrollar una efectiva respuesta de defensa (Madriz, 2002; Martín 2011). El sistema inmune de las plantas se caracteriza por activar una respuesta basal contra patógenos, resultando del reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que se encuentran conservados en una extensa variedad de organismos que permite generar una respuesta de defensa de amplio espectro (Bent y Mackey; 2007; Vallejo. 2010). Los PAMPs también llamados elicitores, al ser reconocidos por moléculas receptoras del hospedero, desencadenan una cascada de señalización de proteínas cinasas que conllevan hacia la activación de genes de resistencia que permiten la llamada inmunidad activada por PAMPs (**Figura 1.7a**). Esta respuesta basal que permite la inmunidad es poco duradera, debido a que los microorganismos evolucionan rápidamente y desarrollan moléculas efectoras las cuales bloquean la activación de las proteínas de defensa y permiten al patógeno entrar a la célula hospedera desarrollando en el hospedero una susceptibilidad (**Figura 1.7b**). A la vez y como resultado de un proceso co-evolutivo, la planta desarrolla proteínas de resistencia (R), que reconocen directa o indirectamente a las moléculas efectoras de los microorganismos. Dichas proteínas generalmente cuentan con dominios de regiones ricas en leucina y de unión a nucleótidos (NB-LRR) que permiten la inmunidad activada por efectores (**Figura 1.7c**). Finalmente los microorganismos logran evadir a las proteínas R mediante cambios en sus proteínas efectoras, lo cual les permiten infectar nuevamente a la célula hospedera, generando así un ciclo co-evolutivo en el que la frecuencia de los genes R y de los genes efectoras cambian a través del tiempo en las poblaciones de hospederos y patógenos, respectivamente (**Figura 1.7d**) (Bent y Mackey; 2007).

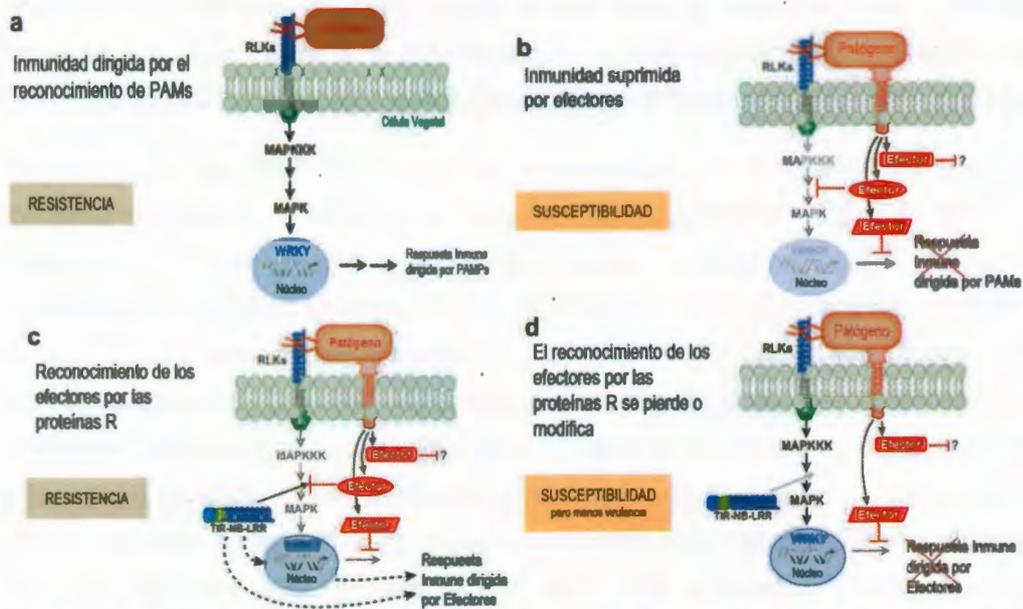


Figura 1. 7 Modelo de evolución de la resistencia a bacteriana en las plantas. **a)** Reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores tipo cinasas (RLRs), que generan una cascada de señalización de cinasas hasta activar Factores de Transcripción tipo WRKY, que activan la inmunidad dirigida por PAMPs; **b)** El patógeno desarrolla proteínas efectoras que suprimen la ruta de señalización por cinasas; **c)** El hospedero desarrolla proteínas R que reconocen los efectores y activan la respuesta inmune; **d)** Los efectores mutan y evaden el reconocimiento de las proteínas R para bloquear nuevamente la activación del sistema inmune de las plantas (Modificada de Bent y Mackey; 2007).

El genoma de cada planta codifica cientos de proteínas de resistencia (R), esto permite a la planta reconocer a un determinado patógeno quien genera moléculas conocidas como factores de avirulencia (avr) o efectores (Martin; 2011). Un gen llamado de avirulencia (avr), producto del patógeno, es reconocido directa o indirectamente por una planta por la producción de proteínas R. El reconocimiento mediado por las proteínas R desencadena una serie de respuestas celulares para combatir al patógeno. Este reconocimiento de R-avr entre plantas y patógenos frecuentemente desencadenan una respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés), la cual se caracteriza por una rápida muerte celular programada de la célula que ocurre en el sitio de infección y de las células vecinas; evitando de esta manera que se propague el microorganismo por toda la planta. Esta respuesta se caracteriza por ser de amplio espectro (defenderse contra varios tipos de microorganismos), permitiendo a la planta defenderse de patógenos fúngicos, bacterianos, virales o nematodos. La respuesta hipersensible está acompañada de la producción de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno, que participa tanto en la muerte del patógeno como el refuerzo de la pared celular a través de cambios

químicos, dicha molécula, al igual que el óxido nítrico que también es sintetizado durante la respuesta hipersensible, participa también en la señalización que en última instancia conduce a la resistencia a patógenos (Agiros, 2005; Martín, 2011).

Otro tipo de defensa es la respuesta conocida como SAR (por sus siglas en inglés *Systemic Acquired Resistance*). Los eventos que permiten la resistencia sistémica comienzan localmente debido a una HR en donde la producción de ácido salicílico (SA) aumenta activando la señalización de SAR (Pieterse *et al*; 2009). En las células más alejadas que no han sido infectadas, la primera reacción de defensa es la síntesis de proteínas de defensa (PR) que van a activar diferentes mecanismos de resistencia en la célula, por lo que es considerada de amplio espectro y larga duración (Camarena y Torre, 2007). Existe también un tipo de resistencia sistémica inducida que se va a desarrollar a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos principalmente rizobacterias. Este tipo de resistencia esta mediada por vías metabólicas sensible al ácido jasmónico y al etileno y son independientes de la expresión de genes PR y ácido salicílico (Pieterse *et al*; 2009) (Figura 1.8).

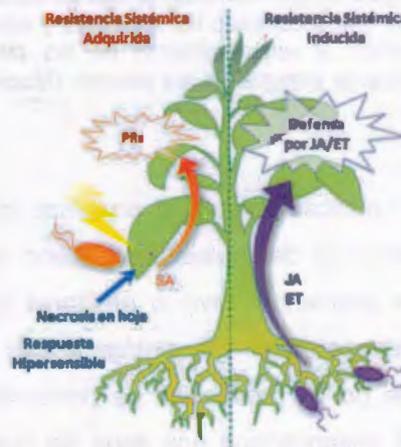


Figura 1. 8 Representación esquemática de las diferentes respuestas a patógenos de las plantas. La respuesta hipersensible genera necrosis en la zona afectada, seguido de la producción de ácido salicílico (SA) que es una molécula esencial para la activación del SAR para la producción de PR y finalmente ISR que es activada por microorganismos benéficos y que viaja a través del sistema vascular de la planta para activar de manera sistémica la inmunidad en la planta (Modificada de Pieterse *et al*; 2009).

1.1.8 Las rutas de señalización en los mecanismos de defensa de las plantas

Estudios de expresión genética en la activación de genes de defensa han demostrado que las plantas cuentan con una serie de mecanismos que les permiten defenderse de

manera eficiente del ataque de patógenos, como los son barreras físicas (producción de ceras, formación de capas corchosas y tildes), barreras químicas (producción de toxinas, metabolitos secundarios, inactivación de enzimas, obstrucción de nutrientes) y la activación de proteínas relacionadas con patogénesis PR (Agrios, 2005). La activación de las proteínas PR incrementan los niveles de hormonas de señalización como lo son el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Van Verk *et al*; 2009).

El SAR es un sistema de respuesta que se activa con el SA, esta fitohormona cambia el potencial redox del citoplasma permitiendo así la monomerización de NPR1 y facilitando su entrada hacia el núcleo donde interactúa con factores de transcripción TGA para incrementar los niveles de expresión de varios genes PR (Durrant y Dong, 2004). La HR permite la activación del SAR, sin embargo, esta respuesta solo es funcional para microorganismos biótrofos, y no en los necrótofos (Durrant y Dong, 2004). Para el caso de microorganismos necrótofos se activan dos rutas que actúan de manera sinergista (en cooperación) activando genes PR que codifican para las proteínas β -1,3- glucanasas (PR-2), quitinasas básicas (PR-3), proteínas tipo Hevein (PR-4) o bien los PDFs (por sus siglas en inglés: *Plant defensin*) que ayudan a las plantas a defenderse de microorganismos fúngicos. Dichas rutas, son activadas por señales de ET y JA actuando de manera antagónica (opuesta) a la ruta de SA, por lo que existen mecanismos de regulación que permiten la conexión entre ambas rutas (Figura 1.9) (Pieterse *et al*; 2009).

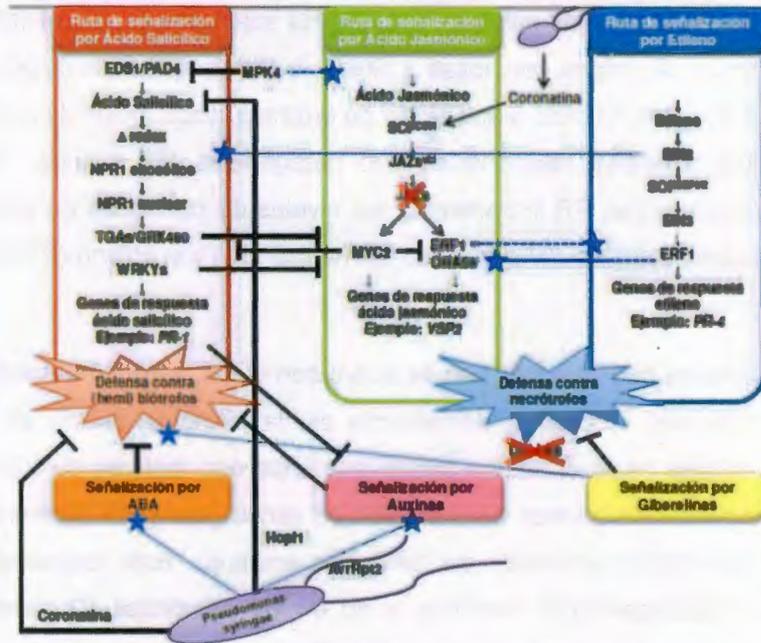


Figura 1. 9 Interacción entre las diferentes rutas de señalización reguladas por fitohormonas durante la respuesta de las plantas al ataque de patógenos. Se ha visto que patógenos como *Pseudomonas syringae* producen proteínas efectoras (Coronatina, HopI1 y AvrRpt2) que suprimen la respuesta de defensa de las plantas. Las rutas de señalización activadas por ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno representan los principales mecanismos bioquímicos para activar los genes de defensa. Las barras “-” representan efectos negativos, mientras que las líneas punteadas con estrellas representan efectos positivos (Imagen tomada y modificada de Pieterse *et al*; 2009).

1.1.9 Factores de Transcripción (FT) y su función en la resistencia a patógenos

Los Factores de transcripción (FT) son proteínas que tiene la capacidad de unirse al ADN, a otros FT o directamente a la ARN polimerasa. Son los principales reguladores de la expresión genética al ser activados por señales citoplasmáticas y están implicados en la activación y represión de la transcripción de los genes. En biotecnología, los FT son visualizados en el futuro como la principal herramienta para desarrollar nuevas variedades de plantas, ya que han jugado un papel muy importante en el origen de la domesticación de muchos cultivos de tal manera que los cambios en la expresión de diversos FT han marcado de manera considerable la generación de importantes características fenotípicas en diversos cultivos económicamente importantes (Century *et al*; 2008). En el genoma de las plantas hay genes de expresión constitutivos los cuales se expresan todo el tiempo, y genes de expresión inducible los cuales se expresan al responder a estímulos específicos externos. Estos genes de expresión dependen de la interacción de FT con elementos *cis* de las

regiones promotoras y/o interacción con otros FT con el objetivo de regular la expresión o represión de un gen determinado dando como resultado cambios en el fenotipo de la planta.

Las plantas continuamente se enfrentan a numerosos estreses abióticos y bióticos en su ambiente natural. La habilidad de las plantas para sobrevivir y adaptarse a cambios ambientales requiere de mecanismos bioquímicos y fisiológicos muy sofisticados. Cuando un estímulo externo es percibido por la célula, ésta produce una señal que se amplifica y transmite, promoviendo de esta forma que ocurran cambios bioquímicos para aliviar el estrés (Eulgem *et al*; 2000; Eulgem y Somssich 2007; Agarwal *et al*; 2011). Una red compleja de rutas de transducción de señales responsivas al estrés, convergen y divergen de manera cooperativa para combatir y generar tolerancia al estrés biótico y abiótico. Como muchos otros procesos biológicos complejos de la planta, las respuestas al estrés biótico y abiótico comprenden la regulación transcripcional de un gran número de genes (Eulgem *et al*; 2000; Eulgem y Somssich 2007; Agarwal *et al*; 2011). Varios de estos genes regulados diferencialmente codifican para enzimas involucradas en rutas del metabolismo primario y secundario, de tal forma la producción *de novo* o la acumulación de estas enzimas resulta en una reprogramación del metabolismo celular para que la planta pueda adaptarse a cambios de su entorno natural. Otros genes diferencialmente expresados codifican para proteínas regulatorias que están involucradas en la activación, supresión y modulación de varias rutas de señalización involucradas en responder al estrés en cuestión. Por lo tanto, la regulación transcripcional desempeña un papel crucial en la plasticidad fenotípica de las plantas para adaptarse a condiciones adversas y sobrevivir (Eulgem *et al*; 2000; Eulgem y Somssich 2007; Agarwal *et al*; 2011).

La regulación transcripcional de la expresión génica depende principalmente de cambios en el nivel o actividad de proteínas conocidas como factores de transcripción que se unen a secuencias específicas de ADN. La reprogramación transcripcional asociada a las respuestas al estrés biótico y abiótico requiere de la acción de una multitud de factores de transcripción. La secuencia genómica de la planta modelo *Arabidopsis* muestra la presencia 1,581 genes que codifican para factores de transcripción, 45% de los cuales parecen ser específicos de plantas. En el caso de arroz se han anotado 1,611 factores de transcripción (Agarwal *et al*; 2011). Los factores de transcripción trabajan en conjunto con otros componentes de la maquinaria de transcripción para modular la expresión de genes blanco de una manera temporal y espacial, lo cual es necesario para un desarrollo normal y una adecuada respuesta a

estímulos externos e internos. Los factores de transcripción identificados están clasificados de acuerdo a sus dominios de unión al ADN, como ejemplos tenemos a los factores de transcripción AP2/ERF, TGA, NAC, MYB, WHIRLY y WRKY (Eulgem *et al*; 2005) (Cuadro 1.1). Los cuales están implicados en la resistencia a enfermedades los cuales pueden responder a estímulos de patógenos por medio del reconocimiento de elicitores, o por medio de moléculas mensajeras como el ácido salicílico, ácido jasmónico o etileno, de manera que regulan la expresión de los genes PR (Eulgem, 2005).

Cuadro 1. 1 Factores de transcripción asociados con la defensa a patógenos en *Arabidopsis thaliana* (Eulgem, 2005).

Tipo de Factor de Transcripción	Tamaño de la familia en <i>Arabidopsis</i>	Características clave	Motivo consenso y sitios de unión	Función
ERF	56	Un dominio AP2/ERF de unión al ADN	GCCGCC (Caja GCC)	Subfamilia de los FT AP2; activadores y represores
R2R3 Myb	125	Dos repeticiones del dominio Myb	Tipo I: (T/C)AAC(T/G)G Tipo II: G(G/T)T(A/T)G(G/T)T	Subfamilia predominante de los factores Myb de plantas
TGA Bzip	10	Un dominio básico de unión al ADN; un motivo de dimerización de proteína cierre de leucina	TGACGTCA (Cajas TGA)	Subfamilia de bZIP's; activadores y represores
NPR1	6	Dominios repetidos Ankyrin; dominio BTB-POZ	Sin sitios de unión al ADN	Interacción con TGA-bZIP's
Whirly	3	Dominio Whirly	GTCAAAA/T	Forman homotetrámeros; se unen al ADN de cadena simple
WRKY	74	Uno o dos dominios de unión al ADN	TTGACC(T/C) (Caja W)	Activadores y represores

1.1.11 Factores de Transcripción (FT) WRKY

Las proteínas WRKY comprenden una familia importante de factores de transcripción que son esenciales en las respuestas de ácido salicílico y agentes patógenos de las plantas. Los FT WRKY tienen la capacidad de unirse a elementos cis de las regiones promotoras de genes PR contribuyendo a la activación o represión de estos genes. La acumulación de los FT WRKY es una característica general de defensa a patógenos. La mayoría de los FT WRKY de *Arabidopsis thaliana* exhiben un incremento en los niveles de transcripción, después de una infección por patógenos o tratamientos con elicitores. Su sobreexpresión o silenciamiento, afecta considerablemente la resistencia o susceptibilidad de la planta. Un gran número de factores de transcripción WRKY han

sido reportados en las secuencias genómicas de plantas, 74 en *Arabidopsis*, alrededor de 100 en arroz, 197 en soya, 66 en papaya, 68 en sorgo y 38 en el musgo *Physcomitrella patens*. Los FT WRKY han sido implicados en la regulación de procesos del desarrollo, tal es el caso del desarrollo de tricomas, desarrollo de la semilla y la senescencia de la hoja. Sin embargo, sus funciones principales parecen ser en la respuesta al estrés biótico y abiótico (Agarwal *et al*; 2011).

1.1.12 Estructura y clasificación de los Factores de Transcripción WRKY

El nombre de WRKY (triptófano W, arginina R, lisina K y tirosina Y) de esta familia de factores de transcripción se deriva del dominio de 60 aminoácidos que contiene al heptapéptido WRKYGDK en la orientación N-terminal y a un dedo de zinc en la orientación C-terminal del dominio. Ciertas cisteínas e histidinas conservadas en este dominio se unen a un átomo de zinc para formar una estructura de tipo dedo. Tanto el motivo WRKY como el dedo de zinc son requeridos para la correcta unión de la proteína al ADN (Eulgem *et al*; 2000).

Eulgem *et al.* (2000), basándose en el número de dominios WRKY y el patrón de los motivos de dedos de zinc clasificó a los factores WRKY en tres grupos. El grupo I presenta dos dominios WRKY, mientras que el grupo II presenta un solo dominio. De manera general, los dominios WRKY del grupo I y II tienen el mismo tipo de motivo de dedo de zinc (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H). El grupo II se divide en subgrupos (a-e) basados en motivos adicionales de aminoácidos presentes fuera del dominio WRKY. El motivo de dedo de zinc de un pequeño grupo de proteínas WRKY presenta la secuencia C-X₇-C-X₂₃-H-X₁-C, debido a esta particularidad a este grupo se le asignó el número III (Figura 1.10 y 1.11).

Grupo I

WRKY1	TLFDIVNDGYRWRKYQQKSVKGSFYPRSYTSSPG...	GVVKKHVERSSHDTKLLITTYEGKHNDMP
WRKY2	SDVDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCAPG...	GVVKKHVERASHDLKSVITTYEGKHNDVP
WRKY3	SEVDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTPD...	GVVKKHVERAATDPKAVITTYEGKHNDVP
WRKY4	SEVDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTPG...	GVVKKHVERAATDPKAVITTYEGKHNDVP
WRKY20	SEVDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTAHG...	GVVKKHVERASHDPKAVITTYEGKHNDVP
WRKY25	SDIDVLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTFG...	GVVKKHVERAADERAVLITTYEGKHNDIP
WRKY26	SDIDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTFG...	GVVKKHVERAFQDPKSVITTYEGKHNDIP
WRKY32	GDVVICGGGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTSAG...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY33	SDIDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTTIG...	GVVKKHVERASHDMRAVITTYEGKHNDVP
WRKY34	SDIDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTANG...	GVVKKHVERASDDPKSVITTYEGKHNDVP
WRKY44	VESDLEDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTSAN...	GVVKKHVERASDDPRAFITTYEGKHNDLL
WRKY45	SQVDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTEBG...	GVVKKHVERASDDGVVITTYEGKHNDVP
WRKY50	SEVDLDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTPN...	GVVKKHVERASTDAKAVITTYEGKHNDVP
WRKY10	SDEDNPNDDGYRWRKYQKQVVKGNPNRSTYKCTHIE...	GVVKKHVERGADNIKLVITTYEGKHNDSP

Grupo III

WRKY30	GVDRTLDDGFSWRKYQKQKILGAKFPRGYRQYRKSQ...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY41	QLEGGPHDDIFSWRKYQKQKILGAKFPRGYRQYRKSQ...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY46	QLEGGPHDDIFSWRKYQKQKILGAKFPRGYRQYRKSQ...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY53	GLEGGPHDDIFSWRKYQKQKILGAKFPRGYRQYRKSQ...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY54	VLEAKSSDDRYAWRKYQKQKILGAKFPRGYRQYRKSQ...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY55	NTDLPPDDHNTWRKYQKQKILGAKFPRGYRQYRKSQ...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY38	SPDFIYDGLWRKYQKQKILGAKFPRGYRQYRKSQ...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY52	IPAIDGDLMTWRKYQKQKILGAKFPRGYRQYRKSQ...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP

Grupo II

(a) WRKY18	DTSLTVKDDGFCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY40	KDGTQWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY60	VSSLTVKDDGFCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
(b) WRKY6	SEAPMISDCCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY9	CETATMIDCCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY31	SEAPMISDCCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY36	CHDPSINDCCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY42	SEAPMISDCCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY47	HKQHVNDCCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY61	NDCCWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
(c) WRKY8	TEVDHLEDGYRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY12	SDVDVLDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY13	SEVDVLDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY23	SEVDHLEDGYRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY24	SDDDVLDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY28	SEVDHLEDGYRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY43	SDADLDDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY48	KSIDMLDDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY49	NSNQCDDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY50	SEVEVLDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY51	DVMDGDFWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY56	SDDDVLDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY57	SDVDNLEDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY59	DEKVALDDGGRWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
(d) WRKY7	KMADIPDDEFSWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY11	KIADIPDDEFSWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY15	KMSDVPDDYSWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY17	KIADIPDDEFSWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY21	KVADIPDDEFSWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY39	KIADIPDDEFSWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
(e) WRKY14	BGEVVPDLWAWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY16	DRGSSDLDWAWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY22	AAEALNSDVAWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY27	TQENLSDLDWAWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY29	KHENLSDDAWAWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP
WRKY35	BGEVVPDLWAWRKYQKQKAVKNSPYPSTYKCTTQK...	GVVKKHVERASHDKAVITTYEGKHNDMP

Figura 1. 10 Clasificación de las proteínas WRKY, y su dominio altamente conservado (Eulgem et al; 2000).

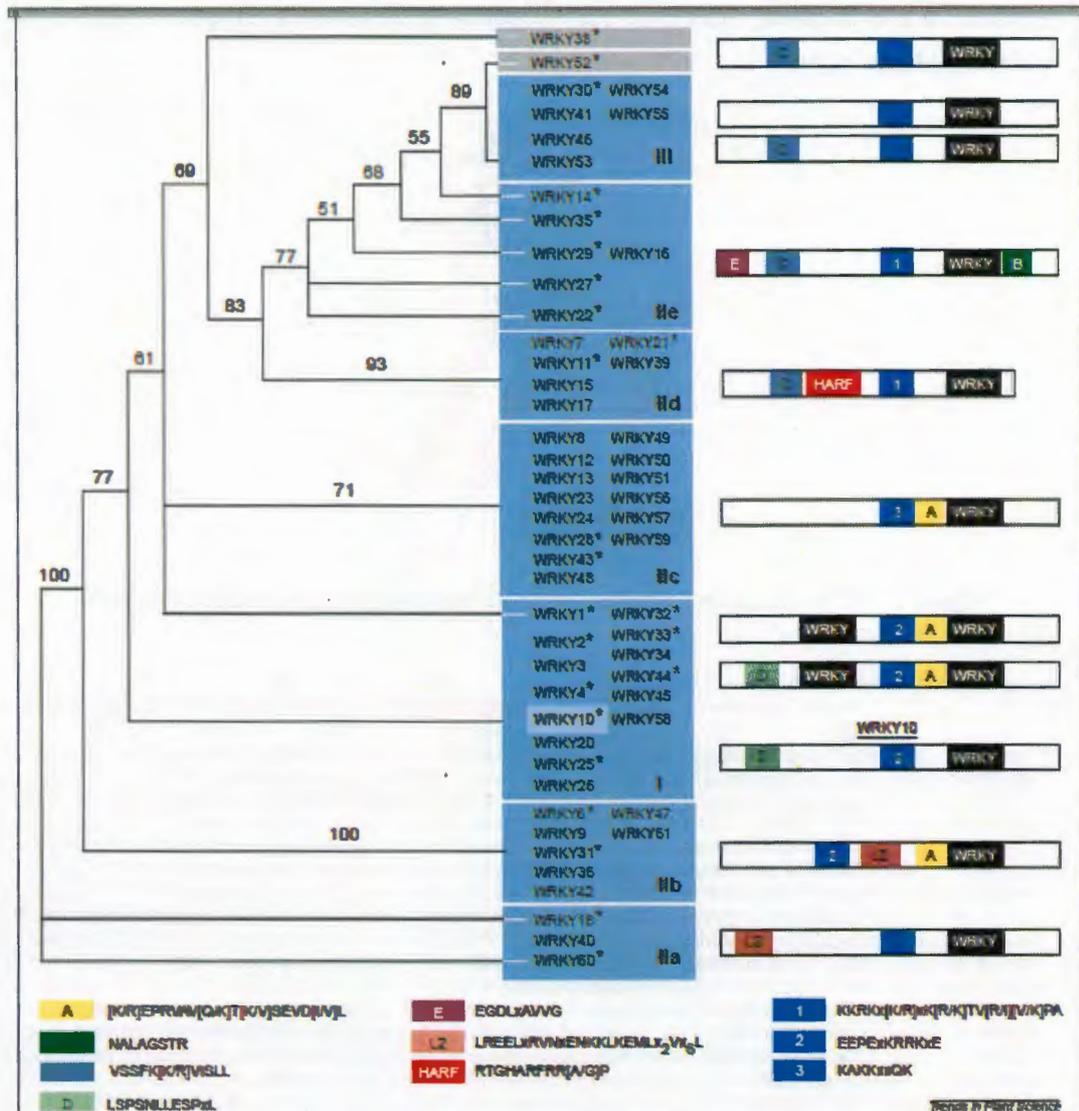


Figura 1. 11 Clasificación de miembros de la familia WRKY de *Arabidopsis thaliana* (Eulgem *et al*; 2000).

La estructura cristalográfica de la proteína AtWRKY4 reveló cuatro cadenas β y un sitio de unión a zinc que se forma por los aminoácidos cisteína e histidina localizados en una de las cadenas β (Yamasaki *et al*; 2005) (**Figura 1.12**). Mientras que la estructura cristal de AtWRKY1-C (C-terminal del dominio WRKY de AtWRKY1) consta de cinco cadenas β , con aminoácidos que se unen al ADN localizados en la cadena β 2 y β 3 (Duan *et al*; 2007) (**Figura 13 y 14**). Solamente un subconjunto de proteínas WRKY parecen tener un motivo de cierre de leucina, PcWRKY4 y PcWRKY5 contienen el motivo predicho de cierre de leucina L-x6-V-x6-L-x6-M-L-x6 y L-x6-L-x6-L-x6 -, respectivamente. Otro caso peculiar, es el gen RRS1 de *Arabidopsis*, el cual confiere

resistencia a la bacteria *Ralstonia solanacearum* y presenta la estructura NBS-LRR-WRKY (AtWRKY52).

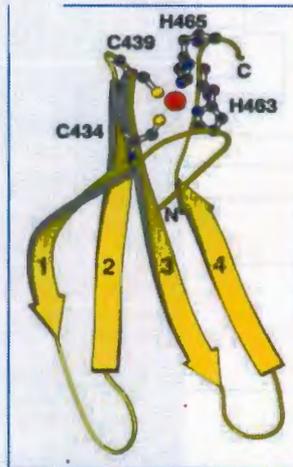


Figura 1. 12 Estructura de WRKY4-C (4 hojas beta plegadas) Yamasaki *et al*; 2005.

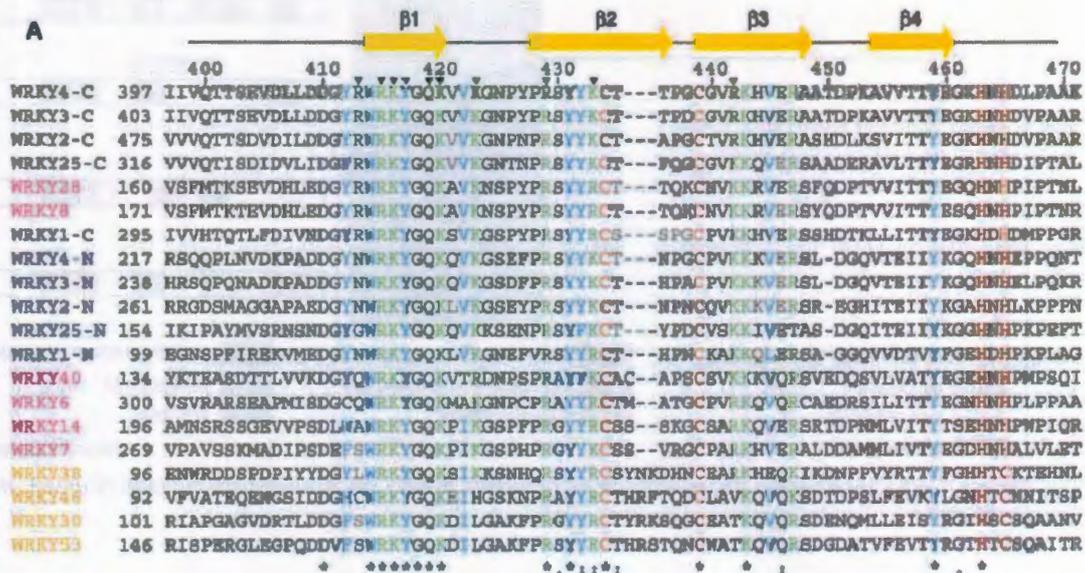


Figura 1. 13 Alineamiento de la secuencia del dominio WRKY de *Arabidopsis thaliana* (Yamasaki *et al*; 2005).

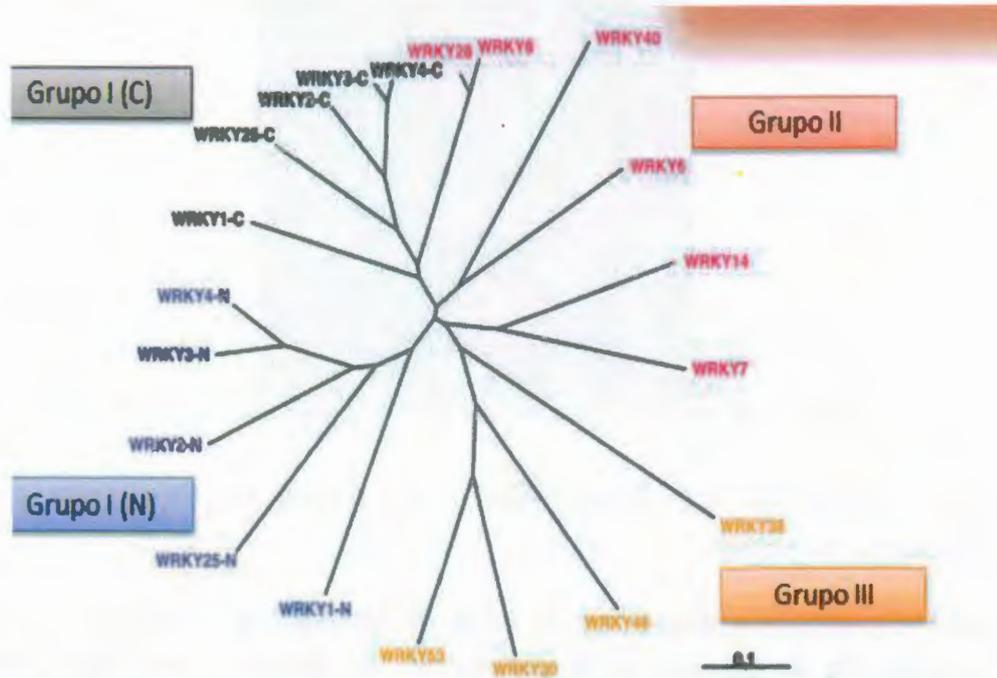


Figura 1. 14 Árbol filogenético del alineamiento de las secuencias del dominio WRKY de *Arabidopsis thaliana* (ver figura anterior) (Yamasaki *et al*; 2005).

Todos los factores de transcripción WRKY estudiados hasta el momento muestran una preferencia de unión a la caja W cuya secuencia es TTGACC/T. Se ha demostrado para algunos miembros WRKY del grupo I que el dominio WRKY ubicado en la porción C-terminal de la proteína y no el ubicado en la porción N-terminal, como el responsable de la unión al ADN. El dominio WRKY de la porción N-terminal probablemente participa en el proceso de unión mediante el aumento de la afinidad del FT por el ADN, o tal vez proporcione una interface para una interacción proteína-proteína, una función conocida de algunos dominios tipo dedos de zinc. En el caso del grupo II y III, como es de esperarse, el único dominio WRKY presente en la proteína es más similar al dominio WRKY ubicado en la porción C-terminal de la proteína del grupo I, lo cual sugiere una función equivalente y para el caso del grupo II y III constituye el principal dominio de unión al ADN. La sustitución de los aminoácidos cisteína e histidina por alanina en el motivo de dedo de zinc C2H2 del dominio WRKY impide la actividad de unión al ADN, indicando que la cisteína e histidina son esenciales para mantener el átomo de zinc y por consiguiente la estructura de dedo de zinc, esencial para la unión al ADN. De manera similar se han mutado aminoácidos del motivo WRKYGQK lo que conduce a que se reduzca la afinidad de unión al ADN (Agarwal *et al*; 2011).

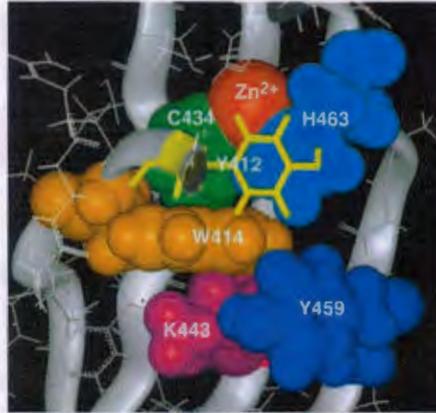


Figura 1. 15 Estructura molecular de *WRKY4-C* (Yamasaki *et al*; 2005).

1.1.13 Origen de los Genes WRKY: su origen en Eucariotas y su expansión en plantas

Análisis comparativos revelan que los genes de regulación de la transcripción están presentes en abundancia en el genoma de las plantas y animales. Análisis filogenéticos muestran que los genes WRKY están agrupados en diferentes grupos con base en su secuencia de aminoácidos. Aunque los genes WRKY son considerados específicos de plantas, se han reportados estos genes en especies diferentes a plantas, como por ejemplo en *Giardia lamblia* un protozooario primitivo, en *Dictyostelium discoideum*, un mohó, y en *Chlamydomonas reinhardtii*, alga verde unicelular. Recientemente 80 miembros de los WRKYs han sido reportados del gimnosperma *Pinus monticola* (Agarwal *et al*; 2011). Todas las plantas superiores analizadas hasta el momento contienen numerosos miembros de los tres grupos de los WRKY, grupos que se diferencian por el número de dominios WRKY y el patrón del motivo del dedo de zinc. En plantas inferiores se ha identificado al dominio WRKY en el helecho *Ceratopteris richardii* y en el musgo *Physcomitrella patens*. Ülker y Somssich en el 2004 aislaron a estos WRKY del musgo *P. patens*, revelando que este musgo contiene 12 genes WRKY. Curiosamente, aunque el grupo III de los WRKY comprenden aproximadamente el 20% de las plantas superiores, ningún miembro del grupo III de los WRKY ha sido encontrado en el musgo *P. patens*. En *Arabidopsis* casi todos los miembros WRKY del grupo III responden a estrés biótico, lo que sugiere que este grupo ha evolucionado al final de las plantas terrestres, tal vez como consecuencia de las crecientes presiones ambientales que se presentaban en esos momentos. El alga verde *C. reinhardtii* contiene un solo gen WRKY (del grupo I que codifica para dos dominios WRKY) (Figura 1.16) (Ülker y Somssich, 2004).

La familia WRKY muestra la evolución de las formas unicelulares más simples hasta las más complejas, las multicelulares. En comparación de los pinos, helechos y musgos con las plantas con flores las cuales tienen una larga familia de WRKYs, indicando que estos factores de transcripción juegan un papel regulador importante en plantas con flores. Los genes del grupo III están enormemente amplificados en monocotiledóneas. Los genes WRKY de arroz del grupo III son evolutivamente más activos, ya que han evolucionado debido a la duplicación de genes en tándem y segmentación, en comparación con los de *Arabidopsis*, por lo tanto muchos tienen funciones específicas en monocotiledóneas.

La ganancia y pérdida de dominios conduce a la expansión de la familia de genes WRKY, y una rápida amplificación de los genes WRKY predice la divergencia de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los genes WRKY están interrumpidos por un intrón en la C-terminal del dominio WRKY del grupo I y en los dominios individuales de los grupos II y III. El tamaño y la secuencia del intrón puede variar, pero su posición es altamente conservada dentro de cada grupo o subgrupo. La longitud del intrón conservado de arroz es de tres a seis veces (~868pb) en comparación con el de *Arabidopsis* (~241pb). Las modificaciones de los patrones de los dedos de zinc son detectados por las proteínas WRKY de arroz y cebada, lo que indica una característica específica de monocotiledóneas. OsWRKY89 contiene un motivo dedo de zinc CX7CX27HX1C mientras que las proteínas del grupo III de *Arabidopsis* tienen un motivo dedo de zinc CX7CX23HX1C.

La base de datos Gen bank reveló la existencia de los WRKY del grupo I en las secuencias de dos eucariotas no fotosintéticos, los cuales son *D. discoideum* (AAO52331) y *G. lamblia* (EAA40901) (Figura 1.16). Estos resultados revelan que el grupo I de los genes WRKY pueden representar su forma ancestral y lo más importante que estos genes WRKY se originaron de 1.5 a 2 mil millones de años en los eucariotas, es decir, antes de la divergencia del *Phylum* de las plantas. Aún no está clara la pregunta de ¿Por qué esta familia de WRKYs se ha expandido tanto en las plantas? y al parecer se han perdido en los linajes de levaduras y animales pero aún no es algo claro (Ülker y Somssich, 2004).

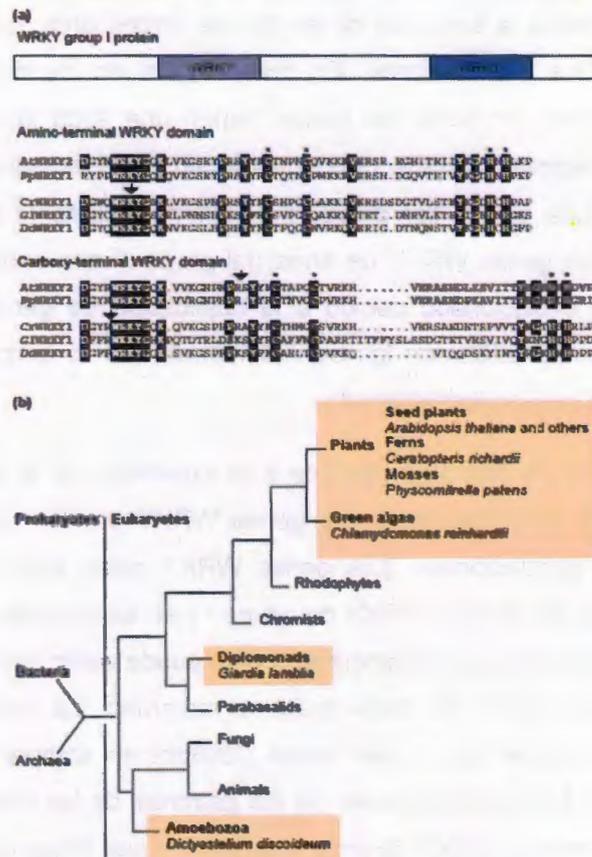


Figura 1. 16 Genes WRKY del grupo I en eucariotas. (a) Representación esquemática de la proteína WRKY del grupo I y la deducción de las secuencias de aminoácidos de los dominios WRKY. WRKY amino y carboxil-terminal de *Arabidopsis thaliana* (At), *Physcomitrella patens* (Pp), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Giardia lamblia* (Gl) y *Dictyostelium discoideum* (Dd). Los residuos de aminoácidos altamente conservados se remarcan en las cajas negras. Los asteriscos marcan las cisteínas e histidinas invariables, las cuales se requieren para formar el motivo dedo de zinc. Las flechas indican las posiciones de los intrones dentro del dominio WRKY de los genes respectivos. (b) La distribución de los genes está representada en una filogenia esquemática de los correspondientes grupos eucariotas. La distribución de los genes WRKY está representada en letras negras y en cajas color durazno (Ulker y Somssich, 2004).

1.1.14 Función de los Factores de Transcripción (FT) WRKY en la resistencia contra patógenos

Los factores de transcripción WRKY han sido hasta el momento los FTs más estudiados en cuanto a su papel en la resistencia a patógenos y continúan siendo de sumo interés en la investigación sobre la interacción molecular planta-patógeno, no solamente desde el punto de vista básico para elucidar el papel que juegan en la inmunidad de las plantas sino también desde el punto de vista práctico para determinar su potencial biotecnológico de generar resistencia a patógenos en cultivos agrícolas. Se tiene evidencia que la expresión de los WRKY se induce en respuesta a

la aplicación exógena de ácido salicílico o a la inoculación con patógenos o moléculas efectoras de éstos (Ver Cuadro 1.2 Agarwal *et al*; 2011). La identificación de elementos *cis* del tipo cajas W en la región promotora del regulador maestro del SAR, NPR1 indica que algunos WRKY actúan arriba de la cascada de señalización de NPR1 y que de manera positiva regulan su expresión durante la activación del SAR (Yu *et al*; 2001).

Cuadro 1. 2 Genes WRKY que se inducen en respuesta a diferentes inductores. At *Arabidopsis thaliana*, Bn *Brassica napus*, Ca *Capsicum annum*, Fa *Fragaria x ananassa*, Hv *Hordeum vulgare*, Lp *Lycopersicon peruvianum*, Lt *Larrea tridentate*, Na *Nicotiana attenuata*, Os *Oryza sativa*, Osi *Oryza sativa indica*, Pc *Petroselinum crispum*, Pt *Populus tremula x Populus alba*, Sc *Solanum chacoense*, SUSIBA *sugar signalingin barley*, St *Solanum tuberosum*, Tc *Thlaspi caerulescens,tobacco (Nicotiana tabacum)*, TIZZ TMV-induced leucine zipper zinc-finger, Vv *Vitis vinifera*, WIZZ wound-induced leucine zipper zinc finger (Agarwal *et al*; 2011).

GEN	GRUPO	FACTOR CAUSANTE DE LA INDUCCIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN
AtWRKY3, 4	I	Infección con <i>Botrytis</i> & <i>P. syringae</i> , SA, JA, ACC
AtWRKY17, 25, 33	IId, I, I	NaCl
AtWRKY18, 40, 60	Ila	SA, <i>P. syringae</i> , <i>B. cinerea</i>
AtWRKY25	I	SA, MgCl ₂ , H ₂ O
AtWRKY25, 33	I	NaCl, manitol, ABA, frío, calor
AtWRKY41		Flagelina (<i>P. syringae</i>)
AtWRKY38, 62	III	PstDC3000 inoculación, SA
AtWRKY53	III	Senescencia
AtWRKY63/ABO3	III	ABA
AtWRKY70	III	Senescencia
Bn WRKY's		Sclerotinia, sclerotiorum e infección por <i>Alternaria brassicae</i> , ABA, BAP JA, SA, ET
CaWRKY1 II	II	<i>X. anoxopodis</i> , <i>P. syringae</i> , SA
CaWRKY2 I	I	<i>P. syringae</i> e infección por <i>X. anopodis</i> , SA, JA
FaWRKY1 IIc	IIc	Infección por <i>Colletotrichum acutatum</i> , ABA, SA, JA
Hv-WRKY38	II	Frío, sequía
LpWRKY1	I	<i>Fusarium oxysporum lycopersici</i> (E-FOL) y quitosano
LtWRKY21	II	CO ₂ , deshidratación, salinidad, frío, calor, herida, ABA, JA, glucosa
NaWRKY3, 6	I	Herida, Conjugado de grasas y amino ácidos (FAC)
OsWRKY's		<i>M. grisea</i> , infección por <i>Xanthomonas oryzae</i> , SA, MeJA, ABA,

		IAA, GA, frío, sequía, salinidad.
OsWRKY3 (OsWRKY12)	Ile	SA, BTH, JA, ACC, infección por <i>Xanthomonas oryzae</i>
OsWRKY31	Ile	Infección por <i>M. grisea</i> , herida, JA, IBA
OsWRKY45	III	BTH, NaCl, manitol, frío, calor, ABA
OsWRKY71	Ila	SA, MeJA, ACC, herida, infección por <i>X. oryzae</i> .
OsWRKY89	Ilb	JA, <i>M. grisea</i>
OsiWRKY (OsWRKY80)	Ilc	<i>Xanthomonas oryzae</i> , heridas
. PcWRKY1, 2, 3	I, I, II	Pep25
PcWRKY4- PcWRKY5	II, III	Tratamiento CHX, tratamiento CHX
PtWRKY23 I	Ilc	Herida, SA, quitosano, Infección por <i>Melampsora</i>
ScWRKY1	I	Embriogenesis
St-WRKY1	II	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , enzimas degradantes de pectina,
SUSIBA2 I Sugar	I	Azúcar
TcWRKY53	III	NaCl, frío, SA
TIZZ II TMV infection	II	Infección por TMV
tWRKY3, 4	III	SA, Infección por TMV
VvWRKY1	Ilc	SA, Etileno, H ₂ O ₂ y herida
VvWRKY2	I	Herida e infección por <i>P. viticola</i>
WIZZ	II	Herida

Los FT WRKY desempeñan un papel crucial en la regulación positiva y negativa de genes involucrados en la defensa contra patógenos; un ejemplo de esto es el gen *AtWRKY18*, aumenta la resistencia al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* mediante la activación de la expresión de genes PR (Chen y Chen 2002). *AtWRKY18* interactúa tanto física como funcionalmente consigo mismo y con los FT *AtWRKY40* y *AtWRKY60*. Análisis mutacionales de combinaciones sencillas, dobles y triples de sus mutantes muestra que estas tres proteínas WRKY tienen funciones redundantes en la respuesta de la planta a diferentes tipos de patógenos microbianos, siendo *AtWRKY18* el que desempeña la función más preponderante en la respuesta de resistencia. Los FT *HvWRKY1* y *HvWRKY2* de la monocotiledónea cebada y estructuralmente similares a *AtWRKY18*, *AtWRKY40* y *AtWRKY60* funcionan como represores de la defensa basal

contra el patógeno *B. graminis* (Xu *et al*; 2006; Shen *et al*; 2007). El análisis funcional de las mutantes de *AtWRKY3* y *AtWRKY4* muestra que regulan de manera positiva la expresión de genes involucrados en la resistencia contra el patógeno necrótrofo *Botrytis cinera*, sin embargo, *AtWRKY4* tiene un efecto negativo en la resistencia contra el patógeno biotrófo *P. syringae* (Lai *et al*; 2008). Estudios a escala genómica en *Arabidopsis* han identificado a ocho genes WRKY (*AtWRKY18*, *AtWRKY38*, *AtWRKY53*, *AtWRKY54*, *AtWRKY58*, *AtWRKY59*, *AtWRKY66* y *AtWRKY70*) como blancos transcripcionales de NPR1, de los cuales *AtWRKY18* es requerido para la activación positiva del SAR, mientras que *AtWRKY58* es un regulador negativo del SAR, el cual es necesario para mantener apagado este sistema de defensa cuando no se le necesita (Wang *et al*; 2006; Agarwal *et al*; 2011). Curiosamente *AtWRKY70* y sus homólogos funcionales (*AtWRKY54*) desempeñar la doble función como reguladores negativos de la biosíntesis de SA y los reguladores positivos de la expresión génica es medida por SA y la resistencia. Para los FT *AtWRKY70* y *AtWRKY53* también son un componente común las vías de señalización de SA y JA, actuando como un activador de genes de inducción a SA y como represores de genes de respuesta a JA, produciendo una integración de señales, así como un equilibrio entre vías antagonicas. *AtWRKY70* confiere una mayor resistencia a los hongos *Erysiphe cichoracearum* biotrófo y a bacterias necrótofas *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (Ecc) pero confiere menos resistencia a hongos necrótofos *Alternaria brassicicola*s. Así, los FT WRKY también muestran una variación en su resistencia a diferentes patógenos dependiendo de la activación de las vías SA o JA, transducción de señales o las proteínas corriente abajo que son inducidas (Agarwal *et al*; 2011).

Los FT *AtWRKY7*, *AtWRKY38*, *AtWRKY62* y *AtWRKY52* tienen función de unión al ADN como represores transcripcionales, su sobreexpresión reduce la expresión de genes relacionados con la defensa por diferentes mecanismos. *AtWRKY7* confiere resistencia a las plantas a *P. syringae* por la regulación de señalización negativa de SA. *AtWRKY38* y *AtWRKY62* no reprimen los genes de defensa directamente, sino que, al interactuar con HDA19, un regulador positivo de la resistencia a enfermedades de las plantas basal. La defensa y represión de *AtWRKY38* y *AtWRKY62* son inactivadas por la interacción con HDA19.

Los factores de transcripción WRKY muestran su participación en las respuestas de las plantas a los hongos patógenos como *Magnaporthe grisea*, el agente causal de la enfermedad del arroz el tizón devastador. Un análisis de la expresión sistemática de genes *OsWRKY* de arroz revela una alta regulación sobre 15 genes de la infección por

M. grisea. Doce de los genes *OsWRKY* inducidos por *M. grisea* también fueron regulados diferencialmente por bacterias patógenas *Xanthomonas oryzae*. Estos FT *WRKY* del arroz también mostraron ser regulados por moléculas de señalización; dos regulados por SA (*OsWRKY45* y *OsWRKY62*), tres por JA (*OsWRKY10*, *OsWRKY82* y *OsWRKY85*), dos mostraron regulación de ambas moléculas de señalización SA y JA (*OsWRKY30* y *OsWRKY83*). Curiosamente, más de la mitad (8 de 15) de FT *OsWRKY* no responden ni a SA o el tratamiento JA, lo que sugiere la participación de otros productos químicos de señalización como el etileno en respuesta al ataque de patógenos. La sobreexpresión de *OsWRKY3* en las plantas de arroz tienen una mayor expresión de NPR1, PR1b, phenylalanineammonia-lyase (ZB8) y peroxidasa (POX22.3), lo que sugiere que *OsWRKY3* es un regulador transcripcional dependiente de SA o JA y de las cascadas de señalización (Wang *et al*; 2006; Agarwal *et al*; 2011).

1.1.15 *AtWRKY18*

AtWRKY18 es un ejemplo de factor de transcripción de los *WRKY*, el cual es inducible por ácido salicílico (SA) y responsable de conferir resistencia a patógenos en plantas. Dicho FT pertenece al grupo IIa ya que tiene un solo dominio *WRKY*. Chen y Chen en el 2002 transformaron plantas de *Arabidopsis* con *AtWRKY18* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Figura 1.17). Las plantas transgénicas que expresaron altos niveles de *AtWRKY18* retrasaron su desarrollo. Cuando expresaron niveles moderados de *AtWRKY18* se potenció el desarrollo regulando las respuestas de defensa en plantas transgénicas, sin causar importantes efectos negativos sobre el crecimiento de la planta. A medida que las plantas transgénicas se desarrollan (etapa madura), el FT *AtWRKY18* mostró un aumento marcado en la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR) y la resistencia al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae*, mientras que en plantas silvestres mostraron poca mejora en la respuestas de defensa.

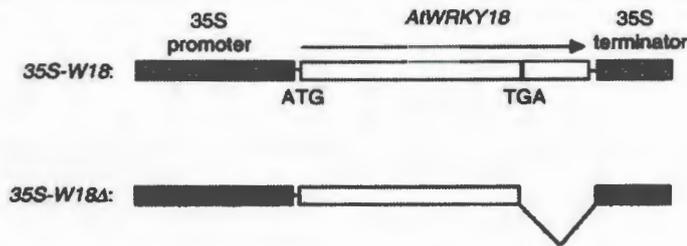


Figura 1. 17. Construcciones de expresión de *AtWRKY18*, donde se puede observar la construcción 35S-W18 (arriba) (la secuencia completa del ADNc *AtWRKY18* colocada entre el promotor y terminador del virus del mosaico de la coliflor 35S) y la construcción 35S-W18Δ (abajo) (la secuencia 3' no traducida de *AtWRKY18* es eliminada) (Chen y Chen, 2002).



Figura 1. 18. Sobreexpresión de *AtWRKY18* aumentan la resistencia a *Pseudomonas syringae*. Wt (Planta sin transformar); W18Δ-1 (Plantas transformadas con promotor 35S y sin el 3'UTR de *AtWRKY18*); W18-5 y W18-4 (dos líneas transgénicas transformadas con promotor y terminador 35S); (Chen y Chen, 2002).

Yu *et al*; 2001 demostraron que las proteínas WRKY son importantes en la expresión inducible de NPR1. La sobreexpresión de NPR1 también puede estimular la expresión de genes PR y mejorar la resistencia a un amplio espectro de patógenos; por lo tanto, la expresión constitutiva de genes PR y la resistencia a enfermedades aumenta en plantas transgénicas de *AtWRKY18*. Resultado de los estudios de Chen y Chen, 2002 en plantas transgénicas indican que *AtWRKY18* podría modular tanto la expresión de genes PR y resistencia a las enfermedades de un patógeno bacteriano, cuando *AtWRKK18* es inducido con el tratamiento de SA, *AtWRKY18* es capaz de activar la expresión de genes PR y mejorar la resistencia al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* en plantas transgénicas maduras, pero no en plantas jóvenes (**Figuras 1.18 y 1.19**); Sin embargo, si se expresa en niveles muy altos, el mismo factor de transcripción causa graves anomalías en el crecimiento de la planta (**Figura 1.18**). Así, la expresión regulada de *AtWRKY18* puede ser importante en la activación de la respuesta de defensa de la planta.

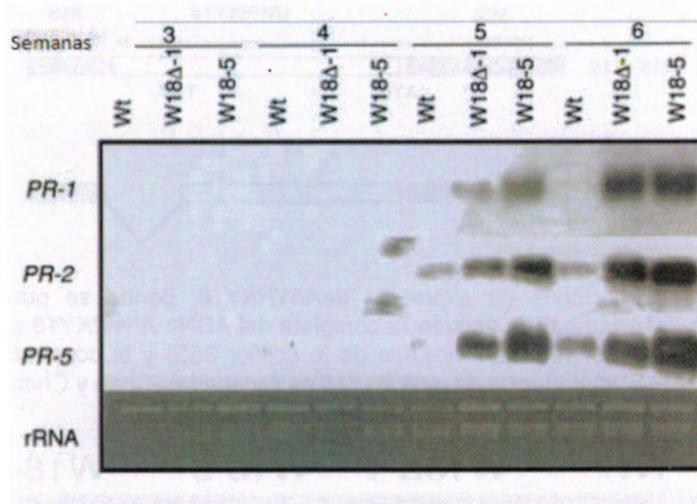


Figura 1. 19 Expresión de genes *PR* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan a *AtWRKY18* (Chen y Chen, 2002).

1.2 HIPÓTESIS

Un homólogo del gen *AtWRKY18* de *A. thaliana* se encuentra presente en el genoma de *Citrus sinensis* y se expresa en tejido de hoja.

1.3 OBJETIVOS

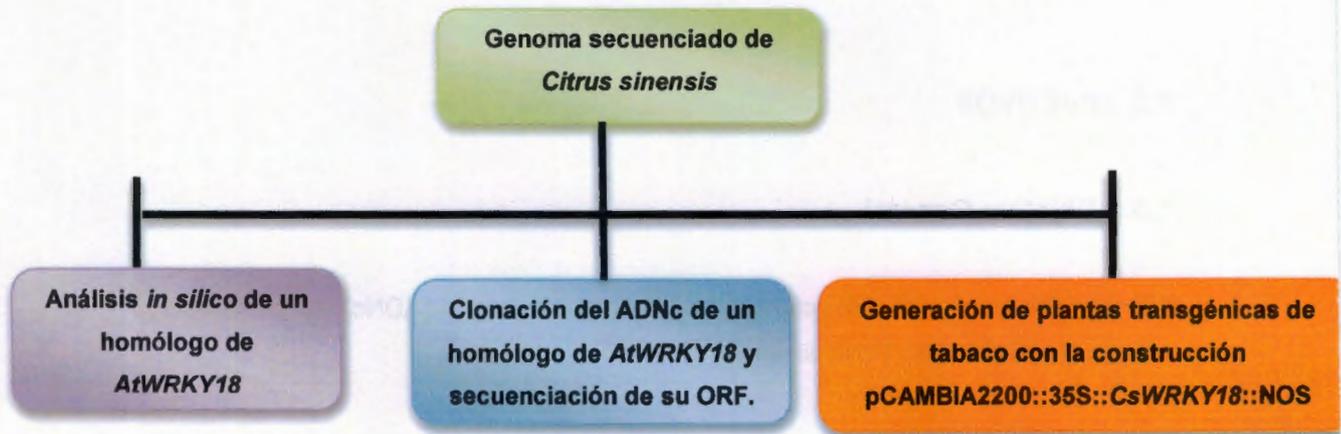
1.3.1 Objetivo General

Clonar y caracterizar la estructura del ADN complementario (ADNc) de un homólogo del gen *AtWRKY18* en *Citrus sinensis*.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar y caracterizar *in silico* a un homólogo de *AtWRKY18* en *C. sinensis*.
2. Clonar el ADNc de un homólogo a *AtWRKY18* a partir de ARN de tejido de hoja de *C. sinensis* y generar una construcción de expresión para transformar a la planta modelo de tabaco.

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



1.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal P. M; Reddy P; y Chikara J. (2011). WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants. *Mol. Biol. Rep.* 38:3883–3896.
- Agrios G.N. (2005). *Plant Pathology*, Academic Press, London.
- Alemán J; Baños H; y Ravelo J. (2007). *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: Una combinación destructiva para la producción cítrica. *Rev. Protección Vegetal.* 22 (3): 154-165.
- Bent A.F; y Mackey D. (2007). Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 399-436.
- Briansky R.H; Chung K.R; y Rogers M.E. (2007). Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). University of Florida. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/CG086>.
- Camarena G.G; y Torre A.R. (2007). Resistencia Sistemática Adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 13:157-162.
- Campbell M.A; Fitzgerald H.M; y Ronald P.C. (2002). Engineering pathogen resistance in crop plants. *Transg. Research.* 11, 599–613.
- Civerolo E.J. (2009). Liberibacters associated with citrus Huanglongbing and potato zebra chip, USDA. Agricultural Research Service Parlier, California, Disponible en: edwin.civerolo@ars.usda.gov (Consultado en Septiembre 2011).
- Chisholm S.T; Coaker G; Day B; y Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814.
- Chen C. y Chen Z. (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. *Plant Physiology.* 129:706-716.

- Da Graça J.V. (2008). Biology, history and world status of Huanglongbing, Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido asiático de los cítricos. Hermosillo, Son.
- Delgadillo V. I. (2010). Huanglongbing, importancia y manejo. 4a Semana Internacional de la Citricultura, Martínez de la Torre, Veracruz/México. 1 - 4 de Diciembre 2010.
- Durrant W.E; y Dong X. (2004) Systemic Acquired Resistance. Annual Review of Phytopathology. 42:185-209.
- Eulgem T; Rushton J.P; Robatzet S, y Somssich E.I. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends in Plant Science. 5:199-206.
- Eulgem T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. Trends in Plant Science 10: 71-78.
- Eulgem T; y Somssich E.I. (2007). Network of WRKY transcription factors in defense signaling. Current Opinion in Plant Biology 10: 366-371.
- FAO. (2008).<http://www.fao.org/economic/>
- FAOSTAT. (2011).Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Naranja. Disponible en: <http://apps.fao.org/faostat>
- FAOSTAT. (2010). Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Naranja. Disponible en: <http://apps.fao.org/faostat>
- Floyd J. M; y Krass C. (2006). New Pest Response Guidelines: Citrus Greening Disease. USDA-APHIS-PPQ- Emergency and Domestic Programs, Riverdale, Maryland.
- García D. C. (2007).Distribución de Huanglongbing (HLB)-Greening en el Mundo, Dirección de Vigilancia y Monitoreo, Buenos Aires Argentina, Disponible en: cdarde@senasa.gov.ar (Consultado en Septiembre 2011).

Gurr S.J; y Rushton P.J. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *TRENDS in Biotechnology*, 23, 275-282.

Hocquellet A ; Bové J.M ; y Garnier M. (1999). Isolation of DNA from the Uncultured “*Candidatus Liberobacter*” species associated with citrus Huanglongbing by RAPD, *Current Microbiology*. 38:176–182.

IICA, (2010).

Knighten C; Redding J; Feiber D; y Compton L. (2005). U.S. Department of Agriculture and Florida Department of Agriculture confirm detection of citrus greening. http://www.doacs.state.fl.us/press/2005/09022005_2.html

Lai Z; Vinod K.M; Zheng Z; Fan B; y Chen Z. (2008) Roles of Arabidopsis WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC Plant Biol* 8:68.

Madriz O. K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 63: 22-32.

Martín C. M.A. (2011). Estudio De La Estructura, Filogenia Y Expresión De Genes Tipo NPR1 De Plátano (*Musa acuminata*). Tesis. 17-20.

Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-Fito-2009. Ciudad de México, D. F., a 2 de julio de 2009. El Coordinador General Jurídico, González-Muñoz W. R.

Plan Rector Sistema Nacional Cítricos. (2005). Diagnóstico Inicial Base de Referencia estructura Estratégica, Segunda Fase. Documento validado por el comité sistema producto cítricos en sesión del 17 de febrero de 2005, Tampico, Tamaulipas, México.

Pieterse C.M; León R.A; Van der Ent S; y Van W.S. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5:103-316.

- Polek M; Vidalakis G; y Godfrey K. (2007). Citrus Bacterial Canker Disease and Huanglonging (Citrus Greening). Regents of the University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 8218. <http://anrcatalog.ucdavis.edu>
- Robles G. P. L. (2008). Manual técnico para la detección del Huanglongbing de los cítricos. Dirección de protección fitosanitaria. SAGARPA/SENASICA/INIFAP.
- Ruíz C. E; Coronado B. J.M; y Myartseva S.N. (2008). Psílido Asiático de los Cítricos, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). 26:323-331, Primera Edición. Casos de Control Biológico en México.
- SAGARPA, (2008). <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>
- SAGARPA, (2010). <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>
- SAGARPA, (2011). <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>
- SAGARPA, (2012). <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>
- Sánchez A. H. (2010). HLB en México, Antecedentes, Situación Actual y perspectivas, 4a Semana Internacional de la Citricultura, Martínez de la Torre, Veracruz/México. 1 - 4 de Diciembre 2010.
- Sechler A; Schuenzel E.L; Cooke P; Donnua S; Thaveechai N; Postnikova E; Stone A.L; Schneider W.L; Damsteegt V.D; y Schaad N.W. (2009). Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' Associated with Huanglongbing. *Phytopathology*. 99(5):480-486.
- SENASICA, (2010). www.senasica.gob.mx/
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, SAGARPA (2011). Consulta de Indicadores de Producción, Precios y Márgenes de Comercialización Nacional de Naranja. Disponible en: www.siap.sagarpa.gob.mx

Shen Q.H; Saijo Y; Mauch S; Biskup C; Bieri S; Keller B; Seki H; Ülker B; Somssich I.E; y Schulze-Lefert P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease resistance responses. *Science*, 315:1098-1103.

SIACON, (2004). <http://www.siap.gob.mx/>

SIAP, (2006). <http://www.siap.gob.mx/>

Singh S; y Rajam M.V. (2009). Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 15(1):3-22.

Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. (2011) Consulta de precios de Naranja. Disponible en: www.economiasniim.gob.mx

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Agosto (2011). Análisis Epidemiológico Fitosanitario/Reporte Epidemiológico 011/HLB y Psílido asiático de los Cítricos, *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Diaphorina citri*.

Tapia C. G. (2009). Programa para la detección y control de Huanglongbing o Greening de los cítricos en la Región de OIRSA, Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) (FAO, Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (2007).

Trujillo A. J; Sánchez A. H.M; y Robles G. P.L. (2008). Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos en México, Hermosillo, Sonora, México. SAGARPA/SENASICA/Dirección General de Sanidad Vegetal, Disponible en: trujillo@senasica.gob.mx (Consultado en Septiembre 2011).

Ülker B; y Somssich E.I. (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding to wards biological function. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:491-498.

Van Verk M; Gatz C; y Lint horst H. (2009). Transcriptional regulation of plant defense responses. *Advances in Botanical Resear*, 51, 397-438.

Vallejo R. M.A. (2010). Caracterización Molecular De Genes Homólogos A Factores De Transcripción De La Familia ERF En *Carica papaya*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Capítulo 1: 20-28.

Wang D; Amornsiripanitch N; y Dong X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens* 2:123.

Xu X; Chen C; Fan B; y Chen Z. (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*. 18:1310-1326.

Yamasaki K; Kigawa T; Inoue M; Tateno M; Yamasaki T; Yabuki T; Aoki M; Seki E; Matsuda T; Tomo Y; Hayami T; Terada T; Shirouzu M; Tanaka A; Seki M; Shinozaki K; y Yokoyama S. (2005). Solution Structure of an Arabidopsis WRKY DNA Binding Domain. *The Plant Cell*, Vol. 17, 944–956.

Yu C; Huang S; Chen C; Deng Z; Ling P; y Gmitter F.G; Jr. (2002). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 147–155, 2002.

Yu D; Chen C; y Chen Z. (2001). Evidence for an Important Role of WRKY DNA Binding Proteins in the Regulation of *NPR1* Gene Expression. *The Plant Cell*, Vol. 13, 1527–1539.

Zhang X; Francis M.L; Dawson W.O; Graham J.H; Orbovic V; Triplett E.W; y Mou Z. (2010). Over-expression of the Arabidopsis *NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur J Plant Pathol*. 128:91-100

CAPÍTULO II

**CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* DE UN HOMÓLOGO A A1WRKY18 EN
*C. sinensis*****2.1 INTRODUCCIÓN**

El cultivo de los cítricos representa una actividad agrícola sumamente apreciada por el alto valor nutricional de los frutos, importación y exportación a gran escala, así como la generación de millones empleos. En México se cultivan alrededor de 549 mil ha de cítricos con una producción de siete millones de toneladas de fruta (naranjas, limones, mandarinas y toronjas) por año (SIAP, 2006; Alemán *et al*; 2007; Trujillo *et al*; 2008; FAO, 2008; Dirección General de Fomento a la Agricultura, 2009; IICA, 2010; Delgadillo, 2010; SAGARPA, 2010). La naranja dulce (*Citrus sinensis*) representa al cítrico más importante en cuanto a su producción, comercialización, importación y exportación y valor nutricional. México es el cuarto productor a nivel mundial de cítricos y el quinto lugar en producción de naranja dulce (FAOSTAT, 2010; FAO, 2011; Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, SAGARPA, 2011; Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados, 2011). Sin embargo, al igual que otros cultivos tropicales, los cítricos están expuestos al ataque de patógenos causantes de diversas enfermedades, las cuales afectan su producción. Las enfermedades más devastadoras que atacan a los cítricos son la cancrrosis de los cítricos, causada por la bacteria *Xanthomonas citri*, y el Huanglongbing (HLB) (Knighten *et al*; 2005; Polek *et al*; 2007), causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp*, las cuales generan pérdidas importantes (Hocquellet *et al*; 1999; Sechler *et al*; 2009; Sánchez, 2010). El HLB es la enfermedad que ha atacado con más fuerza en los últimos años generando alertas fitosanitarias y medidas de contingencia (Floyd y Krass, 2006; Robles, 2008; Norma Oficial Mexicana de Emergencia, 2009; Civerolo, 2009; Tapia, 2009; Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, 2011). Hasta el momento los métodos más efectivos para el control de estos patógenos son el uso de bactericidas, barreras culturales y su uso en combinación, pero no han sido suficientes, ya que las pérdidas por estas enfermedades continúan; además la aplicación de estos productos químicos a largo plazo resulta ser muy tóxico para la salud humana y el medio ambiente (Martínez,

2009; Zhang *et al*; 2010). La generación de variedades resistentes que no requieran del uso de plaguicidas sería una solución ideal a estas enfermedades. En los últimos años, el mejoramiento genético basado en la biotecnología, es una estrategia eficaz en el desarrollo de variedades resistentes a diversos fitopatógenos (Campbell *et al*; 2002; Yu *et al*; 2002; Gurr y Rushton 2005; Singh y Rajam, 2009). A pesar de que se cuenta con esta herramienta poderosa para el desarrollo de variedades resistentes a diversos patógenos, el conocimiento que se tiene de los genes involucrados en la resistencia contra patógenos en cítricos es muy limitado. Actualmente ya se cuentan con protocolos estandarizados de cultivo *in vitro* y de transformación genética en cítricos, sin embargo, la eficiencia de éstos aun es baja; a la par se cuenta con plantas modelo como el tabaco, la cual es una herramienta muy eficaz para estudiar la función de genes de otras especies de plantas ya que su ciclo de vida es corto y sus protocolos de transformación y regeneración están bien establecidos. La publicación reciente de la secuencia genómica completa de la naranja, nos facilitará la caracterización sistemática de todos los genes de la naranja involucrados en la resistencia al estrés biótico, lo cual facilitará el mejoramiento genético de los cítricos mediante.

Los Factores de Transcripción (FT) juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes de defensa (Eulgem, 2005). Los factores de transcripción WRKY son proteínas altamente conservadas en plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. Al igual se ha visto que están presentes en musgos, algas y protistas (Ülker y Somssich, 2004; Agarwal *et al*; 2011). Los FT de la familia WRKY han sido objeto de mucha atención en los últimos años debido a su participación preferencial hacia la resistencia al estrés biótico y se han caracterizado en distintas especies y que por su naturaleza pueden activar genes relacionados con la patogénesis (PR) (Eulgem *et al*; 2000; Eulgem, 2005; Eulgem y Somssich, 2007; Argüello y Negaresh, 2009; Agarwal *et al*; 2011). Existen 74 miembros de la familia WRKY en *A. thaliana* (Ülker y Somssich, 2004) y la búsqueda y análisis de estos genes en otras especies nos da la oportunidad de encontrar y utilizar los genes involucrados en la resistencia a patógenos. Se ha comprobado que varios genes de diferentes especies miembros de la familia WRKY aumentan sus niveles de expresión cuando las plantas están expuestas a estímulos de estrés biótico (Agarwal *et al*; 2011) o a la aplicación exógena de hormonas involucradas en la resistencia como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) (Pieterse *et al*; 2009). Este aumento en los niveles de expresión desencadena el aumento de expresión de genes PR y a

su vez le permiten a la planta resistir al ataque de patógenos (Gutterson y Reuber, 2005; Chisholm *et al*; 2006). Varios de los genes WRKY funcionan como reguladores positivos o negativos de la expresión de genes de defensa. De los WRKY que funcionan como reguladores positivos se encuentran el gen *AtWRKY18* de *A. thaliana*; su expresión se induce en respuesta a la acumulación de ácido salicílico y la actividad de NPR1 (Yu *et al*; 2001; Chen y Chen 2002) y su sobre-expresión en *Arabidopsis* aumenta la resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae*. En base a la relevancia de lo anterior se requiere buscar y caracterizar secuencias homólogas a WRKY en cultivos tropicales como los cítricos para la generación de variedades resistentes a patógenos y para evitar que las enfermedades acaben con la producción cítrica y de esta forma evitar consecuencias muy negativas para la economía del país.

La disponibilidad pública de la secuencia del genoma completo de la naranja dulce nos da la posibilidad por primera vez en la historia de identificar y caracterizar genes tipo WRKY por medio de herramientas bioinformáticas, al igual nos brinda la oportunidad de descubrir y estudiar los genes de este cultivo involucrados en la resistencia a patógenos que causan las enfermedades ya mencionadas y muchas más; y en conjunto la oportunidad de mejorar genéticamente al cultivo. Con base a lo anterior, el objetivo del presente capítulo de investigación fue identificar y caracterizar *in silico* a un homólogo de *AtWRKY18* en *C. sinensis*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Aislamiento *in silico* de una secuencia homóloga a *AtWRKY18* en *Citrus sinensis*

Para identificar probables genes de *Citrus sinensis* que codifiquen para WRKYs, los cuales pudieran estar implicados en conferir resistencia a patógenos, se procedió a realizar una búsqueda bibliográfica de WRKYs previamente caracterizados en otras especies. El criterio para elegir la secuencia de interés fue que regule de manera positiva la expresión de genes de defensa, responda a la hormona ácido salicílico y que su sobre-expresión en plantas transgénicas genere resistencia a patógenos de tipo bacteriano. De todos los genes consultados se decidió elegir al *AtWRKY18*, factor de transcripción de *Arabidopsis thaliana*, el cual es inducible por ácido salicílico, y su sobre-expresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis* genera resistencia a la bacteria *P. syringae*. La secuencia de dicho FT se encuentra disponible en el sitio web National Center for Biotechnology Information (NCBI) con un número de acceso de AAM65594 con un total de 310 amino ácidos. Es importante mencionar que la secuencia del genoma completo de *C. sinensis* se encuentra disponible de manera pública en la base de datos de Phytozome (<http://www.phytozome.net/search.php>). Una vez obtenida la secuencia del *AtWRKY18* de *Arabidopsis* se realizó un BLASTP en la página web del phytozome con la finalidad de identificar un homólogo en el genoma de *C. sinensis* y posteriormente caracterizar *in silico* la secuencia.

2.2.2 Obtención de marcos de lectura abierto y diseño de oligonucleótidos

A partir de la secuencia homóloga de *AtWRKY18* en naranja, obtenida mediante el análisis del BLASTP, se obtuvieron de lo predicho en phytozome los posibles marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés), CDS, intrones, 5'UTR y 3'UTR. Posteriormente se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificación por medio de RT-PCR de fragmentos de los genes encontrados a partir de las ORFs descritas por el programa FGENESH.

2.2.3 Alineamiento múltiple de secuencias

Se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia obtenida en el BLASTP (*CsWRKY18*) con las siguientes secuencias de aminoácidos : *AtWRKY18* (AAM65594 NCBI), *OsWRKY13*(AK067329 NCBI), *AtWRKY32* (CAA18200 NCBI), *AtWRKY20* (CAB43860 NCBI), *AtWRKY3* (AAD17441 NCBI), *AtWRKY2* (AB026656 NCBI), *AtWRKY55* (AAD32805 NCBI), *AtWRKY46* (AAD23042 NCBI), *AtWRKY41* (AAC35548 NCBI), *AtWRKY30* (BAB11571 NCBI), *Cucumis satives* (Cucsa.271570 Phytozome), *Populus trichocarpa* (POPTR_0006s27950 Phytozome), *Carica papaya* (evm.TU.superconting_127.2- Phytozome), *Vitris vinífera* (GSVIVG01015952001. Phytozome), *Oryza sativa* (LOC_Os00g25060. Phytozome), *Sorghum bicolor* (Sb02g024760 Phytozome) y *Zea mays* (GRMZM2G125653 Phytozome). Los alineamientos múltiples fueron realizados en el software Clustal X y el sombreado de los aminoácidos conservados se realizó en el programa Boxshade v. 3.21. Posteriormente se alinearon en el programa Mega 5 con el algoritmo Muscle para, a partir del alineamiento, inferir el mejor modelo evolutivo para el árbol filogenético.

2.2.4 Análisis filogenético

Para realizar el análisis filogenético se infirió un árbol filogenético, donde se utilizaron 18 secuencias de aminoácidos de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas de diferentes especies de plantas, a *AtWRKY18* de *Arabidopsis* y la secuencia predicha *CsWRKY18* de naranja dulce (Eulgem, 2005; Agarwal *et al*; 2011). Se realizó un alineamiento de las secuencias anteriormente mencionadas con Muscle; a este alineamiento se le calculó el mejor modelo evolutivo el cual fue JTT: Jones-Taylor-Thornton más una distribución gama de 0.69 (Nei y Kumar, 2000; Tamura *et al*; 2011) y con ese alineamiento y ese modelo se pudo inferir el árbol filogenético. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El árbol filogenético fue linearizado donde se asume una misma tasa evolutiva para todos los linajes (Felsenstein, 1985) al igual está elaborado a escala, lo que indica que la longitud de las ramas es proporcional a las distancias evolutivas. Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método de JTT con una gama de 0.69 (Jones *et al*; 1992). El análisis filogenético fue realizado utilizando el software Mega 5 (Tamura *et al*; 2011).

2.2.5 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de la secuencia CsWRKY18 de *Citrus sinensis*

Para determinar si la secuencia de aminoácidos de CsWRKY18 de *C. sinensis* podría presentar una conformación tridimensional similar a la estructura del dominio WRKY4 descrita por Yamasaki *et al*; 2005, se realizó un modelaje por homología de la estructura tridimensional de la secuencia CsWRKY18 de *C. sinensis* utilizando el programa Swiss-Model (Arnold *et al*; 2006) desarrollado por el instituto suizo de bioinformática. Este programa calcula una predicción del modelo tridimensional basándose en la homología encontrada por el alineamiento entre la secuencia sometida al programa y la base de datos del "Protein Data Bank", el cual contiene la estructura tridimensional de miles de proteínas que se han modelado por métodos experimentales de espectrofotometría o de resonancia magnética nuclear (Guex y Peitsch 1997, Schwede *et al*; 2003, Bordoli *et al*; 2009). Se utilizaron los parámetros predeterminados por el programa.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Identificación de una secuencia homóloga a *AtWRKY18* en *Citrus sinensis*

El BLASTP comparó nuestra secuencia de referencia (query) (*AtWRKY18* /AAM65594) con el genoma de *C. sinensis*, así se encontraron secuencias homólogas según los parámetros preestablecidos por BLASTP (Figura 2.1). Por cada referencia se analizó e identificó la secuencia con mayor puntaje (Score), y menor valor E (probabilidad de que el alineamiento BLASTP haya ocurrido al azar) (Cuadro 2.1).

Cuadro 2. 1 Resultados de la búsqueda de la secuencia homóloga a *AtWRKY18* en el genoma de *C. sinensis*. Utilizando la base de datos Phytozome. Se reporta el primer resultado.

Número de accesión Phytozome	% de identidad	% de similitud	% de coverage (cobertura)	Valor E	Score
orange1.1g020831m	45.5%(131/288)	61.6%(177/288)	92.90322	9.3e-58	221.1

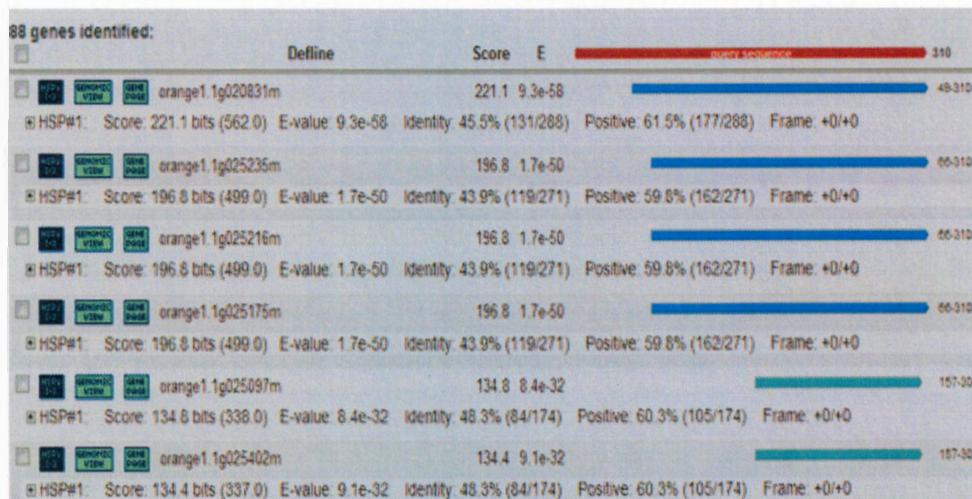


Figura 2. 1 Identificación de un homólogo de *AtWRKY18* en el genoma de *C. sinensis* (Phytozome, 2011).

2.3.2 Obtención de marco de lectura abierto y diseño de oligonucleótidos

La secuencia homóloga de *AtWRKY18* para *C. sinensis* fue denominada *CsWRKY18*. La ORF predicha de *C. sinensis* contiene el dominio WRKY de unión al ADN. La ORF cuenta con 966 pb que codifican para una proteína de 321 aminoácidos (**Figura 2.2**). Esta secuencia presentó homología con el gen que codifica para el factor de transcripción *AtWRKY18*. A partir de estos datos se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar mediante RT-PCR la ORF predicha. También, se diseñó una pareja de oligonucleótidos internos. Los oligonucleótidos para la ORF fueron los siguientes: *CsWRKY18* ORF (Forward) 5'-tattcggagctcaacaatggattcaacgtgggtggac-3' y *CsWRKY18* ORF (Reverse) 5'-ttacgagtcgacctagagtgaccatctttgtg-3'. Para los oligonucleótidos internos se diseñaron los siguientes: *CsWRKY18* RT-PCR (Forward) 5'-attgagccctagccatgttc-3' y *CsWRKY18* RT-PCR (Reverse) 5'-tagctgctgcaagtgtgctg-3', a una escala de 0.025 μ mol. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la compañía SIGMA.

1	ATG GAT TCA ACG TGG GTG GAC ACC TCT CTT GAC CTC AAT CTC AAT	45
1	M D S T W V D T S L D L N L N	15
46	CTT CTG AAT CAC AGT AGT GAA GTT CCG AAG AGA GAG TTT AAG GGA	90
16	L L N H S S E V P K R E F K G	30
91	GAT CAC TTT GCT GAA TTT GAA GAG AGA GCT TCA GTT AAA CAA GAG	135
31	D H F A E F E E R A S V K Q E	45
136	ACT GGA ATT TTG GTG GAG GAA TTG AAT AGG ATA AGC ACT GAG AAC	180
46	T G I L V E E L N R I S T E N	60
181	AAG AAG CTG AAT GAA ATG CTT TCC ATT TTG TGT AAG AAT TAC AAC	225
61	K K L N E M L S I L C K N Y N	75
226	AAT TTG CGG CAG CAG TAC ATG GAT TTG ATG AAC AAG AAC ACA GAA	270
76	N L R Q Q Y M D L M N K N T E	90
271	AAT GAA GTT GGA ATA TCA AAG AAG AGG AAG GCT GAG AGT GAA GAT	315
91	N E V G I S K K R K A E S E D	105
316	CAT TGC CAC ACG ATT GGC TTC AAT GTA CAC GCT ACT GAG TCC AGC	360
106	H C H T I G F N V H A T E S S	120
361	ACT AGT ACT GAC GAA GAG TCA TGC AAA AGG CCA AAG GAT AAC AAC	405
121	T S T D E E S C K R P K D N N	135
406	ACC AAG GCA AAA GTT TCT AGG TTT TAT GTG AGA GCC AGT GAT TCA	450
136	T K A K V S R F Y V R A S D S	150
451	AAT TCA ACC CTG ATT GTG AAG GAT GGG TAT CAA TGG AGA AAG TAT	495
151	N S T L I V K D G Y Q <u>W R K Y</u>	165
496	GGC CAA AAG GTT ACA AGA GAC AAC CCA TCA CCT AGG GCT TAC TTC	540
166	<u>G Q K</u> V T R D N P S P R A Y F	180
541	AAG TGT TCT TTC GCC CCA AGC TGT CCC GTA AAG AAGAAG GTG CAA	585
181	K C S F A P S C P V K KK V Q	195
586	AGA AGT GCT GAG GAT CCA TCA ATT TTA GTG GCA ACT TAT GAA GGA	630
196	R S A E D P S I L V A T Y E G	210
631	GAG CAT AAT CAT CCT CAG CCT ACG GAT TCA AAA GCT GAA TTA TCA	675
211	E H N H P Q P T D S K A E L S	225
676	TTG AGC CCT AGC CAT GTT GCA ACT ATT GGA AAT CCT ATT CAT GTT	720
226	L S P S H V A T I G N P I H V	240
721	TCT GCG GCG TCA TCG ATG CTA TCA GCA AGC CCT ACT GCA ACT CTT	765
241	S A A S S M L S A S P T A T L	255
766	GAT ATG ATT CAA CCT GGA TTT TTG TTT GAT GAT GCC AAA AAA TCA	810
256	D M I Q P G F L F D D A K K S	270
811	TCA GTT CAA CAA ATT GAA GCT CCA GCA ATC CAT CAG ATT TTG GTC	855
271	S V Q Q I E A P A I H Q I L V	285
856	CAA CAA ATG GCT TCT AAT TTG ACC AAA GAT CCT AAT TTT ACA GCA	900
286	Q Q M A S N L T K D P N F T A	300
901	GCA CTT GCA GCA GCT ATT TCA GGA AGA TTT GCT GAT CAG GCC CGA	945
301	A L A A A I S G R F A D Q A R	315
946	ACA CAA AGA TGG TCA CTC TAG	966
316	T Q R W S L *	

Figura 2. 2 Marco de lectura abierto de la secuencia CsWRKY18.

2.3.4 Análisis filogenético

El árbol filogenético muestra que la secuencia de CsWRKY18 de *C. sinensis* (Remarcado en rojo) se agrupa con otras pertenecientes al grupo II (Figura 2.4). Más específicamente, se muestra que la secuencia homóloga de AtWRKY18 de *C. sinensis* (CsWRKY18) y AtWRKY18 se encuentran en el grupo IIa. En este árbol filogenético se incluyeron secuencias pertenecientes a los grupos I y III de los WRKYs tanto de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Diversos estudios han realizado diferentes arboles filogenéticos comparando secuencias WRKY para su clasificación (Wang *et al.*; 2006; Lai *et al.*; 2008; Agarwal *et al.*; 2011). La clasificación de las secuencias utilizadas en el árbol filogenético de la Figura 2.4, corresponden a la clasificación descrita por Eulgem *et al.*; 2000, Yamasaki *et al.*; 2005, Agarwal *et al.*; 2011.

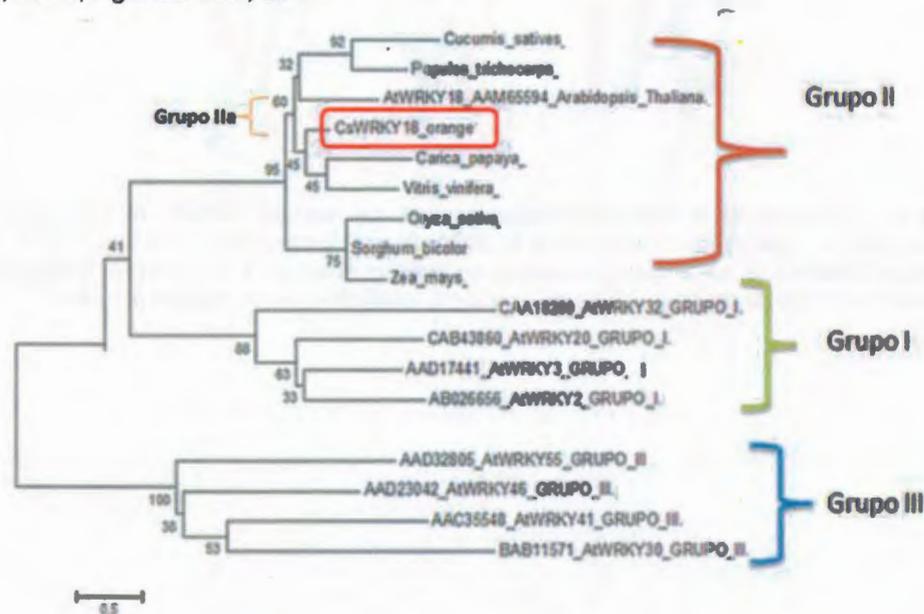


Figura 2. 4. Árbol filogenético de CsWRKY18 con otras secuencias homólogas.

2.3.5 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de la secuencia CsWRKY18 de *Citrus sinensis*

En la **Figura 2.5** se observa el análisis de la estructura tridimensional del dominio WRKY de unión al ADN. La estructura tridimensional de la secuencia homóloga (*CsWRKY18*) a *AtWRKY18* cuenta con 4 estructuras β -plegadas y con residuos de Cisteína-Histidina que hacen posible la unión al ADN, localizados en la cadena β -1 y β -4.

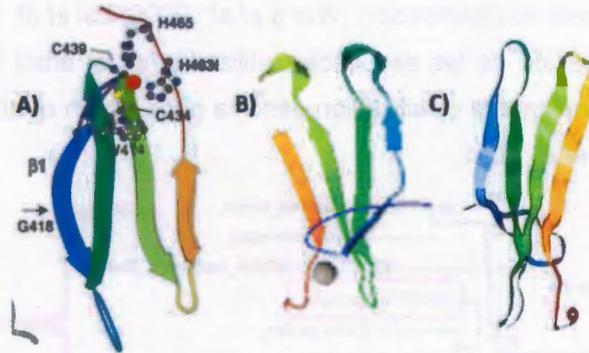


Figura 2.5 Análisis de la estructura tridimensional del dominio WRKY. A) Estructura del dominio *WRKY4* descrita por Yamasaki *et al*; 2005. B) y C) Estructura del dominio WRKY de la secuencia *CsWRKY18*, en ambas estructuras se pueden observar 4 estructuras β -plegadas y con la unión al ADN de residuos (Cisteína-Histidina) localizados en la cadena β -1 y β -4.

2.4 DISCUSIÓN

Es una realidad que la citricultura es una actividad agronómica e industrial de suma importancia para la economía mexicana, siendo México uno de los principales productores de cítricos; es por ello que en los últimos años se han buscado nuevas alternativas para contrarrestar los efectos de las enfermedades que afectan a la citricultura, ya que las medidas de control tradicionales no han resultado ser suficientes. Dentro de esas nuevas alternativas se ha recurrido a la biotecnología como parte importante en el desarrollo de nuevas estrategias para aminorar los efectos de las enfermedades causadas por patógenos como lo son la cancrrosis de los cítricos y el Huanglongbing (HLB), las cuales generan pérdidas importantes de producción, y su sintomatología es mimética y engañosa, ya que fácilmente se confunde con otras enfermedades de fácil control y con deficiencias nutricionales (Hocquellet *et al.*; 1999; Knighten *et al.*, 2005; Polek *et al.*; 2007; Sechler *et al.*; 2009; Sánchez, 2010). Actualmente se cuenta con la secuencia del genoma completo de *Citrus sinensis*, el cual es el cítrico más importante en cuanto a producción y economía a nivel mundial y nacional. La publicación de la secuencia genómica de *C. sinensis* ofrece la posibilidad de analizar su genoma y buscar genes involucrados en la resistencia a patógenos, para desarrollar variedades resistentes que resuelvan o contrarresten la pérdida de la producción.

Los factores de transcripción (FT) se han considerado como el futuro de muchas aplicaciones biotecnológicas para la generación de variedades resistentes a diversas condiciones ambientales, ya que son los reguladores clave de los procesos de transcripción del genoma, por esta razón los FT son secuencias clave para la generación de cultivos resistentes a enfermedades, (Eulgem *et al.*, 2000; Eulgem, 2005; Eulgem y Somssich, 2007, Century *et al.*; 2008). Actualmente con los cambios ambientales a los que la humanidad se está enfrentando, se necesita cubrir la necesidad alimenticia de manera urgente, y en el área agronómica se requieren de variedades resistentes a estrés biótico, para cubrir esta necesidad básica de alimentación, y los cítricos están entre los cultivos tropicales más apreciados por su alto valor nutricional.

Se han realizado diferentes estudios que muestran a los FT tipo WRKY como los responsables de conferir resistencia al ataque de patógenos, y en los últimos años estos FTs han sido motivo de muchos estudios por su participación preferencial en

estrés biótico, lo cual los hace excelentes candidatos de estudio para mejorar la resistencia de los cultivos a condiciones de estrés biótico (Eulgem *et al*; 2000; Eulgem, 2005; Eulgem y Somssich, 2007; Argüello y Negaresh, 2009, Rushton *et al.*, 2010, Agarwal *et al.*, 2011). La familia de FT tipo WRKY ha sido reportada en las secuencias genómicas de plantas, 74 en *Arabidopsis*, alrededor de 100 en arroz, 197 en soya, 66 en papaya, 68 en sorgo y 38 en el musgo *Physcomitrella patens*. (Ülker *et al*; 2004). Varios de los genes WRKY funcionan como reguladores positivos o negativos de la expresión de genes de defensa. Entre los WRKY que funcionan como reguladores positivos se encuentran el gen *AtWRKY18* de *Arabidopsis thaliana*. La expresión del gen *AtWRKY18* se induce en respuesta a la acumulación de ácido salicílico y la actividad de NPR1 (Chen y Chen 2002; Eulgem y Somssich 2007; Wang *et al*; 2006). Chen y Chen en el 2002, demostraron que la sobre-expresión de *AtWRKY18* en *Arabidopsis* conduce a un aumento en la tolerancia contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Gracias a este hecho interesante es posible realizar la búsqueda y caracterización de secuencias homólogas a WRKY en cultivo tropicales.

En la presente tesis se realizó un análisis bioinformático y se identificó un homólogo de *AtWRKY18* en el genoma secuenciado de *Citrus sinensis* y se caracterizó *in silico* la secuencia, nombrada como *CsWRKY18*, la cual mostró una estructura similar a la de factores de transcripción WRKY funcionalmente caracterizados.

El alineamiento múltiple nos confirmó que el dominio WRKY de unión al ADN se encuentra altamente conservado en la secuencia homóloga encontrada de *CsWRKY18*. En estudios posteriores se han realizado diversos alineamientos en diferentes especies tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (arroz, papaya, pepino, sorgo, *Arabidopsis*, uva, etc.), demostrando que el dominio WRKY de unión al ADN se encuentra altamente conservado (Eulgem *et al*; 2000; Chen y Chen 2002; Eulgem; 20005; Yamasaki *et al*; 2005; Ülker *et al*; 2004; Wang *et al*; 2006, Eulgem y Somssich 2007; Rushton *et al*; 2010; Agarwal *et al*; 2011), como lo es en este caso de *CsWRKY18*.

El análisis filogenético demostró que *CsWRKY18* es homólogo de *AtWRKY18* de *Arabidopsis thaliana*, por lo cual es posible que este homólogo codifique para un factor de transcripción tipo WRKY involucrado en la defensa a patógenos bacterianos dependiente de la ruta del ácido salicílico. La secuencia homóloga *CsWRKY18* corresponde al grupo IIa de la clasificación de los FT WRKY.

Sus homólogos más cercanos de acuerdo al árbol filogenético son *Carica papaya* y *Vitris vinifera*, algunos FT WRKY para estas especies ya han sido identificados y actualmente se siguen estudiando ya que aún no se tiene clara la función específica de cada uno de estos WRKY (Wang *et al*; 2006; Rushton *et al*; 2010; Agarwal *et al*; 2011). El grupo II presenta un solo dominio de unión al ADN y tienen el mismo tipo de motivo de dedo de zinc (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H) que el grupo I. Aunque adicionalmente el grupo II se divide en subgrupos (a-e) basados en motivos adicionales de aminoácidos presentes fuera del dominio WRKY (Rushton *et al*; 2010; Agarwal *et al*; 2011). Numerosos estudios han realizado diferentes árboles filogenéticos de los WRKYs de diferentes especies y así han logrado clasificarlos de acuerdo a sus características estructurales y moleculares; con el fin de poder entender cada una de las funciones específicas de cada grupo. Aunque aún no hay algo claro en relación a esto (Eulgem *et al*; 2000; Eulgem; 2005; Ülker *et al*; 2004; Yamasaki *et al*; 2005; Wang *et al*; 2006, Eulgem y Somssich 2007; Rushton *et al*; 2010; Agarwal *et al*; 2011). Aunque estudios realizados por Ülker y colaboradores en el 2004 argumentan que la clave de la clasificación de los WRKYs se debe a cuestiones evolutivas, donde la ganancia y pérdida de dominios condujo a la expansión de la familia de genes WRKY, y una rápida amplificación de los genes WRKY lo que predice la divergencia de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Ülker *et al*; 2004).

La predicción del modelaje por homología del dominio WRKY de naranja dulce, resultó de una estructura tridimensional de 4 estructuras β -plegadas y con la unión al ADN de residuos (Cisteína-Histidina) localizados en la cadena β -1 y β -4, similar a la del dominio WRKY4 de *A. thaliana*, descrita por Yamasaki *et al.*, 2005; por lo cual posiblemente su función sea la misma.

Gracias a la identificación *in silico* de la secuencia CsWRKY18 fue posible realizar la clonación del ADN complementario de CsWRKY18 y los resultados de este trabajo se muestran y discuten en el siguiente capítulo.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal P. M; Reddy P; y Chikara J. (2011). WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants. *Mol. Biol. Rep.* 38:3883–3896.
- Arnold K; Bordoli L; Kopp J; y Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22:195-201.
- Alemán J; Baños H; y Ravelo J. (2007). *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: Una combinación destructiva para la producción citrícola. *Rev. Protección Vegetal.* 22 (3): 154-165.
- Argüello M.I; y Negaresh S. (2009). Presencia de genes (WRKY) asociados a la respuesta al estrés biótico en cacao de Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1):41-46.
- Bordoli L; Kiefer F; Arnold K; Benkert P; Battey J; y Schwede T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, 4, 1-13.
- Campbell M.A; Fitzgerald H.A; y Ronald P.C. (2002). Engineering pathogen resistance in crop plants. *Transgenic Research*, 11: 599–613.
- Civerolo E.J. (2009). Liberibacters associated with citrus Huanglongbing and potato zebra chip, USDA. Agricultural Research Service Parlier, California, Disponible en: edwin.civerolo@ars.usda.gov (Consultado en Septiembre 2011).
- Chen C. y Chen Z. (2002). Potentiation of Developmentally Regulated Plant Defense Response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced Arabidopsis Transcription Factor. *Plan Physiology*. 129:706.716.
- Delgadillo V. I. (2010). Huanglongbing, importancia y manejo. 4a Semana Internacional de la citricultura, Martínez de la Torre, Veracruz/México. 1 - 4 de Diciembre 2010.

Eulgem T; Rushton J.P; Robotized S; y Somssich E.I. (2000).The WRKY superfamily of plant transcription factors.Trends in Plant Science. 5:199-206.

Eulgem T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. Trends in Plant Science. 10: 71-78.

Eulgem y Somssich (2007). Network of WRKY transcription factors in defense signaling. Current Opinion in Plant Biology 10: 366-371.

FAO. (2011).Estadísticas de FAO. Sistema FAOSTAT. Disponible en:
<http://faostat.fao.org/>

FAOSTAT, (2011).Sistema FAOSTAT. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Floyd J. M; y Krass C. (2006).New Pest Response Guidelines: Citrus Greening Disease. USDA-APHIS-PPQ- Emergency and Domestic Programs, Riverdale, Maryland.

Guex N; y Peitsch M. C. (1997).SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18: 2714-2723.

Gurr S.J; y Rushton P. J. (2005).Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? TRENDS in Biotechnology, 23, 275-282.

Hocquellet A; Bové J. M ; y Garnier M. (1999). Isolation of DNA from the Uncultured "Candidatus Liberobacter" species associated with citrus Huanglongbing by RAPD, Current Microbiology. 38:176–182.

IICA, (2010).

Jones D.T; Taylor W.R; y Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.

Knighten C; Redding J; Feiber D; y Compton L. (2005). U.S. Department of Agriculture and Florida Department of Agriculture confirm detection of citrus greening. http://www.doacs.state.fl.us/press/2005/09022005_2.html

Martínez C. J. L. (2009). Huanglongbing, Ficha Técnica, SAGARPA/SENASICA.

Nei M; y Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-Fito-2009. Ciudad de México, D. F., a 2 de julio de 2009. El Coordinador General Jurídico, González-Muñoz W. R.

Plan Rector Sistema Nacional Cítricos. (2005). Diagnóstico Inicial Base de Referencia estructura Estratégica, Segunda Fase. Documento validado por el comité sistema producto cítricos en sesión del 17 de febrero de 2005, Tampico, Tamaulipas, México.

Polek M; Vidalakis G; y Godfrey K. (2007). Citrus Bacterial Canker Disease and Huanglonging (Citrus Greening). Regents of the University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 8218. <http://anrcatalog.ucdavis.edu>

Robles G. P. L. (2008). Manual técnico para la detección del Huanglongbing de los cítricos. Dirección de protección fitosanitaria. SAGARPA/SENASICA/INIFAP.

Ruiz C. E; Coronado B.J.M; y Myartseva S.N. (2008). Psílido Asiático de los Cítricos, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). 26:323-331, Primera Edición. Casos de Control Biológico en México.

Rushton P. J; Soomssich I. E; Ringler P; y Shen Q. J. (2010). WRKY transcription factors. Trends in Plant Science.15:5.

SAGARPA, (2008).<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>

SAGARPA, (2010).<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>

SAGARPA, (2011).<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>

Saitou N, y Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*4:406-425.

Sánchez A. H. (2010). HLB en México, Antecedentes, Situación Actual y perspectivas, 4a Semana Internacional de la Citricultura, Martínez de la Torre, Veracruz/México. 1 - 4 de Diciembre 2010.

Schwede T; Kopp J; Guex N; y Peitsch M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385.

Schwarz R; y Dayhoff M. (1979). Matrices for detecting distant relationships. In: Dayhoff M., editor, *Atlas of protein sequences*, pages 353-58. National Biomedical Research Foundation.

Sechler A; Schuenzel E.L; Cooke P; Donnua S; Thaveechai N; Postnikova E; Stone A.L; Schneider W.L; Damsteegt V.D; y Schaad N.W. (2009). Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with Huanglongbing. *Phytopathology*. 99(5):480-486

SENASICA, (2010).www.senasica.gob.mx/

Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, SAGARPA (2011). Consulta de Indicadores de Producción, Precios y Márgenes de Comercialización Nacional de Naranja. Disponible en: www.siap.sagarpa.gob.mx

SIAP, (2011). <http://www.siap.gob.mx/>

SIACON, (2011).<http://www.siap.gob.mx/>

Singh S; y Rajam M.V. (2009). Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15(1):3-22.

- Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. (2011) Consulta de precios de Naranja. Disponible en: www.economiasniim.gob.mx
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Agosto (2011). Análisis Epidemiológico Fitosanitario/Reporte Epidemiológico 011/HLB y Psílido asiático de los Cítricos, *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Diaphorina citri*.
- Tamura K; Peterson D; Peterson N; Stecher G; Nei M; y Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Tapia C. G. (2009). Programa para la detección y control de Huanglongbing o Greening de los cítricos en la Región de OIRSA, Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) (FAO, Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (2007).
- Trujillo A. J; Sánchez A. H.M, y Robles G.P.L. (2008). Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos en México, Hermosillo, Sonora, México. SAGARPA/SENASICA/Dirección General de Sanidad Vegetal, Disponible en: trujillo@senasica.gob.mx (Consultado en Septiembre 2011).
- Ülker B; y Somssich E.I. (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:491-498.
- Wang D; Amornsiripanitch N; y Dong X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PloS Pathogens* 2: e123.
- Yamasaki K; Kigawa T; Inoue M; Tateno M; Yamasaki T; Yabuki T; Aoki M; Seki E; Matsuda T; Tomo Y; Hayami T; Terada T; Shirouzu M; Tanaka A; Seki M; Shinozaki K; y Yokoyama S. (2005). Solution Structure of an Arabidopsis WRKY DNA Binding Domain. *The Plant Cell*, Vol. 17, 944–956.

Yu C; Huang S; Chen C; Deng Z; Ling P; y Gmitter F.G; Jr. (2002).Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*71: 147–155, 2002.

Yu D; Chen C; y Chen Z. (2001).Evidence for an Important Role of WRKY DNA Binding Proteins in the Regulation of *NPR1* Gene Expression. *The Plant Cell*, Vol. 13, 1527–1539.

Zhang X; Francis M.L; Dawson W.O; Graham J.H; Orbovic V; Triplett E.W. y Mou Z. (2010).Over-expression of the Arabidopsis *NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur J Plant Pathol*. 128:91-100.

CAPÍTULO III

Clonación del ADN complementario de un homólogo de *AtWRKY18* en *C. sinensis* y generación de una construcción de expresión para transformar a la planta modelo de tabaco

3.1 INTRODUCCIÓN

La manipulación genética de los cítricos a través de técnicas convencionales es siempre una tarea difícil para los criadores de plantas, debido a las diversas limitaciones biológicas que presenta entre las cuales destacan: un largo período juvenil, alta heterocigosidad, incompatibilidad sexual, poliembriónia nucelar y gran tamaño de las plantas que dificultan de manera considerable la mejora del cultivar; es por ello que se han realizado varios intentos para mejorar los cítricos mediante el uso de diversas técnicas *in vitro* (Singh y Rajam, 2009).

Los cítricos *sps* son ampliamente conocidos por su recalcitrancia a la transformación y el enraizamiento posterior, esto podría deberse a los diferentes genotipos y las diferentes respuestas fisiológicas de las técnicas de cultivo, pero la investigación constante ha llevado al establecimiento de protocolos mejorados para asegurar la producción de plantas transformadas de manera uniforme, aunque con una eficiencia relativamente baja, dependiendo del genotipo (Singh y Rajam, 2009; Zhang *et al*; 2010).

Los programas de mejoramiento se enfocan en la generación de plantas con resistencia o mayor tolerancia a estrés biótico o abiótico conduciendo a una mayor producción. En los últimos años, el mejoramiento genético basado en la biotecnología, es una estrategia eficaz en el desarrollo de variedades resistentes a diversos fitopatógenos (Campbell *et al*; 2002; Gurr y Rushton 2005; Singh y Rajam, 2009; Zhang *et al*; 2010). A pesar de que se cuenta con esta herramienta poderosa para el desarrollo de dichas variedades, el conocimiento que se tiene de los genes involucrados en la resistencia contra patógenos en este cultivo es muy limitado.

La publicación de la secuencia genómica completa de la naranja (*Citrus sinensis*), nos facilitará la caracterización sistemática de todos los genes de la naranja involucrados en la resistencia a estrés biótico, lo cual facilitará el mejoramiento genético del cultivo.

La transformación genética se ha convertido en un enfoque importante en programas implicados en la mejora de cultivares de cítricos permitiendo a los investigadores introducir genes específicos en cultivares superiores ya existentes, manteniendo la integridad cultivar (Orbovic y Grosser, 2006).

Se han hecho grandes esfuerzos en la obtención de plantas transgénicas de cítricos a través de la transformación de protoplastos mediante la introducción directa de ADN y por el empleo de *Agrobacterium rhizogenes*, y de *Agrobacterium tumefaciens* (Orbovic y Grosser, 2006).

En este capítulo de investigación se tiene por objetivo generar una construcción de expresión con el ADNc de CsWRKY18 para transformar a la planta tabaco, utilizando a *A. tumefaciens*. Tabaco es una planta modelo de rápido desarrollo y ciclo de vida corto por lo que es posible obtener plantas transgénicas en corto tiempo; se ha utilizado con éxito en técnicas de cultivo *in vitro* y transformación genética utilizando a *A. tumefaciens* como vehículo de transformación; por lo tanto tabaco es una buena opción para la transformación genética y probar *in vivo* el funcionamiento de un gen como en este caso CsWRKY18 (Clemente, 2006).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material Vegetal

El material vegetal que se utilizó en este proyecto fueron plántulas jóvenes de *Citrus sinensis* obtenidas de un vivero cítrico de la ciudad de Mérida, Yucatán (certificado N° VPPC/2005/31/42). Las plántulas obtenidas se trasplantaron en el vivero del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, para su posterior uso. El material vegetal de tabaco que se utilizó fueron hojas jóvenes de tabaco de plantas germinadas en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

3.2.2 Extracción de ARN y ADN

La extracción de ADN y ARN se hizo con el estuche comercial de PHYTOPURE ILUSTRÁ. Se utilizó de 100 a 150mg de tejido de hoja, el cual fue macerado en nitrógeno líquido con un mortero y un pistilo. El tejido pulverizado se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 600 µl del reactivo 1 y 10 µl de β-mercaptoetanol. Se mezcló invirtiendo el tubo y se le agregaron 200 µl del reactivo 2, se mezcló por inversión hasta homogenizar. La muestra se incubó a 65 °C por 10 minutos, agitando cada 2 minutos en vortex. Después de la incubación se colocó en hielo por 20 minutos y posteriormente, los ácidos nucleídos se separaron del material proteico agregando 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) frío (-20 °C). Luego se agregó 100 µl de Nucleon Resin perfectamente mezclada en vortex antes de su utilización. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos agitando cada 2 minutos en vortex. Se separaron las fases centrifugando 10 minutos a 2214 rcf, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Se centrifugó nuevamente a 8855 rcf durante 5 minutos y nuevamente se transfirió a un tubo nuevo. Se precipitaron los ácidos nucleídos con 1 volumen de isopropanol frío, se centrifugó a 8855 rcf durante 5 minutos para conseguir un pellet (pastilla). Se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con 1 mL de etanol frío, cada lavado se realizó con una centrifugación a 8855 rcf durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente aproximadamente 15 minutos. Se resuspendió en 40 µl de H₂O ultrapura, se incubó a 65 °C por 10 minutos agitando con vortex cada 2 minutos y enfriando en hielo por 3 minutos. Se pipeteó arriba y abajo para mezclar y se centrifugó a 8855 rcf durante 1 minuto para remover desechos. Se transfirió a un tubo nuevo. Se corrió una electroforesis con un gel de agarosa al 1.2%.

Con 0.36 gramos de agarosa y 30 mL de TAE 1X (Tris, Ácido Acético y EDTA), se calentó la agarosa durante 45 segundos en el horno de microondas y se dejó enfriar hasta que no esté demasiado caliente y se pueda manejar (evitar que se solidifique), se agregaron 0.05 µl de bromuro de etidio y se vació en el porta geles de la cámara de electroforesis, a un voltaje de 9 V/cm durante 85 minutos.

3.2.3 Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría

Para estimar la concentración y el nivel de pureza del ADN extraído se utilizó un espectrofotómetro SmartSpect plus de BioRad. Para cuantificar la concentración se tomó 5 µl de muestra + 95 µl de H₂O ultra pura (dilución 1:20). Para medir la pureza se tomó 5 µl de muestra + 95 µl Tris HCl 10 mM pH 7.5 y se midió en un relación A260/A280. Dicho método se realizó siguiendo las recomendaciones de Qiagen (Qiagen, 2001).

3.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa utilizando como plantilla ADN genómico

La amplificación por PCR de la secuencia de interés se realizó utilizando los pares de oligonucleótidos que amplifican la ORF completa del gen de interés 1,475 pb. Y los pares de oligonucleótidos que amplifican un fragmento interno de la ORF de un exón de 242 pb.

Cuadro 3. 1 Amplificación de ADNg de *CsWRKY18*.

oligonucleótidos diseñados	Secuencia de los oligonucleótidos diseñados	
<i>CsWRKY18</i> (1475 pb)	Forward	5'-TATTCGGAGCTCAACAATGGATTCAACGTGGGTGGAC-3'
	Reverse	5'-TTACGAGTTCGACCTAGAGTGACCATCTTTGTG-3'
<i>CsWRKY18</i> (242pb)	Forward	5'-ATTGAGCCCTAGCCATGTTGC-3'
	Reverse	5'-TAGCTGCTGCAAGTGCTGCTG-3'

Cuadro 3. 2 Mix: Mezcla de reacción para amplificación del ADN.

Mezcla de reacción de 48µL			
Reactivos:	Concentración:		Vol. (µl).
Agua Ultrapura	76.4 µl		38.3
Buffer PCR	10X	10 µl	5
dNTP 10 Mm	10mM	2 µl	1
MgCl ₂ 25mM	50mM	3 µl	1.5
Oligo ORF (F) (Rev)	10µM	1µl/u	1
Oligo RT-PCR(F) (Rev)	10µM	1µl/u	1
Tap Pol comercial 5U/ µl	5U/ µl	0.4 µl	0.2
ADN	4µl		2

El programa empleado en el termociclador fue: Inicio: 95 °C (3min), 35 ciclos (95 °C/ 30s, 50 °C/ 30min, 72 °C/ 2 min), Final: 72 °C (5min). Enfriamiento 12 °C.

Se corrió una electroforesis con un gel de agarosa al 1.2%. Con 0.36 gramos de agarosa y 30mL de TAE 1X (Tris, Ácido Acético y EDTA) se calentó la agarosa durante 45 segundos en el horno de microondas y se dejó enfriar hasta que no esté demasiado caliente y se pueda manejar (evitar que se solidifique), se agregaron 0.05 µl de bromuro de etidio y se vació en el porta geles de la cámara de electroforesis, con un voltaje de 9 V/cm durante 85 minutos.

3.2.5 Síntesis de ADN complementario

La síntesis de ADNc partió de una muestra de 8 µg de ARN total, se agregó 1 µl (50 µM) de oligo dT primer y la cantidad de agua necesaria para llegar a un volumen de 20 µl, se calentó la muestra a 75 °C por 5 minutos para linearizar los ARN mensajeros y se enfrió la muestra en hielo por 3 minutos. A los 20 µl se agregaron 8 µl de buffer de la enzima transcriptasa reversa (5 X first strand buffer), 4 µl 0.01M de DTT (0.1M), 4 µl de dNTP's (10 mM) y 2 µl de inhibidor de RNasas (RNase OUT 40U/µl. Invitrogen). Los 38 µl de reacción se dividieron en dos tubos diferentes con 19 µl cada uno. En el primer tubo se agregó 1 µl de enzima reversa transcriptasa (Súper Script III 200 U/ µl. Invitrogen) y en el segundo tubo se agregó 1 µl de agua ultra pura como control negativo para descartar contaminación por ADN genómico. La reacción se incubó por 90 minutos a 50 °C, después se inactivó la enzima incubando la muestra a 75 °C por 15 min. Seguidamente se agregaron 2 µl de RNasa A (10mg/ml) para degradar el ARN remanente incubando la muestra a 37 °C por 30 min. Finalmente, se agregó 80 µl de

H₂OUP (dilución 1:5) para ajustar la reacción a un volumen final de 100 µl y se conservó a -20 °C.

3.2.6 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando 5 µl de ADNc como plantilla. El programa para llevar a cabo la reacción utilizó una temperatura inicial de desnaturalización de 95 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 50 °C por 30 s y 72 °C por 2 minutos; y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Como control positivo para comprobar que no haya una carga diferencial en el gel y para corroborar que los componentes de la reacción funcionen adecuadamente, se utilizaron oligonucleótidos para el gen del factor de elongación 1 alfa (EF1α) de *C. sinensis*, y los oligonucleótidos que amplifican una región interna de la ORF (242 pb). El control negativo también utilizó estos oligonucleótidos en la muestra sin retrotranscriptasa, en este caso no se esperaba ver amplificación, de ocurrir sería un indicativo de contaminación de la reacción con ADN genómico. Los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la RT-PCR se muestran en el cuadro.

Cuadro 3. 3 Amplificación de ADNc en el gen homólogo *CsWRKY18*.

oligonucleótidos diseñados	Secuencia de los oligonucleótidos diseñados	
<i>CsWRKY18</i> ORF (966 pb)	Forward	5'- TATTCGGAGCTCAACAATGGATTCAACGTGGGTGGAC- 3'
	Reverse	5'-TTACGAGTCGACCTAGAGTGACCATCTTTGTG-3'
<i>CsWRKY18</i> (242 pb)	Forward	5'-ATTGAGCCCTAGCCATGTTGC-3'
	Reverse	5'-TAGCTGCTGCAAGTGCTGCTG-3'
EF1a <i>Citrus sinensis</i> (212 pb)	Forward	5'-TTCACCCTTGGTGTGAAGC-3'
	Reverse	5'-TACCAGTCAAGGTTCTGTGG-3'

3.2.7 Clonación del ADNc de CsWRKY18 en el vector pGEM-TEasy

El fragmento amplificado de 966 pb se purificó con el High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) previo a la clonación, se ajustó el volumen de PCR a 100 μ l, en un tubo eppendorf nuevo se agregaron los 100 μ l de muestra + 500 μ l de buffer de unión y mezcló homogéneamente. Se transfirió la mezcla a una columna de purificación y se centrifugó a 12052 rcf por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se agregó 500 μ l de buffer de lavado centrifugando a 12052 rcf por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se agregaron 200 μ l de buffer de lavado centrifugando a 12052 rcf por 1 minuto. Se cambió la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo, seguido se eluyó el ADN con 50 μ l de buffer de elución y centrifugó a 12052 rcf por 1 minuto. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso. La clonación se utilizó el vector pGEM-TEasy de PROMEGA (Figura 3.1). La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l con las siguientes condiciones: 7.8 μ l del inserto purificado (CsWRKY18), 1 μ l de buffer de ligasa 10X, 1 μ l de vector pGEM-TEasy (50 μ g/ μ l), 0.2 de la enzima T4 ADN ligasa (1 U/ μ l; NEB). Se incubó a 16 °C por 16 horas y la enzima se inactivó a 65 °C por 20 minutos.

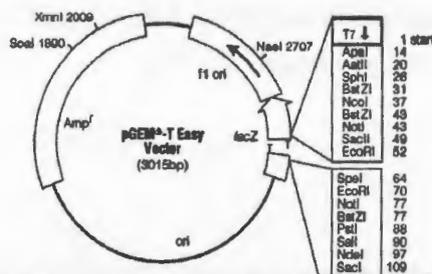


Figura 3. 1 Esquema del vector de clonación pGEM®-T Easy.

Para la transformación se utilizó 10 μ l de la ligación (toda la ligación) + 200 μ l de células competentes de *Escherichia coli* DH10B e se incubaron en hielo por 30 minutos. Se dio un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos, se incubó en hielo 2 minutos y se agregó 800 μ l de medio SOC para recuperar las bacterias a 37 °C por 90 minutos de 180-185 rpm. 100 μ l de bacterias fueron plaqueadas en cajas con medio LB sólido con 50 μ l de ampicilina (100 mg/ μ l) como antibiótico de selección, 250 μ l de IPTG (0.1 M) para inducir la expresión del gen lacZ y 80 μ l de XGAL (80 μ g/ μ l) como sustrato de la β -galactosidasa. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 16 horas para observar colonias blancas y azules. Para la selección de colonias recombinantes el vector tiene el gen lacZ localizado en el sitio de clonado múltiple de manera que cuando el inserto interrumpe el gen no permite la expresión de la β -

galactosidasa dando colonias blancas. Las colonias fueron crecidas en medio LB líquido con 5 μ l de ampicilina (100 mg/ μ l) e incubadas a 37 °C de 12-16 horas a 215 rpm. El plásmido fue extraído con el High Pure Plasmid IsolationKit (ROCHE), donde se recolectaron las células centrifugando a 4981 rcf por 30 segundos, se agregó 250 μ l de buffer de lisis e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido se agregó 350 μ l de buffer de unión frío (4 °C) e incubó en hielo 5 minutos. Se centrifugó a 12052 rcf por 10 minutos, transfiriéndose el sobrenadante a una columna (spin tubes) y se centrifugó a 12052 rcf por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó por 30 segundos más y se descartó el sobrenadante. Para lavar se añadieron 700 μ l de buffer II al filtro y se centrifugó a 12052 rcf por 30 segundos, se descartó el sobrenadante. Se centrifugó a 12052 rcf por otros 30 segundos más y descartó el sobrenadante. Finalmente se eluyó el ADN plasmídico agregando 50 μ l de buffer Tris-HCL 10mM pH 7.5 a la columna, se dejó 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 6149 rcf por 30 segundos, se recolectó el sobrenadante a un tubo nuevo. Teniendo el plásmido aislado y purificado se realizó el análisis de restricción con 1 μ l de plásmido purificado más 1 μ l de la endonucleasa *EcoRI invitrogen* (10U/ μ l), 2 μ l de buffer React 3 Invitrogen 10X y 16 μ l de H₂OUP en una reacción total de 20 μ l. Se incubó a 37 °C por 2 horas e inactivo la enzima a 65 °C por 10 minutos. El plásmido digerido fue observado en un gel de agarosa al 1.2%.

3.2.8 Secuenciación

Una vez que se comprobó que el plásmido digerido contenía la secuencia (966 pb) de nuestro gen *CsWRKY18*, se mandó a secuenciar en la Universidad de Clemson en Carolina del Sur, Estados Unidos. Se mandaron a secuenciar 50 ng. En un volumen de 2.5 μ l de H₂OUP más 1 pmol/ μ l en un volumen de 0.5 μ l de los oligonucleótidos universales que se alinean a los extremos de pGEM-TEasy, llamados M13 Forward y M13 Reverse, teniendo un volumen final de 3 μ l. Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación tanto Forward como Reverse de cada secuencia se ensamblaron con el programa SeqMan (DNASTAR Lasergene v. 7.2.1), con la finalidad de obtener la lectura final de la secuencia Forward y Reverse, el alineamiento de la secuencia *CsWRKY18 in silico* a partir de ADNc con la mejor clona secuenciada (*CsWRKY18 in vitro*) de acuerdo a la mejor lectura de la separación capilar del electroferograma se realizó con el programa Clustal X, este alineamiento se realizó con la finalidad de

verificar el inicio y término de los ORFs; el resultado del alineamiento se observó con el programa BOXSHADE 3.21.

3.2.9 Transformación de *Escherichia coli* con los plásmidos pCAMBIA 2200::35S::NOS y pGEMTEasy::CsWRKY18

Con el objetivo de obtener suficiente cantidad de los plásmidos pCAMBIA 2200::35S::NOS y pGEMTEasy::CsWRKY18 para realizar la construcción de interés, se llevó a cabo la transformación la cepa Top10 de *E. coli*. Se transfirió 1 μL de cada plásmido (pGEM-TEasy::CsWRKY18 y pCAMBIA-2200::35S::NOS) a tubos Eppendorf y se le adicionó 50 μL de células competentes homogeneizando perfectamente. Se incubó en hielo por 15 minutos y posteriormente se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos e inmediatamente enfriada en hielo por 5 minutos. Se le adicionó 1 mL de medio LB líquido (en campana de flujo laminar) y se dejó incubando a 37 °C por 45 minutos a 150 rpm. Posteriormente, en un tubo Falcon (que contenía el mL de LB líquido incubado a 37 °C anteriormente), se le agregaron 14 mL de medio LB líquido más 15 μL de cloranfenicol (50 mg/mL) para pCAMBIA-2200::35S::NOS y 14 mL de medio LB líquido más 15 μL de carbenicilina (100 mg/mL) para pGEM-TEasy::CsWRKY18, incubando a 37 °C toda la noche a 150 rpm.

3.2.10 Extracción del plásmido

Los plásmidos fueron extraídos basándose en el método de Birnboim y Doly, 1979; a partir de un volumen final de 4 mL de cultivo bacteriano sedimentado. Se resuspendió en 50 μL de Agua Milli Q estéril y el plásmido se almacenó a -20 °C.

3.2.11 Digestión de los plásmidos con enzimas de restricción *SacI* y *SaI*

Se realizaron dos reacciones de digestión, la primera corresponde a pGEM-TEasy::CsWRKY18 y la segunda a pCAMBIA-2200::35S::NOS. Cada reacción se digirió con las enzimas *SacI* y *SaI*. Cada reacción de digestión contenía lo siguiente: la primera digestión con la enzima *SacI*; en un volumen final de 20 μL : 2 μg de plásmido, 1 μL de enzima *SacI* (20 U/ μL), 2 μL de Buffer 1 10X y 15 μL de agua Milli Q estéril, se mezcló bien por pipeteo y se incubó a 37 °C por 2 horas. La digestión con la enzima

*Sa*I fue bajo las mismas condiciones con excepción de que esta enzima trabaja con diferente buffer. Se realizaron purificaciones después de cada digestión con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor, con excepción de *CsWRKY18* ya que éste solo después de la primera digestión ya que se realizó una purificación de banda (ver las condiciones en la siguiente sección). Se resuspendió en 30 µL de Agua Milli Q estéril y se almacenó a -20 °C. Las digestiones se visualizaron en un gel de agarosa 1%- TAE 1X para la comprobación de la presencia del inserto de interés.

3.2.12 Purificación de la banda de *CsWRKY18*

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1 %- TAE 1X de la digestión con la enzima *Sac*I y *Sa*I del gen *CsWRKY18*. La banda correspondiente del gen de interés fue cortada con la ayuda de un bisturí y se depositó en un tubo Eppendorf. El gen *CsWRKY18* fue purificado con el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN siguiendo las instrucciones del proveedor. Se resuspendió en 30 µL de Agua Milli Q estéril y se almacenó a -20 °C.

3.2.13 Ligación del ADNc de *CsWRKY18* a pCAMBIA 2200::35S::NOS

El ADNc de *CsWRKY18* purificado se ligó al vector pCAMBIA 2200 (purificado) que contiene al promotor 35S y al terminador NOS. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL usando 2 µL de vector; 6 µL de inserto; 1µL de la enzima T4 DNA ligasa (1U/µL), 1 µL de buffer ligasa 10X. La mezcla de ligación se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos y luego fue incubada a 16 °C toda la noche.

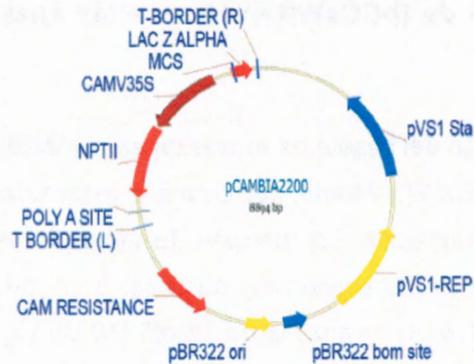


Figura 3. 2 Vector binario pCAMBIA2200. Este vector contiene el gen *nptII* que codifica la proteína neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico de kanamicina y el gen *cat* que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa que confiere resistencia a cloranfenicol. La expresión del gen *nptII* está regulada por el promotor constitutivo CaMV35S.

3.2.14 Transformación de *Escherichia coli* con la construcción (pCCsWRKY18)

La reacción de ligación previa fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* cepa Top10. Para la transformación se utilizaron 5 μ L de la ligación y 50 μ L de células competentes. La mezcla fue incubada en hielo durante 5 minutos y después se sometió a un choque térmico a 42 $^{\circ}$ C por 45 segundos e inmediatamente enfriada en hielo por 5 minutos. Luego se le adicionó 1 mL de medio LB líquido (en campana de flujo laminar) y se dejó incubando a 37 $^{\circ}$ C por 45 minutos a 150 rpm. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10392 rcf por 2 min, se descartaron 900 μ L de sobrenadante, se resuspendió la pastilla en los 100 μ L restantes y las células se plaquearon en cajas Petri que contenían 25 mL de LB (sólido) con 50 mg/mL cloranfenicol. Las cajas Petri se dejaron incubando a 37 $^{\circ}$ C toda la noche. Las colonias seleccionadas fueron transferidas a medio LB (líquido) más cloranfenicol (50 mg/mL) y fueron crecidas a 37 $^{\circ}$ C por 16 horas a 150 rpm. Los plásmidos fueron extraídos basándose en el método de Birnboim y Doly, 1979; a partir de un volumen final de 4 mL de cultivo bacteriano sedimentado. Se resuspendió en 50 μ L de Agua Milli Q estéril. El plásmido se almacenó a -20 $^{\circ}$ C.

3.2.15 Doble digestión de (pCCsWRKY18) con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*

Para comprobar la inserción del casete de expresión en pCAMBIA2200 se llevó a cabo la digestión con enzimas *EcoRI* y *HindIII*, debido a que estas enzimas flanquean en los extremos del casete de expresión. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 10 μL con los siguientes reactivos: 3 μL de plásmido, 0.5 μL de enzima *EcoRI* (20 U/ μL), 0.5 μL de enzima de *HindIII* (10 U/ μL), 1 μL de buffer 2 10 X y 5 μL de agua Milli Q estéril. Se incubó a 37 °C por 2 horas. Las digestiones se visualizaron en un gel de agarosa 1 % TAE 1X para la comprobación de la presencia del inserto de interés.

3.2.16 PCR para comprobar que las colonias se transformaron con la construcción (pCCsWRKY18)

Para comprobar que las colonias seleccionadas tuvieran la construcción (pCCsWRKY18), se realizó un PCR en la siguiente reacción de amplificación: En un volumen final de 25 μL con 0.5 μl de Taq generada en el laboratorio de Plantas del IPICYT (Taq casera), 0.5 μL de d'NTPs 10 mM, 1.5 μL de MgCl_2 25 mM, 5 μL de buffer GoTaq 5X y 15.5 μL de agua Milli Q estéril. Se utilizó 0.5 μL (10 μM) de cada uno de los oligonucleótidos (pBI121) sentido y antisentido. El programa empleado en el termociclador fue: Desnaturalización inicial: 94 °C (5min), 35 ciclos (Desnaturalización 94 °C/ 30s, Alineamiento 57 °C/ 30min, Extensión 72 °C/ 1:30 min), Extensión final: 72 °C (5min) Enfriamiento 10 °C. Se tomaron los 25 μL de los productos de PCR, y se corrió en un gel de agarosa 1%-TAE 1X. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el DNA 1 Kb Ladder (BioLabs/New England).

3.2.17 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez que se obtuvo la construcción de expresión pCAMBIA 2200 35S::CsWRKY18::NOS se procedió a introducir este plásmido a células competentes de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 previamente generadas en el laboratorio. Se agregó 1 μg de plásmido y se mezcló con 200 μL de células competentes, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido por 1 minuto, seguido se dio un choque térmico a 37 °C por 5 minutos y se colocaron los tubos en hielo por 3 minutos. Las bacterias

transformadas se recuperaron agregando 800 μ L de medio YM (Extracto de levadura, D-manitol, NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, agar a pH 7.0) e incubando en oscuridad a 28 °C por 3 horas a 150 rpm. Se colectaron las células centrifugando a 984 rcf por 5 minutos y se plaquearon 100 μ L de bacterias en cajas Petri con medio YM con Estreptomicina (100 mg/L), Cloranfenicol (10 mg/L) y Rifampicina (50 mg/mL). Las cajas fueron incubadas en oscuridad a 28 °C por 48 h, finalmente las colonias que sean capaces de crecer tentativamente son las que contendrán el plásmido de interés.

3.2.18 PCR para la comprobación de la transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se realizó una PCR de colonia con la intención de verificar si las colonias que fueron capaces de crecer en medio YM más cloranfenicol (50 mg/mL), contenían nuestro inserto de interés. Se utilizaron los oligonucleótidos del ADNc de CsWRKY18 con una banda esperada de 966 pb. Antes de iniciar la PCR se escogieron y se marcaron 2 colonias, estas colonias se picaron con la ayuda de palillos y se disolvieron en la reacción de amplificación. En un volumen final de 50 μ L con 0.2 μ L de TaqPolimerasa (5U/ μ L, invitrogen), 2 μ L de dNTPs 10 mM, 2.5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 5 μ L de PCR buffer 10X y 16.3 μ L de agua ultrapura. Se trabajó con 1 μ L (10 μ M) de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido. El programa empleado en el termociclador fue: Desnaturalización inicial: 95 °C (3min), 35 ciclos (Desnaturalización 95 °C/ 30s, Alineamiento 55 °C/ 30min, Extensión 72 °C/ 2 min), Extensión final: 72 °C (5min) Enfriamiento 12 °C. Se tomó una alícuota de 10 μ L de los productos de PCR, y se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1.5%-TAE 1X. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el 2-Log DNA Ladder (BioLabs). Las colonias seleccionadas fueron transferidas a medio YM (líquido) + 10 mg/L de cloranfenicol, 50 mg/L de rifampicina y 100 mg/L de estreptomicina y fueron crecidas a 28 °C por 24 horas a 225 rpm. Posteriormente se tomó 500 μ L de *Agrobacterium* y se les adicionó 300 μ L de glicerol al 65 %. Estas muestras se almacenaron a -80 °C.

3.2.19 Transformación de tabaco con pCCsWRKY18 mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* para la transformación de tabaco (*Nicotiana tabacum*). La transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Clemente, 2006. De la construcción de expresión (pCCsWRKY18) obtenida, se introdujo a células competentes de *A. tumefaciens*, donde 1 µg de plásmido se mezcló con 200 µL de células competentes, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido por 1 minuto, seguido se dio un choque térmico a 37 °C por 5 minutos y se colocaron los tubos en hielo por 3 minutos. Las bacterias transformadas se recuperaron agregando 800 µL de medio YM (Extracto de levadura, D-manitol, NaCl, MgSO₄·7H₂O, K₂HPO₄·3H₂O, agar a pH 7.0) e incubando en oscuridad a 28 °C por 3 horas a 150 rpm. Se colectaron las células centrifugando a 984 rcf por 5 minutos y se plaquearon 100 µL de bacterias en cajas Petri con medio YM con Estreptomicina (100 mg/L), Cloranfenicol (10 mg/L) y Rifampicina (50 mg/mL). Las cajas fueron incubadas en oscuridad a 28 °C por 48 h, finalmente las colonias que sean capaces de crecer son las que contengan el plásmido de interés. Para la transformación de tabaco se inocularon tubos Falcon con 5 ml de medio YM + estreptomina (100 mg/L), cloranfenicol (10 mg/L) y rifampicina (50 mg/mL) con colonias aisladas de las bacterias correspondientes de la construcción y se incubando en oscuridad a 28 °C a 200 rpm por 12 h. Al día siguiente en matraces con 50 ml de medio YM + estreptomina (100 mg/L), cloranfenicol (10 mg/L), rifampicina (50 mg/mL) y acetosiringona (100 µM) se inoculó 500 µL y 1 ml de cultivo de *A. tumefaciens* y se incubaron a 28 °C a 200 rpm por 12 hrs. Transcurrido el tiempo se procedió a medir la densidad óptica de los cultivos hasta llegar a un rango 0.6-1.0. Una vez obtenida la D.O. deseada se colectaron las células a 984 rcf por 20 minutos y se retiró el sobrenadante, las bacterias fueron resuspendidas en 20 mL de medio de co-cultivo líquido + acetosiringona (100 µM) y se incubó a 28 °C a 150 rpm por 1 hora. Posteriormente se midió la D.O. hasta llegar a 0.6-1.0 y en la campana de flujo laminar se agregaron los explantes de tabaco (previamente cortados 24 h antes de iniciar la transformación que fueron depositadas en cajas con medio de precultivo) y se incubaron los tubos inclinados a 28 °C a 75 rpm por 30 minutos. Los explantes se transfirieron en cajas Petri con medio de co-cultivo sólido+ acetosiringona (100 µM) y se incubaron en oscuridad a 25 °C por 72 h. Tres días después del proceso de transformación se realizaron lavados de los explantes transformados en medio de co-cultivo líquido con timentina (150 mg/L) con el objetivo de controlar el crecimiento de *Agrobacterium*. Los

explantes fueron sembrados en medio MS de propagación con kanamicina (150 mg/L) como agente de selección de las plantas transformadas y timentina (150 mg/L) como agente de control para *A. tumefaciens*, se conservados en condiciones de 25 °C con periodos de 16 h luz y 8 hrs oscuridad durante 3 semanas para generar los brotes de tejido transformado.

Cuadro 3. 4 Medios de cultivo para la transformación de tabaco con *A. tumefaciens* (Clemente, 2006).

Soluciones	Medio de precultivo 1L	Medio de co-cultivo 1L	Medio de regeneración 1L	Medio de enraizamiento 1L
Macronutrientes 10X	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Micronutrientes 100X	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Fe EDTA 100X	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Vitaminas 100X	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
MES	-	3.7 g	-	-
BAP (1mg/mL)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
ANA (1mg/mL)	0.1 mL (100µ)	0.1 mL (100µ)	0.1 mL (100µ)	0.1 mL (100µ)
pCPA (8mg/mL)	1 mL	1 mL	-	-
Sacarosa	30 g	30 g	30 g	30 g
pH (KOH/HCL)	5.7	5.4	5.7	5.7
Agar	8g	8g	8g	8g

3.2.20 Extracción de ácidos nucleicos de tabaco

El ADN total de las muestras estudiadas fue aislado mediante el protocolo de Kieffer y colaboradores (2000). Entre 100 y 200 mg de tejido fueron macerados en nitrógeno líquido con un mortero y pistilo. El tejido pulverizado se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 600µl de buffer de extracción (CTAB 2%, PVP40 2%, EDTA 25mM, Tris HCl 100mM y NaCl 2M) y 12µl de β-mercaptoetanol. La muestra se incubó a 65 °C por 10 minutos. Posteriormente, los ácidos nucleicos se separaron del material proteico agregando 600µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se separaron las fases centrifugando 5 min a 12052 rcf, se tomó el sobrenadante y se precipitó el ácido nucleico con isopropanol frío incubando la muestra en hielo por 5 minutos. La pastilla

fue resuspendida en 48 μL de H_2O Ultra pura, posteriormente las trazas de ARN fueron degradadas con 2 μL de RNasa A (1 $\text{mg}/\mu\text{L}$) incubando a 37 $^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Finalmente las muestras fueron conservadas a -20 $^\circ\text{C}$.

3.2.21 Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría

Para estimar la concentración y el nivel de pureza del ADN extraído se utilizó un espectrofotómetro SmartSpect plus de BioRad. Se tomaron 5 μL de muestra más 95 μL de UPH_2O (dilución 1:20) para cuantificar la concentración y 5 μL de muestra más 95 μL de Tris HCl 10 mM pH 7.5 para estimar la pureza (relación A260/A280) (Qiagen, 2001).

3.2.22 Detección por PCR de la presencia del transgén *CsWRKY18* en plantas de tabaco transformadas con el plásmido pCCsWRKY18

Se evaluó la presencia del transgén *CsWRKY18* en las plantas transformadas de tabaco de la generación T0 mediante PCR, se emplearon oligonucleótidos para la amplificación de la región interna del gen *CsWRKY18* (242 pb). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL , con 1 μL de template, 0.2 μL de TaqPolimerasa (5U/ μL , Invitrogen), 1 μL de dNTPs 10 mM, 1.5 μL de MgCl_2 50 mM, 5 μL de PCR buffer 10x y 38.3 μL de agua ultrapura. Se trabajó con 1 μL (10 μM) de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido. La reacción de PCR se efectuó con el siguiente programa: Desnaturalización inicial: 95 $^\circ\text{C}$ (3min), 35 ciclos (Desnaturalización 95 $^\circ\text{C}$ / 30s, Alineamiento 60 $^\circ\text{C}$ / 30min, Extensión 72 $^\circ\text{C}$ / 2 min), Extensión final: 72 $^\circ\text{C}$ (5min) Enfriamiento 12 $^\circ\text{C}$. Se tomó una alícuota de 10 μL de los productos de PCR, y se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1.2%-TAE 1X. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el 2-Log DNA Ladder (BioLabs).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción de ARN y ADN

El método de extracción de ácidos nucleicos de hoja en *C. sinensis* con el protocolo de PHYTOPURE ILUSTRA generó resultados satisfactorios, ya que se observaron las bandas correspondientes a ADN y ARN íntegras. Los resultados de la extracción en cuanto al ARN mostraron bandas ribosomales 25S, 18S y 5S íntegras, lo cual nos indica que los ARN mensajeros no se degradaron y por lo tanto pueden ser utilizados para la síntesis de ADNc. Como marcador de peso molecular se utilizó 2-Log (New England Biolabs).

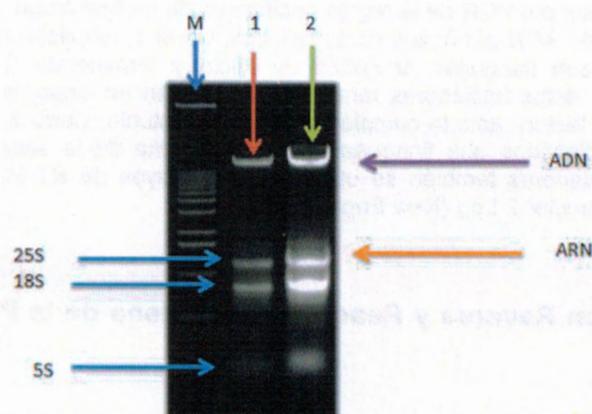


Figura 3. 3 Electroforesis de ARN y ADN del tejido de *C. sinensis*. La extracción de ARN y ADN se realizó mediante el protocolo LEIT PHYTOPURE ILUSTRA.

3.3.2 Amplificación por PCR de un homólogo de *AtWRKY18* en

Citrus sinensis

Se realizó una PCR convencional a partir de ADN genómico (1475 pb, 5 exones y 4 intrones) como plantilla (**Figura 3.4**), con el fin de verificar la eficacia de los oligonucleótidos diseñados, una vez corroborados los resultados, dichos oligonucleótidos se utilizarán para la amplificación del ADNc (966 pb) de *CsWRKY18*. La amplificación del gen *CsWRKY18* generó una banda del tamaño esperado de 1,475 pb conteniendo intrones. La banda correspondiente a 242 pb es la amplificación de un par de oligonucleótidos que franquean un fragmento interno de un exón).

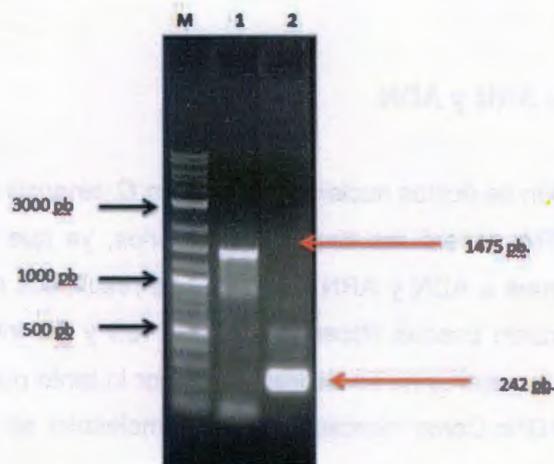


Figura 3. 4 Amplificación por PCR de la región codificante de un homólogo del gen *AtWRKY18* de *C. sinensis* utilizando ADN genómico como plantilla. Carril 1, amplicón obtenido (1,475 pb) con oligonucleótidos que flanquean el codón de inicio y término de la traducción de la secuencia de estudio, estos iniciadores también se utilizarán en ensayos de RT-PCR para amplificar el marco de lectura abierto completo del gen de estudio; Carril 2, amplicón obtenido (242 pb) con oligonucleótidos que flanquean un exón interno de la secuencia homóloga a *AtWRKY18*, estos iniciadores también se utilizarán en ensayos de RT-PCR cuantitativa. M, marcador de peso molecular 2-Log (New England Biolabs).

3.3.3 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La amplificación de *CsWRKY18* a partir de ADNc, se muestra en la **Figura 3.5**. El tamaño del amplicón esperado es de 966 pb correspondiente a la ORF de la secuencia *CsWRKY18* y se muestra en el carril 1 y 2 de la **Figura 3.5**. En el carril 3 se observa la amplificación de 242 pb correspondientes a un fragmento interno de la ORF el cuál utilizamos como control positivo. En los carriles 4 y 5 no se observó el factor de elongación 1 alfa ($EF1\alpha$) de *C. sinensis* debido a que los oligonucleótidos no funcionaron. En el carril 6 no se obtuvo banda debido a que es nuestro control negativo y no se espera que amplifique por no contener ADNc.

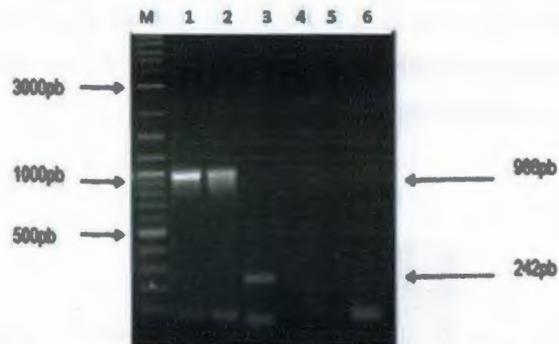


Figura 3. 5 Reacción de RT-PCR utilizando ADNc como plantilla.

A pesar de que el del factor de elongación 1 alfa (EF1 α) de *C. sinensis* no se observa, se sabe que nuestra reacción de RT-PCR es correcta debido a la amplificación de los oligonucleótidos del fragmento interno de la ORF (242 pb) ya que anteriormente en la reacción de PCR de *CsWRKY18* a partir de ADN genómico se utilizó como control.

3.3.4 Clonación del gen *CsWRKY18* (ADNc) en el vector pGEM-TEasy

En la siguiente Figura se puede observar que la purificación del producto de PCR se realizó de manera correcta, ya que se muestra claramente en el carril 1 de la **Figura 3.6**, el fragmento esperado de 966 pb.

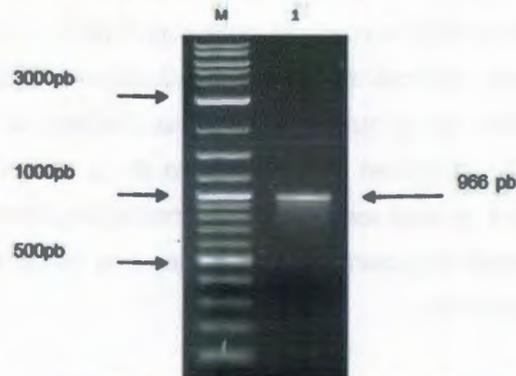


Figura 3. 6 Fragmento purificado de *CsWRKY18* a partir de ADNc (966 pb) con el High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) previó a la clonación.

El fragmento de *CsWRKY18* a partir de ADNc de 966 pb fue exitosamente insertado y clonado en el vector pGEM-TEasy. La digestión del vector por la endonucleasa *EcoRI* fue analizada por fraccionamiento en gel de agarosa al 1.2%. Se pudieron observar los fragmentos del tamaño esperado (966 pb) de *CsWRKY18* de ADNc (**Figura 3.7**). Cada

fragmento fue analizado de 4 clonas para verificar que se insertara el fragmento que correspondiera al tamaño esperado. La clona del carril 3 no se observa en la **Figura 3.7** por lo tanto no se insertó el fragmento en el vector.



Figura 3.7 Digestión de 4 clonas del vector pGEM-T Easy con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar los insertos correspondientes a *CsWRKY18* de ADNc (966 pb). La banda de 3,015pb corresponde al vector pGEM-T Easy.

3.3.5 Secuenciación

En este alineamiento (**Figura 3.8**) se muestra a la secuencia predicha de la ORF de *CsWRKY18* y su secuencia de ADNc (966 pb), donde se logra observar que ambas secuencias son similares, más no idénticas ya que se observó dentro del alineamiento un cambio en el nucleótido 519 marcado en color rojo. Debido a este cambio se realizó un alineamiento de esas mismas secuencias traducidas a proteínas, con el fin de verificar que este cambio en el nucleótido 519 no afectará la secuencia de amino ácidos (**Figura 3.9**). Con base en el alineamiento de la secuencia de proteínas, se observó que este cambio en esta posición es una mutación silenciosa.

Se mandaron a secuenciar seis clonas de las cuales dos dieron el mismo resultado al alinearlas con la ORF predicha.

CsWRKY18insilico	1	ATGGATTCAACGTGGGTGGACACCTCTCTTGACCTCAATCTCAATCTTCTGAATCACAGT
CsWRKY18seq778.779	1	ATGGATTCAACGTGGGTGGACACCTCTCTTGACCTCAATCTCAATCTTCTGAATCACAGT
CsWRKY18insilico	61	ACTGAACTTTCGAAGACAGAGATTTAAGCGAGATCAATTTGCTCAATTTGAAGAGAGAGCT
CsWRKY18seq778.779	61	ACTGAACTTTCGAAGACAGAGATTTAAGCGAGATCAATTTGCTCAATTTGAAGAGAGAGCT
CsWRKY18insilico	121	TCAGTTAAACAAGAGACTGGAAATTTGGTGGAGGAATTAATAGGATAAGCACTGAGAAC
CsWRKY18seq778.779	121	TCAGTTAAACAAGAGACTGGAAATTTGGTGGAGGAATTAATAGGATAAGCACTGAGAAC
CsWRKY18insilico	181	AAGAAGCTGAATGAAATGCTTTTCATTTTGTCTAAGAATTACAACAATTTGCGGCAGCAG
CsWRKY18seq778.779	181	AAGAAGCTGAATGAAATGCTTTTCATTTTGTCTAAGAATTACAACAATTTGCGGCAGCAG
CsWRKY18insilico	241	TACATGGATTTGATGAACAAGAACACAGAAAAATGAAGTTGGAATATCAAAGAAGAGGAAG
CsWRKY18seq778.779	241	TACATGGATTTGATGAACAAGAACACAGAAAAATGAAGTTGGAATATCAAAGAAGAGGAAG
CsWRKY18insilico	301	GCTGAGAGTGAAGATCATTTGCCACACGATTGGCTTCAATGTACACGGCTACTGAGTCCAGG
CsWRKY18seq778.779	301	GCTGAGAGTGAAGATCATTTGCCACACGATTGGCTTCAATGTACACGGCTACTGAGTCCAGG
CsWRKY18insilico	361	ACTAGTACTGACGAAGAGTCAATGCAAAAAGGCCAAAAGGATAACAACACCAAGGCCAAAAGTT
CsWRKY18seq778.779	361	ACTAGTACTGACGAAGAGTCAATGCAAAAAGGCCAAAAGGATAACAACACCAAGGCCAAAAGTT
CsWRKY18insilico	421	TCTAGGTTTTATGTGAGAGCAGTGAATTCAAATTC AACCTGATTTGTGAAGGATGGGTAT
CsWRKY18seq778.779	421	TCTAGGTTTTATGTGAGAGCAGTGAATTCAAATTC AACCTGATTTGTGAAGGATGGGTAT
CsWRKY18insilico	481	CAATGGAGAAACTATGGCCAAAAGGTTACAAGAGACACTTATCACCTAGGGCTTACTTC
CsWRKY18seq778.779	481	CAATGGAGAAACTATGGCCAAAAGGTTACAAGAGACACTTATCACCTAGGGCTTACTTC
CsWRKY18insilico	541	AACTGTTCTTTGCGCCCAAGTGTCTCCATAACAAGAAGGTGC AAAGAAGTCTGAGGAT
CsWRKY18seq778.779	541	AACTGTTCTTTGCGCCCAAGTGTCTCCATAACAAGAAGGTGC AAAGAAGTCTGAGGAT
CsWRKY18insilico	601	CCATCAATTTTACTGGCAACTTATGAAGGAGAGCATANTCATCTCAGCCTACGGATTCA
CsWRKY18seq778.779	601	CCATCAATTTTACTGGCAACTTATGAAGGAGAGCATANTCATCTCAGCCTACGGATTCA
CsWRKY18insilico	661	AAAGCTGAATFATCATTTGAGCCCTAGCCATGTTGCAACTATGGAAATGCTATTATGTT
CsWRKY18seq778.779	661	AAAGCTGAATFATCATTTGAGCCCTAGCCATGTTGCAACTATGGAAATGCTATTATGTT
CsWRKY18insilico	721	TCTGCGCGCTCATCGATGCTATCAGCAAGCCCTACTGCAACTCTTGATATGATTCAACCT
CsWRKY18seq778.779	721	TCTGCGCGCTCATCGATGCTATCAGCAAGCCCTACTGCAACTCTTGATATGATTCAACCT
CsWRKY18insilico	781	GGATTTTGTGTTGATGATGCCAAAAAATCATCAGTTCAACAAATTAAGACTCCAGCAATC
CsWRKY18seq778.779	781	GGATTTTGTGTTGATGATGCCAAAAAATCATCAGTTCAACAAATTAAGACTCCAGCAATC
CsWRKY18insilico	841	CATCAGATTTTGGTCCACAAATGGCTTCTAATTTGACCAAAGATCCTAATTTTACAGCA
CsWRKY18seq778.779	841	CATCAGATTTTGGTCCACAAATGGCTTCTAATTTGACCAAAGATCCTAATTTTACAGCA
CsWRKY18insilico	901	GCAATTCAGCAGCTATTTGAGGAAGATTTGCTGATCAGGCTCGAACCAAAAGATGGTCA
CsWRKY18seq778.779	901	GCAATTCAGCAGCTATTTGAGGAAGATTTGCTGATCAGGCTCGAACCAAAAGATGGTCA
CsWRKY18insilico	961	CTCTAG
CsWRKY18seq778.779	961	CTCTAG

Figura 3. 8 Alineamiento de la ORF predicha *in silico* (Phytosome) y del ADNc (este trabajo) de CsWRKY18

CsWRKY18insilico	1	MDSTWVDTSLDLNLLNLLNHSSEVPKRPFKGDHFAEFEERASVKQETGILVEELNRIISTEN
CsWRKY18seq778.779	1	MDSTWVDTSLDLNLLNLLNHSSEVPKRPFKGDHFAEFEERASVKQETGILVEELNRIISTEN
CsWRKY18insilico	61	KRLNEMLSILCKNYNNLRQQYMDLNNNTENEVGI SKRFAESEDHCHTIGFNVHATES
CsWRKY18seq778.779	61	KRLNEMLSILCKNYNNLRQQYMDLNNNTENEVGI SKRFAESEDHCHTIGFNVHATES
CsWRKY18insilico	121	TSTDEESCRRPFDNNTFAKVSRYVFRASDSNSTLIVKDGQWRKYGQVTRDNPSPRAYF
CsWRKY18seq778.779	121	TSTDEESCRRPFDNNTFAKVSRYVFRASDSNSTLIVKDGQWRKYGQVTRDNPSPRAYF
CsWRKY18insilico	181	KCSFAPSCPVKKVQRSAEDPSILVATYEGEHNHPQPTDSFAELSLSPSHVATIGNPIHV
CsWRKY18seq778.779	181	KCSFAPSCPVKKVQRSAEDPSILVATYEGEHNHPQPTDSFAELSLSPSHVATIGNPIHV
CsWRKY18insilico	241	SAASSMLSASPTATLDMIQPGFLFDDAFESSVQQIEAPAIHQILVQOMASNLTKDPNFTA
CsWRKY18seq778.779	241	SAASSMLSASPTATLDMIQPGFLFDDAFESSVQQIEAPAIHQILVQOMASNLTKDPNFTA
CsWRKY18insilico	301	ALAAAI SGRFADQARTQRWSL
CsWRKY18seq778.779	301	ALAAAI SGRFADQARTQRWSL

Figura 3. 9 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a las secuencias CsWRKY18 a partir de ADNc (778) y CsWRKY18 *in silico*.

3.3.6 Elaboración de la construcción

pCAMBIA2200::35S::CsWRKY18::NOS

Para contar con un cassette de expresión para el gen *CsWRKY18*, se realizó su clonación en el vector binario pCAMBIA2200. pCAMBIA 2200 es un plásmido con el cual se realizan transformaciones mediante *Agrobacterium tumefaciens*, tiene un tamaño de 8,894 pb mientras que el tamaño del T-DNA 2,512 pb, contiene el gen *npIII* que aporta resistencia al antibiótico kanamicina lo que permite la selección de posibles plantas transformadas y para la selección de bacterias cuenta con un gen *cat* que aporta resistencia a cloranfenicol, también contiene el sitio multiclonal PUC18 dentro del gen *lacZ* que permite introducir la secuencia de ADN de interés.

El gen *CsWRKY18* esta clonado en un vector pGEM-T Easy; flanqueado por las enzimas *SacI* y *SaII* por medio de doble digestión se liberó el gen y se clonó en el vector binario pCAMBIA 2200 utilizando las mismas enzimas de restricción. En la **Figura 3.10** se pueden observar las digestiones de pGEM-T Easy *CsWRKY18* y del vector binario pCAMBIA2200 con las enzimas de restricción *SacI* y *SaII*. Los amortiguadores de las enzimas *SacI* y *SaII* son incompatibles por lo tanto fue necesario realizar una digestión independiente para cada enzima. En la **Figura 3.10 A** se puede observar una banda de ~966 pb que corresponde al ADNc de *CsWRKY18*. En la **Figura 3.10 B** se observa el fragmento de 8,894 pb del plásmido pCAMBIA2200 resultado de la digestión con las enzimas *SacI* y *SaII*.

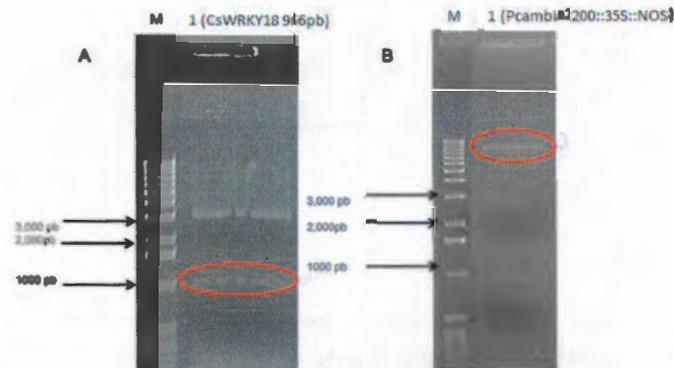


Figura 3. 10 Digestión de *CsWRKY18* y *pCAMBIA2200::35S::NOS* con las enzimas de restricción *SacI* y *SaI*

Una vez obtenidas las bandas esperadas se cortaron del gel de agarosa y se purificaron (kit de purificación Qiagen).

3.3.7 Verificación de la clonación del plásmido *pCAMBIA2200::35S::CsWRKY18::NOS* por análisis de restricción.

Se realizó un análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (**Figura 3.11**) con el cual se confirmó que la clonación se realizó exitosamente. En la **Figura 3.12** se pueden observar 6 clonas de las cuales 2 presentaron el fragmento esperado en la construcción *pCAMBIA2200::35S::CsWRKY18::NOS*.; se observan las bandas que corresponden al plásmido *pCAMBIA 2200* que mide 8894 pb (banda superior) y fragmento esperado de 1800 pb que comprende el promotor 35S (593 pb), el gen *CsWRKY18* (966 pb) y el terminador NOS (265 pb).

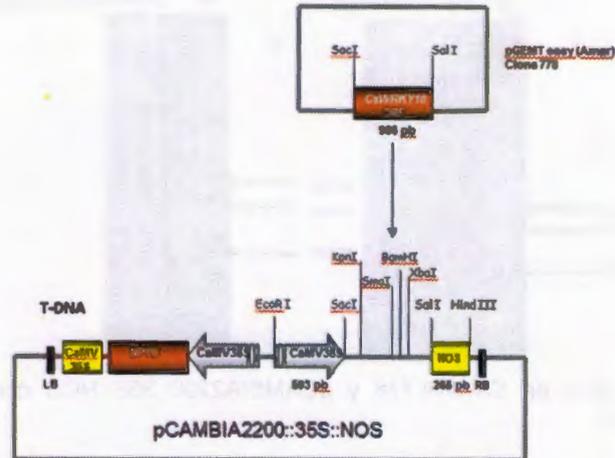


Figura 3. 11 Representación del cassette de expresión de *CsWRKY18* con el promotor 35S y el terminador NOS con sus sitios de restricción

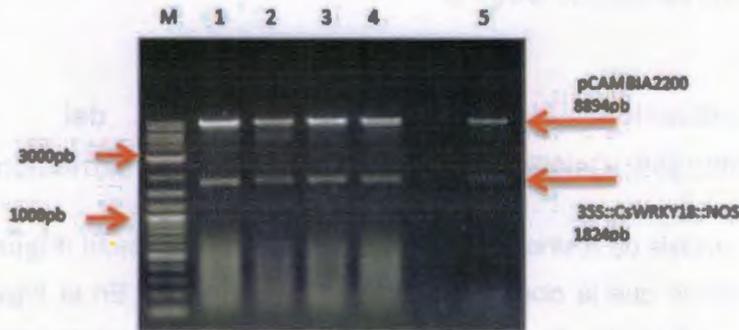


Figura 3. 12 Digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Donde se observan dos bandas correspondientes a las 2 colonias transformadas (corridas por duplicado) (Carriles 1-4) con la construcción (pCCsWRKY18) (~1824 pb), y la banda correspondiente a pCambia2200 (8894 pb).

3.3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de colonias de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo la construcción pCCsWRKY18

Con la finalidad de verificar si la transformación de *A. tumefaciens* con nuestro cassette de expresión fue exitosa, se llevó a cabo una PCR de colonia a dos colonias diferentes (colonia 1 y colonia 5). En el carril 1 (colonia 1) y 2 (colonia 5) de la **Figura 3.13** se observa la banda del producto de PCR de ADNc de *CsWRKY18*, con una banda esperada de 966 pb. En el carril 3 se observa la banda de 242 pb correspondiente a un fragmento interno de la ORFs el cual utilizamos como control positivo. En el carril 4 no se observa banda debido a que es nuestro control negativo y no debe observarse banda por no contener ADNc. Estos resultados muestran que la

transformación de *A. tumefaciens* con el gen de interés fue exitosa y se podrá utilizar para la transformación de plantas de tabaco.



Figura 3. 13 Gel de agarosa al 1% del PCR de colonia de *A. tumefaciens*. En el carril 1 y 2 se observa la banda correspondiente a la amplificación del gen CsWRKY18 con una banda esperada de 966 pb.

3.3.9 Transformación de tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo la construcción pCCsWRKY18

Se realizó la transformación de tabaco con *A. tumefaciens* que contiene la construcción pCCsWRKY18. En la figura se observa el proceso de la regeneración de las plantas de tabaco sin transformar (**Figura 3.15.**), y en la **Figura 3.14** se observan los brotes de los explantes que fueron transformados con el plásmido pCCsWRKY18. Estos resultados indican que el proceso de transformación, el tipo de explante utilizado, así como los medios de cultivo fueron adecuados. Una vez que las plantas regeneradas formaron raíces se sembraron en un sustrato comercial que contiene peat moss y agricolita, a una temperatura ambiente de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. La intensidad lumínica ($75\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{ s}$) fue suministrada con lámparas fluorescentes T5HO de alto rendimiento.

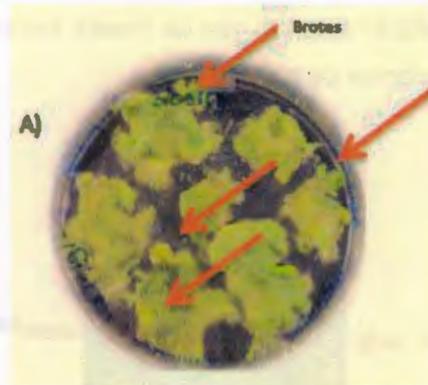


Figura 3. 14 Transformación de tabaco con *A. tumefaciens*. A) Explantes transformados con el gen *CsWRKY18* de 21 días de edad.

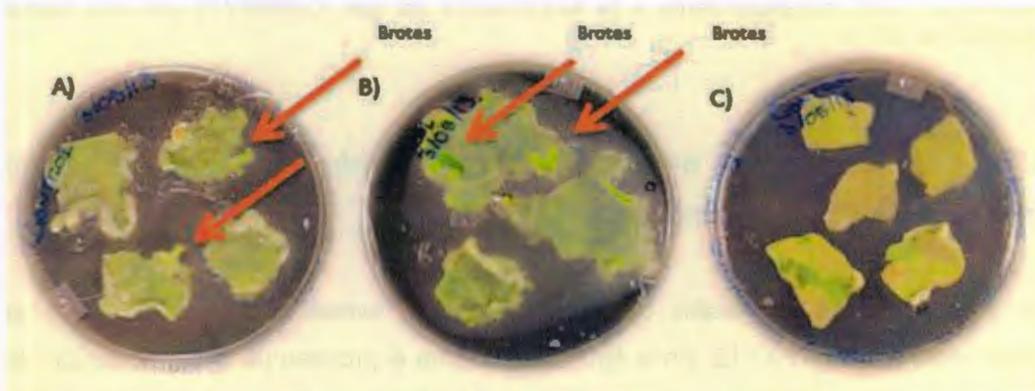


Figura 3. 15. Controles de explantes sin transformar. A) Control de regeneración sin antibióticos. B) Control de regeneración con timentina (150mg/L). C) Control negativo con timentina (150mg/L) y kanamicina (100mg/L).

3.3.10 Evaluación de la presencia del transgén en plantas de la generación T0 de tabaco

Una vez enraizadas las plantas, se extrajo ADN de las hojas. Posteriormente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos que amplifican 242 pb de la región interna del gen *CsWRKY18*. En la **Figura 3.16** se puede apreciar la presencia de las bandas amplificadas para el gen *CsWRKY18* (242 pb), correspondientes a las siete líneas transgénicas seleccionadas (L1-L7) en comparación con la planta silvestre utilizada como testigo (WT) donde no debe observarse banda debido a que esta planta no está transformada (carril 8-9), en el carril 10 se observa la banda correspondiente a un fragmento interno de la ORF de

242 pb utilizado como control positivo. En el carril 11 no se observa banda ya que es nuestro control negativo y no debe observarse banda por no contener ADN.

Con base en estos resultados y a los controles utilizados se puede concluir que la transformación dio resultados positivos.



Figura 3. 16 Análisis de PCR de las siete líneas transgénicas de la T0 de tabaco. Utilizando a la WT como control negativo de la transformación.

Aunque se logró la obtención de siete regenerantes de tabaco que presentaron a *CsWRKY18*, se planea repetir el ensayo de transformación para obtener otras regenerantes ya que este primer grupo de plantas transformadas no sobrevivió el proceso de aclimatación en el cuarto de crecimiento.

3.4 DISCUSIÓN

Para estudiar la función de los genes involucrados en la resistencia a patógenos se recurre a la manipulación genética. El mejoramiento genético de los cítricos a través de técnicas convencionales es una actividad difícil debido a diversas características biológicas que presenta entre las cuales destacan: un largo período juvenil, alta heterocigotidad, incompatibilidad sexual, poliembrionía nucelar y gran tamaño de las plantas que dificultan de manera considerable el mejoramiento genético; por lo que se han realizado varios intentos para mejorar los cítricos mediante el uso de diversas técnicas *in vitro* (Singh y Rajam, 2009; Zhang *et al.*; 2010). Los cítricos son ampliamente conocidos por su recalcitrancia a la transformación y el enraizamiento posterior, esto podría deberse a los diferentes genotipos y las diferentes respuestas fisiológicas de las técnicas de cultivo, pero la investigación constante ha llevado al establecimiento de protocolos mejorados para asegurar la producción de plantas transformadas de manera uniforme, aunque con una eficiencia relativamente baja, dependiendo del genotipo (Orbovic y Grosser, 2006; Singh y Rajam, 2009). Los programas de mejoramiento se enfocan en la generación de plantas con resistencia o mayor tolerancia a estrés biótico o abiótico conduciendo a una mayor producción. En los últimos años, el mejoramiento genético basado en la biotecnología, representa una estrategia eficaz en el desarrollo de variedades resistentes a diversos fitopatógenos (Campbell *et al.*, 2002; Gurr y Rushton 2005; Singh y Rajam, 2009). A pesar de que se cuenta con esta herramienta poderosa para el desarrollo de dichas variedades, el conocimiento que se tiene de los genes involucrados en la resistencia contra patógenos en cítricos es muy limitado. La transformación genética se ha convertido en un enfoque importante en programas implicados en la mejora de cultivares de cítricos permitiendo a los investigadores introducir genes específicos en cultivares superiores ya existentes, manteniendo la integridad cultivar (Orbovic y Grosser, 2006). Se han probado diferentes protocolos, como la transformación de protoplastos y la utilización de *Agrobacterium rhizogenes*, protocolos que han tenido éxito aunque con una eficiencia relativamente baja. El método más utilizado para transformar cítricos ha sido utilizando a *Agrobacterium tumefaciens* (Orbovic y Grosser, 2006). *A. tumefaciens* es la bacteria más utilizada en transformación genética de plantas dicotiledóneas; esta técnica ofrece alta frecuencia de integración del transgén y, bajo número de copias por lo que es probable que no ocurran anomalías en las segregaciones; alta eficiencia y un bajo costo (Riva *et al.*; 1998).

La publicación de la secuencia genómica completa de la naranja dulce permitirá la caracterización sistemática de todos los genes de la naranja involucrados en la resistencia a estrés biótico, lo cual facilitará el mejoramiento genético del cultivo. El uso de promotores constitutivos es común, siendo el más utilizado en plantas dicotiledóneas el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Chen y Chen, 2002). Se ha visto que el uso de este promotor en el gen *NPR1* de *A. thaliana* conduce a la expresión constitutiva del gen y dicha expresión constitutiva ayuda a conferir una mayor resistencia a la bacteria *P. syringae* (Cao *et al*; 1998, Chen y Chen, 2002). Adicionalmente el uso de plantas modelo ayuda a hacer análisis de expresión de genes de interés en un corto periodo de tiempo y reducir costos. El tabaco es una planta modelo de rápido desarrollo y fácil de transformar mediante *A. tumefaciens* por lo que es posible obtener plantas transgénicas en corto tiempo, por lo tanto el tabaco es un buen modelo para la transformación genética y probar *in vivo* el funcionamiento de un gen (Clemente, 2006), como en este caso *CsWRKY18*. A futuro nos daría evidencias importantes del funcionamiento de este gen, y a la par si dicho gen funciona como en el caso de *AtWRKY18* en *Arabidopsis*.

En este trabajo hemos logrado clonar el ADNc de un homólogo de *AtWRKY18*, al cual nombramos como *CsWRKY18*. La secuencia homóloga *CsWRKY18* contiene 5 exones y 4 intrones y corresponde al grupo IIa de la clasificación de los FT WRKY. El grupo II presenta un solo dominio de unión al ADN y tienen el mismo tipo de motivo de dedo de zinc (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H) que el grupo I. El grupo II se divide en subgrupos (a-e) basados en motivos adicionales de aminoácidos presentes fuera del dominio WRKY (Ülker *et al*; 2004; Wang *et al*; 2006; Rushton *et al*; 2010; Agarwal *et al*; 2011). Numerosos estudios han realizado diversos análisis bioinformáticos tanto de alineamiento, árboles filogenéticos y predicciones de proteínas de los WRKYs en diferentes especies y así han logrado clasificarlos de acuerdo a sus características estructurales y moleculares; con el objetivo de entender cada una de las funciones específicas de cada grupo (Eulgem *et al*; 2000; Ülker *et al*; 2004; Eulgem; 20005; Yamasaki *et al*; 2005; Wang *et al*; 2006, Eulgem y Somssich 2007; Rushton *et al*; 2010; Agarwal *et al*; 2011; Chen *et al*; 2012). La secuencia *in silico* de la ORF de *CsWRKY18* y la secuencia *in vitro* *CsWRKY18* de ADNc (966 pb), son similares, mas no idénticas ya que se encontró un cambio en el nucleótido 519 (Figura 3.8). Se realizó un alineamiento de esas mismas secuencias traducidas a proteínas, con el fin de verificar que este cambio en el nucleótido 519 no afectara la codificación de la secuencia cuando esta sea traducida, y se observó que este cambio corresponde a

una mutación silenciosa, por lo tanto no afecta de ningún modo la traducción de la proteína (**Figura 3.9**). Un gran número de factores de transcripción WRKY han sido reportados en las secuencias genómicas de plantas, 74 en *Arabidopsis*, alrededor de 100 en arroz, 197 en soya, 66 en papaya, 68 en sorgo y 38 en el musgo *Physcomitrella patens*. Los FT WRKY han sido implicados en la regulación de procesos del desarrollo, tal es el caso del desarrollo de tricomas, desarrollo de la semilla y la senescencia de la hoja. Sin embargo, sus funciones principales parecen ser en la respuesta al estrés biótico y abiótico (Agarwal *et al*; 2011)

Para el caso de la transformación genética de tabaco con el gen *CsWRKY18*, se observaron las bandas amplificadas para el fragmento interno del gen *CsWRKY18* (242 pb), el cual está presente en las líneas transgénicas seleccionadas, en cuanto al testigo no se observó banda alguna lo cual era de esperarse, ya que es una planta de tabaco sin transformar. Estos resultados nos indican que las plantas son transgénicas debido a la presencia del gen *CsWRKY18*. El estudio de Chen y Chen en el 2002 ha demostrado que al sobre-expresar al gen *AtWRKY18* se puede incrementar la tolerancia a la bacteria *P. syringae*, por lo que la sobre-expresión de *CsWRKY18* en *C. sinensis* probablemente generará una respuesta similar contra las bacterias que más afectan la producción de este cultivo. Se espera que este trabajo puedan contribuir al desarrollo de variedades cisgénicas de naranja que puedan ser más tolerantes a las diversas plagas y enfermedades que afectan a este cultivo, incluyendo la cancrrosis de los cítricos (Zhang *et al*; 2010) y el HLB, principales enfermedades que limitan la producción y generan pérdidas cuantiosas, reducir costos de producción y reducir el uso de bactericidas tóxicos para el medio ambiente y la salud humana (Alemán *et al*; 2007; Argüello y Negaresh, 2009; Civerolo, 2009; Delgadillo, 2010).

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal P. M; Reddy P; y Chikara J. (2011). WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants. *Mol. Biol. Rep.* 38:3883–3896.
- Alemán J; Baños H; y Ravelo J. (2007). *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: Una combinación destructiva para la producción citrícola. *Rev. Protección Vegetal.* 22 (3): 154-165.
- Argüello M.I; y Negaresh S. (2009). Presencia de genes (WRKY) asociados a la respuesta al estrés biótico en cacao de Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1):41-46.
- Campbell M.A; Fitzgerald H.M; y Ronald P.C. (2002). Engineering pathogen resistance in crop plants. *Transgenic Research*, 11, 599–613.
- Civerolo E.J. (2009). Liberibacters associated with citrus Huanglongbing and potato zebra chip, USDA. Agricultural Research Service Parlier, California, Disponible en: edwin.civerolo@ars.usda.gov (Consultado en Septiembre 2011).
- Chen C. y Chen Z. (2002). Potentiation of Developmentally Regulated Plant Defense Response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced Arabidopsis Transcription Factor. *Plan Physiology.* 129:706.716.
- Chen L; Song Y; Li S; Zhang L; Zou C; y Yu D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta*1819. 120-128.
- Clemente T. (2006) *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). *Methods Mol Biol.* 343:143-154.
- Delgadillo V. I. (2010). Huanglongbing, importancia y manejo. 4a Semana Internacional de la Citricultura, Martínez de la Torre, Veracruz/México. 1 - 4 de Diciembre 2010.
- Eulgem T; Rushton J.P; Robatzet S; y Somssich E.I. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Elsevier Science.* 5:199-206.

Eulgem T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. Trends in Plant Science 10: 71-78.

Eulgem T; y Somssich E.I. (2007). Network of WRKY transcription factors in defense signaling. Current Opinion in Plant Biology 10: 366-371.

Gurr S.J; y Rushton P.J. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? TRENDS in Biotechnology, 23, 275-282.

Orbovic V; y Grosser J. (2006). Methods in Molecular Biology, Agrobacterium Protocols. Kan Wang © Human Press Inc; Totowa NJ. . 2da Edición. 2, 344(17):177-189

Riva G. A; González C. J; Vázquez P. R; y Ayra P. C. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. EJB Electronic Journal of Biotechnology, 1:3.118-133.

Rushton P. J; Somssich I. E; Ringler P; y Shen Q. J. (2010). WRKY transcription factors. Trends in Plant Science.15:5.

Shen Q.H; Saijo Y; Mauch S, Biskup C; Bieri S; Keller B; Seki H; Ülker B; Somssich I.E; Schulze-Lefert P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease resistance responses. Science, 315:1098-1103.

Singh S; y Rajam M.V. (2009). Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. Physiol. Mol. Biol. Plants 15(1):3-22.

Ülker B; y Somssich E.I. (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding to wards biological function. Current Opinion in Plant Biology. 7:491-498.

Van Verk M; Gatz C; y Linthorst H. (2009). Transcriptional Regulation of Plant Defense Responses. Advances in Botanical Research, 51, 397-438.

Wang D; Amornsiripanitch N; y Dong X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. PloS Pathogens 2:123.

Xu X; Chen C; Fan B; y Chen Z. (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*. 18:1310-1326.

Yamasaki K; Kigawa T; Inoue M; Tateno M; Yamasaki T; Yabuki T; Aoki M; Seki E; Matsuda T; Tomo Y; Hayami T; Terada T; Shirouzu M; Tanaka A; Seki M; Shinozaki K; y Yokoyama S. (2005). Solution Structure of an Arabidopsis WRKY DNA Binding Domain. *The Plant Cell*, Vol. 17, 944–956.

Zhang X; Francis M.L; Dawson W.O; Graham J.H; Orbovic V; Triplett E.W; y Mou Z. (2010). Over-expression of the Arabidopsis NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur J. Plant Pathol*. 128:91-100.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

1. El análisis bioinformático mostró que la secuencia encontrada dentro del genoma de *Citrus sinensis* nombrada en este estudio como *CsWRKY18* presentó una estructura similar a la de factores de transcripción WRKY funcionalmente caracterizados.
2. El alineamiento múltiple confirmó que el dominio WRKY de unión al ADN se encuentra altamente conservado en la secuencia homóloga encontrada de *CsWRKY18*.
3. El modelaje por homología del dominio WRKY de *CsWRKY18* mostró una estructura tridimensional similar a la del dominio WRKY4 de *A. thaliana*, descrita por Yamasaki *et al*; 2005; por lo tanto su función como FT podría ser la misma.
4. El análisis filogenético indicó que *CsWRKY18* es homólogo de *AtWRKY18* de *Arabidopsis thaliana*, perteneciente al grupo IIa; concluyendo que este homólogo codifica para un factor de transcripción WRKY posiblemente involucrado en la cascada de señalización de defensa a patógenos dependiente de ácido salicílico.
5. Se elaboró una construcción de expresión con el ADNc de *CsWRKY18* (pCAMBIA2200::35S::CsWRKY18::NOS) y se logró la transformación de hojas de tabaco mediante *A. tumefaciens*, lográndose obtener siete plantas regeneradas (T0) que presentaron el transgén de interés, el cual fue detectado por PCR.

4.2 PERSPECTIVAS

En la presente tesis se clonó un ADNc homólogo a *AtWRKY18* en el genoma de *Citrus sinensis*. El ADNc de *CsWRKY18* tiene todas las características estructurales de los FT tipo WRKY que inducen la activación de la expresión de genes de defensa. Por lo tanto, es necesario realizar análisis funcionales que corroboren este hecho. La disponibilidad del ADNc de *CsWRKY18* permitirá realizar ensayos funcionales para determinar su papel en la resistencia al ataque de patógenos y su respuesta a la fitohormona de ácido salicílico.

Para determinar la integración y el número de copias del transgén *CsWRKY18* en las plantas transgénicas de tabaco se planea realizar un Southern blot. Este análisis nos permitirá determinar si las plantas transgénicas obtenidas se pueden considerar como líneas transgénicas. También se propone la realización de un Northern blot o bien la realización de una RT-PCR de tiempo real para cuantificar los niveles de expresión de *CsWRKY18* en las diferentes líneas transgénicas de tabaco obtenidas. Las líneas transgénicas serán retadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* para evaluar la capacidad de estas plantas de resistir el ataque de este patógeno y de esta forma determinar su papel en la resistencia a bacterias. La forma en que se planea evaluar la resistencia de las plantas transgénicas contra este patovar será mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), se espera observar un menor número de UFCs en las plantas transgénicas que muestren mayor resistencia. También se planea evaluar la expresión de *CsWRKY18* en plántulas de *C. sinensis* tratadas con diferentes concentraciones de ácido salicílico, para este fin se utilizará la técnica de RT-PCR de tiempo real. Se espera que la contribución de este trabajo sea útil para la generación de variedades cisgénicas de naranja dulce y de esta forma se puedan reducir las pérdidas económicas ocasionadas por las enfermedades bacterianas: cancrrosis y HLB.
