



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA TGA EN PAPAYA (Carica papaya L.)"

Tesis que presenta

FABIO MARCELO IDROVO ESPÍN

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán, Julio 2012



centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA TGA EN PAPAYA (Carica papaya L.)"

Tesis que presenta

FABIO MARCELO IDROVO ESPÍN

En opción al título de

DUCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Obción Biotecnología

Mérida, Yucatán, Julio 2012



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C. POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA TGA EN PAPAYA (*Carica papaya* L.)", fue realizado por el estudiante Fabio Marcelo Idrovo Espín, en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández y el Dr. Santy Peraza Echeverría, dentro de la Opción Biotecnología perteneciente al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.



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 0 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. EN LO ESPECIAL. ESTOS SE REGIRÁN 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.

FABIO MARCELO IDROVO ESPÍN

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Jorge Santamaría Fernández y el Dr. Santy Peraza Echeverría, por sus consejos, enseñanzas y apoyo que valoro mucho. Lo que he aprendido con Ustedes me acompañará por siempre.

A la Dra. Gabriela Fuentes Ortíz por su apoyo invaluable durante toda la investigación.

Al Dr. Jorge Santamaría Fernández por su inmejorable disposición al trabajo conjunto, apoyo constante y supervisión.

Al Dr. Santy Peraza Echeverría por su valiosa asesoría en el análisis *in silico*, en la transformación de papaya, por sus acertadas sugerencias durante de la investigación y la revisión del artículo derivado de esta tesis.

Al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado por constante su apoyo en bioinformática.

A los distinguidos miembros del comité revisor Dr. Jorge Santamaría Fernández, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Luisa López Ochoa, Dr. Roberto Gaxiola, Dra. Virgina Herrera Valencia, Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado y Dr. Víctor Suárez por sus comentarios y sugerencias sobre el documento final de tesis.

Al comité tutorial integrado por el Dr. Jorge Santamaría Fernández, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Luisa López Ochoa y Dr. Roberto Gaxiola, por sus comentarios y revisiones continuas.

Al MC. Carlos Talabera y MC. Francisco Espadas del Lab. de Fisiología Molecular por su constante ayuda y asistencia técnica.

A la MC. Adriana Quiroz M. del laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica y la Q. B. A. Ileana C. Borges Argáez del Lab. de Biotecnología de Cultivos Tropicales y Microalgas por su apoyo.

Al Técnico Eduardo Castillo por su valiosa asistencia en la transformación de papaya.

A la Dra. Marcela Gamboa y la Q. I. Irma Medina Baizabal por proveer las cepas de *C. gloeosporioides*.

A la MC. Mariana Menéndez y MC. Miguel Ángel Vallejo por facilitarme oligonucleótidos utilizados durante mi investigación.

A la MC. Anabel Solís por facilitarme callos de papaya Maradol utilizados en la presente tesis.

Al Ing. Fernando Contreras M. por facilitarme frutos para el ensayo de C. gloeosporioides.

A la MC. Sophia Loayza, investigadora incansable, por su apoyo, comentarios y sugerencias.

Al Sr. José Arjona por facilitarnos material vegetal de papaya utilizado en la presente tesis.

Al la Lcda. Gilma Michell, a Landy y Alejandra en la dirección de posgrado por su constante interés y apoyo.

Al CONACYT por la beca de estudios N° 228112 y al proyecto de ciencia básica N° 83829 a partir del cual derivó esta tesis.

De forma personal, expreso mi eterna gratitud con México, con el aporte de su maravillosa gente pude realizar mis estudios de posgrado y culminar con mi formación profesional.

Al Dr. Jorge Santamaría Fernández y la Dra. Gabriela Fuentes Ortiz por brindarme su amistad, apoyo incondicional, oportuno y sincero.

A mis amigos en el Lab. de Fisiología Molecular Carlos Talabera, Francisco Espadas, Mariana Menéndez, Benjamín Rodríguez, Anabel Solíz, Mariela Vázquez Calderón, Humberto Estrella Maldonado, Arianna Chan León, Fátima Sosa Canul, Christian Alcocer Jáuriga, Katiana Trejo Guillén, Nelly Estrella, Martha Chi, Daniel Leal y Fernando Contreras por haber compartido conmigo fraternos momentos durante mis estudios en el CICY. A mis amigos en el Lab. de Biotecnología de Cultivos Tropicales y Microalgas gracias por su amistad.

A toda mi familia en Ecuador, a mis padres León Idrovo⁺ y Ruth Espín por todo su cariño, enseñanzas y ejemplo. Un agradecimiento en particular a Rita Cabezas, Fernando Loayza y Madeleine Loayza. A mis primos, tíos y sobrinos que siempre recuerdo con afecto, todos Ustedes constantemente me brindaron su apoyo y palabras de aliento.

A la Dra. Ivón Ramírez Morillo por su invaluable ayuda y consejos sinceros.

Al Dr. Lizandro Peraza gracias por su importante apoyo a mi llegada a Mérida y amistad.

A la Sra. Rita Martínez, su fuerza y tenacidad han sido un ejemplo para mí, gracias por recibirnos afectuosamente, como a su familia.

A todos Ustedes, gracias.

De forma especial, un agradecimiento profundo a mi esposa Sophia, cuyo amor, tenacidad, espíritu crítico y fuerza inspiradora me acompañaron siempre durante este proceso. A mis hijos por su cariño infinito, sonrisas oportunas y travesuras, este logro no es soló mío, fue un esfuerzo conjunto que no pudo realizarse sin su apoyo.

.

DEDICATORIA

A mi amada esposa, **Sophia** A mis hijos **Adrián** y **Omar** El equipo perfecto para cualquier aventura Listos como siempre, para los retos que vendrán.

ÍNDICE	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I	
1.1 INTRODUCCIÓN	3
1.2 ANTECEDENTES GENERALES	4
1.2.1 PAPAYA	4
1.2.1.1 BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PAPAYA	5
1.2.2 Colletotrichum gloeosporioides	8
1.3 FACTORES TRANSCRIPCIONALES CLASE bZIP	11
1.3.1 FACTORES TRANSCRIPCIONALES TGA	12
1.3.2 FACTORES TRANSCRIPCIONALES TGA Y SU INTERACCION	15
CON NPR1	
1.4 SECUENCIA ASF-1 Y ELEMENTO as-1	16
1.5 DEFENSA EN PLANTAS	17
1.5.1 RECONOCIMIENTO, GENES DE RESISTENCIA	18
1.5.2 SEÑALIZACIÓN DE DEFENSA, BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO	18
SALICÍLICO	
1.5.3 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA	20
1.5.4 FUNCIÓN DE LOS FACTORES TGA EN LA DEFENSA Y DESARROLLO DE PLANTAS	21
1.6 CONTROL DE EXPRESIÓN DE TRANSGENES MEDIANTE	24
1.7 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	27
1.8 HIPOTESIS	27
1.9 OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
1.9.1 OBJETIVO GENERAL	27
1.9.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
1.9.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
REFERENCIAS	30

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN *in silico* DE HOMÓLOGOS DE TGAS EN 39 EL GENOMA SECUENCIADO DE *Carica Papaya* Var. SunUp

i

2.1 INTRODUCCIÓN	39
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.2.1 SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y PROTEÍNAS TGAS	40
2.3 RESULTADOS	42
2.3.1 HOMÓLOGOS DE TGA EN PAPAYA Y Arabidopsis	42
2.3.2 ANÁLISIS COMPARATIVO EN PARES DE SECUENCIAS CpTGA Y AtTGA	45
2.3.3 DOMINIOS ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS CPTGA PREDICHAS	45
2.3.3.1 DOMINIO DE UNIÓNN A ADN Y ZIPPER DE LEUCINA	45
2.3.3.2 DOMINIOS ACIDOS RICOS EN GLUTAMINA	46
2.3.4 FILOGENIA DE SECUENCIAS CpTGA Y AtTGA	47 ,
2.4 DISCUSION	48
2.4.1 EL GENOMA DE PAPAYA CONTIENE SIETE GENES CPTGA HOMÓLOGOS A LA SUBFAMILIA DE GENES AtTGA	48
2.4.2 EL DOMINIO DE bZIP EN LAS SECUENCIAS DE CPTGA COMPARTEN AMINOACIDOS CONSERVADOS ENCONTRADOS EN MIEMBROS DE ATTGA	49
2.4.3 LOS DOMINOS ÁCIDOS RICOS EN GLUTAMINA SE ENCUENTRAN DENTRO DE LAS SECUENCIAS CPTGA	50
2.4.4 LOS RESIDUOS DE CISTEINA PUEDEN ACTUAR COMO SITIOS DE UNION PARA NPR1	51
2.4.5 LOS MIEMBROS DE CPTGA SE AGRUPAN EN SUBCLADOS DEFINIDOS RELACIONADOS CON DEFENSA Y DESARROLLO	52
REFERENCIAS	54
CAPÍTULO III	
CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HOMÓLOGOS DE TGA EN <i>Carica papaya</i> var. Maradol; EXPRESÍÓN BASAL, EN RESPUESTA A SA Y A <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	59
3.1 INTRODUCCIÓN.	59
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.2.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	62
3.2.2 SINTESIS DE ADNC	62
3.2.3 CONDICIONES DE RT-PCR	63
3.2.4 MATERIAL VEGETAL DE C. papaya Var Maradol	64
3.2.5 MATERIAL VEGETAL PARA EL ENSAYO DE EXPOSICIÓN AL	64
PATÓGENO C. gloeosporioides	

ii

3.3 RESULTADOS	65
3.3.1 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE DIFERENTES TEJIDOS DE	65
C. papaya Var Maradol	
3.3.2 PATRONES DE EXPRESIÓN BASAL DE GENES CPTGA EN	67
DIFERENTES TEJIDOS DE C. papaya Var Maradol	
3.3.3 PATRONES DE EXPRESIÓN DE HOMÓLOGOS DE TGA EN	68
RESPUESTA A LA INDUCCIÓN CON ÁCIDO SALICÍLICO	
3.3.4 DESARROLLO DE LA ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE C.	69
papaya Var Maradol	
3.3.5 PATRONES DE EXPRESIÓN DE HOMÓLOGOS DE TGA EN	71
RESPUESTA A LA INDUCCIÓN CON C. gloeosporioides.	
3.4 DISCUSIÓN	73
3.4.1 LA INFECCIÓN DE C. gloeosporioides REDUCE LA	73
CANTIDAD DE ARN TOTAL EN TEJIDO ENFERMO	
3.4.2 LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES TIPO CpTGA SE	73
EXPRESAN EN DIFERENTES TEJIDOS DE FORMA BASAL	
3.4.3 LOS GENES CpTGA RESPONDEN A LA INDUCCIÓN CON SA	75
3.4.4 LOS GENES CpTGA RESPONDEN A LA INOCULACIÓN CON	77
C. gloeosporioides	
REFERENCIAS	81

CAPÍTULO IV

TRANSFORMACIÓN	TRANSITORIA	DE	CALLOS	87
EMBRIOGÉNICOS DE Ca	arica papaya va	r. Maradol	CON EL	
SISTEMA DE EXPRESIÓN	INDUCIBLE POR	RETANOL	ALC	
4.1 INTRODUCCIÓN				87
4.2 MATERIALES Y ME	TODOS			88
4.2.1 PURIFICACIÓN DE	LOS PLÁSMIC	OS pRB35	SAICR Y	88
pRB35SAIcRGUS				
4.2.2 TRANSFORMACIÓN	DE A. tumefacier	s LBA4404	CON LOS	90
PLÁSMIDOS pRB35SAIcR Y	pRB35SAIcRGUS	10		
4.2.2.1 CULTIVO DE CEPAS	DE A. tumefacien	s transforma	das	91
4.2.3 TRANSFORMACIÓN	EN TEJIDOS PR	ROVENIENTE	S DE C.	92
papaya var Maradol				
4.2.3.1 TRANSFORMACIÓN	DE CALLOS DE C.	papaya var	Maradol	92
4.2.3.2 TRANSFORMACIÓN	DE CÉLULAS EN	SUSPENSI	ÓN DE C.	93
papaya var Maradol				
4.2.3.3 TRANSFORMACIÓN	DE EXPLANTES	S DE C. p	apaya var	93
Maradol				
4.2.3.4 TRANSFORMACIÓN	DE EMBRIONE	S CIGOTICO	DS DE C.	93
<i>papaya</i> var Maradol				

4.2.4 LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE GUS	94
4.2.5 PROTOCOLO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y	95
REGENERACIÓN DE PLANTAS DE C. papaya var Maradol	
4.3 RESULTADOS	96
4.3.1 GENERACIÓN DE CEPAS DE A. tumefaciens	96
TRANSFORMADAS CON LOS PLÁSMIDOS pRB35SAICR Y	
pRB35SAIcRGUS	
4.3.2 VERIFICACIÓN DE LA INSERCIÓN DEL CASSETTE DE	97
EXPRESIÓN EN A. tumefaciens	
4.3.3 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN CALLOS DE C.	98
papaya var Maradol CON EL PLÁSMIDO pRB35SAIcRGUS	
4.3.4 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN CALLOS DE C.	98
papaya var Maradol CON LOS PLÁSMIDOS pRB35SAICR Y	
pRB35SAIcRGUS	
4.3.5 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE C.	99
papaya var Maradol	
4.3.6 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN EXPLANTES DE C.	101
papaya var Maradol CON LOS PLÁSMIDOS pRB35SAICR Y	
pRB35SAIcRGUS	
4.3.7 TRANSFORMACION TRANSITIORIA DE EMBRIONES	103
CIGÓTICOS DE C. papaya var Maradol	
4.3.8 PROTOCOLO ALTERNATIVO DE EMBRIOGÉNESIS	104
SOMATICA Y REGENERACION DE PLANTAS DE C. papaya var	
Maradol 439 ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE C. papava var Maradol	106
	107
4.4 DISCUSION	107
DI ÁSMIDOS DERSESAIOE V DE A. IUMERACIENS CON LOS	107
	108
var Maradol MEDIANTE A tumofacions	100
443 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIONES	109
REFERENCIAS	110
Our Inco de CERAS de Ar dumed como de so SARES SO COM NO	
CAPÍTULOV	
	112
5.1 DISCUSION GENERAL	440
5.2 CONCLUSIONES GENERALES	110
5.3 PERSPECTIVAS	120
REFERENCIAS	122
ANEXU	12/
	iv

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1.1 Síntomas característicos producidos por <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya	8
Figura 1.2 Proceso de infección en plantas por especies de Colletotrichum	10
Figura 1.3 Diagrama y clasificación de proteínas bZIP en Arabidopsis	13
Figura 1.4 Dominios en secuencias proteicas tipo TGA	14
Figura 1.5 Cisteínas involucradas en la interacción entre TGA1 y NPR1	16
Figura 1.6 Regulación de la expresión de genes PR de defensa, mediada por NPR1 y TGA en presencia de SA	17
Figura 1.7. Rutas biosintéticas de SA	19
Figura 1.8 Acido salicílico, derivado glucosilado de SA, metil salicilato y el análogo funcional sintético ácido 2,6-dicloroisonicotínico	20
Figura 1.9 Modelo de inducción por etanol del sistema alcR:alca fusionado a un gen TGA	26
Figura 1.10 Estrategia experimental dividida en etapas y correspondiente a los capítulos subsiguientes en la presente tesis	29
Figura 2.1 Representación de secuencias proteicas predichas CpTGA	43
Figura 2.2. Alineamiento de secuencias proteicas bZIP predichas	44
Figura 2.3 Representación esquemática probable del zipper de leucina de CpTGA1	46
Figura 2.4 Alineamiento de secuencias homólogas a <i>CpTGA</i> , dominio de activación QI	47
Figura 2.5 Relaciones evolutivas de homólogos de TGA en <i>A. thaliana</i> y <i>C. papaya</i> var SunUp.	48
Figura 3.1 Análisis de integridad de ARN	65
Figura 3.2 Análisis de integridad de ARN total proveniente de fruto de papaya Maradol.	66
Figura 3.3 Expresión basal, productos de RT-PCR, para genes TGA en <i>C. papaya</i> var Maradol	64
Figura 3.4 Expresión de genes <i>CpTGA</i> de papaya en respuesta a la inducción con SA 1mM a los 0, 4, 8 y 12 días posteriores al tratamiento	68
Figura 3.5 Síntomas observados en frutos de papaya Maradol al noveno día posterior al inicio del experimento	69
Figura 3.6 Área promedio de frutos al noveno día de iniciado el experimento	70
Figura 3.7 Frutos de papaya Maradol utilizados en el ensayo de exposición al patógeno al inicio del experimento (día cero) y a los nueve días osteriores.	71

۷

.

Figura 3.8 Amplificación de secuencias de ADNc de homólogos de TGA con oligonucleótidos específicos	72
Figura 4.1. Mapa de restricción de pRB-35SAlcR	89
Figura 4.2. Procedimiento para extracción de embriones cigóticos	94
Figura 4.3 Fragmentos esperados para los productos de la doble digestión con HindIII y EcoRI de los plásmidos pRB35SAlcRGUS y pB35SAlcR	97
Figura 4.4 Gel de los productos de PCR para el cassette de expresión 35S::AlcR::GUS y el control positivo el gen <i>uidA</i> (GUSPlus) que presentaron una banda única de 1200 pb	98
Figura 4.5 Callos no embriogénicos de papaya Maradol transformados transitoriamente con el plásmido pRB35SAlcRGUS.	98
Figura 4.6 Expresión transitoria de <i>uidA</i> (GUSPlus) callos no embriogénicos de papaya Maradol.	99
Figura 4.7 Transformación transitoria de callos embriogénicos de papaya Maradol y ensayo histoquímico de GUS	100
Figura 4.8 Transformación transitoria de callos embriogénicos de papaya Maradol	101
Figura 4.9 Expresión transitoria de <i>uidA</i> (GUSPlus) en hojas (con peciolo) de plántulas de papaya Maradol de aproximadamente 21 días de edad provenientes de invernadero	102
Figura 4.10 Transformación transitoria de tallos de papava Maradol	103
Figura 4.11 Ensayo histoquímico de GUS en embriones cigóticos de papaya Maradol transformados con bacterias que poseen los plasmidos pRB35SAlcRGUS, pLBA4404 y pCAMBIA1305.1	103
Figura 4.12 Embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos de <i>C.</i> papaya Var Maradol	104
Figura 4.13 Plántulas <i>in vitro</i> de <i>C. papaya</i> var Maradol obtenidas a partir de embriogénesis somática en medio de germinación	105
Figura 4.14 Plantas de <i>C. papaya</i> var Maradol traspasadas a sustrato estéril durante la etapa de aclimatación	106
Figura 4.15. Plantas de <i>C. papaya</i> var Maradol en invernadero, obtenidas a partir de embriogénesis somática	106

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 1.1 Reportes selectos de transformación genética de C. papaya	6
Tabla 1.2 Comparación entre el genoma de C. papaya y A. thaliana	7
Tabla 1.3 Reportes selectos de estudios diversos en C. papaya	7
Tabla 1.4 Factores TGA y su función más probable en la expresión de genes en A. thaliana	23
Tabla 1.5 Ejemplos de sistemas inducibles utilizados en plantas	25
Tabla 2.1. Homólogos de genes tipo TGA en C. papaya	42
Tabla 2.2 Porcentaje de identidad entre 17 secuencias protéicas tipoTGA de A. thaliana y C. papaya.	45
Tabla 3.1 Ejemplos de genes que poseen elementos as-1	61
Tabla 3.2 Secuencia de oligonucleótidos y longitud esperada de los amplicones correspondientes (5'-3')	63
Tabla 3.3 Concentración promedio de ARN en diferentes tejidos de C. papaya var Maradol	66
Tabla 4.1 Tiempo de respuesta de embriones somáticos de papaya Maradol y período de subcultivo en cada etapa del protocolo alternativo de embriogénesis somática	107

2,4-D	2, 4- Dichlorophenoxyacetic acid
ADHI	Alcohol dehidrogenasa l
AldDH	Aldehído dehidrogenasa
as-1	Elemento as-1
ASF-1	Activating sequence factor 1
BTB/POZ	Broad-complex, tramtrack, and bric-a-brac/poxvirus, zinc finger
BTH	Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid s-methyl ester
bZIP	Basic domain-Leucine zipper / Dominio básico-zipper de leucina
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DUA	Dominio de unión a ADN
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid / ácido etilendiamino tetraacético
EMSA	EMSA (Electrophoretic mobility shift assay
ERF	Ethylene-response factor
ET	Ethylene / etileno
FTs	Factores transcripcionales
Genes R	Genes de resistencia
GUS	Glucuronidase
HR	Hypersensitive response / respuesta hipersensible
INA	2,6-dichloroisonicotinic acid
JA	Jasmonic acid / ácido jasmónico
LeuZIP	Leucine zipper / Zipper de leucina
MeSA	Methyl salicylate / salicilato de metilo
MS	Murashige y Skoog
NPR1	Nonexpressor of pathogenesis-related (PR) genes 1
PAL	Phenylalanineammonia-lyase
PAN	Perianthia
PR1	Pathogenesis related 1
PRSV	Papaya ring spot virus-P
PVP	Polivinilpirrolidona

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura

QI y QII	Dominios ácidos ricos en glutamina I y II
ROS	Reactive oxygen species / especies reactivas de oxígeno
SA	Salicylic acid / ácido salicílico
SABP	SA-binding protein
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y
	Alimentación
TGA	TGACG Motif-binding factor
TMV	Tobacco mosaic virus / virus del mosaico del tabaco
WGS	Whole genome shotgun
X-GIcA	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide cyclohexylammonium salt
Mpb	Mega pares de bases

х

Los factores transcripcionales TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) están involucrados en la defensa de la planta e interactúan con la proteína NPR1 considerada como la reguladora maestra de la respuesta sistémica adquirida (SAR) y promover de esta forma la expresión de genes PR (Pathogenesis related).

El desarrollo de la presente tesis se debe a la falta de conocimiento del número, la estructura, filogenia y el comportamiento de genes que codifican para factores transcripcionales TGA de papaya Maradol y su posible relación con la defensa en papaya. En comparación con las 10 secuencias genómicas de *AtTGA* de *Arabidopsis thaliana*, se encontraron *in silico* seis genes homólogos dentro del genoma de *C. papaya* var SunUp y se denominaron como *CpTGA1*, *CpTGA2*, *CpTGA3*, *CpTGA4*, *CpTGA5* y *CpTGA6* y un gen homólogo a bZIP denominado *CpTGA7* que presentaron altos porcentajes de identidad de nucleótidos traducidos en la búsqueda tblastx. CpTGA5 corresponde a una secuencia previamente reportada como bZIP (denominada Cp25) que no había sido reportada como TGA.

En el árbol filogenético se observó que tres genes se agruparon uno cada uno dentro de subclados originalmente relacionados con defensa. Se propuso la clasificación de los CpTGA en función de los subclados formados I, II o III involucrados en defensa y desarrollo.

CpTGA1, CpTGA, CpTGA6 y *CpTGA4* mostraron expresión basal en todos los tejidos que se probaron. *CpTGA2* se expresó fuertemente en todos los tejidos excepto en peciolos mientras que *CpTGA5* se expresó solamente en pétalos y en menor medida en peciolos lo que sugiere que este gen es tejido específico y puede estar involucrado en desarrollo floral de papaya. Por otro lado se evaluó la expresión de toda la familia de CpTGA6 en respuesta a ácido salicílico (SA). La expresión de *CpTGA3, CpTGA4* y *CpTGA6* incrementó ligeramente en respuesta a SA, lo que sugiere la posible participación de estos genes en la respuesta SAR en papaya.

Adicionalmente se evaluó la expresión de genes *CpTGA* en frutos de papaya Maradol contra *C. gloeosporioides. CpTGA1, CpTGA3* y *CpTGA6* mostraron expresión aparentemente menor en frutos infectados lo que sugiere que estos genes no responden adecuadamente contra el patógeno. *CpTGA2, CpTGA4* y *CpTGA5* no presentaron cambio en la expresión y probablemente que no se relacionen en la defensa en contra de *C. gloeosporioides.* Por el contrario *CpTGA7* fue el único que aumentó su expresión y podría relacionarse en la defensa en contra del patógeno.

También se transformó diferentes tejidos de papaya. Se verificó la expresión transitoria de un gen reportero *uidA* regulado por un promotor inducible por etanol. Finalmente se estableció un protocolo alternativo de embriogénesis somática de papaya Maradol a partir de embriones cigóticos. Conjuntamente la expresión transitoria y la transformación de embriones somáticos ofrecen la posibilidad de obtener plantas transgénicas de papaya Maradol que sobre expresen transgenes como los TGAs regulados por un promotor inducible con la finalidad de aumentar la resistencia de papaya en contra de patógenos como *C.gloeosporioides*.

Palabras clave: bZIPs, TGAs, respuesta sistémica adquirida, defensa, Colletotrichum gloeosporioides, promotor inducible por etanol, embriogénesis somática, papaya Maradol

TGA transcription factors (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) are involved in plant defense and are found to interact with the NPR1 protein considered as the master regulator of systemic acquired resistance (SAR) and promote by this way the expression of PR genes (Pathogenesis related).

The development of this thesis is due the lack of knowledge of the number, structure, phylogeny and behavior of genes that codify for TGA transcription factors in papaya Maradol and its' possible relation with defense of papaya.

Compared to the10 *AtTGA* genomic sequences from Arabidopsis thaliana, 6 homologous genes of were found in silico within the genome of *Carica papaya* var SunUp papaya var and were called as *CpTGA1*, *CpTGA2*, *CpTGA3*, *CpTGA4*, *CpTGA5* and *CpTGA6* and one homologous gene to bZIP called *CpTGA7* that showed high identity percentages of translated nucleotides from tblastx search.

The phylogenetic tree showed that three genes were grouped one each in a subclade originally related with defense. It was proposed the classification of *CpTGA* in function of the formed subclades I, II and III involved in defense and development.

CpTGA1, CpTGA3, CpTGA6 and *CpTGA4* showed basal expression in all tissues that were tested. *CpTGA2* was strongly expressed in all tissues except in petioles while CpTGA5 was expressed only in petals and to a lower extent in petioles suggesting that this gene is tissue specific and may be involved in floral development of papaya. In addition was evaluated the expression of the entire family of CpTGA6 in response to salicylic acid (SA). The expression of *CpTGA3, CpTGA4 and CpTGA6* increased in response to SA, suggesting the involvement of these genes in the SAR response in papaya.

In addition was evaluated the gene expression of *CpTGA* in papaya Maradol fruits against *C. gloeosporioides*. *CpTGA1*, *CpTGA3* and *CpTGA6* apparently showed lower expression in infected fruits suggesting that these genes do not respond adequately to the pathogen. *CpTGA2*, *CpTGA4* and *CpTGA5* showed no change in expression and probably are not related to the defense against *C. gloeosporioides*. On the contrary *CpTGA7* was the only that increased its' expression and may be related to the defense against the pathogen.

Also were transformed different tissues of papaya. Was verified the transient expression of a *uidA* reporter gene regulated by an ethanol inducible promoter. Finally was established an alternative protocol of somatic embryogenesis for papaya Maradol from zygotic embryos. Together transient expression and transformation of somatic embryos offer the possibility for obtaining transgenic plants of papaya Maradol that over express transgenes like TGAs regulated by an inducible promoter with the purpose of enhance the resistance of papaya against pathogens as *C. gloeosporioides*.

Key words: bZIPs, TGAs, systemic acquired resistance, defense, *Colletotrichum gloeosporioides*, ethanol inducible promoter, somatic embryogenesis, papaya Maradol

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) probablemente tuvo sus orígenes en México y Costa Rica, para luego dispersarse a la India, Filipinas y África. Actualmente se cultiva en climas tropicales hasta los 2000 msnm, puede cultivarse expuesta totalmente al sol, requiere altas temperaturas y suelo muy bien drenado. La planta es de crecimiento rápido y genera un árbol con ramificaciones. El fruto es largo, de entre 7 a 30 cm de longitud, llegando a pesar hasta 9 kg y es de forma oblonga hasta esférica. El fruto comestible se consume fresco, se usa para elaborar jaleas y como saborizante. Adicionalmente la papaya contiene la enzima proteolítica papaína que se extrae y se comercializa como ablandador de carne. Finalmente, el fruto tiene un alto contenido en vitamina A y B (Hill, 2008).

Para México la papaya Maradol es uno de los más importantes productos de exportación, según la FAO en el año 2007 México fue el primer exportador y segundo principal productor de papaya en el mundo (FAOSTAT, 2007).

Una de las principales enfermedades de la papaya es causada por *Colletotrichum gloeosporioides* que puede causar antracnosis. Las infecciones de antracnosis se inician en etapas tempranas del desarrollo de la fruta, pero el patógeno permanece quiescente como un apresorio con infección o hifa sub cuticular hasta que la fruta alcanza la edad óptima (Dodd, 1992).

De acuerdo con Flaishman y Kolattukudy (1994), los niveles de etileno producidos por frutas climatéricas son suficientes para promover la infección de hongos. Loon *et al.* (2006) mencionaron que el etileno puede inducir la resistencia cuando se aplica antes de la infección pero que cuando la inducción ocurre durante la infección o cuando los primeros síntomas se manifiestan, se estimula el progreso (de la enfermedad, dependiendo del tipo de interacción entre planta y patógeno.

Se ha reportado que durante la maduración de aguacate y plátano el etileno aumenta de 0.2 a valores comprendidos entre 25 y 450 uL L⁻¹, este incremento en la concentración de etileno fue más que suficiente para promover la infección por *C. gloeosporioides* o *C. musae*. El etileno actuó como señal para estimular la germinación de esporas, formación

de micelio y formación de apresorios múltiples aumentando la capacidad de los hongos para ingresar dentro del hospedero (Flaishman y Kolattukudy, 1994).

Casarrubias *et al.* (2002) determinaron que el mayor avance de la antracnosis (esporulación de *C. gloeosporioides*) se presentó en frutos en estado de maduración para consumo y aquellos que iniciaron su etapa climatérica.

Por tanto el problema relacionado con la infección por *C. gloeosporioides* en papaya radica en que el hongo se encuentra presente en etapas tempranas de desarrollo del fruto sin presentar sintomatología, pero una vez que el fruto empieza a madurar, el hongo utiliza la señal química promovida por el etileno para iniciar su proliferación y generalizar el ataque en el fruto en etapa de postcosecha durante el transporte y la venta del producto.

La presente tesis se justifica debido a que se requieren procedimientos alternativos y efectivos para el control de *C. gloeosporioides* en papaya Maradol en etapa de postcosecha con la finalidad de reducir las pérdidas ocasionadas por la antracnosis desarrollada por este patógeno durante el almacenamiento, transporte, y venta del producto.

El aporte fundamental de esta tesis se centra en la caracterización molecular de factores transcripcionales tipo TGA en papaya, el estudio de la expresión de genes que codifican para estos factores transcripcionales relacionados a su vez con la regulación de genes de defensa y finalmente el establecimiento de un procedimiento para la obtención de embriones cigóticos con potencial para su transformación genética.

1.2 ANTECEDENTES GENERALES

1.2.1 PAPAYA

La papaya es una eudicotiledonea que pertenece al orden de las Brassiccales, familia Caricaceae, taxa papaya o *Carica papaya*, su centro de origen probable es Centroamérica, y las mayores zonas productoras alrededor del mundo son Brasil, Nigeria, India, México e Indonesia (Ploetz, 2008).

Es una planta arborescente y perennifolia de entre 2 a 10 m de alto. Posee una copa abierta y redondeada, hojas palmeadas grandes y pecioladas unidas directamente al tallo principal. Peciolo largo (0.7 a 1 m). Tallo erguido, cilíndrico y hueco excepto en los nodos. La corteza es lisa, verde grisácea con manchas pardas oscuras. Las flores pueden ser pistiladas, estaminadas o bisexuales con cáliz tubular de 8 a 10 mm de largo. Los frutos son bayas elipsoidales esféricas. Las semillas son esféricas, la endotesta es pardo negruzca y arrugada y están cubiertas por una capa mucilaginosa (sarcotesta). Existen plantas dioicas, monoicas, hermafroditas y polígamas (Vazquez *et al.*1999).

El fruto de papaya aporta 39 kcal, 1 g de proteína y 10 g de carbohidratos por 100g de fruto fresco, tiene alto contenido en vitamina A, B, C y D (Ploetz, 2008; Vazquez *et al.* 1999).

De acuerdo con SIAP-SAGARPA hasta el mes de abril de 2012 se contabilizaron 16,557 Ha de papaya sembradas en México con una producción de 160369 ton de frutos de papaya. Comparativamente para el año 2010 se sembraron 16,227.71 Ha de papaya, que representó una producción de 616,215.46 ton con un ingreso de 2,617,933,160 millones de pesos.

1.2.1.1 BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PAPAYA

La papaya es la primera especie frutícola tropical de la cual se ha obtenido una variedad modificada genéticamente, resistente al virus de la mancha anular de la papaya PRSV (Papaya ringspot virus-type P).

El virus causa manchas circulares en la planta y es un limitante en la producción mundial. Los PRSV-P son viriones de 780x12 nm encapsulados dentro de una cápside proteica de 36kDa, se transmiten por poblaciones de áfidos (Ploetz, 2008).

Quemada *et al.* (1990) clonaron la cubierta proteica de la cepa HA 5-1 (d'ebilitada) del PRSV de Hawaii y posteriormente diseñaron una construcción quimérica consistente en un "enhancer" de la región 5' no traducida y 16 aa de la secuencia codificante de la cubierta proteica del virus del mosaico del pepino y la secuencia estructural de la cubierta proteica del PRSV HA5-1. Posteriormente Fitch *et al.* (1990) consiguieron transformación

estable en papaya. La primera línea resistente al PRSV Hawaiano se denominó Sunset y posteriormente se obtuvieron otras líneas resistentes como la SunUp (homocigota para el gen de la cubierta proteica del virus) y la Rainbow (derivada de la cruza entre la variedad SunUp y la variedad no transgénica Kapoho, Gonsalves 2004).

Desde entonces otros trabajos referentes a la transformación genética de papaya se han reportado (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Reportes selectos de transformación genética de C. papaya

Característica	Autor
Silenciamiento del gen ACCoxidasa, promueve la maduración retardada en frutos de papaya	López et al. (2009)
Expresión de una defensina de Dahlia en papaya, resistencia a <i>Phytophthora palmivora</i>	Zhu <i>et al</i> . (2007)
Expresión del gen <i>MSCH</i> (codifica para una quitinasa), tolerancia a la araña roja <i>Tetranychus cinnabarinus</i> Boisd	McCafferty <i>et al.</i> (2006)
Expresión del gen de estilbeno sintasa VST1, resistencia a <i>Phytophthora palmivora</i>	Zhu <i>et al</i> . (2004)
Inserción del gen <i>ESAT-6</i> para inmunnoprofilaxis de tuberculosis, papaya como una posible vacuna comestible	Zhang <i>et al.</i> (2003)
Expresión del gen de citrato sintasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , tolerancia a aluminio	De la Fuente <i>et al.</i> (1997)
Expresión del gen <i>bar</i> , resistencia a fosfinotricina (herbicida)	Cabrera-Ponce <i>et al.</i> (1995)

Adicionalmente, Ming *et al.* (2008) reportaron la secuenciación del genoma de la variedad transgénica *C. papaya* var SunUp a partir de 2.8 millones de secuenciaciones aleatorias del genoma (WGS) proveniente de una planta femenina de la variedad referida.

Mediante tinción con el fluorocromo DAPI específico de ADN (Singleton y Sainsbury, 2006), Ming *et al.* (2008) determinaron en la etapa de paquiteno de la meiosis, que:

- Papaya posee 9 pares de cromosomas altamente eucromáticos,
- · Es de herencia diploide,
- Compartió un ancestro común con Arabidopsis hace alrededor de 72 millones de años.
- Su genoma posee 372 Mpb y es 2.976 veces más grande que el genoma de Arabidopsis (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Comparación entre el genoma de C. papaya y A. thaliana.

	C. papaya	A. thaliana
Tamaño (Mpb)	372	125
Número de cromosomas	9	5
Número de genes	24746	31114
Genes tipo ßZIP	56	80
Long. promedio de gen (pb/gen)	2373	2232
Long. promedio de intrón (pb)	479	165

Esta especie también ha sido objeto de estudio referente a biología molecular, bioquímica, cultivo de tejidos, fisiología, entre otros (Tabla 1.3), sin embargo hasta la fecha no existen trabajos relacionados con la expresión de genes TGA.

Tabla 1.3 Reportes selectos de estudios diversos en C. papaya

Estudio	Autor
Embriogénesis somática a partir de cultivo de células en suspensión	Anandan <i>et al.</i> (2012)
Propiedades antioxidantes de la papaína del látex de frutos inmaduros	Da Silva <i>et al</i> . (2010)
Caracterización del gen de subtilasa <i>CpSUB1</i> , relacionado con maduración	Othman y Nuraziyan (2010)
Embriogénesis somática en respuesta a luz, gelificante y phloridzin	Ascencio-Cabral et al. (2008).
Construcción de mapa genético de alta densidad	Chen et al. (2007)
Clonación de genes relacionados con desarrollo floral FLORICAULA y LEAFY	Qingyi et al. (2005)

1.2.2 Colletotrichum gloeosporioides

La infección de frutos y vegetales por patógenos puede ocurrir antes, durante o después de la cosecha. Las infecciones que ocurren antes de la cosecha y que permanecen quiescentes hasta algún punto de la maduración, son comunes entre los cultivares de frutos tropicales (Coates y Johnson, 1997).

Los hongos son los más importantes y prevalentes patógenos vegetales, le siguen en orden decreciente las enfermedades producidas por virus, bacterias, oomicetos, nematodos, fitoplasmas, viroides, plantas parásitas y protozoarios (Ploetz, 2008).

De acuerdo con el portal GBIF ver. 1.3.2 (2011) el patógeno *C. gloeosporioides* (Penz), sinónimo de *Glomerella cingulata*, pertenece al reino de los Hongos, filo Ascomicota, clase Ascomiceto, familia Glomerellaceae, género *Colletotrichum* y especie *Colletotrichum* gloeosporioides.

El hongo produce en *C. papaya* la antracnosis considerada como la más seria enfermedad en postcosecha para este cultivar y otras especies como mango, banana, aguacate, chícharo, fresas etc. *C. gloeosporioides* causa dos tipos de síntomas de antracnosis en papaya (Figura 1.1), lesiones circulares hundidas con esporulaciones color rosa y lesiones hundidas pronunciadamente definidas marrones-rojizas descritas como manchas de chocolate (Tarnowski y Ploetz, 2010; Coates y Johnson, 1997).



Figura 1.1 Síntomas característicos producidos por *C. gloeosporioides* en frutos de papaya a) lesiones típicas en el fruto de papaya de acuerdo con lo reportado por Tapia *et al.* (2008).b) micelio blanco algodonoso con acérvulos negros en un fruto de papaya de acuerdo con lo reportado por Hernández *et al.* (2005).

Los conidios de *C. gloeosporioides* requieren elevada humedad relativa (más de 82%), alta precipitación y temperaturas entre 22 y 32 grados centígrados para la producción óptima, germinación e infección. El hongo puede afectar cualquier tejido de la planta hospedera y usualmente se dispersan por la lluvia, el mayor daño se observa en flores y frutos. Las flores presentan lesiones oscuras e irregulares y suelen caerse (Ploetz, 2008; Redondo, 2003).

De acuerdo con Münch *et al.* (2008) las especies de *Colletotrichum* inician la infección con el desarrollo del apresorio melanizado, posteriormente se desarrolla la vesícula de infección y la hifa primaria, estas estructuras no matan la célula hospedera. Esta etapa de infección se llama biotrófica. Posteriormente en la etapa necrotrófica las hifas secundarias se dispersan dentro del tejido hospedero y lo matan, por esta razón las especies de *Colletotrichum* se denominan hemibiotróficas (Figura 1.2).

Las frutas climatéricas como la papaya son aquellas que exhiben un pronunciado incremento en la respiración y la producción de etileno que coincide con la maduración. Este tipo de frutas pueden ser cosechadas inmaduras para ser consumidas luego al madurar (Coates y Johnson, 1997). Flaishman y Kolattukudy (1994) demostraron que el etileno induce la germinación y formación de apresorios en suspensiones de conidios de *C. gloeosporioides* y *C. musae*.

Lakshmi *et al.* (2011) determinaron que el periodo de incubación de *C. gloeosporioides* en hojas de papaya era de 8.3 días posteriores a la inoculación y en frutos fue de 3.9 días, en cambio Casarrubias *et al.* (2002) al infectar frutos de papaya Maradol mediante 5 μ L de inóculo de *C. gloeosporioides* a concentraciones entre 3 y 4 x 10³ esporas mL⁻¹ observaron germinación de conidios entre 2 y 3 días posteriores a la inoculación, a las 90 horas las hifas invadieron la epidermis, los primeros estratos del parénquima en frutos en estado de maduración para consumo y en frutos en inicio de su etapa climatérica.

Se han reportado pérdidas de hasta el 5%, en campo ocasionadas por antracnosis (Robledo, 2003). En cambio, en postcosecha las pérdidas pueden ser entre 29% (Robledo, 2003) hasta valores superiores al 90% durante épocas favorables para el desarrollo de la enfermedad (Tatagiba *et al.* 2002).

Cap will be

Capítulo I



Figura 1.2 Proceso de infección en plantas por especies de *Colletotrichum* a) inicio de la interacción parasítica compatible, fase biotrófica b) formación del tubo de germinación, apresorio melanizado (línea gruesa negra) sobre la cutícula, vesícula de infección e hifa primaria, fase biotrófica c) aparecimiento de nuevas hifas primarias, formación de hifa secundaria inicio de fase necrotrófica d) colonización de las células, fase necrotrófica e) formación de acérvulo y desarrollo de nuevos conidios. Cn conidio Tg tubo germinativo Ap apresorio Vi vesícula de infección Hp hifa primaria Hs hifa secundaria Ac acérvulo. Basado en Horbach *et al.* (2011), Münch *et al.* (2008), Peres *et al.* (2005) y Cano *et al.* (2004).

Para reducir la incidencia producida por *C. gloeosporioides* se practica en las plantaciones la remoción manual de peciolos maduros (amarillos y secos donde se concentra el inóculo), frutos infectados, maduros y sobre maduros, el deshoje de las plantas de papaya y el aclareo. En postcosecha el lavado en disolución con hipoclorito de sodio al 2%

también contribuye a reducir la enfermedad y finalmente el almacenamiento a 17 °C permite conservar el fruto un tiempo mayor (Redondo, 2003).

1.3 FACTORES TRANSCRIPCIONALES CLASE bZIP

La transcripción es la etapa inicial en la que los genes son seleccionados para la expresión y modulación de los niveles de expresión. Se han identificado muchas proteínas que se unen al ADN e interactúan con promotores de genes vegetales, algunas de estas proteínas son estructuralmente similares a factores transcripcionales de animales o levaduras mientras que otras son ubicuas en plantas. Los factores transcripcionales usualmente son codificados por familias génicas. Un determinado factor actúa con un promotor específico. Los factores transcripcionales interactúan con las secuencias blanco *in vivo* dentro de la cromatina (Yanagisawa, 1998).

La regulación transcripcional de genes eucariontes se modula en parte por interacciones entre los factores transcripcionales (FTs) y sus correspondientes sitos de unión a ADN cercanos al gen regulado (Narlikar y Hartemink, 2006). La activación o represión de estos factores transcripcionales es uno de los pasos más críticos dentro del sistema de regulación celular que controla varios procesos biológicos (Brivanlou y Darnell, 2002). En la base de datos TRANSFAC 6.0 (Wingender *et al.* 2001) se encuentran agrupados los FTs en 5 superclases:

- Dominios básicos,
- Dominios de unión a ADN coordinados por Zn
- Hélice vuelta hélice
- Factores de andamio Beta con contactos para surco menor y
- otros factores transcripcionales.

Entre la superclase de dominios básicos se encuentra la clase de zipper de leucina (bZIP basic domain/Leu zipper; TRANSFAC 6.0; Wingender *et al.* 2001). Jakoby *et al.* (2002) clasificaron los 75 bZIP de *Arabidopsis* conocidos hasta esa fecha, en función de sus secuencias. Identificaron dominios específicos y agruparon a los 75 miembros bZIP en diez grupos (A hasta I y el grupo S) y un onceavo grupo con miembros sin clasificar (Figura 1.3 y Figura 1.4).

Capítulo I

El dominio bZIP dimeriza a través de 30 a 40 residuos proteicos y el sitio específico de unión a ADN se encuentra inmediatamente después del extremo N-terminal (Kohn *et al.* 1997). Para *Arabidopsis* los bZIP en su mayoría homodimerizan, las repeticiones de leucina se denominan heptámeros y cada una de las siete posiciones de aminoácidos es designada con una letra **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** y **g**. Las posiciones **a**, **d**, **e** y **g** determinan la especificidad de la dimerización. Los aminoácidos cargados en posición **a** inhiben la formación de homodímeros, las leucinas usualmente se ubican en posición **d** estabilizando el dímero, finalmente la interacción entre aminoácidos en posición **g** de un zipper de leucina y aminoácidos en la posición **e** de otro zipper de leucina opuesto resulta en la atracción o repulsión lo que finalmente determina la homodimerización o héterodimerización de zippers de leucina. Si la interacción pero si la interacción es entre aminoácidos similarmente cargados la homodimerización se inhibe (Deppmann *et al.* 2006, Deppmann *et al.* 2004, Vinson *et al.* 1989).

En un estudio realizado por Kirchler *et al.* (2010) se determinó que los residuos de serinas en las posiciones 15 y 19, dentro del dominio de unión a ADN de los bZIPs en plantas, tienen el potencial de ser sitios de fosforilación *in vivo*. La modificación generada por esta fosforilación provocaría la repulsión del bZIP del elemento al que se una dentro del promotor regulatorio del gen, permitiendo la regulación fina a nivel post transduccional.

1.3.1 FACTORES TRANSCRIPCIONALES TGA

Los TGAs se encuentran dentro de la clase de bZIP, pertenecen a la familia de factores de unión a la caja G, clase zipper de Leucina y superclase de dominios básicos (TRANSFAC 6.0; Wingender *et al.* 2001).

En *Arabidopsis* se conocen 10 miembros tipo TGA (Figura 1.3) que se ubican dentro del grupo **D** (Jakoby *et al.* 2002).

Capítulo I



Figura 1.3 Diagrama y clasificación de proteínas bZIP en *Arabidopsis*. Los bZIP de cada grupo se muestran en rectángulos grandes, los rectángulos pequeños representan dominios conservados junto con sus secuencias consenso del lado derecho de la figura.

Cada miembro de los factores transcripcionales TGA posee regiones conservadas de aminoácidos (Figura 1.4). De acuerdo con Vinson *et al.* (1989) el bZIP está formado por el dominio de unión a ADN (DUA) y el zipper de leucina (LeuZIP). Kirchler *et al.* (2011) determinaron que dentro del dominio de unión a ADN se encuentran residuos fosforilables

de glutamina, alanina y serina regularmente espaciados por tres aminoácidos (QxxxAxxxS).

En la región del extremo C terminal ocurre la interacción de TGA con NPR1 (Fan *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2000) dentro de esta región se encuentra el dominio de activación formado por dos dominios ácidos ricos en glutamina designados como QI y QII (Chuang *et al.* 1999, Schindler *et al.* 1992)

Finalmente, de acuerdo con Jakoby *et al.* (2002).las secuencias proteicas tipo TGA de *Arabidopsis* poseen en el extremo C terminal una firma característica identificada como Yx2RL[RQ]ALSS[LS]W.



Figura 1.4 Dominios en secuencias proteicas tipo TGA a) Diagrama de dominios conservados dentro de secuencias TGA de *Arabidopsis* las flechas negras representan los residuos fosforilables de glutamina, alanina y serina DUA dominio de unión a ADN, LeuZIP zipper de leucina QI/QII dominios ácidos ricos en glutamina F firma característica del bZIP del grupo D
b) Región bZIP, dominio de unión a ADN, dos líneas negras y zipper de leucina residuos de leucinas y glicina distribuidas regularmente con asteriscos c) línea punteada que representa la firma característica Yx2RL[RQ]ALSS[LS]W del grupo D de factores transcripcionales TGA de *Arabidopsis.* Aminoácidos idénticos encerrados en rectángulo negro, similares en gris, el resto aminoácidos diferentes.

Basado en Jakoby et al. (2002), Chuang et al. (1999), Schindler et al. (1992), Katagiri et al. (1990), Vinson et al. (1989).

1.3.2 FACTORES TRANSCRIPCIONALES TGA Y SU INTERACCIÓN CON NPR1

En mamíferos, los bZIPs se involucran en funciones como el desarrollo, ritmo circadiano, aprendizaje, memoria, respuesta al estrés y a la radiación. En plantas, genes a los que se asocian los TGA incluyen la glutatión transferasa (*GST*) que está involucrada en detoxificación y *PR1* (pathogenesis related 1). La unión selectiva de los TGAs con el ADN se efectúa en los elementos *as-1* de los promotores regulatorios de dichos genes (Amoutzias *et al.* 2006; Johnson *et al.* 2003; Zhang *et al.* 1999).

El gen *NPR1* codifica una proteína con dominio BTB/POZ y dominio de repeticiones de anquirina, la cual media interacciones proteína-proteína y está presentes en muchas proteínas con diferentes funciones (Spoel *et al.* 2003). El dominio de repeticiones de anquirina es esencial en la interacción con TGAs (Després *et al.* 2003, Zhou *et al.* 2000). Cao *et al.* (1994) determinaron que en plantas mutantes de Arabidopsis deficientes en *npr1* la ruta de señalización de SA estaba bloqueada y que SAR y la resistencia local estaban interrumpidas.

A partir de ensayos de dos híbridos en levaduras se conoce que NPR1 interactúa *in vitro* con TGA3, TGA7, TGA2, TGA5, TGA6 por el contrario NPR1 no interactúa *in vitro* con TGA1, TGA4 ni PAN (Hepworth *et al.* 2005, Després *et al.* 2000, Zhou *et al.* 2000).

Mediante un ensayo *in vitro* en levaduras, Després *et al.* (2003) caracterizaron la región de interacción de TGA1 con NPR1 (Figura 1.5), dentro de esta región de 30 aminoácidos ubicados en el primer dominio ácido rico en glutamina QI, se determinó que las cisteínas en posición 260 y 266 en su forma oxidada impedían la interacción entre TGA1 y NPR1 mientras que en su forma reducida la promovían posterior a la exposición a SA. Concluyeron que TGA1 forma un enlace de disulfuro en su forma oxidada, con efecto inhibitorio sobre la interacción con NPR1, en los residuos de cisteína Cis-260 presentes únicamente en TGA1 y TGA4 Després *et al.* 2003).



Figura 1.5 Cisteínas involucradas en la interacción entre TGA1 y NPR1 El triángulo invertido blanco indica la posición 260, el negro la posición 266. Aminoácidos idénticos encerrados en rectángulo negro, similares en gris, el resto aminoácidos divergentes (Basado en Després *et al.* 2003)

1.4 SECUENCIA ASF-1 Y ELEMENTO as-1

De acuerdo con Lam *et al.* (1989), la secuencia ASF-1 (Activating Sequence Factor 1) es una proteína con especificidad de unión a ADN en dos motivos tandem TGACG denominados *as-1* (activating sequence 1) localizados dentro del promotor regulatorio del virus del mosaico de la coliflor (CamMV35S). Estos elementos también se encuentran localizados en el promotor regulatorio de *PR1* y poseen motivos TGACG que intervienen en la respuesta a SA en tabaco y Arabidopsis, para diferenciarlos se los denominó como LS5 y LS7. En *N. tabaccum* la secuencia de LS7 es **TaAC GTCA** y la de LS5 es **TGAC GgC**c mientras que en *Arabidopsis* son tcta**TGAC GTaA** y **TGAC GT**aga (Blanco *et al.* 2005). LS7 es un elemento regulatorio positivo involucrado en respuestas a ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y ácido salicílico (SA). Se conoce que en tabaco, este elemento *cis* puede ser activado por SA a concentraciones de 1 mM (Kegler *et al.* 2004). La mutación del elemento LS7 produjo la pérdida total de la inducción de PR1. Mientras que LS5 es un elemento regulatorio negativo cuya mutación aumentó la expresión de PR1 (Lebel *et al.* 1998).

En ensayos de unión competitiva a ADN Schindler *et al.* (1992) demostraron que TGA1 de Arabidopsis interactuaba fuertemente con el pentámero TGACG. El dominio de unión a ADN en TGA1 se localizó en el extremo N terminal mientras que el C terminal está enriquecido de glutamina y aminoácidos acídicos, este dominio está involucrado en la activación transcripcional.

1.5 DEFENSA EN PLANTAS

Incapaces de moverse, las plantas evolucionaron mecanismos sofisticados de protección químicos o físicos, de acuerdo con Glazenbrook (2005). De forma general, durante la infección de un patógeno la planta biosintetiza la molécula señal ácido salicílico (SA Salicylic acid) que activa la expresión de *NPR1*, la proteína NPR1 interactúa con factores transcripcionales TGAs para regular la expresión de genes *PR* que codifican para pequeñas proteínas secretadas con actividad antimicrobiana e inducir finalmente la resistencia sistémica adquirida SAR (Systemic Acquired Resistance, Figura 1.6).

La SAR es una respuesta inmunológica inducida de forma local que confiere resistencia a través de toda la planta a un amplio espectro de patógenos y puede ser activada por aplicación exógena de SA (Wang *et al.* 2005).



Figura 1.6 Regulación de la expresión de genes PR de defensa, mediada por NPR1 y TGA en presencia de SA a) antes de la inducción con SA, NPR1 reside dentro de un complejo homo oligomérico dentro del citoplasma, después de la inducción con SA, la acumulación de SA dispara un cambio redox b) esto provoca la monomerización de NPR1, como un resultado de la reducción de puentes disulfuro intermoleculares. c) En su forma monomérica, NPR1 es transportada hacia el núcleo, activa la expresión de genes PR e induce la SAR. NPR1 como oligómero en color amarillo, NPR1 como monómero en color naranja, TGAs cuadrados color celeste (Basado en Weigel, 2005).

En los siguientes numerales se detallan los genes y etapas involucrados con la defensa en plantas.

1.5.1 RECONOCIMIENTO, GENES DE RESISTENCIA

Las rápidas respuestas defensivas de las plantas conducen a un crecimiento limitado del patógeno, y se explican en base al modelo de gen por gen que describe la interacción entre los productos de los genes de avirulencia (Avr) del patógeno y de resistencia (R) del hospedero.

La producción de efectores virulentos del patógeno conducen al reconocimiento por los genes correspondientes de resistencia de la planta. Los patógenos reconocidos por esta vía no causan enfermedad y se llaman patógenos avirulentos, el hospedero es resistente y la interacción es incompatible. Al fallar el reconocimiento por la falta del gen de avirulencia o el gen R del hospedero, el patógeno se llama virulento, el hospedero es susceptible y la interacción es compatible (Glazenbrook, 2005).

La resistencia mediada por genes R se asocia con la producción rápida de especies reactivas de oxígeno ROS (del inglés reactive oxygen species) que a su vez son necesarias para la muerte celular programada (conocida como respuesta hipersensible HR, hypersensitive response). Los efectos finales de HR son los de contener al patógeno dentro de las lesiones y evitar que se dispersen a través de la planta, adicionalmente limitar el acceso de nutrientes y agua al patógeno (Glazenbrook, 2005; Weigel, 2005).

Adicionalmente, los genes R se involucran en la activación de la ruta de señalización dependiente de ácido salicílico (SA Salicylic acid). El ácido salicílico se acumula en el tejido afectado y sano donde promueve la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis (pathogenesis-related PR) que finalmente contribuyen a la resistencia sistémica adquirida SAR (Systemic Acquired Resistance). La SAR comprende inmunidad local y sistémica en contra de un amplio rango de patógenos normalmente virulentos. Es de larga duración y efectiva en retos subsecuentes. (Glazenbrook, 2005; Weigel 2005; Spoel *et al.* 2003).

1.5.2 SEÑALIZACIÓN DE DEFENSA, BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO SALICÍLICO

Se conocen dos rutas de biosíntesis de SA en plantas:

- Producción de SA en el citoplasma a partir de fenilalanina (en plantas como el tabaco y pepino) siguiendo la ruta de fenilpropanoides (Figura 1.7). En tabaco, la conversión del ácido *trans* cinámico a partir de fenilalanina por la enzima fenilalanina amonio liasa (Phenylalanineammonia-lyase, PAL) promueve la resistencia en contra de invasión fúngica al producir ácido benzoico, precursor de SA (Chaturvedi y Shah, 2007; Hayat *et al.* 2007; Dixon *et al.* 2002).
 - Producción de SA a partir de ácido corísmico e isocorísmico derivados del shikimato. La conversión de estos precursores ocurre en los plastidios en *Arabidopsis* (Kawano y Furuichi. (2007).



Figura 1.7 Rutas biosintéticas de SA (Chaturvedi y Shah, 2007; Hayat et al. 2007; Dixon et al. 2002).

En hojas de tabaco de plantas que adquirieron resistencia a la infección por virus del mosaico del tabaco ocurrió la interconversión entre SA y su forma glucosilada debido al exceso de SA. Presumiblemente el SA almacenado como glucósido, puede ser utilizado posteriormente si se requiere (Kawano y Furuichi, 2007).

En hojas de *Nicotiana tabaccum* var. Xanthi inducidas por inóculos de virus del mosaico del tabaco (TMV), Vernooij *et al.* (1994) determinaron que el contenido de SA en hojas infectadas (1.5 a 2.5 µg g⁻¹ tejido) era mayor al contenido encontrado en hojas control (0.03 a 0.04 µg g⁻¹ tejido).

1.5.3 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA

Forouhar *et al.* (2005) demostraron que la esterasa de tabaco SABP (SA-binding protein) presentó actividad con el metil salicilato (inactivo) como sustrato para producir SA (activo) por hidrólisis. Posteriormente Park *et al.* (2007) determinaron que el MeSA es una señal traslocable por floema para inducir SAR y que SABP2 es su receptor en tejido distal (lejano al sitio de infección). Por otro lado, Ward *et al.* (1991) identificaron genes que se expresaron fuertemente dentro del primer día posterior a la aplicación de SA durante el inicio de SAR en *Nicotiana tabaccum* cv Xanthi. Colectivamente los denominaron como genes SAR y pertenecen a familias que codifican para proteínas PR-1 (PR-1 a, PFMb y PFMc), PR-2 (PR-2a, PR-2b y PR-2c), PR-3 (PR-3a y PR-3b), PR-4 (PR-4a y PR-4b), PR-5 (PR-5a y PR-5b) y PR-Q' una β,3-glucanasa extracelular.

En *Arabidopsis*, la expresión de PR1 puede inducirse por aplicación exógena de SA o de su análogo fisiológico, el ácido 2,6-dicloroisonicotínico o INA (Zhang *et al.* 2003). Sustancias relacionadas con SA se ilustran en la Figura 1.8.



Figura 1.8 Acido salicílico, derivado glucosilado de SA, metil salicilato y el análogo funcional sintético ácido 2,6-dicloroisonicotínico (Chaturvedi y Shah, 2007).

De forma general, plantas mutantes y transgénicas afectadas en la acumulación de SA, son más susceptibles a infección por patógenos que las silvestres. En cambio al bloquear la respuesta a JA se generan plantas más susceptibles a herbívoros y con susceptibilidad aumentada a patógenos necrótrofos. Este efecto se debe a que SAR suprime la señalización de JA, priorizando la resistencia a patógenos biótrofos sobre las defensas de JA a insectos herbívoros y patógenos necrótrofos (que usualmente matan el tejido vivo y se alimentan del remanente). La acumulación de SA activa y trasloca NPR1 al núcleo y este a su vez promueve la activación de genes *PR*, el remanente de NPR1 activado en el citosol suprime la expresión de genes y bioacumulación de JA facilitando el ingreso de

reguladores negativos de genes responsivos a JA hacia el núcleo o inhibiendo reguladores positivos de genes responsivos a JA (Spoel *et al.* 2003)

1.5.4 FUNCIÓN DE LOS FACTORES TGA EN LA DEFENSA Y DESARROLLO DE PLANTAS

De forma general se conoce que miembros de las familias de factores de transcripción ERF, R2R3 Myb, TGA bZIP, Whirly y WRKY de *Arabidopsis*, se unen a elementos dentro del promotor de genes de defensa regulando su expresión. Los elementos *cis* blancos de estos factores transcripcionales y sus secuencias son conocidas (Euglem, 2005). En particular, y de acuerdo con Kesarwani *et al.* (2007), los factores TGA regulan diferencialmente la expresión de los genes PR.

Kesarwani *et al.* (2007) usaron mutantes para determinar la expresión del gen *PR1*, demostraron que el mutante tga2-2 producía una mayor expresión de *PR1* en respuesta a la inducción con INA. Por tanto se concluyó que TGA2, en presencia de otros factores TGA, es un represor de los genes *PR*. Mediante ensayos de movilidad EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) Després *et al.* (2000) demostraron que TGA2 puede unirse a los elementos LS5 y LS7 debido a que formaron complejos LS5 y LS7 con TGA2. En cambio NPR1 no se unió a LS5 ni LS7, pero la adición de NPR1 a la mezcla de reacción, produjo aumento en la formación de complejos LS5/TGA2 y LS7/TGA2. TGA4 también se unió al elemento LS7 y la adición de NPR1 no aumentó de forma significativa la cantidad de complejo formado, por lo que TGA2 parece tener función dual de activador y represor transcripcional dependiendo del tipo de elemento as-1 del promotor al cual se una, pudiendo ser al positivo LS7 o al negativo LS5 (Kesarwani *et al.* 2007).

Al inocular plantas mutantes y silvestres de *Arabidopsis*, Kesarwani *et al.* (2007) observaron que en la planta mutante tga3-1 se presentó mayor crecimiento bacteriano en relación con la silvestre y menor crecimiento bacteriano que la mutante npr1-1. La doble mutante tga3-1/npr1-1 presentó mayor crecimiento en comparación con las dos primeras, demostrando que TGA3 se necesita para la defensa inducida y basal, además que su función no es totalmente dependiente de NPR1

Zhang *et al.* (2003) por su parte indujeron con INA plantas mutantes tga6-1, tga2-1/tga5-1 y plantas silvestres.

Observaron niveles de expresión del gen PR1 altos y similares. La expresión de PR1 inducida por INA y en la ausencia de INA, fue muy baja en la triple mutante tga6-1/tga2-1/tga5-1. La doble mutante tga2-1/tga5-1 sin inducción con INA presentó baja expresión de PR1. Por tanto TGA2, TGA5 y TGA6 son suficientes para producir la expresión de PR1 y su consecuente resistencia a patógenos, luego de la inducción por INA. Su función es redundante en la inducción de SAR (Zhang *et al.* 2003).

La expresión de gen *PR1* inducido por INA en dobles mutantes tga1-1/tga4-1, fue similar a la del mutante tga1-1. En cambio al inocular los mutantes con *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* ES4326 y cuantificar el crecimiento bacteriano, tga1-1/tga4-1 permitió mayor crecimiento que el observado en tga4-1 y un poco más que en tga1-1 (Kesarwani *et al.* 2007). El crecimiento bacteriano comparado entre los pares de mutantes tga1-1/tga4-1 y npr1-1 fueron casi los mismos, (además de ser mayores que el crecimiento observado entre tga4-1 y la variedad silvestre). Por tanto TGA1 y TGA4 regulan positivamente la resistencia basal, son parcialmente redundantes y TGA1 tiene un mayor efecto en la resistencia que TGA4 (Kesarwani *et al.* 2007). Usando construcciones de ihpARN (intron hairpin ARN) específicas para TGA4 y TGA5 de Arabidopsis, Rhonda *et al.* (2004) determinaron en ensayos de inducción con SA que TGA4 es un represor y TGA5 es un activador de la expresión de genes que poseen el elemento as-1 en sus promotores.

El mutante TGA6_{ACT} sobre expresa TGA6, la doble mutante tga2-2/ TGA6_{ACT} produjo un aumento considerable en la expresión de PR1 en relación con la expresión conseguida mediante los mutantes TGA6_{ACT} y tga2-2 lo cual demostró que TGA6 es un activador transcripcional constitutivo de PR1, reprimido por la presencia de TGA2. El triple mutante tga2-2/TGA6_{ACT}/tga3-1 produjo la represión total de PR1 reforzando la afirmación de que TGA3 es el mayor activador transcripcional de genes PR (Kesarwani *et al.* 2007).

Los TGA restantes identificados en *Arabidopsis* se relacionan esencialmente con aspectos de desarrollo. A partir de dos líneas mutantes (T-ADN de inserción) *perianthia-1* y *perianthia-2*, Running *et al.* (1996) determinaron que *PAN* se relaciona con el número de órganos florales. Comúnmente las flores silvestres de *A. thaliana* poseen cuatro verticilos

concéntricos de órganos. Cuatro sépalos en el primer verticilo, seguido de cuatro pétalos en el segundo verticilo, seis estambres en el tercer verticilo y finalmente dos carpelos en el cuarto verticilo (central). En cambio una flor de una planta mutante *pan-1* de forma general presentó cinco sépalos en el primer verticilo, cinco pétalos en el segundo verticilo, cinco estambres en el tercer verticilo y dos carpelos en el cuarto verticilo.

De forma similar Murmu *et al.* (2010) generaron mutantes de inserción *tga9* y *tga10.* Las mutantes por si solas no produjeron un fenotipo diferente a las silvestres lo que sugiere que poseen funciones redundantes, la doble mutante *tga9tga10* en cambio produjo anteras morfológicamente anormales (esterilidad masculina) sin cambios aparentes en el patrón floral.

En papaya Porter *et al.* (2008) reportaron la secuencia C*p*25, como una clona similar a *liguleless2 (lg2)* que codifica para una proteína de zipper básico de leucina en maíz. Este gen se expresó específicamente en raíz y se asoció con desarrollo de las mismas. Frente a la exposición a *Phytophthora palmivora*, este gen mostró baja expresión en raíz.

Con la información disponible, las funciones más probables de TGA en *Arabidopsis* son las siguientes:

Tabla 1.4 Factores TGA y su función más probable en la expresión de genes en Arabidopsis thaliana (Basado en Murmu et al. 2010, Shearer et al. 2009, Kesarwani et al. 2007, Running et al. 1996).

Factor	N° de Accesión	Función probable						
AtTGA1	At5g65210	Resistencia basal, parcialmente redundante. Promueve mayor resistencia que TGA4.						
AtTGA2	At5g06950	Represor o activador de <i>PR1</i> dependiendo del elemento <i>as-1</i> al que se una. Suficiente para promover expresión de <i>PR1</i> , redundante con TGA5 y TGA6.						
AtTGA3	At1g22070	Resistencia basal e inducida, mayor activador transcripcional de <i>PR1</i> .						
AtTGA4	At5g10030	Resistencia basal, parcialmente redundante junto con TGA1.						
AtTGA5	At5g06960	Suficiente para promover expresión de <i>PR1</i> , redundante con TGA2 y TGA6.						
AtTGA6	At3g12250	Suficiente para promover expresión de <i>PR1</i> , redundante con TGA2 y TGA5.						
AtTGA7	At1g77920	Probablemente redundante a TGA3						
AtPAN	At1g68640	Regula el número de órganos florales						
AtTGA9	At1G08320	Relacionado con el desarrollo de anteras, ambos son						
AtTGA10	At5G06839	funcionalmente redundantes						

1.6 CONTROL DE EXPRESIÓN DE TRANSGENES MEDIANTE PROMOTORES INDUCIBLES

El control de la expresión de genes recombinantes bajo el control de un promotor inducible permite obtener una respuesta muy específica de los mismos en el momento preciso de la inducción. Al respecto Gatz (1997) menciona que los sistemas de inducción de los genes son un componente esencial para el control cuantitativo y temporal de los genes transferidos.

Idealmente, los sistemas de expresión regulable de transgenes deben tener niveles de expresión bajos en ausencia de la sustancia química, incrementar rápidamente su expresión una vez que se aplique el inductor, ser altamente específicos respecto al inductor, presentar un amplio rango de respuestas con respecto a la concentración del inductor, no deben tener efectos tóxicos en la planta u otros organismos del ecosistema de la planta, no deben causar efectos pleiotrópicos en la especie vegetal, deben ser de fácil aplicación en campo o invernadero (atomización) o condiciones de cultivo de tejidos, la inducción debería ser eficaz a bajas concentraciones (Zuo y Chua, 2000; Gatz, 1999).

El inductor por tanto debe afectar solo la expresión del transgen. Se usan elementos regulatorios bien caracterizados de organismos evolutivamente distintos como levaduras, *E. coli, Drosophila melanogaster* o células de mamíferos que responden a señales químicas que usualmente no se encuentran en plantas (Tabla1.4). El control génico puede realizarse a nivel transcripcional (activación ó represión del promotor) y mediante el control post transcripcional de la función proteica (Gatz, 1997).

Los genes propios de la planta también pueden ser inducidos por el regulador químico de la expresión derivando de forma negativa en el crecimiento y desarrollo de la misma. Por ejemplo la ausencia de nutrientes o señales químicas del metabolismo (como posibles reguladores de la expresión) afectarían negativamente las condiciones fisiológicas de la planta además son difíciles de manipular. Adicionalmente deben excluirse promotores que responden a fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal (Gatz, 1997). Tabla 1.5 Ejemplos de sistemas inducibles utilizados en plantas

Nombre	Características	Inductor	Referencia	
GVG	DUA de GAL4 (levadura)/TAD proteína VP16 (herpes viral), RD del receptor gluco corticoide (rata)	Dexametasona (dex)	Aoyama y Chua, (1997).	
Heliothis EcR/GR	Receptor quimérico, dominio glucocorticoide de transactivación de <i>Heliothis virescens</i> y dominios de unión a ADN	RH5992, agroquímico no esteroidal	Martínez <i>et al.</i> (1999).	
tTA	Dominio represor de tetraciclina (bacteriano) fusionado al dominio de activación VP16 (herpes viral).	Tetraciclina	Weinmann <i>et al.</i> (1999).	

De acuerdo con Roslan *et al.* (2001) y Caddick *et al.* (1998) el promotor alc derivado del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* es un switch genético adecuado para la expresión de genes en plantas debido a que:

- Es relativamente simple, compuesto de dos elementos, el factor de transcripción AlcR (gen *aclR*) y el promotor derivado a partir de *alcA* (Figura 1.10).
- Existe divergencia evolutiva entre A. nidulans y las plantas superiores de forma que es poco probable que un homólogo en plantas de la proteína AlcR active el promotor alcA.
- Los inductores químicos son moléculas orgánicas relativamente simples y de baja toxicidad.
- A condiciones normales de crecimiento los niveles naturales de inductores endógenos son bajos.

En *A. nidulans*, alcR controla la activación de un número de genes estructurales como el alcA y aldA, los cuales codifican la alcohol dehidrogenasa I (ADHI) y la aldehído dehidrogenasa (AldDH) respectivamente (Roslan *et al.* 2001).

Salter *et al.* (1998) utilizaron un sistema inducible compuesto por un cassette regulador (35S:alcR) y un cassette efector (alcA:CaMV35S:CAT). El gen reportero de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) respondió a la inducción con etanol de forma tiempo y dosis dependiente en plántulas y plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabaccum* cv. Samsun NN).

En plántulas cultivadas mediante hidroponía se detectó la actividad de CAT (Hg CAT mg⁻¹ proteína total) mediante la prueba de ELISA después de la inducción con etanol al 0.01%, el nivel de actividad permaneció constante entre 0.02 y 0.08%, presentó un máximo a concentración de 0.1%. A concentraciones de 0.5, 1 y 5 % la actividad de CAT decreció y las plántulas se observaron estresadas, a concentraciones de 10 y 20% las plántulas murieron (Salter *et al.* 1998). Al atomizar etanol en las hojas de plantas maduras (ocho semanas) no se detectó expresión a concentración de 0.1% de etanol y se obtuvieron bajos niveles de actividad de CAT para 0.5 y 1%. A concentración de 2.5% obtuvieron niveles de actividad similares a los del ensayo con hidroponía (entre 0.02 y 0.08%). El máximo se obtuvo a 20% de etanol pero se observó un deterioro en las plantas. Finalmente al adicionar etanol al agua de riego se obtuvieron niveles altos de expresión a concentracion se obtuvieron niveles altos de expresión a concentracion se obtuvieron niveles altos de expresión a concentración de 0.1% de etanol y 5.5% (Salter *et al.* 1998).



Figura 1.9 Modelo de inducción por etanol del sistema alcR:alca fusionado a un gen TGA a) En ausencia de etanol, la proteína AlcR producida por el gen *alcR* no se une al promotor palcA b) el etanol adicionado permite que AlcR se una al promotor del gen palcA c) el gen TGA se expresa (Basado en Tomsett *et al.* 2004).

1.7 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Las preguntas que inicialmente surgieron fueron las siguientes:

¿Cuántos factores transcripcionales tipo TGA se encuentran dentro del genoma de *C. papaya* var Maradol? De encontrarse debemos sustentar que dichos factores transcripcionales pertenezcan al tipo TGA.

De estos posibles factores transcripcionales tipo TGA ¿Cuál responde de forma constitutiva en la planta? ¿Responden únicamente al ataque de patógenos o también responden a otro estímulo diferente? ¿Responden a inductores como SA y a la infección de una cepa de hongo? De hacerlo ¿Cuál se expresa más?

¿El sistema de regulación inducible por etanol AlcC podría funcionar en papaya para expresar al menos un gen reportero?

De lo dicho anteriormente se plantearon las siguientes hipótesis.

1.8 HIPÓTESIS

- Dentro del genoma de *C. papaya* var Maradol existen genes que codifican para factores transcripcionales tipo TGA y su expresión se ve modificada por la aplicación exógena de SA o la presencia del patógeno *C. gloeosporioides*.
- En *C. papaya* var Maradol se puede sobre expresar un gen reportero mediante un promotor inducible por etanol.

1.9 OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.9.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar homólogos de factores de transcripción de la familia TGA en papaya (*C. papaya* L.).

1.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la estructura y filogenia de homólogos de factores de transcripción TGA en la variedad transgénica de papaya SunUp.

2. Evaluar la expresión de homólogos de genes TGA en *C. papaya* var Maradol de forma basal y posterior a la aplicación de SA e infección con *C. gloeosporioides*.

3. Evaluar el sistema inducible de expresión alc en *C. papaya* var Maradol utilizando un gen reportero.

1.9.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para probar las hipótesis y cumplir con los objetivos propuestos se diseñó la estrategia experimental ilustrada en la (Figura1.10). Se dividió el trabajo en tres etapas de investigación:

Etapa 1 Durante esta etapa se realizó la búsqueda de secuencias TGAs de *A. thaliana*, se trabajó *in silico* para aislar las secuencias homólogas a bZIP de *A. thaliana* en *C. papaya* var Maradol. Se alinearon las secuencias, obtuvo la filogenia de las secuencias y diseñaron oligos para RT-PCR.

Etapa 2 Durante esta etapa se procedió a efectuar los ensayos *in vivo*, se colectó el material vegetal de una plantación comercial para determinar la expresión basal de los homólogos de TGA en *C. papaya* var Maradol, se utilizaron plántulas para el ensayo con SA y finalmente se usaron frutos expuestos a *C. gloeosporioides*.

Etapa 3 Finalmente en esta etapa se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido que contiene el sistema pAlcR/alcA inducible por etanol con el gen reportero *uidA*. Posteriormente se realizó la transformación transitoria en diferentes tejidos de papaya, y paralelamente se estandarizó un protocolo de embriogénesis somática mediante el cual se obtuvo embriones somáticos a partir de embriones cigóticos de *C. papaya* var Maradol.

Figura 1.10 Estrategia experimental dividida en etapas y correspondiente a los capítulos subsiguientes en la presente tesis. Los procedimientos agrupados dentro del polígono de color amarillo claro (Etapa 1) corresponden al Capítulo II, aquellas agrupadas en el polígono verde claro (Etapa 2) son del Capítulo III y finalmente los agrupados en el polígono rosa (Etapa 3) son las del Capítulo IV. Las líneas sólidas representan procedimientos polígono rosa (Etapa 3) son las del segmentadas representan procedimientos aún no realizados

-



Capítulo I

29

REFERENCIAS

- Amoutzias G. D., A. S. Veron, J. Weiner III, M. Robinson-Rechavi, E. Bornberg-Bauer, S. G. Oliver, D. L. Robertson (2006). One Billion Years of bZIP Transcription Factor Evolution: Conservation and Change in Dimerization and DNA-Binding Site Specificity. Mol. Biol. Evol. 24(3):827–835.
- Anandan R., D. Sudhakar, P. Balasubramanian, A. Gutiérrez (2012). In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of Carica papaya L. Scientia Horticulturae 136:43-49.
- Ascencio A., H. Gutiérrez, B. Rodríguez, A. Gutiérrez (2008). Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. Scientia Horticulturae 118:155-160.
- Aoyama T., N. Chua. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. Plant Journal. 11:605-612.
- Blanco F., V. Carretón, N. Frey, C. Dominguez, T. Pérez-Acle, D. Van der Straeten, X. Jordana, L. Holuigue (2005). Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology. 59:927-944.
- Brivanlou A.H., J. E. Darnell (2002). Signal transduction and the control of gene expression. Science 295: 813–818.
- Cabrera-Ponce, J. L., A Vegas-Garcia, L. Herrera-Estrella (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. Plant Cell Rep.15:1-7.
- Caddick M. X., A. J. Greenland, I. Jepson, K. Krause, N. Qu, K. V. Riddell, M. G. Salter,
 W. Schuch, U. Sonnewald, A. B. Tomsett (1998). An ethanol inducible gene switch for
 plants used to manipulate carbon metabolism. Nature Biotechnology. 16:177-180.
- Cano J., J. Guarro, J. Gene (2004). Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. Journal of Clinical Microbiology. 42(6): 2450–2454.
- Cao H., S. A. Bowling, A. S. Gordon, X. Dong (1994). Characterization of an Arabidopsis Mutant That 1s Nonresponsive to inducers of Systemic Acquired Resistance. The Plant Cell 6:1583-1592.

- Casarrubias U., E. Cárdenas, D. Nieto, J. Gutierrez. (2002). Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Revista Mexicana de Fitopatología. 20:88-93.
- Chaturvedi R., J. Shah (2007). Salicylic acid in plant disease resistance. *In*: Salicylic acid: a plant hormone. (2007). Hayat S., A. Ahmad. (Eds.). Springer pp. 335-370.
- Chen C., Q. Yu, S. Hou, Y. J. Li, M. Eustice, R. L. Skelton, O. Veatch, R. E. Herdes, L. Diebold, J. Saw, Y. Feng, W. Qian, L. Bynum, L. Wang, P. H. Moore, R. E. Paull, M. Alam, R. Ming (2007). Construction of a sequence-tagged high-density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in Brassicales. Genetics 177: 2481-2491.
- Chuang C., M.P. Running, R.W. Williams (1999). The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. Genes and Development 13:334-344.
- Coates L., G. Johnson (1997). Postharvest diseases of fruit and vegetables. *In*: Plant Pathogens and Plant Diseases. Brown J., H. Ogle. (Eds). The Australasian Plant Pathology Society Inc. p. 539.
- Da Silva C. R., M. B. N. Oliveira, E. S. Motta, G. S. de Almeida, L. L. Varanda, M. de Pádula, A. C. Leitão, A. Caldeira (2010). Genotoxic and Cytotoxic Safety Evaluation of Papain (*Carica papaya* L.) Using In Vitro Assays. Journal of Biomedicine and Biotechnology doi:10.1155/2010/197898.
- De la Fuente J. M., V. Ramírez, J. L. Cabrera, L Herrera (1997). Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. Science 276:1566-1568.
- Deppmann C., R. S. Alvania, E. J. Taparowsky (2006). Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: Insight into the evolution of closed interaction networks. Mol. Biol. Evol. 8:1480-1492.
- Deppman C., A. Acharya, V. Rishi, B. Wobbes, S. Smeekens, E. J. Taparowsky, C. Vinson (2004). Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to Homo sapiens B-ZIP motifs. Nucleic Acids Research 11:3435-3445.
- Després C., C. Chubak, A. Rochon, R. Clark, T. Bethune, D. Desveaux, P. R. Fobert (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA. The Plant Cell 15: 2181–2191.

- Després C., C. DeLong, S. Glaze, E. Liu, P. R. Fobert (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. The Plant Cell 12:279–290.
- Dixon R., L. Achnine, P. Kota, C. Liu, M. S. Reddy, L. Wang (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defense-a genomics perspective. Molecular Plant Pathology. 3(5): 371–390.
- Dodd J. C., A. Estrada, M. J. Jeger (1992). Epidemiology of Collectrichum gloeosporioides in the Tropics. In: Collectrichum: Biology, Pathology and Control. Bailey A. J., M. J. Jeger. CABI publishing. USA.
- Euglem T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. Trends in plant Science 10(2):71-78.
- Fan W., X. Dong (2002). In Vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. The Plant Cell 14:1377-1389.

FAOSTAT (2007). http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx

Fitch M., R. Manshardt, D. Gonsalves, J. L. Slightom, J. C. Sanford (1990). Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 9:189-194.
 Flaishman M., P. E. Kolattukudy (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening

hormone as a signal. Plant Biology. 91:6579-6583.

- Forouhar F., Y. Yang, D. Kumar, Y. Chen, E. Fridman, S. Wook Park, Y. Chiang, T. B. Acton, G. T. Montelione, E. Pichersky, D. F. Klessig, L. Tong (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. PNAS. 102(5):1773–1778.
- Fromm H., F. Katagiri, N. Chua (1991). The tobacco transcription activator TGA1a binds to a sequence in the 5' upstream region of a gene encoding a TGA1a-related protein. Mol. Gen. Genet. 229:181-188.
- Gatz C. (1997). Chemical control of gene expression. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108.

GBIF ver 1.3.2 (2011). http://data.gbif.org/welcome.htm

- Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 43:205–27.
- Gonsalves D. (2004). Transgenic Papaya in Hawaii and Beyond. AgBioForum. 7(1&2): 36-40.

- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
- Hayat S., B. Ali, A. Ahmad (2007). Salicylic acid biosynthesis: Metabolism and physiological role in plants. *In*: Salicylic acid: A Plant Hormone. (2007). Hayat S., A. Ahmad. (eds.). Springer pp. 1-14.
- Hepworth S. R., Y. Zhang, S. McKim, X. Li, G. W. Haughna (2005). BLADE-ON-PETIOLE-Dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. The Plant Cell 17:1434-1448.
- Hernández R. C., L. Bravo, M. Corona, P. VIIIa, S. Bautista, L. Barrera (2005). Caracterización morfocultural y sintomatológica de dos aislamientos de *Colletotrichum* gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc. de papayo (*Carica papaya* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 23(3): 223-231.
- Hill D. S. (2008). Pests of Crops in Warmer Climates and Their Control. Springer Science + Business Media, B.V.
- Horbach R., A. R. Navarro, W. Knogge, H. B. Deising (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. Journal of Plant Physiology 168:51-62.
- Jakoby M., B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J. V. Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj, F. Parcy (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science 7(3):106-111.
- Johnson C., E. Boden, J. Arias (2003). Salicylic Acid and NPR1 Induce the recruitment of *trans*-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. The Plant Cell 15:1846-1858.
- Kawano T., T. Furuichi. (2007). Salicylic acid as a defense-related plant hormone. Roles of oxidative and calcium signaling paths in salicylic acid biology. *In*: Salicylic Acid: A Plant Hormone. (2007). Hayat S., A. Ahmad. (eds.). Springer pp. 277-321.
- Katagiri F., K. Yamazaki, M. Horikoshi, R.G. Roeder, N. Chua (1990). A plant DNAbinding protein increases the number of active preinitiation complexes in a human in vitro transcription system, Genes Development 4:1899-1909.
- Kegler C., I. Lenk, S. Krawczyk, R. Scholz, C. Gatz (2004). Functional characterization of tobacco transcription factor TGA2. 1. Plant MolBiol. 55:153-164.

- Kesarwani M. J. Yoo, X. Dong (2007). Genetic Interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 144:336–346.
- Kirchler T., S. Briesemeister, M. Singer, K. Schutze, M. Keinath, O. Kohlbacher, J. Vicente-Carbajosa, M. Teige, K. Harter, C. Chaban (2010). The role of phosphorylatable serine residues in the DNA-binding domain of *Arabidopsis* bZIP transcription factors. European Journal of Cell Biology 89:175–183.
- Kohn W.D., C. T. Mant, R. S. Hodges (1997). α-Helical protein assembly motifs. The Journal of Biological Chemistry 272(5):2583–2586.
- Lakshmi B. K. M., P. N. Reddy, R. D. Prasad (2011). Cross-infection potential of *Collectotrichum gloeosporioides* Penz. Isolates causing anthracnose in subtropical fruit crops. Tropical Agricultural Research 22(2):183-193.
- Lam E, Y. K. Lam (1995). Binding site requirements and differential representation of TGF factors in nuclear ASF-activity. Nucleic Acids Res. 23:3778-3785.
- Lebel E., P. Heifetz, L. Thorne, S. Uknes, J. Ryals, E. Ward (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. The Plant Journal 16(2):223–233.
- Loon L. C., B. P. J. Geraats, H. J. M. Linthorst (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. Trends in Plant Science 11(4):184-191.
- López R., J. L. Cabrera, L. J. Saucedo, L. Carreto, R. Villanueva, J. C. Díaz, M. A. Gómez,
 L. Herrera (2009). Ripening in papaya fruit is altered by ACC oxidase cosuppression.
 Transgenic Res. 18:89-97.
- McCafferty H. R. K., P. H. Moore, Y. J. Zhu (2006). Improved *Carica papaya* tolerance to carmine spider mite by the expression of Manduca sexta chitinase transgene. Transgenic Research (2006) 15:337-347.
- Ming R, S. Hou, Y. Feng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J. H. Saw, P. Senin, W. Wang, B. V. Ly, K. L. Lewis, S. L. Salzberg, L. Feng, M. R. Jones, R. L. Skelton, J. E. Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R. E. Paull, T. P. Michael, K. Wall, D. W. Rice, H. Albert, M. L. Wang, Y. J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R. A. Acob, P. Guan, A. Blas, C. M. Wai, C. M. Ackerman, Y. Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J. K. Na, E. V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J. E. Bowers, A. R. Gschwend, A. L. Delcher, R. Singh, J. Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura, M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R. Navajas-Pérez, M. J. Torres, F. A. Feltus, B. Porter, Y. Li, A. M.

Burroughs, M. C. Luo, L. Liu, D. A. Christopher, S. M. Mount, P. H. Moore, T. Sugimura, J. Jiang, M. A. Schuler, V. Friedman, T. Mitchell-Olds, D. E. Shippen, C. W. dePamphilis, J. D. Palmer, M. Freeling, A. H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang, M. Alam (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). Nature 452(24):991-996.

- Murmu J., M. J. Bush, C. DeLong, S. Li, M. Xu, M. Khan, C. Malcolmson, P. R. Fobert, S. Zachgo, S. R. Hepworth (2010). *Arabidopsis* basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. Plant Physiology 154:1492-1504.
- Münch S., U. Lingner, D. S. Floss, N. Ludwig, N. Sauer, H. B. Deising (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. Journal of Plant Physiology 165:41-51.
- Narlikar L., A. J. Hartemink (2006). Sequence features of DNA binding sites reveal structural class of associated transcription factor. Bioinformatics 22(2):157-163.
- Othman R., A. Nuraziyan (2010). Fruit-specific expression of papaya subtilase gene. Journal of Plant Physiology 167 (2010) 131–137 Journal of Plant Physiology 167:131-137
- Park S., E. Kaimoyo, D. Kumar, S. Mosher, D. F. Klessig (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science 138(5):113-116.

Pathway Is Required for Systemic Acquired Resistance. Science 308:1036-1040.

- Peres N.A., L. W. Timmer, J. E. Adaskaveg, J. C. Correll (2005). Life styles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease 89(8):784-796.
- Ploetz R. (2008). Tropical fruit crops and the diseases that affect their production. International Commission on Tropical Biology and Natural Resources. *In*: Encyclopedia of Life Support Systems EOLSS. 3:71-106.
- Porter B.W., K.S. Aizawa, Y.J. Zhu, D.A. Christopher (2008). Differentially expressed and new non-protein-coding genes from a *Carica papaya* root transcriptome survey. Plant Science 174:38-50.
- Qingyi Y., P. H. Moore, H. H. Albert, A. H. K. Roader, R. Ming (2005). Cloning and characterization of a *FLORICAULAILEAFY* ortholog, *PFL*, in polygamous papaya. Cell Research 15(8):576-584.
- Quemada H., B. L'Hostis, D. Gonsalves (1990). The nucleotide sequences of the 3'terminal regions of papaya ringspot virus strains w and p. J. Gen. Virol. 71:203-210.

- Redondo A. (2003). Manejo no convencional de enfermedades en papaya. *In*: Agronomía y manejo sanitario de la producción y poscosecha en papaya. Memorias. Redondo R. (ed). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. p. 45.
- Rhonda C. F., B. S. Karam (2004) TGA5 acts as a positive and TGA4 acts as a negative regulator of ocs element activity in *Arabidopsis* roots in response to defence signals. FEBS Letters 563:141-145.
- Robledo L. (2003). Caracterización del sistema de producción de papaya en la región Caribe Colombiana. *In*: Agronomía y manejo sanitario de la producción y poscosecha en papaya. Memorias. Redondo R. (ed). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. p. 22, 24.
- Roslan H. A., M. G. Salter, C. D. Wood, M. R. H. White, K. P. Croft, F. Robson, G. Coupland, J. Doonan, P. Laufs, A. B. Tomsett, M. X. Caddick (2001). Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 28:2 225-235.
- Running M. P., E. M. Meyerowitz (1996). Mutations in the PERIANTHIA gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern. Development 122:1261-1269.
- Salter M. G., J. A. Paine, K. V. Riddell, I. Jepson, A. J. Greenland, M. X. Caddick, A. B. Tomsett (1998). Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. The Plant Journal 16(1):127–132.
- Santamaría F., E. Sauri, F. Espadas y Gil, R. Díaz, A. Larqué, J. M. Santamaría (2009). Postharvest ripening and maturity indices for Maradol papaya. Interciencia 34(8):583-588.
- Schindler U. H., H. Beckmann, A. R. Cashmore (1992). TGA1 and G-box binding factors: Two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. The Plant Cell 4:1309-1319.
- Shearer H., L. Wang, C. DeLong, C. Despres, P. R. Fober (2009). NPR1 enhances the DNA binding activity of the *Arabidopsis* bZIP transcription factor TGA7. Botany 87:561–570.
- SIAP-SAGARPA. (2012). http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com
- Singleton P., D. Sainsbury. (2006). Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. John Wiley & Sons. p. 222.
- Spoel S. H., A. Koornneef, S. M. C. Claessens, J. P. Korzelius, J. A. Van Pelt, M. J. Mueller, A. J. Buchala, J. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L. C. Van Loon, X. Dong, C.

M. J. Pieterse (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonatedependent defense pathways through a novel function in the cytosol. American Society of Plant Biologists. The Plant Cell 15:760-770.

- Swarbreck D., C. Wilks, P. Lamesch, T. Z. Berardini, M. Garcia-Hernandez, H. Foerster, D. Li, T. Meyer, R. Muller, L. Ploetz, A. Radenbaugh, S. Singh, V. Swing, C. Tissier, P. Zhang, E. Huala (2008). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. Nucleic Acids Research 36:1009-1014.
- Tapia R., A. Quijano, A. Cortes, P. Lappe, A. Larque, D. Perez (2008). PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. Mol Biotechnol 40:293-298.
- Tarnowski T., R. C. Ploetz. (2010). First Report of *Colletotrichum capsici* causing postharvest anthracnose on papaya in south Florida. Plant Disease 94(8): 1065.2-1,065.2
- Tatagiba J. S., J. Liberato, L. Zambolim, J. Ventura, H. Costa (2002). Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) do mamoeiro. Fitopatologia Brasileira 27:186-192.
- Tomsett B., A. Tregova, A. Garoosi, M. Caddick (2004). Ethanol-inducible gene Expression: first step towards a new green revolution?. Trends in Plant Science 9:159-161.
- Vinson C.R., P.B. Sigler, S.L. McKnight (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of Leucine zipper proteins, Science 246 911-916.
- Vernooij B., L. Friedrich, A. Morse, S. Uknes, H. Kessmann, J. Ryals (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. The Plant Cell 6:959-965.
- Ward E. R., S. J. Uknes, S. C. Williams, S. S. Dincher, D. L. Wiederhold, D. C. Alexander,
 P. Ahl-Goy, J. Métraux, J. A. Ryals (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. The Plant Cell 3:1085-1094.
- Weigel R. R., U. M. Pfitzner, C. Gatz (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 Modulates PR Gene Expression in *Arabidopsis*. The Plant Cell 17: 1279–1291.
- Weinmann P., M. Gossen, W. Hillen, H. Bujard, C. Getz (1999). A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. The Plant Journal 5(4):559-569.

- Wingender E., X. Chen, E. Fricke, R. Geffers, R. Hehl, I. Liebich, M. Krull, V. Matys, H. Michael, R. Ohnhäuser, M. Prüβ, F. Schacherer, S. Thiele, S. Urbach. (2001). The TRANSFAC system on gene expression regulation. Nucleic Acid Research 29(1): 281-283.
- Yanagisawa S. (1998). Transcription factors in plants: Physiological functions and regulation of expression. Journal of Plant Research 111:363-371.
- Zhang G. L., P. Zhou, A. Guo, W. Shen, X. Li (2003). An Initial Study of Transgenic *Carica papaya* Used as a Kind of Vaccine for Anti-Tuberculosis. Acta Botanica Yunnanica 25(2):223-229.
- Zhang Y., M. J. Tessaro, M. Lassner, X. Li (2003). Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors TGA2, TGA5 and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. The Plant Cell 15:2647-2653.
- Zhang Y., W. Fan, M. Kinkema, X. Li, X. Dong. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. Plant Biology 96:6523-6528.
- Zhou, J.M., Y. Trifa, H. Silva, D. Pontier, E. Lam, J. Shah, D. F. Klessig (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. Mol.Plant Microbe Interact. 13:191-202.
- Zhu. J. Z., R. Agbayani, P. H. Moore (2007). Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor. Planta 226:87–97.
- Zhu Y. J., R. Agbayani, M. C. Jackson, C. S. Tang, P. H. Moore (2004). Expression of the grapevine stilbene synthase gene VST1 in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. Planta 220:241-250.
- Zuo J., N. Chua (2000). Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. Current Opinion in Biotechnology 11:146-151.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN in silico DE HOMÓLOGOS DE TGAS EN EL GENOMA SECUENCIADO DE Carica papaya Var. SunUp

2.1 INTRODUCCIÓN

Las células eucariontes responden al crecimiento, desarrollo y factores ambientales en parte por la regulación de la expresión de grupos específicos de genes. Los mecanismos de activación transcripcional en eucariontes se basan en el arreglo modular de secuencias regulatorias de ADN que actúan en *cis* (el efecto de la secuencia regulatoria depende de la posición relativa del gen que regula dentro de la molécula de ADN) y de proteínas regulatorias que actúan en *trans* (proteínas que actúan sobre otras moléculas de ADN; Herrera *et al.* 2004).

Los factores transcripcionales bZIP se encuentran presentes en todos los eucariontes y deben su nombre a las regiones altamente conservadas de dominios de bZIPs compuestos por una región básica que contacta el ADN y un zipper de leucina formado por repeticiones de siete residuos hidrofóbicos responsables de la dimerización (Amoutzias *et al.* 2006; Meng *et al.* 2005).

En plantas los bZIPs se involucran en desarrollo, fotomorforgénesis, expresión de genes de defensa en contra de patógenos, maduración de semillas, desarrollo floral y foliar (Pyo *et al.* 2008; Riechmann, 2002). En *A. thaliana* los bZIP se han subdividido en diez grupos (A hasta I y S) en base a la similitud de las secuencias de los dominios de bZIP (Jakoby *et al.* 2002). Sus factores transcripcionales bZIP tipo TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) corresponden al grupo D y se conocen 10 miembros (Jakoby *et al.* 2002; Cheong *et al.* 1998). Se ha observado que la proteína NPR1 (NON PR1 EXPRESSOR) necesaria para la inducción de la respuesta sistémica adquirida (SAR), interactúa con factores transcripcionales TGA y activan conjuntamente genes que responden a ácido salicílico (Salicylic acid SA). En ausencia de SA la proteína NPR1 se encuentra dentro del citoplasma y el núcleo, en respuesta al SA, NPR1 se acumula dentro del núcleo y aumenta la actividad de unión a ADN de las proteínas TGA (Riechmann, 2002).

Como resultado de la secuenciación del genoma de *C. papaya* var SunUp Ming *et al.* (2008) identificaron 56 genes tipo bZIP, de los cuales únicamente uno ha sido reportado. El gen nombrado Cp25 homólogo de *liguleless2 (lg2)* que codifica para una proteína de zipper básico de leucina (Porter *et al.* 2008). Los factores transcripcionales tipo TGA, el número de miembros de este tipo o sus dominios proteicos no han sido reportados en ninguna base biológica de datos o en artículos de investigación.

El objetivo de este capítulo fue determinar el número de miembros de factores transcripcionales bZIP que pertenecen a los del tipo TGA. Para lo cual se realizó una búsqueda dentro del genoma secuenciado de *C. papaya* var SunUp, se identificaron los factores transcripcionales de la clase bZIP grupo D, se agruparon en función de la filogenia de sus secuencias proteicas. Finalmente se determinaron los elementos conservados dentro de cada secuencia para su posterior clasificación como TGA.

De la búsqueda *in silico* de secuencias homólogas a TGAs en *A. thaliana, encontramos* siete que compartieron motivos conservados conocidos previamente en TGAs de *A. thaliana*. La filogenia de estos homólogos de TGAs permitió agruparlos en clados posiblemente relacionados con la defensa y desarrollo en papaya.

La información obtenida a partir de la identificación y clasificación de homólogos de TGAs para *C. papaya* var Maradol podría ser usada para generar variedades de papaya mejoradas genéticamente, con especial énfasis a la respuesta en contra del ataque por patógenos, en la que los factores transcripcionales TGAs están directamente relacionados.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y PROTEÍNAS TGAS

Las secuencias de TGAs de *Arabidopsis*, se obtuvieron a partir de la base de datos TAIR (Swarbreck *et al.* 2008) y las secuencias de *C. papaya* L. se obtuvieron del genoma completo de la especie armada en 3207 supercontigs que comprenden 372 Mpb y registrada con los números de accesión DS981520 a DS984726 (WGS scaffolds DS981520-DS984726) en el GeneBank del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?term=DS981520:DS984726[PACC]). La búsqueda de secuencias de *C. papaya* L. homólogas a secuencias TGA de *Arabidopsis* se realizó mediante tblastx (Altschul *et al.* 1997) con los argumentos establecidos por defecto en el programa, umbral esperado 10, tamaño de palabra 3 y matriz de puntuación BLOSUM62.

El agrupamiento y selección de las secuencias con mayor porcentaje de identidad se efectuó con los programa Blast Parser v1.2 (http://geneproject.altervista.org/), y MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). Las secuencias codificantes con valores E menores a 10⁻⁴ y porcentajes de identidad superiores a 25% dentro del genoma de *C. papaya* var Maradol fueron descargadas de la base de datos de secuencias y se tradujeron en los seis marcos de lectura posibles, usando el programa de algoritmos de predicción de genes FGENESH (http://linux1.softberry.com/all.htm).

A partir de las secuencias de nucleótidos traducidos, se realizó el análisis evolutivo de comparación en pares y el alineamiento de las secuencias con el programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). Se utilizó el algoritmo de alineamiento Clustal W con los parámetros establecidos en el programa por defecto.

La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El árbol consenso fue inferido a partir de una prueba de boostrap de 1000 réplicas, las ramas que correspondieron a particiones reproducidas en menos del 50% fueron colapsadas. El porcentaje de repeticiones de árboles en los cuales los TGA se agruparon juntos en la prueba de bootstrap se mostraron junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol se generó a escala, con longitudes de las ramas en las mismas unidades a aquellas de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo basado en matrices de JTT (Jones *et al.* 1992) y se expresaron en unidades que representan el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. La razón de variación entre los sitios fue modelada mediante una distribución gamma (parámetro de contorno G=0.93). El análisis involucró 17 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían gaps y datos perdidos fueron eliminadas. En total fueron consideradas 235 posiciones en la base de datos final. El análisis evolutivo fue conducido mediante MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

Oligonucleótidos para RT-PCR a partir de las secuencias homólogas de genes TGA de *C. papaya* fueron diseñados de forma manual y analizados (temperaturas de fusión, formación de dímeros, ubicación) mediante la asistencia del software FastPCR (Kalendar, 2009).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 HOMÓLOGOS DE TGA EN PAPAYA Y Arabidopsis

Se encontraron *in silico* 7 secuencias dentro del genoma de *C. papaya* Var SunUp en los supercontigs con números de accesión DS981620, DS981525, DS981569, DS981521, EF12305, DS981605 y DS982325, las secuencias fueron anotadas como *CpTGA1*, *CpTGA2*, *CpTGA3*, *CpTGA4*, *CpTGA5*, *CpTGA6* y *CpTGA7* respectivamente. Las secuencias de proteínas predichas CpTGA mostraron un alto porcentaje de identidad con las secuencias AtTGA (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Homólogos de genes bZIP tipo TGA en *C. papaya*. Se muestra también la secuencia EF12305 previamente reportada (Porter *et al.* 2008). La ubicación de la secuencia de nucleótidos esta definida por la columna de posición dentro del supercontig. La longitud representa el tamaño de la secuencia de aminoácidos. Los porcentajes de identidad, similitud y cobertura se refieren a la región de cobertura cuya longitud de aa se define dentro de los paréntesis en la columna del porcentaje de identidad.

Número de accesión	Posición dentro del supercontig	Nombre	Long. (aa)	Valor E	% de Identidad	% de Similitud	% de Cobertura
D\$981620	2922573- 2926990	CpTGA1	427	1e ⁻¹²²	82 (77/93)	92	21.78
D\$981525	1361004- 1365073	CpTGA2	438	30-78	72 (67/92)	89	21.01
D\$981569	801096- 805214	CpTGA3	349	6e ⁻⁹³	78 (75/95)	93	27.22
D\$981521	634902- 641401	CpTGA4	492	48-72	69 (66/95)	86	19.31
EF12305, Cp25	70242- 76245	CpTGA5	246	10-101	76 (70/92)	89	37.40
DS981605	1346-4541	CpTGA6	514	10-103	69 (64/92)	80	17.90
D\$982325	218425- 218718	CpTGA7	285	1e ⁻⁶⁵	79 (73/92)	93	32.28

Capítulo II

Las secuencias de proteínas predichas CpTGA comparten los principales dominios característicos de estos factores transcripcionales con excepción de CpTGA7 que carece de los dominios de activación transcripcional y la firma característica del grupo (Figura 2.1).



residuos de glutamina, alanina y serina. Las cajas ilustran las posiciones para el dominio de unión a ADN (DUA), el zipper de leucina (LeuZIP), dominios ácidos ricos en glutamina (QI y QII) y la firma Figura 2.1 Representación de secuencias proteicas predichas CpTGA. La flecha negra representa los Se observan dos residuos de cisteína en CpTGA1 probablemente nvolucrados en la interacción de CpTGA1 con NPR1. grupo D. característica del

Cada una de las siete secuencias de nucleótidos tipo TGA identificadas en este análisis fue traducida y presentó aminoácidos conservados en posiciones equivalentes (Fig. 2.2).

Figura 2.2 Alineamiento de secuencias proteicas bZIP tipo TGA predichas, la región básica se representa con dos líneas gruesas negras, el triángulo blanco representa glutamina en posición 11 (Gln¹¹), el gris alanina en posición 15 (Ala¹⁵) y serina en posición 19 (Ser¹⁶). Se observan los heptámeros *H0, H1, H2* y *H3,* las flechas grises representan los residuos de leucina y glicina dentro de la región de homodimerización en posición *d*. La línea gruesa gris representa los 92 a de cobertura. Los dominios ácidos ricos en glutamina se representan por QI yQII. Las flechas negras detallan la ubicación de los residuos de cisteína implicados en la unión de NPR1 y TGA1. La firma característica del grupo D (Jakoby *et al.* 2002) está subrayada con una línea gruesa punteada



Capítulo II

2.3.2 ANÁLISIS COMPARATIVO EN PARES DE SECUENCIAS CPTGA Y AtTGA

Las secuencias CpTGA1, AtTGA1 y AtTGA4 presentaron porcentajes de identidad superiores a 80% entre ellas. En cambio CpTGA2 se relacionó más con AtTGA2 con un 78.81% de identidad, seguido de AtTGA6 (78.39%) y AtTGA6 (76.27%). CpTGA3 presentó porcentajes de identidad de 78.39% con AtTGA3 y 76.26% con AtTGA7. CpTGA4 presentó un 75.42 % de identidad con AtPAN, mientras que CpTGA5 y CpTGA6 presentaron porcentajes de identidad de 77.54 % y 81.78% con AtTGA9 y AtTGA10 respectivamente. Finalmente CpTGA7 presentó el más bajo porcentaje de identidad de 38.98% con TGA2 (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Porcentaje de identidad entre 17 secuencias proteicas tipo TGA de *A. thaliana* y *C. papaya.* El porcentaje representa los aminoácidos idénticos por sitio entre las secuencias. Todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes fueron eliminadas, se consideraron 236 posiciones totales en la base de datos final. El análisis evolutivo se hizo mediante MEGA5 (Tamura et al. 2011).

A2 TGA3	TOAL				A.thaliana					
	IGA4	TGA5	TGA6	TGA7	PAN	TGA9	TGA10			
47 69.49	80.93	58.90	58.90	69.49	55.08	53.81	50.85			
57.20	58.47	76.27	78.39	55.93	71.61	61.02	61.86			
05 78.39	67.80	57.63	58.05	76.27	52.12	53.39	55.08			
15 54.24	54.24	69.92	73.73	53.39	75.42	58.05	58.05			
47 53.39	50.42	58.90	58.90	51.69	57.20	77.54	63.14			
71 55.93	52.12	61.86	61.86	54.24	58.05	63.98	81.78			
27.12	27.54	36.44	38.14	27.12	32.63	30.08	30.51			
	81 57.20 05 78.39 15 54.24 47 53.39 71 55.93 98 27.12	81 57.20 58.47 05 78.39 67.80 15 54.24 54.24 47 53.39 50.42 71 55.93 52.12 98 27.12 27.54	81 57.20 58.47 76.27 05 78.39 67.80 57.63 15 54.24 54.24 69.92 47 53.39 50.42 58.90 71 55.93 52.12 61.86 98 27.12 27.54 36.44	81 57.20 58.47 76.27 78.39 05 78.39 67.80 57.63 58.05 15 54.24 54.24 69.92 73.73 47 53.39 50.42 58.90 58.90 71 55.93 52.12 61.86 61.86 98 27.12 27.54 36.44 38.14	81 57.20 58.47 76.27 78.39 55.93 05 78.39 67.80 57.63 58.05 76.27 15 54.24 54.24 69.92 73.73 53.39 47 53.39 50.42 58.90 58.90 51.69 71 55.93 52.12 61.86 61.86 54.24 98 27.12 27.54 36.44 38.14 27.12	81 57.20 58.47 76.27 78.39 55.93 71.61 05 78.39 67.80 57.63 58.05 76.27 52.12 15 54.24 54.24 69.92 73.73 53.39 75.42 47 53.39 50.42 58.90 58.90 51.69 57.20 71 55.93 52.12 61.86 61.86 54.24 58.05 98 27.12 27.54 36.44 38.14 27.12 32.63	81 57.20 58.47 76.27 78.39 55.93 71.61 61.02 05 78.39 67.80 57.63 58.05 76.27 52.12 53.39 15 54.24 54.24 69.92 73.73 53.39 75.42 58.05 47 53.39 50.42 58.90 58.90 51.69 57.20 77.54 71 55.93 52.12 61.86 61.86 54.24 58.05 63.98 98 27.12 27.54 36.44 38.14 27.12 32.63 30.08			

2.3.3 DOMINIOS ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS CPTGA PREDICHAS

2.3.1.1 DOMINIO DE UNIÓN A ADN Y ZIPPER DE LEUCINA

El dominio de unión a ADN se identificó en el extremo N terminal de las secuencias CpTGA Dentro de este dominio todas las secuencias CpTGA poseen residuos de glutamina, alanina y serina espaciados regularmente por tres aminoácidos QxxxAxxxS (Figura 2.1 y Figura 2.2).

La secuencia CpTGA4 posee una secuencia corta de 34 aa que separa el dominio de unión a ADN del zipper de leucina (Figura 2.2).



Las siete secuencias CpTGA poseen el zipper de leucina, cuya longitud es de 28 residuos de aa y están formados por heptámeros *H0*, *H1*, *H2* y *H3*. En la posición *a* se encontró residuos alifáticos de valina para el heptámero *H0* mientras que para los heptámeros *H1*, *H2* y *H3* se encontraron residuos cargados. En la posición *d*, residuos de leucina se encontraron para los heptámeros *H0* y *H1*, sin embargo para los heptámeros *H2* y *H3*, se encontraron residuos de valina y ácido glutámico. Las posiciones *g* son hidroxílicas para los heptámeros *H0* (excepto para CpTGA3 donde se encontró una histidina) y *H1*, los heptámeros *H2* y *H3* tienen posiciones *g* alifáticas.

Las posiciones *e* son acídicas para heptámeros *H0* y *H2*, alifáticos para heptámeros *H3* y principalmente hidroxílicos para el heptámero *H1* (Figura 2.2).

De acuerdo con nuestros resultados, probablemente el zipper de leucina de CpTGA1 está conformado por dos leucinas, una valina y una glicina ubicadas dentro de la región interna de la hélice, los residuos de tirosina, serina, leucina y alanina se ubican en posición g de la hélice superior, en la hélice inferior las posiciones e son ocupadas por ácido glutámico, isoleucina ácido glutámico y leucina (Figura 2.3).



Figura 2.3 Representación esquemática probable del zipper de leucina de CpTGA1, las características químicas de los aminoácidos se representan por esferas, las posiciones de residuos de aminoácidos se detallan al lado derecho de la hélice superior e inferior, la flecha roja indica la interacción necesaria entre g y e para promover la dimerización.

2.3.3.2 DOMINIOS ÁCIDOS RICOS EN GLUTAMINA

Las secuencias CpTGA1 hasta CpTGA6 presentaron dominios de conexión de longitud variable que enlazan el dominio de unión a ADN y el zipper de leucina con sus respectivos dominios de activación transcripcional. Estos dominios se identificaron como QI y QII (Figura 2.1) y se ubicaron en el extremo C terminal de las secuencias.

Para los miembros de AtTGA el número promedio de residuos de glutamina dentro de QI fue de 27% y para CpTGA fue de 28%. En tanto que para QII el porcentaje promedio para AtTGA fue de 23% y de 32 % para CpTGA. El primer dominio rico en glutamina QI para los seis primeros miembros CpTGA presentó la siguiente secuencia consenso: Qx3[VI][CY]xLx[QH]SxQ[QE]AE[DE]AL[SY]QGx[ED]xL[QN]Q, de igual manera para el segundo dominio QII la secuencia consenso fue [QR]ADxLR[QH][QE][TI]L[QH]x[ML]x[RQ][IV]LTxRQ. La secuencia CpTGA7 presentó pocos aminoácidos conservados en ambos dominios.

Dentro del dominio predicho QI, dos residuos de Cisteína fueron localizados dentro de CpTGA1 (CxxxxxC) en posiciones equivalentes para Cis260 y Cis266 (Figura 2.4).

	272 282 292
CpTGA1	GGERPSELLKVLIPHFDPLTDQQLLDVCNLKQSCQQAE
CpTGA2	GGFRSSELLKLLLNQLEPLTEQQLVSIYNLQQSSQQAE
CpTGA3	GGFRPSELLNVVTPQLEP TDQQIVDICNLRQSSQQAE
CpTGA4	GGFRSSELLKILGNHLEPLTEQQLMGICNLQQSSQQAE
CpTGA5	GGERPSDLIKMLISQLDPLTEQQVMGIYSLQHSSQQAE
CpTGA6	GGFRPSELIKIIPNQVEPLTEQQILGICGLQQSTQEAE
CpTGA7	MALD-VEYARWEEDQNRHINELRSAMNSHASD

Figura 2.4 Alineamiento de secuencias homólogas a *CpTGA*, dominio de activación QI. Región en la que se reconoce la región involucrada en la interacción de TGA1 con NPR1 en *Arabidopsis*. El triángulo invertido blanco indica la posición 290, el negro la posición 296 respecto a CpTGA1. Aminoácidos idénticos están encerrados en rectángulo negro, similares en gris, el resto aminoácidos divergentes.

2.3.4 FILOGENIA DE SECUENCIAS CPTGA Y AtTGA

El árbol filogenético (Figura 2.5) describe el agrupamiento de 17 secuencias homólogas de nucleótidos traducidos tipo *CpTGA* y *AtTGA*. Se identificaron 3 subclados. En el subclado I se observaron dos nodos internos que agruparon a CpTGA1, AtTGA1 y AtTGA4 en el primer nodo y a CpTGA3, AtTGA3 y AtTGA7 en el otro. En el subclado II formado por dos nodos internos, se observó que a partir del primer nodo se agruparon CpTGA2, CpTGA7, AtTGA2, AtTGA5 y AtTGA6 y a partir del segundo CpTGA4 y AtPAN.

En el subclado III también se observaron dos nodos, a partir del primero se agruparon CpTGA5 y AtTGA9 y finalmente CpTGA6 y AtTGA10. CODICATO /

Capítulo II



Figura 2.5 Relaciones evolutivas de homólogos de TGA en *A. thaliana* y *C. papaya* var SunUp. Filogenie obtenida a partir del método de Neighbor-Joining con prueba de boostrap de 1000 réplicas, las distancias evolutivas se calcularon mediante el modelo basado en matrices de JTT con una distribución gamma (G=0.96), las secuencias TGA de papaya se señalan mediante una flecha negra, los subclados I, II y III se detallan al lado derecho de la filogenie.

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 EL GENOMA DE PAPAYA CONTIENE SIETE GENES C_PTGA HOMÓLOGOS A LA SUBFAMILIA DE GENES AtTGA

Aunque se reportó previamente la presencia de 56 genes que codifican para bZIPs dentro del genoma de papaya (Ming *et al.* 2008), solo una secuencia ha sido identificada como bZIP dentro de la base de datos del NCBI (Porter *et al.* 2008).

La reducción en los genes de papaya en comparación con los de *Arabidopsis* ya ha sido previamente reportada, este efecto probablemente se debe a la ausencia de una duplicación reciente en el genoma de papaya (Ming *et al.* 2008; Moore and Ming, 2008). En la presente tesis se describen seis secuencias completas de nucleótidos traducidas del tipo bZIP denominadas *CpTGA1*, *CpTGA2*, *CpTGA3*, *CpTGA4*, *CpTGA5*, *CpTGA6* y una secuencia truncada, *CpTGA7* las cuales se identificaron *in silico* dentro del genoma de papaya.

2.4.2 EL DOMINIO DE bZIP EN LAS SECUENCIAS DE CPTGA COMPARTEN AMINOÁCIDOS CONSERVADOS ENCONTRADOS EN MIEMBROS DE ATTGA

Los factores transcripcionales como los de la subfamilia TGA se unen a secuencias de ADN específicas y son capaces de activar o reprimir la transcripción. Estos factores se forman de proteínas modulares con dominios funcionalmente distintos y son responsivos en tejidos específicos, tipos celulares o de una forma transitoria o dependiente de un estímulo (Luscombe *et al.* 2000).

Alineamientos previos de factores transcripcionales TGA presentaron dominios conservados entre los miembros de la subfamilia involucrados en la regulación de la transcripción (Meng *et al.* 2005, Jakoby *et al.* 2002, Landshullz *et al.* 1998, Schindler *et al.* 1992).

El bZIP en las proteínas CpTGA está formado por dos dominios, el dominio de unión a ADN y el zipper de leucina de acuerdo con lo descrito para estas estructuras proteicas por Vinson *et al.* (1989). El dominio de unión a ADN de secuencias CpTGA se localizó dentro del extremo N terminal en concordancia con lo reportado previamente para AtTGA1 (Katagiri *et al.* 1990). Los residuos de glutamina, alanina y serina identificados dentro del dominio de unión a ADN se localizaron en posiciones equivalentes a residuos putativos fosforilables previamente descritos por Kirchler *et al.* (2010) comúnmente encontrados dentro de la región básica de proteínas bZIP.

Es bien conocido que la fosforilación de factores transcripcionales está involucrada en la regulación de la expresión de genes en plantas (Sarokin *et al.* 1992). Dentro de la región

D BOAL MARK

básica los residuos de serina-13 encontrados en todos los miembros de CpTGA se ubicaron en posiciones equivalentes a serina-19 en *A. thaliana* conocidas por mediar la fosforilación (Kirchler *et al.* 2010, Amoutzias *et al.* 2006). La fosforilación de este residuo resulta en el impedimento de la unión de ADN (Meshi *et al.*1998) y puede estar involucrada en la repulsión del factor transcripcional en el promotor (Kirchler *et al.* 2010). Por tanto la fosforilación puede ser responsable de la regulación fina de la expresión de genes de papaya modulada por miembros CpTGA.

Las combinaciones posibles en la formación de homodímeros y heterodímeros para los bZIP son complejas y variadas, para papaya, nuestros resultados presentaron casi el mismo patrón de composición de aminoácidos en todas las posiciones de los heptámeros. En la posición d las leucinas podrían estabilizar el dímero formado de acuerdo con lo que ha sido reportado por Deppmann et al. (2004). Los aminoácidos cargados en posición a para los heptámeros H1, H2 y H3 inhibirían la formación de homodímeros (Deppmann et al. 2004). Por otro lado las interacciones probables de atracción de residuos en posiciones g y e son inhibidas en CpTGA haciendo difícil la formación de heterodímeros lo que coincide con lo mencionado por Deppmann et al. (2004). Aunque esto provocaría la desestabilización de dímeros CpTGA se sabe que sus homólogos de Arabidopsis forman homodímeros (Deppmann et al. 2006) efecto que podría reflejarse también en papaya. En comparación con H1 para At5g42910 (bZIP grupo A) la posición g está ocupada por ácido glutámico, mientras que la posición e tiene una lisina, un residuo básico, estos aminoácidos cargados promueven la interacción atractiva y debido a la ausencia de interacciones repulsivas, se favorece la formación de homodímeros (Deppmann et al. 2006, Deppmann et al. 2004).

2.4.3 LOS DOMINIOS ÁCIDOS RICOS EN GLUTAMINA SE ENCUENTRAN DENTRO DE LAS SECUENCIAS CPTGA

Los dominios QI y QII se ubicaron sobre el extremo C terminal como fue sugerido para AtTGA3 y AtPAN por Meng *et al.* (2005) y Chuang *et al.* (1999) respectivamente. Dentro de los dominios QI y QII de AtTGA, el número promedio de residuos de glutamina en cada dominio fue casi el mismo que para sus homólogos CpTGA. Los dominios enriquecidos con residuos ácidos o con glutamina están involucrados en la activación de factores
transcripcionales de acuerdo con lo reportado por Katagiri et al. (1990) y Schwechheimer et al. (1998).

2.4.4 LOS RESIDUOS DE CISTEINA PUEDEN ACTUAR COMO SITIOS DE UNIÓN PARA NPR1

Los residuos de cisteína localizados dentro de QI en CpTGA1 fueron previamente reportados para AtTGA1 y se involucran en la interacción entre AtTGA1 y AtNPR1 posterior a la inducción con SA (Després *et al.* 2003). Las cisteínas oxidadas frecuentemente forman enlaces disulfuro involucrados en la estabilización de proteínas y regulación de actividad biológica (Niroshini *et al.* 2003). La observación de que CpTGA1 posee dos residuos de cisteína (Cis290 y Cis296) dentro del dominio rico en glutamina Q1, sugiere que este factor transcripcional puede ser dependiente de condiciones redox y controlado por SA durante la interacción con NPR1. Esto fue reportado previamente para TGA1 que forma un enlace disulfuro intramolecular en el residuo de cisteína bajo condiciones oxidantes, previniendo la interacción con NPR1. En contraste, bajo una inducción posterior con SA, TGA1 es reducido e interactúa con NPR1 (Després *et al.* 2003).

Los miembros restantes carecen de estos residuos en el dominio de activación QI, por tanto el SA probablemente regula la interacción con NPR1 mediante mecanismos alternos. Recientemente Boyle *et al.* (2009) sugirieron que el SA desune un oligómero de TGA2 previa la interacción con NPR1. Aunque no está claro si AtPAN es regulado por un puente disulfuro intramolecular o por S-glutationilación, AtPAN interactúa constitutivamente con cofactores BOP1 y BOP2 mediante Cis340 equivalente a Cis266 en TGA1 (Murmu *et al.* 2010). BOP1 codifica para una proteína con un dominio BTB/POZ con repeticiones de ankirina involucradas en la morfogénesis de hojas, de hecho NPR1 pertenece a la misma familia que BOP1 (Ha *et al.* 2004).

Las glutaredoxinas florales ROXY1 y ROXY2 involucradas en el desarrollo de anteras, son probablemente reguladas de forma redox por AtTGA9 y AtTGA10. Los residuos oxidados C-terminales pueden formar un puente de ditiol que inhibe la actividad de factor transcripcional de AtTGA9/AtTGA10, una vez que hay cambio redox la reducción de

cisteínas pueden iniciar la biosíntesis de ROXY1 y ROXY2 (Murmu *et al.* 2010). CpTGA5 y CpTGA6 comparten residuos Cis en posiciones equivalentes a AtTGA9 y AtTGA10 que presumiblemente estarían involucradas en la regulación redox.

Finalmente, con excepción de CpTGA7, los miembros de CpTGA poseen sobre el Cterminal, la firma característica identificada para AtbZIP del grupo D descritas por Jakoby *et al.* (2002). La secuencia consenso predicha fue Yx2RLR[AT]LSSLW, aunque posean esta región característica, hasta la presente fecha no se ha asociado con una función biológica en particular.

2.4.5 LOS MIEMBROS DE CPTGA SE AGRUPAN EN SUBCLADOS DEFINIDOS RELACIONADOS CON DEFENSA Y DESARROLLO

Basado en el alineamiento (Fig. 2.2) un árbol filogenético fue generado para evaluar las relaciones evolutivas de genes AtTGA y sus homólogos en papaya CpTGA. Las secuencias homólogas AtTGA y CpTGA se agruparon dentro de tres subclados (Fig 2.5). Previamente Shearer et al. (2008) también identificaron tres clados asociados con defensa en los genes TGA de A. thaliana pero esta clasificación no consideró a los genes involucrados en desarrollo. En el caso de papaya, al menos un miembro de TGA de papaya se identificó en cada uno de los clados I, II o III anteriormente mencionados. Recientemente Murmu et al. (2010) reportaron una filogenie con los diez miembros de AtTGA en la cual se generaron tres subclados definidos. De acuerdo con esta nueva clasificación CpTGA1 se agrupa con AtTGA1 y AtTGA4, conocidos por estar involucrados en resistencia basal (Kesarwani et al. 2007). También dentro de este subclado CpTGA3 se agrupó con AtTGA3 y AtTGA7 involucrados en la activación transcripcional de genes PR (Shearer et al. 2009), por tanto CpTGA3 podría estar actuando de la misma manera. CpTGA2 se agrupó en el subclado II con AtTGA2, AtTGA5 y AtTGA6 por tanto es probable que se involucre en la activación o represión transcripcional de PR1 como fue descrito por Shearer et al. (2009) y Kesarwani et al. (2007) para el caso de los TGA de A. thaliana.

Estos homólogos se agruparon formando una politomía debido a la incertidumbre sobre el orden correcto de la ramificación generada mediante el método de Neighbor-Joining (con

prueba de boostrap de 1000 réplicas) con el modelo basado en matrices de JTT implementado en MEGA5. Esto se explica en función de la secuencia CpTGA7 en la cual los dominios QI y QII no se encontraron totalmente conservados en relación con las demás secuencias. Además esta secuencia está truncada y su longitud no era comparable con las demás secuencias, las posiciones de aa faltantes en el extremo C terminal fueron determinantes en generar una ramificación muy larga que aparentemente no tendría sentido evolutivo real. MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) simplificó el resultado, generando la politomía observada.

Sin embargo esta secuencia se conservó durante el análisis debido a que cabe la posibilidad de que exista un error en la secuenciación de la misma. También cabe la posibilidad más interesante aún, de que esta secuencia sea la correcta y pueda ser el resultado de un mecanismo alterno de defensa en papaya respecto a Arabidopsis, como fue postulado anteriormente por Ming *et al.* (2008).

Dentro del mismo subclado CpTGA4 se agrupó con el gen *PERIANTHIA* involucrado en desarrollo floral (Chuang *et al.* 1999). Este gen en papaya parece ser el resultado de una divergencia evolutiva más reciente, esta misma divergencia explica el hecho de que estas secuencias no se hayan agrupado dentro de la politomía (más antigua) referida en el párrafo anterior.

Finalmente CpTGA5 y CpTGA6 se agruparon dentro del mismo subclado III con AtTGA9 y AtTGA10 respectivamente, en *A. thaliana* se observó que AtTGA9 y AtTGA10 estaban relacionados con desarrollo floral (Murmu *et al.* 2010) sin embargo el subclado III no se agrupó con CpTGA4 o AtPAN debido a que evolutivamente divergieron antes.

En conclusión, la evidencia estructural y filogenética presentada en este capítulo sugiere que *C. papaya* tiene una familia de FT tipo *CpTGA* de 6 miembros, con altos porcentajes de identidad (superiores al 70%) con miembros TGA de *A thaliana*. Adicionalmente *C. papaya* posee un homólogo *CpTGA*7 con un porcentaje de identidad de 38.98% con *AtTGA2*. Conjuntamente, estos FT probablemente comparten funciones similares en defensa y desarrollo respecto a sus homólogos en *A. thaliana*.

REFERENCIAS

- Altschul S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- Amoutzias G. D., A. S. Veron, J. Weiner, M. Robinson-Rechavi, E. Bornberg-Bauer, S. G. Oliver, D. L. Robertson (2006). One Billion Years of bZIP transcription factor evolution: Conservation and change in dimerization and DNA-binding site specificity. Mol. Biol. Evol. 24(3):827-835.
- Boyle P., E. Le Su, A. Rochon, H. L. Shearer. J. Murmu, J. Yan Chu (2009). The BTB/POZ domain of the *Arabidopsis* disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. The Plant Cell 21:3700–3713.
- Cheong Y., C. Yoo, J. Park, G. Ryu, V. Goekjian, R. T. Nagao, J. L. Key, M. J. Cho, J. C. Hong (1998). STF1 is a novel TGACG-binding factor with a zinc-finger motif and a bZIP domain which heterodimerizes with GBF proteins. The Plant Journal 15(2):199-209.
- Chuang C., M. P. Running, R. W. Williams (1999). The PERIANTHIA gene encondes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev.13:334-344.
- Deppman C., A. Acharya, V. Rishi, B. Wobbes, S. Smeekens, E. J. Taparowsky, C. Vinson (2004). Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to Homo sapiens B-ZIP motifs. Nucleic Acids Research 11:3435-3445.
- Deppmann C., R. S. Alvania, E. J. Taparowsky (2006). Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: Insight into the evolution of closed interaction networks. Mol. Biol. Evol. 8:1480-1492.
- Després C., C. Chubak, A. Rochon, R. Clark, T. Bethune, D. Desveaux, P. R. Fobert. (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA. The Plant Cell 15:2181-2191.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

FGENESH. http://linux1.softberry.com/all.htm

- Ha C. M., J. H. Jun, H. G. Nam, J. C. Fletcher (2004). BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45:1361–1370.
- Herrera F., D. Shooltz, S. Triezenrberg (2004). Mechanisms of transcriptional activation in eukaryotes. *In*: Transcription factors. Gossen M., J. Kaufamnn, S. J. Triezenberg (*eds*). Springer Verlag.
- Jakoby M., B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J. V. Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj, F. Parcy (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science 7(3):106-111.
- Jones D. T., W. R. Taylor, J. M. Thornton (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences 8:275-282.
- Kalendar R.,D. Lee, A. H. Schulman (2009). FastPCR Software for PCR primer and probe design and repeat search. Genes, Genomes and Genomics. 3(1):1-14.
- Katagiri F., K. Yamazaki, M. Horikoshi, R. G. Roeder, N. Chua (1990). A plant DNAbinding protein increases the number of active preinitiation complexes in a human in vitro transcription system. Genes Dev. 4:1899-1909.
- Kirchler T., S. Briesemeister, M. Singer, K. Schutze, M. Keinath, O. Kohlbacher, J. Vicente-Carbajosa, M. Teige, K. Harter, C. Chaban (2010). The role of phosphorylatable serine residues in the DNA-binding domain of *Arabidopsis* bZIP transcription factors. European Journal of Cell Biology 89:175-183.
- Landshullz H. W, P. F. Johnson, S. L. McKnight (1998). The Leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science 240:1759-1764.
- Meng X., W. Zhao, R. Lin, M. Wang, Y. Peng (2005). Identification of a novel rice bZIPtype transcription factor gene, OsbZIP1, involved in response to infection of *Magnaporthe grisea*. Plant Molecular Biology Reporter 23:301a–301m.
- Meshi T., I. Moda, M. Minami, M. Okanami, M. Iwabuch (1998). Conserved Ser residues in the basic region of the bZIP-type transcription factor HBP-1a(17): importance in DNA binding and possible targets for phosphorylation. Plant Molecular Biology 36:125-136.
- Ming R, S. Hou, Y. Feng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J. H. Saw, P. Senin, W. Wang, B. V. Ly, K. L. Lewis, S. L. Salzberg, L. Feng, M. R. Jones, R. L. Skelton, J. E. Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R. E. Paull,

T. P. Michael, K. Wall, D. W. Rice, H. Albert, M. L. Wang, Y. J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R. A. Acob, P. Guan, A. Blas, C. M. Wai, C. M. Ackerman, Y. Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J. K. Na, E. V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J. E. Bowers, A. R. Gschwend, A. L. Delcher, R. Singh, J. Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura, M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R. Navajas-Pérez, M. J. Torres, F. A. Feltus, B. Porter, Y. Li, A. M. Burroughs, M. C. Luo, L. Liu, D. A. Christopher, S. M. Mount, P. H. Moore, T. Sugimura, J. Jiang, M. A. Schuler, V. Friedman, T. Mitchell-Olds, D. E. Shippen, C. W. dePamphilis, J. D. Palmer, M. Freeling, A. H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang, M. Alam (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). Nature 452(24):991-996.

- Moore P. H., R. Ming (2008). Papaya genome: A model for tropical fruit trees and beyond. Tropical Plant Biol. 1:179-180.
- Murmu J., M. J. Bush, C. DeLong, S. Li, M. Xu, M. Khan, C. Malcolmson, P. R. Fobert, S. Zachgo, S. R. Hepworth (2010). *Arabidopsis* basic leucine-zipper Transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. Plant Physiology 154 :1492-1504.
- NCBI. http://www.ncbi.nlm.nih.gov
- Niroshini G. M., G. I Giles, C. Jacob (2003). Multiple roles of cysteine in biocatalysis. Biochemical and Biophysical Research Communications 300:1-4.
- Porter B.W., K.S. Aizawa, Y.J. Zhu, D.A. Christopher (2008). Differentially expressed and new non-protein-coding genes from a *Carica papaya* root transcriptome survey. Plant Science 174:38-50.
- Pyo H., T. Demura, H. Fukuda. (2008). Vascular cell expression patterns of *Arabidopsis* bZIP group I. Plant Biotechnology 23:497-501.
- Riechmann J. L. (2002). Transcriptional regulation: a genomic overview. The *Arabidopsis* book pp 1-46.
- Saitou N., M. Nei (1987). The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.
- Sarokin L. A., N. H. Chua (1992). Binding sites for two novel phosphoproteins, 3AF5 and 3AF3, are required for rbcS-3A expression. The Plant Cell 4:473-483.

- Schindler U. H., H. Beckmann, A. R. Cashmore. (1992) TGA1 and G-Box binding factors: Two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-boxlike element TGACGTGG. The Plant Cell 4:1309-1319.
- Schwechheimer C., C. Smith, M. W. Bevan (1998). The activities of acidic and glutaminerich transcriptional activation domains in plant cells: design of modular transcription factors for high-level expression. Plant Molecular Biology 36:195-204.
- Swarbreck D., C. Wilks, P. Lamesch, T. Z. Berardini, M. Garcia-Hernandez, H. Foerster,
 D. Li, T. Meyer, R. Muller, L. Ploetz, A. Radenbaugh, S. Singh, V. Swing, C. Tissier,
 P. Zhang, E. Huala (2008). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. Nucleic Acids Research 36:1009-1014.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
- Vinson C. R., P. B. Sigler, S. L. McKnight (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of Leucine zipper proteins. Science 246:911-916.
- Vinson C., A. Acharya, E.J. Taparowsky (2006). Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. Biochimica et Biophysica Acta 1759:4-12.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HOMÓLOGOS DE TGA EN Carica papaya var. Maradol; EXPRESIÓN BASAL, EN RESPUESTA A SA Y A Colletotrichum gloeosporioides

3.1 INTRODUCCIÓN

La regulación de la biosíntesis de proteínas es una de las principales formas que poseen los organismos para controlar su metabolismo. La respuesta de un organismo a nivel molecular puede depender de factores ambientales que ejerzan su acción sobre las células del mismo, cada célula debe ser capaz de modular una respuesta encendiendo o apagando genes de forma coordinada.

Según Reddy y Subba (2001), las plantas están expuestas constantemente a factores estresantes que limitan su crecimiento y desarrollo, por ejemplo temperatura baja o alta, sequía, alta salinidad (factores abióticos) o patógenos como bacterias, hongos o virus (factores bióticos).

Los factores abióticos inducen ajustes en el metabolismo (aclimatación) o alteran sus patrones de crecimiento para evitar exposición constante al estrés, los factores bióticos en cambio activan respuestas bioquímicas y estructurales como respuesta a ataques por microorganismos patógenos y herbívoros (Artlip y Wisniewski, 2001). Las respuestas de protección de las plantas en contra de factores abióticos y bióticos, referidas como *crosstalk* o comunicación cruzada, se regulan a partir de hormonas endógenas como SA, JA, ET y ácido abscísico ABA (Fujita *et al.* 2006).

Las respuestas defensivas en contra de patógenos pueden ser dependientes de ácido salicílico (SA) cuando se encaminan a contrarrestar el ataque de patógenos biótrofos mientras que las respuestas defensivas dependientes de ácido jasmónico lo hacen en contra de patógenos necrotrófos (Glazebrook, 2005; McDowell y Dangl, 2000). En plantas el SA ejerce un efecto antagonista en la biosíntesis y expresión de genes responsivos a JA mediado por la proteína NPR1 (Spoel *et al.* 2003).

En cambio los patógenos han desarrollado mecanismos que suprimen la resistencia del hospedero, los biótrofos suprimen la respuesta dependiente de SA y de forma análoga los necrótrofos suprimen las respuestas defensivas dependientes de JA (Barret y Heil, 2012). Frente al ataque de un patógeno se distinguen las reacciones compatibles en las que existe una fuerte infestación por parte del patógeno y las reacciones incompatibles en las que la planta resiste al ataque del patógeno. La respuesta hipersensible es la típica reacción incompatible y se caracteriza por la muerte celular programada de las células infectadas (Schulze *et al.* 2002), esta es una respuesta local. Paralelamente con la respuesta hipersensible, se desarrolla la resistencia sistémica adquirida SAR (Systemic Acquired Resistance) que activa los sistemas de defensa en partes infectadas y no infectadas dentro de la planta, interviene el ácido salicílico (SA Salicylic acid), un derivado del metabolismo de los fenólicos que actúa como sustancia señal. Adicionalmente, se sintetizan enzimas líticas, las proteínas PR (pathogenesis-related) para la defensa en contra de los patógenos (Schulze *et al.* 2002).

El SA promueve cambios en el estado redox dentro del citosol que disparan la reducción, monomerización y translocación nuclear de NPR1 que se une a factores transcripcionales TGA para finalmente aumentar su actividad de unión al ADN en elementos *cis* de genes como los PR que responden a SA (Holuigue *et al.* 2007). Dentro del citosol el remanente NPR1 se involucra en la supresión de la expresión de genes responsivos a JA (Spoel *et al.* 2003).

Los factores transcripcionales TGA pertenecen a una familia de bZIPs compuesta por 10 miembros para *A. thaliana* (Jakoby *et al.* 2002) y se unen al denominado elemento *as-1*, la cual se encuentra presente dentro del promotor del gen PR1. Se conocen otros genes que poseen el elemento *as-1* dentro de sus promotores que potencialmente pueden estar regulados por factores transcripcionales tipo TGA (Tabla 3.1).

Los TGAs forman subclados diferentes dentro de la superclase de bZIPs de *A. thaliana* (Murmu *et al.* 2010), se conocen tres subclados el primer subclado conformado AtTGA1 y AtTGA4 involucrados en resistencia basal (Kesarwani *et al.* 2007). También dentro de este subclado AtTGA3 y AtTGA7 están involucrados en la activación transcripcional de genes *PR* (Shearer *et al.* 2009).

Tabla 3.1 Ejemplos de genes que poseen elementos as-1

Gen	Nombre	Unión a AtTGA	Referencia
EIGT	Glucosyltransferase	nd	Uquillas et al. (2004)
ROXY19, (GRX480)	Glutaredoxin	AtTGA2	Li <i>et al</i> . (2011), Ndamukong <i>et al</i> . (2007)
GST25	Glutathione S-transferase	nd	Blanco <i>et al</i> . (2005)
GST6	Glutathione S-transferase	nd	Uquillas et al. (2004)
OPR1	12-oxophytodienoate reductase	nd	Blanco et al. (2005)
PDF1.2	Plant defensin 1.2	AtTGA2	Spoel et al. (2003)
UGT1	UDP-Glycosyl transferase	nd	Blanco et al. (2005)

Dentro del subclado II AtTGA2, AtTGA5 y AtTGA6 están involucrados en la activación o represión transcripcional de *PR1* (Shearer *et al.* 2009, Kesarwani *et al.* 2007). Dentro del mismo subclado APAN involucrado en desarrollo floral (Chuang *et al.* 1999).

Finalmente el subclado III conformado por AtTGA9 y AtTGA10 relacionados con desarrollo floral (Murmu *et al.* 2010).

La papaya es una especie susceptible a un gran número de patógenos bacterianos, virales y fúngicos, entre ellos *C. gloeosporioides* responsable de la antracnosis, es el más importante patógeno que promueve considerables pérdidas de la producción sobre todo en postcosecha (Coates y Johnson, 1997). En *C. papaya* var SunUp Zhu *et al.* (2003) reportaron la presencia de cuatro homólogos de PR1 designados como CpPR1-a, CpPR1-b, CpPR1-c y CpPR1-d. Este último gen considerado como un marcador ideal para SAR en papaya incrementó sus niveles de mARN alrededor de 20 veces más luego de la inducción con BTH. Porter *et al.* (2008) reportaron la secuencia bZIP, Cp25 que se expresó en raíz de forma basal y que presentó escasa respuesta posterior a la inoculación con *Phytophthora palmivora*. No se han reportado estudios que describan la expresión de genes tipo TGA en papaya de formal basal o como respuesta a la exposición a ácido salicílico (SA) o patógenos como *C. gloeosporioides*.

En la presente tesis se analizó la expresión basal de homólogos a factores transcripcionales TGA de *C. papaya* var Maradol, así como su respuesta a la aspersión

con SA y finalmente al ataque de una cepa de *C. gloeosporioides* de concentración conocida.

Los resultados permitieron identificar la expresión de homólogos de genes TGA en peciolo, hoja, flor, fruto maduro y fruto inmaduro, adicionalmente se reportaron los genes que respondieron a SA y al patógeno.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Se pulverizó el tejido vegetal en un mortero con nitrógeno líquido y se pesó dentro de un tubo para microcentrífuga entre 100 a 500 mg. Se añadieron 500 µL de amortiguador caliente (60 °C) compuesto por CTAB (2 %), polivinilpirrolidona PVP (2 %), Tris-HCI (100 mM pH 8.0), ácido etiléndiaminotetraacético EDTA (25 Mm), NaCI (2M) y β-mercaptoetanol (2%). Se mezcló vigorosamente e incubó a 60 °C por 15 min mezclando suavemente por inversión cada 2 minutos. Se añadieron 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y colocaron los tubos en hielo por 5 min. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min (4°C). Se trasfirió el sobrenadante a otro tubo para microcentrífuga y se añadieron 250 µL de LiCI (7.5 M). Se dejó incubar hasta el día siguiente a 4 °C. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min (4 °C). Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el ARN en 30 µL de agua ultrapura. Este ARN se almacenó a -80 °C. Se midió la concentración (en ng µL⁻¹) mediante NANODROP[®] y se observó la calidad del ARN en gel de agarosa al 1.2 % a 80 V.

3.2.2 SINTESIS DE ADNc

El ARN total fue tratado con ADNasa, para cada reacción se preparó la mezcla compuesta por 1 μ L de amortiguador para ADNasa 10x, 1 μ L de ADNasa1, 0.5 μ L de inhibidor de ARNasas (RNAse OUT) y 20 μ L de ARN. Se incubó durante 15 minutos a 30 °C, se añadió 1 μ L de solución de paro y finalmente se incubó durante 10 minutos a 65°C.

Se transfirió a un tubo para microcentrífuga el volumen necesario de ARN en disolución para obtener una concentración de entre 300 a 500 ng ARN μ L⁻¹. Se adicionó agua ultrapura para ajustar un volumen de 9.0 μ L. Se adicionó 1 μ L de Random Primers una concentración 1.0 μ g mL⁻¹ y 1.0 μ L dNTPs (10 mM). Se incubó a 70 °C por 5 min

inmediatamente, se incubó en hielo por 5 min. Se añadieron 9 µL de la mezcla de reacción compuesta por 2.0 µL de amortiguador 5x First standard (Invitrogen™), 2.0 µL DTT (0.1 M), 4.0 µL MgCl₂ (25 mM), 1.0 µL Transcriptasa reversa M-MLV. Se incubó a 25°C (5 min), 42°C (1:30 h) y finalmente a 70°C (15 min). Se almacenó a -20°C hasta la extensión con los oligonucleótidos adecuados.

3.2.3 CONDICIONES DE RT-PCR

Los oligonucleótidos para la RT-PCR (Tabla 3.2) fueron diseñados de forma manual a partir de las secuencias homólogas de genes TGA de *C. papaya* y verificados mediante los programas FastPCR (Kalendar *et al.* 2009). Adicionalmente se diseñaron oligonucleótidos para GST (número de accesión AJ000923) en papaya (Lam y Bakar, 1999) como gen de respuesta temprana a SA (Uquillas *et al.* 2004) y se utilizaron las secuencias reportadas para *CpPR1-d* como gen de respuesta tardía a SA y marcador de SAR en papaya (Zhu *et al.* 2003).

Tabla 3.2 Secuencia de oligonucleótidos y longitud esperada de los amplicones correspondientes (5'-3').

	Secuencia	Secuencia	Long.
	sentido	antisentido	Amplicón
CpTGA1	agtgatatagagctccgcatac	tcaaagtgtggaataaggac	200
CpTGA2	acattacgcaggcttgctc	tgatcagcctgttatgctc	250
CpTGA3	atgtcagcaactgtgaactc	tcgaccttagcagcatctgc	203
CpTGA4	tatggagttcagcaaggagc	atgaagattgccgcctgctc	208
CpTGA5	acgccaagacgttgagacg	ttcctcctccaccgccac	183
CpTGA6	aataccgaatcaagtggagcc	agagcttgttgatggcaagag	212
CpTGA7	agaatgtagcaggtcgatc	agctgatgaattctccgcattg	111
GST	atggcggacgaggttgttc	ccttgtcgctccatacctca	244
CpPR-1d	gcggtcactatactcaggtt	tgcctggaggatcatagttg	125

De forma general la amplificación de genes TGAs se efectuó a partir de 1.5 μ L de templete en mezcla con 5 μ L de Buffer 10x RxnPCR, 2.0 μ L MgCl₂, 0.8 μ L de dNTPs, 1.5 μ L de primer F, 1.5 μ L de primer R, 0.2 μ L de TaqPolimerasa, y agua suficiente para completar un volumen de 50 μ L.

La reacción se efectuó en un termociclador Eppendorf mediante un programa que consistió de una etapa de desnaturalización a 95 °C (3min), seguido de 38 ciclos con desnaturalización a 95 °C (30 s), alineación a 56 °C (30 s), extensión 72 °C (1 min) y una etapa de extensión final a 72 °C (10 min).

Las muestras se fraccionaron en un gel de agarosa al 1.2% a 5V cm⁻¹ durante una hora.

3.2.4 MATERIAL VEGETAL DE C. papaya Var Maradol

Se utilizaron diferentes tipos de tejidos de acuerdo con el tipo de ensayo propuesto:

Para determinar la expresión basal en los diferentes tejidos de *C. papaya* var Maradol, se utilizaron ARN de plantas de aproximadamente un año de edad colectadas en la plantación comercial "Rancho Alegre" en el Estado de Yucatán (N 21°18.2190, W087°46.1790). Se usó tejido proveniente de peciolo, hojas, flores (cerradas), frutos inmaduros de aproximadamente 15 cm y frutos maduros de aproximadamente 30 cm (a los cuales se les removió la semillas). El material vegetal se mantuvo en refrigeración a -80 °C hasta su procesamiento.

• Para el ensayo en respuesta a la inducción con SA se utilizaron plántulas de 43 días de edad cultivadas en invernadero en una mezcla de Agrolita-Peat Moss (1:1). Las plántulas se regaron regularmente con agua destilada y cada ocho días con solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). Tres días previos al ensayo, las plántulas de papaya Maradol se llevaron a un cuarto de cultivo con fotoperiodo de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz a 25 °C para su aclimatación. Las plantas no inducidas se regaron con 30 mL de agua destilada y las inducidas con 30 mL de una solución 1 mM SA y se cosecharon a tiempo cero y a cuatro, ocho y doce días posteriores a la inducción con SA y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

3.2.5 MATERIAL VEGETAL PARA EL ENSAYO DE EXPOSICIÓN AL PATÓGENO C. gloeosporioides

Se utilizaron frutos en etapa de madurez fisiológica 2 de acuerdo con la clasificación del estadío de madurez propuesto por Santamaría *et al.* (2009). Se lavaron ligeramente con detergente líquido y abundante agua, se agruparon los frutos en tres grupos, el primero

sin tratamiento (se atomizaron con agua destilada estéril) el segundo con una suspensión de fungicida comercial Mirage a concentración de 2 mL L⁻¹ y adherente (0.1 mL L⁻¹).

Finalmente en el tercer grupo de frutos se inoculó con esporas en suspensión de C. gloeosporioides a concentración de 1×10^6 esporas mL⁻¹.

Posterior a la atomización, se guardaron los frutos dentro de cajas transparentes de plexiglas con la finalidad de promover el desarrollo del hongo y se dejaron madurar hasta terminado el experimento. Se tomaron muestras de fruto, extrajo el ARN y se analizó la expresión de genes tipo *CpTGA*. La cuantificación del área afectada de los frutos se realizó mediante el software ImageJ (Abramoff *et al.* 2004).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE DIFERENTES TEJIDOS DE *C. papaya* Var Maradol

El ARN total fue aislado a partir de peciolos, hojas, pétalos, frutos maduros e inmaduros, sin degradación ni contaminación con ADN (Figura 3.1). En el gel de agarosa se observaron el par de bandas correspondientes a las subunidades 25S y 18S. Las bandas fueron ligeramente intensas para ARN proveniente de peciolo, muy intensas para hoja y flor, y de baja intensidad para fruto inmaduro y maduro.



Figura 3.1 Análisis de integridad de ARN proveniente de peciolos P, hojas H, pétalos Pt, frutos inmaduros Fi y frutos maduros Fm de papaya Maradol.

El mayor rendimiento promedio de ARN obtenido por tejido, se obtuvo en hojas, seguido de flores y peciolos, finalizando con el más bajo contenido para frutos maduros e inmaduros (Tabla 3.3).

Tejido	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Conc. Promedio µg ARN 100 ⁻¹ mg ⁻¹ tejido fresco
Peciolos	2.10	10.01
Hojas	1.91	20.96
Pétalos	2.10	15.62
Frutos inmaduros	1.90	1.23
Frutos maduros sanos	2.03	1.80
Frutos Maduros sanos atomizados con Mirage	2.16	1.45
Frutos Maduros enfermos	2.11	1.18

 Tabla 3.3 Concentración promedio y pureza de ARN extraído de diferentes tejidos de C.

 papaya var Maradol

HINGING & BU 2001LET BETVERTERIG 30 JULY MAN

A partir del ARN total del mesocarpio de los frutos correspondientes a los tres tratamientos en respuesta a *C. gloeosporioides* (Figura 3.2) se observó que las bandas ribosomales provenientes del ARN aislado a partir del mesocarpio de frutos aparentemente sanos (atomizados con agua y Mirage) eran más intensas que las provenientes del mesocarpio de fruto enfermo previamente inoculado con *C. gloeosporioides* lo que sugiere la degradación del ARN debida a la infección por el patógeno.



Figura 3.2 Análisis de integridad de ARN total proveniente de fruto de papaya Maradol. Líneas 1, 2, 3A y 3B fruto atomizado con agua. Líneas 4A, 4B, 5 y 6 fruto atomizado con fungicida Mirage (2 mL L⁻¹) y adherente (0.1 mL L⁻¹). Líneas 7, 8, 9A y 9B pulpa lesionada, fruto atomizado con suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* (1x 10⁶ esporas mL⁻¹).

3.3.2 PATRONES DE EXPRESIÓN BASAL DE GENES *CpTGA* EN DIFERENTES TEJIDOS DE *C. papaya* Var Maradol

El ADNc obtenido y usado como plantilla para la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos generó amplicones del tamaño esperado (Figura 3.3).



Figura 3.3 Expresión basal, productos de RT-PCR, para genes TGA en *C. papaya* var Maradol (Cada columna corresponde a un tejido, en su orden: P peciolo, H hoja, Pt pétalo, Fi fruto inmaduro y Fm fruto maduro *EF1α* Elongation Factor 1, gen control. T(-) sin ADNc T(+) con ADNc, O r/f (-) sin oligonucleótidos O r/f (+) sin oligonucleótidos.

El gen *CpTGA1* presentó bandas uniformemente intensas en peciolos, hojas, pétalos y frutos maduros y una banda menos intensa en fruto inmaduro. *CpTGA3* presentó una banda uniforme en hojas, pétalos, frutos maduros e inmaduros y una banda ligeramente más intensa en peciolos.

CpTGA2 generó bandas similarmente intensas en hojas, pétalos, frutos inmaduros y frutos maduros, no se observó banda en peciolo. *CpTGA4* presentó bandas difusas en peciolos, hojas, pétalos y frutos inmaduros y una banda ligeramente más intensa en frutos maduros. El gen *CpTGA7* presentó bandas uniformes en peciolos, hojas, flores y frutos maduros, adicionalmente una banda difusa en fruto inmaduro.

CpTGA5 mostró una banda intensa en pétalos y una banda difusa en peciolos. El gen *CpTGA6* presentó bandas en todos los tejidos con mayor intensidad en peciolos y pétalos, en menor intensidad en frutos inmaduros y mucho menos en frutos maduros.

3.3.3 PATRONES DE EXPRESIÓN DE HOMÓLOGOS DE TGA EN RESPUESTA A LA INDUCCIÓN CON ÁCIDO SALICÍLICO

Considerando la expresión de los genes *CpTGA* en hojas de plantas colectadas a los cuatro, ocho y doce días posteriores a la inducción con SA (Figura 3.4). Todos los genes se expresaron de forma variable a diferentes tiempos desde el inicio del experimento, la excepción fue el gen *CpTGA5* que no se expressó en ningún caso.

Todos los miembros de *CpTGA* mostraron una expresión basal débil en plantas que no fueron tratadas con SA excepto *CpTGA5* que no respondió al tratamiento con SA. Al cuarto día posterior a la aplicación de SA, la expresión de *CpTGA3* aumentó muy levemente mientras que la expresión de *CpTGA4* y *CpTGA6* aumentó ligeramente más. La expresión de *CpTGA2* y *CpTGA1* permaneció inalterada.



Figura 3.4 Expresión de genes CpTGA de papaya en respuesta a la inducción con SA 1mM a los 0, 4, 8 y 12 días posteriores al tratamiento.

En los genes control, *CpNPR1* se expresó de forma aparentemente uniforme con aumentos de expresión entre los cuatro y doce días de iniciado el experimento.

Para el gen *CpPR-1d* la expresión fue similar desde el cuarto al doceavo día, en el gen *CpGST1* se observó una expresión homogénea en los mismos días. Finalmente para el gen *CpEF1a* la expresión fue uniforme en todos los tiempos (Fig. 3.4).

3.3.4 DESARROLLO DE LA ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE C. papaya Var Maradol

Finalizado el ensayo al noveno día, los frutos sin tratamiento (atomizados con agua destilada estéril) presentaron muy poca presencia de micelio blanco algodonoso y lesiones, el área promedio de micelio fue inferior al 10% y la de lesión alrededor del cinco por ciento. Las lesiones circulares formaron una ligera depresión en la epidermis del fruto, con un halo color naranja intenso, en la parte central de la lesión (Figura 3.5 a).



Figura 3.5 Síntomas observados en frutos de papaya Maradol al noveno día posterior al inicio del experimento a) fruto sin tratamiento, escasas lesiones circulares con halo color naranja b) fruto atomizado con fungicida Mirage a concentración de 2 mL L⁻¹, esporádicas lesiones circulares color café claro c) fruto inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* (1x 10⁶ esporas mL⁻¹), múltiples lesiones circulares con halo color naranja, desarrollo de micelio blanco algodonoso y acérvulos negros d) y e) lesiones recubiertas de micelio blanco algodonoso y acérvulos negros en frutos inoculados con *C. gloeosporioides* f) sección transversal de una lesión típica provocada por *C. gloeosporioides*, se aprecia una región de acérvulo negro recubierta de micelio blanco y pulpa de fruto afectada.

Para los frutos atomizados con Mirage se observó una menor área promedio ocupada por el micelio (cerca del uno por ciento) mientras que el área promedio de las lesiones fue de alrededor del tres por ciento. Las lesiones circulares eran de color café claro (Figura 3.5 b).

En tanto que los frutos atomizados con el inóculo de *C. gloeosporioides* presentaron un área promedio de al menos el 60% de formación de micelio y de cerca del 40% de lesiones. El micelio era blanco, algodonoso con acérvulos negros, las múltiples lesiones circulares se presentaron como depresión en la epidermis del fruto, con halo naranja y principalmente recubiertas por una delgada capa de micelio blanco, la epidermis del fruto en algunos casos se desprendió con facilidad (Figura 3.5 c hasta e).

En la Fig 3.6 se aprecia la diferencia entre las áreas sanas y enfermas en frutos de papaya Maradol al noveno día posterior al ensayo de exposición al patógeno *C. gloeosporioides*. Comparativamente puede observarse que los frutos inoculados con el patógeno tenían un área de afectación considerablemente mayor a los frutos que no recibieron tratamiento y los que fueron atomizados con fungicida Mirage.



Figura 3.6 Área promedio de frutos al noveno día de iniciado el experimento S_9 frutos sin tratamiento **M** frutos atomizados con Mirage a concentración de 2 mL L⁻¹ *Cg* frutos inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* (1x 10⁶ esporas mL⁻¹).

El daño producido por *C. gloeosporioides* fue evidente, se puede observar en la Figura 3.7 que prácticamente la totalidad de los frutos inoculados con la cepa del patógeno mostraron afectación por micelio y lesiones. En cambio en los frutos sin tratamiento y en

Capítulo III

los atomizados con Mirage se observó de forma muy ligera la presencia de lesiones y formación de micelio típicas de *C. gloeosporioides* aunque estos grupos de frutos no se hayan puesto en contacto con el patógeno lo que sugiere la presencia latente de *C. gloeosporioides*. Al tomar una muestra de tejido infectado con el patógeno en frutos atomizados con agua y Mirage y cultivarla en un medio apropiado. Se determinó al menos de forma visual que la cepa poseía las mismas características morfológicas en comparación con la cepa de *C. gloeosporioides* caracterizada con la que se preparó el inóculo para el ensayo.



Figura 3.7 Frutos de papaya Maradol utilizados en el ensayo de exposición al patógeno al inicio del experimento (día cero) y a los nueve días posteriores **S9** frutos de papaya al día 9 sin tratamiento **M** frutos al día 9 atomizados con fungicida Mirage (2 mL L^{-1}) y adherente (0.1 mL L^{-1}) **Cg** frutos al día 9 inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* (1×10^{6} esporas mL⁻¹).

3.3.5 PATRONES DE EXPRESIÓN DE HOMÓLOGOS DE TGA EN RESPUESTA A LA INDUCCIÓN CON C. gloeosporioides

Para el gen *CpTGA1* se observó una banda difusa para frutos S₀ además dos bandas intensas en los frutos S₉ y M. Finalmente una banda de menor intensidad para *Cg*. En cambio, en la expresión del gen *CpTGA3* se observó expresión uniforme en S₀ y M, expresión ligeramente mayor en S₉ y una expresión menor en *Cg* (Figura 3.8).

IN CLUBSON -

Capítulo III



Figura 3.8 Amplificación de secuencias de ADNc de homólogos de TGA con oligonucleótidos específicos S_0 frutos sin tratamiento al día cero S_9 frutos sin tratamiento al día nueve **M** frutos atomizados con fungicida Mirage (2 mL L⁻¹) y adherente (0.1 mL L⁻¹) *Cg* frutos atomizados con suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* (1x 10⁶ esporas mL⁻¹). *EF1a* Elongation Factor 1, gen control.

Para el gen CpTGA2 se observó una mayor expresión en **M** y expresión menor en S₀, S₉ y Cg.

En el gen CpTGA4 se observó expresión baja y uniforme en S₀ y S y M, aparentemente la expresión en frutos Cg fue ligeramente mayor.

Para el gen *CpTGA7* se observó una ligera expresión en S_0 y S_9 , y un aparente aumento de la expresión en **M** y finalmente mayor expresión en frutos *Cg*.

El gen *CpTGA5* no se expresó en ningún grupo de frutos. El gen *CpTGA6* presentó baja expresión en S_0 , expresón mayor en frutos S_9 y expresión uniforme de menor intensidad en **M** y *Cg*.

En el gen *CpNPR1* se observó expresión uniforme en los frutos **S**₀, **S**₉ y *Cg*, y una banda de menor intensidad en frutos **M**.

Para el gen *CpPR-1d* se observó expresión uniforme en los frutos S_0 , S_9 y *Cg* con un aparente aumento en la expresión en los frutos **M**. Finalmente el gen *CpGST1* se expresó uniformemente en los frutos S_0 , S_9 , **M** y se observó una expresión menor en frutos *Cg*.

La expresión del gen EF1a se observó muy uniforme en todos los frutos (Fig. 3.8).

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 LA INFECCIÓN DE C. gloeosporioides REDUCE LA CANTIDAD DE ARN TOTAL EN TEJIDO ENFERMO

Mediante el protocolo de extracción descrito anteriormente, se obtuvo ARN de buena calidad. En todos los casos el coeficiente A₂₆₀/A₂₈₀ es mayor a 1.8 indicio de escasa contaminación con proteínas. Se observó que la concentración en microgramos (µg) promedio ARN obtenida por cada 100 mg tejido coincidió con la mayor abundancia de ARN observado en el gel de agarosa. Interesantemente se encontró que la intensidad de bandas de ARN total en el gel de agarosa era menor en tejidos provenientes de frutos infectados por *C. gloeosporioides* (Fig. 3.2), este efecto probablemente se debió a la degradación del ARN debido al aumento de la infección. Al respecto Dean *et al.* (2002) obtuvieron resultados similares, en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con *Colletotrichum destructivum*, en un gel de agarosa observaron la degradación progresiva de ARN a medida que la enfermedad aumentaba en función del tiempo.

3.4.2 LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES TIPO CpTGA SE EXPRESAN EN DIFERENTES TEJIDOS DE FORMA BASAL

En la presente tesis se reporta la expresión de *CpTGA1*, *CpTGA2* y *CpTGA3* en hojas maduras y pétalos, en cambio Pontier *et al.* (2002) detectaron la proteína AtTGA2 en homóloga a CpTGA2 en hojas maduras de *Arabidopsis* pero no detectaron AtTGA1 (homóloga a CpTGA1) o AtTGA3 (homóloga a CpTGA3).

CpTGA2 (quien comparte un alto porcentaje de identidad con *AtTGA6*), no se expresó en peciolos, pero si se expresó en frutos inmaduros. En contraste Xiang *et al.* (1997) encontró expresión de *AtTGA6* en peciolos pero muy baja expresión en silicuas inmaduras.

CpTGA3 se expresó en frutos maduros mientras que en *Arabidopsis*, Miao *et al.* (2004) no encontraron expresión de *AtTGA3* en silicuas maduras por hibridación Northern.

Para el caso de *CpTGA4*, en la presente tesis se reporta la expresión basal uniforme en todos los tejidos, en *Arabidopsis* la expresión de su más cercano homólogo *AtPAN* se observó en meristemos (Running *et al.* 1996) y se involucra con la regulación del número de órganos de periantia en *Arabidopsis* (Chuang *et al.* 1999) así como la regulación de *AGAMOUS* (*AG*), relacionado con el patrón floral en *Arabidopsis*.

Para *CpTGA5*, se encontró expresión basal en pétalos y en menor medida en peciolos, para el caso de *Arabidopsis*, su más cercano homólogo *AtTGA9* mostró expresión en silicuas y hojas (Murmu *et al.* 2010). Adicionalmente *CpTGA5* es la secuencia previamente reportada para papaya por Porter *et al.* (2008) como CP25 (número de accesión EF12305) una clona similar a liguleless2 (lg2) un gen que codifica para una proteína de zipper básico de leucina en maíz, asociado probablemente con desarrollo de la raíz.

Se observó expresión basal de *CpTGA6* en todos los tejidos, incluidos hojas y frutos inmaduros, mientras que su homólogo en *Arabidopsis*, *AtTGA10* no mostró expresión en hojas ni en silicuas (Murmu *et al.* 2010).

Estas diferencias en la expresión de genes *CpTGA* en papaya pueden atribuirse a las diferencias de edad y condiciones ambientales de ambos sistemas, para *Arabidopsis* la mayoría de los ensayos fueron hechos en plántulas, mientras que en papaya se usaron plantas maduras del campo expuestas a una gran variedad de condiciones ambientales.

Debido a que el gen *CpTGA7* se agrupó en el subclado II formando una politomía no resuelta aún y posee un bajo porcentaje de identidad no puede compararse su expresión con algún homólogo de *Arabidopsis*.

La expresión basal de los homólogos *CpTGA* fue variada probablemente en respuesta a los estímulos a los que fueron expuestas las plantas provenientes de la plantación comercial de la cual se obtuvieron las muestras, lo que sugiere la naturaleza multifuncional de los FTS.

Previamente Zhu *et al.* (2003) demostraron la expresión de *CpPR-1d* en hojas y raíces, nuestros resultados confirman la expresión del gen marcador de SAR en hojas de papaya Maradol, adicionalmente reportamos la expresión (aunque reducida) del gen en flores de esta variedad.

La expresión del gen *CpGST1* se observó en todos los tejidos ensayados. Previamente Lam y Bakar (1989) caracterizaron el gen *CpGST1* y verificaron su expresión por hibridación Northern en diferentes tejidos. Estos autores también reportaron un máximo de expresión en frutos maduros y expresión muy ligera en hojas y flores, este resultado concuerda con la expresión del gen *CpGST1* en papaya Maradol.

Nuestros resultados reportan por primera vez la expresión del gen *CpGST1* en peciolo, y de forma sorprendente en fruto inmaduro, expresión que no fue detectada en el experimento descrito por Lam y Bakar (1989).

Esta diferencia en la expresión en fruto inmaduro probablemente se deba a las variedades utilizadas. El gen de *CpGST1* fue caracterizado a partir de papaya var Eksotika 2 (Bakar y Lam, 1999; Lam y Bakar, 1999) mientras que nuestros experimentos se realizaron a partir de papaya var. Maradol.

La expresión del gen *CpNPR1* en hojas, flores y frutos maduros, concuerda con la expresión reportada para este gen en papaya Maradol (Peraza *et al.* 2012). Adicionalmente reportamos por primera vez la expresión de *CpNPR1* en tejidos de fruto maduro de papaya Maradol (Fig. 3.3).

3.4.3 LOS GENES CpTGA RESPONDEN A LA INDUCCIÓN CON SA

El ligero aumento en la expresión de *CpTGA3* en respuesta a SA es concordante con la expresión de *AtTGA3* que aumentó alrededor de cinco veces en plantas tratadas con SA respecto a plantas no inducidas (Farinati, 2010). En cambio, el incremento de la expresión de *CpTGA4* posterior a la aplicación con SA es inesperada, su homólogo *AtPAN* se ha relacionado más a procesos de desarrollo (Maier *et al.* 2011). El aumento de expresión de *CpTGA4* posterior al tratamiento con SA puede deberse al hecho de que *CpTGA4* y *AtPAN* posiblemente compartieron un ancestro común con homólogos TGA relacionados con defensa (*AtTGA2, AtTGA5, AtTGA6* y *CpTGA2*). Es por tanto posible que desde la

divergencia con *Arabidopsis*, ambas funciones (defensa y desarrollo) hayan permanecido conservadas para *CpTGA4*.

El hecho de que la expresión de *CpTGA1* no se haya visto alterada por la exposición con SA, es consistente con lo descrito por en *A. thaliana* para *AtTGA1* (Zimmermann *et al.* 2004). Al respecto Després *et al.* (2003) reportaron que la aplicación de SA no aumentó la expresión en *Arabidopsis* de su homólogo *AtTGA1* pero promovió la interacción entre AtNPR1 y AtTGA1. Es probable que la misma regulación se efectúe en papaya.

En nuestros resultados se observa que la expresión de *CpTGA2* no cambió en respuesta a SA en papaya, esto contrasta con el ligero aumento en la expresión de *AtTGA2* tres días posteriores a la aplicación con INA (un análogo de SA) reportado previamente en hojas de *A. thaliana* (Kim y Delaney, 2002).

El incremento en la expresión de *CpTGA6* también puede considerarse inesperado, ya que su homólogo *AtTGA10* se ha asociado con procesos de desarrollo floral (Murmu *et al.* 2010). Por su parte, *CpTGA5* no se expresó ni en condiciones no inducidas ni posterior a la inducción con SA su homólogo *AtTGA9* también se relaciona con desarrollo floral (Murmu *et al.* 2010). De momento para los genes *AtTGA9* y *AtTGA10* en *Arabidopsis* no se han reportado trabajos previos sobre la expresión de estos genes posterior a la inducción con SA. El aumento en la expresión de *CpNPR1* es consistente con lo reportado previamente para papaya donde *CpNPR1* se expresó en ausencia de BTH pero incrementó sus niveles de transcritos alrededor de dos veces más, posterior a la inducción con BTH (Zhu *et al.* 2003).

La acumulación de mensajeros de proteínas PR se ha usado como criterio para determinar si una planta se encuentra en SAR (Enyedi *et al.* 1992; Ward *et al.* 1991). La aplicación externa de SA activa el mismo juego de genes que se expresan de forma natural en la inducción de SAR por la presencia de patógenos (Gaffney *et al.* 1993).

Debido a que la expresión de *CpPR-1d* alcanzó un máximo a las 24 horas posterior a la inducción con SA (Fig. 3.4), este es un indicio del posible establecimiento de la SAR en las plántulas de papaya Maradol.

En papaya var SunUp, Zhu *et al.* (2003) reportaron que la inducción de la expresión del gen *CpPR-1d* aumentó progresivamente a partir de las tres horas posteriores a la inducción con BTH, expresión que aumentó después hasta 14 días siguientes a la inducción.

El gen *CpGST1* también se expresó de forma constitutiva con un ligero aumento posterior a la inducción. Este gen fue originalmente descrito para papaya var Eksotika 2, expresado ligeramente en hojas y altamente expresado en frutos maduros (Lam y Bakar, 1999) pero no existen reportes que documenten su expresión en respuesta a SA en papaya. Se conoce que los genes tipo *GST* también se encuentran regulados por factores transcripcionales tipo TGA (Johnson *et al.* 2001), por tanto es probable que la expresión constitutiva de los *CpTGA* promovió el patrón de expresión observado para *CpGST*

3.4.4 LOS GENES CpTGA RESPONDEN A LA INOCULACIÓN CON C. gloeosporioides

Finalizado el experimento, al día 9 los frutos de papaya S_9 sin tratamiento, los frutos de papaya **M** atomizados con fungicida Mirage (2 mL L⁻¹) y adherente (0.1mL L⁻¹) y los frutos de papaya **Cg** inoculados con esporas de *C. gloeosporioides* (1x 10⁶ esporas mL⁻¹) estaban maduros en su totalidad, esta maduración prematura resulta inesperada para ese número de días. Santamaría *et al.* (2009) propusieron una escala visual de etapas de madurez, correlacionada con la producción de etileno y el color entre otras. En esta escala, la etapa cuatro corresponde al octavo día posterior a la cosecha, tiempo en cual se alcanza el máximo pico de etileno, posteriormente la concentración de etileno baja y en etapas 5 y 6 (a partir del día 13 posterior a la cosecha) el fruto se considera maduro, apto para el consumo. En nuestro experimento, al día 9 los frutos maduros se encontraban en etapa 6 (Figura 3.7) la maduración prematura se atribuye a que los frutos se mantuvieron contenidos dentro de las cajas de plexiglas, con la finalidad de asegurar un ambiente de alta humedad propicio para el desarrollo de *C. gloeosporioides*.

Debido a que en los frutos S_9 sin tratamiento, los frutos de papaya **M** atomizados con fungicida Mirage se observaron lesiones y formación de micelio con similares características a las de *C. gloeosporioides*, aunque en mucha menor cantidad y tamaño comparada con los frutos **Cg** se presume que los frutos aparentemente sanos de papaya

estaban infectados por la presencia del patógeno de forma endógena, la atomización con Mirage redujo el desarrollo del hongo pero no lo eliminó totalmente. El hongo presente de forma endógena pudo colonizar los frutos y promover la aparición aunque sea escasa, de los síntomas observados. Las infecciones quiescentes por patógenos a nivel post cosecha son comunes para cultivos tropicales (Coates y Johnson, 1997), se conoce que el apresiorio de *C. gloeosporioides* actúa de forma quiescente en papaya, permaneciendo latente en frutos inmaduros (Prusky y Plumbley, 1992), adicionalmente se sabe que el etileno induce la germinación y formación de apresiorios en suspensiones de conidios de *C. gloeosporioides* (Flaishman y Kolattukudy, 1994) por tanto existe suficiente evidencia que respalde este argumento.

Los frutos *Cg* en cambio se observaron afectados prácticamente en su totalidad por micelio o lesiones características de la infección por *C. gloeosporioides* (Fig. 3.5 y 3.7) por tanto el inóculo a la concentración descrita en la sección 3.2.6 fue suficiente para promover la colonización de los frutos. Hernández *et al.* (2005) caracterizaron morfológicamente dos aislados diferentes de *C. gloeosporioides*, independientemente del aislado las lesiones se describieron como circulares o de forma irregular, con micelio de color blanco y textura algodonosa abundante, con presencia de acérvulos negros y masas de esporas color naranja.

Adicionalmente, el período de colonización para *C. gloeosporioides* en papaya es de 3.9 días (Lakshmi *et al.* 2011), tiempo que no coincide con el pico de etileno para papaya (Santamaría *et al.* 2009). Es probable por tanto que el tiempo de incubación del hongo, se redujera al igual que el tiempo de maduración de los frutos para este experimento.

En el subclado I los miembros *CpTGA1* y *CpTGA3* mostraron patrones de expresión equivalentes en los frutos sin tratamiento al día cero, frutos S_9 al noveno día sin tratamiento, frutos **M** atomizados con fungicida Mirage y frutos *Cg* inoculados con *C. gloeosporioides.* En los miembros de este subclado, la presencia de patógeno endógeno en frutos S_9 aparentemente generó bandas de intensidad mayor respecto a los frutos sin tratamiento S_0 , de forma interesante los frutos S_9 presentaron lesiones pequeñas y escaso micelio en los frutos.

En cambio, en frutos **M** atomizados con fungicida Mirage, al parecer el fungicida redujo la presencia de patógeno endógeno. De acuerdo con León *et al.* (2005) Se conoce que el procloraz (ingrediente activo del fungicida Mirage) utilizado en papaya Maradol ha demostrado tener la mayor efectividad (porcentaje de inhibición en la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*, 96.5%) y menor severidad (porcentaje de área dañada de frutos 1.7%), por tanto la inhibición de la germinación de esporas del patógeno podría explicar el descenso en la intensidad de las bandas en frutos **M**, respecto a S_0 y S_9 .

De forma interesante las bandas en frutos *Cg* inoculados con *C gloeosporioides*, presentaron una menor intensidad. Los acérvulos se han observado en la etapa necrotrófica de *C. graminicola* con la finalidad de generar nuevos conidios (Horbach *et al.* 2011) y debido a que se observaron múltiples acérvulos negros en frutos del grupo *Cg* es probable que los genes *CpTGA1* y *CpTGA3* no respondan de forma adecuada en etapas tardías de la infección con *C. gloeosporioides*, es probable que la elevada presencia del patógeno presente al noveno día posterior a la inoculación, redujo la expresión de estos dos genes *CpTGA1* y *CpTGA3* (agrupados en un subclado de defensa) como una estrategia de *C. gloeosporioides* para colonizar.

En frutos *Cg* inoculados con *G. gloeosporioides*, el micelio formado presentó múltiples acérvulos, comparativamente en *Arabidopsis* Chen *et al.* (2002) reportaron que *AtTGA1* indujo su expresión ante la infección por el virus del mosaico de la coliflor y por infección con *Botrytis cinerea* mientras que *AtTGA4* se reprimió 9 horas posterior a la infección con *P. syringae* pv tomate DC3000 y 24 h después de la infección con el virus de mosaico de la coliflor.

Inesperadamente se observó un patrón de bandeo similar en frutos S_0 , S_9 , M y Cg para el miembro CpTGA6 miembro del subclado III (homólogo a AtTGA10, este último asociado con desarrollo, Murmu *et al.* 2010).

En el subclado II *CpTGA2* y *CpTGA4* prácticamente no presentaron cambio alguno frente a la exposición al patógeno, comparativamente en *Arabidopsis*, *AtTGA2* respondió frente al estrés por frío más no al estrés por patógeno (Chen *et al.* 2002) mientras que el miembro del mismo subclado *AtTGA5* se indujo por infecciones con bacterias como *P. syringae*, pv tomate DC3000/ avrRpt2, *P. syringae* pv maculicola ES4326/avrRpt2 y el virus del mosaico de la coliflor (Chen *et al.* 2002). En el subclado III CpTGA5 no presentó bandas y *CpTGA6* aparentemente aumentó su expresión por la presencia del patógeno. De forma sorprendente el homólogo *CpTGA7* fue el único en el que se observó mayor intensidad de la banda en frutos *Cg* inoculados con *G. gloeosporioides* respecto a los frutos S_0 , S_9 y M. Sin embargo este miembro de *CpTGA* no posee un homólogo definido en *Arabidopsis* con el cuál se pueda comparar. La expresión basal del homólogo mostró expresión uniforme independientemente del tejido ensayado.

La expresión del gen *CpPR-1d* fue constitutiva en todos los frutos, apoyando la idea de la posible presencia de patógeno endógeno, es conocido que *C. gloeosporioides* permanece de forma latente en frutos inmaduros (Prusky y Plumbley, 1992) por tanto obtener frutos totalmente libres de patógeno es una tarea muy difícil de conseguir.

La expresión constitutiva de genes de defensa en papaya se ha reportado previamente. Porter *et al.* (2009) determinaron que la expresión de los genes tipo *PR* identificados como *Cp29* (codifica para una β -1,3-glucanasa) y Cp45 (codifica para una proteína HIR de sus siglas en inglés hypersensitive induced reaction protein) presentaron expresión en raíces no inoculadas con *Phytophthora palmivora*, la expresión de estos genes aumentaron doce horas después de la inoculación con el patógeno. De forma interesante Porter el al. (2009) mencionan que, aunque la expresión de *Cp29* aumentó debido a la presencia del patógeno, no lo hizo de forma consistente con el desarrollo de la enfermedad sugiriendo la posible presencia de un inhibidor de glucanasas codificado por *Phytophthora palmivora* para promover la infección.

REFERENCIAS

- Abramoff M.D., P. J. Magalhaes, S. J. Ram (2004). Image Processing with ImageJ. Biophotonics International 11(7):36-42.
- Artlip T., M. E. Wisniewski (2001). Induction of proteins in response to biotic and abiotic stresses. *In*: Handbook of plant and crop physiology. Pessarakli M. (ed). Marcel Dekker, Inc. Second Edition. p. 657.
- Bakar U. K., P. F. Lam (1999). Construction of cDNA libraries from ripe and unripe Eksotika 2 papaya. J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 27(2):193-199.
- Barrett L. G., M. Heil (2012). Unifying concepts and mechanisms in the specificity of plant– enemy interactions. Trends in Plant Science 17(5):281-292.
- Blanco F., V. Garreto, N. Frey, C. Dominguez, T. Pérez, D. Van der Straeten, X. Jordana, L. Holuigue (2005). Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in Arabidopsis. Plant Molecular Biology 59:927-944.
- Chen W., N. Provart, J. Glazenbrook, F. Katagiri, H. Chang, T. Eulgem, F. Mauch, S. Luan, G. Zou, S. Whitham, P. Budworth, Y. Tao, Z. Xie, X. Chen, S. Lam, J. Kreps, J. Harper, A. Si-Ammour, B. Mauch-Mani, M. Heinlein, K Kobayashi, T. Hohn, J. L. Dangl, X. Wang, T. Zhu (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. The Plant Cell 14:559-574.
- Chuang C., M. P. Running, R. W. Williams (1999). The PERIANTHIA gene encondes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. Genes and Development 13:334-344.
- Coates L., G. Johnson (1997). Postharvest diseases of fruit and vegetables. *In*: Plant Pathogens and Plant Diseases. Brown J., H. Ogle. (eds). The Australasian Plant Pathology Society Inc. p. 539.
- Dean J. D., P. H. Goodwin, T. Hsiang (2002). Comparison of relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of β-1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* Infected with *Colletotrichum destructivum*. Plant Molecular Biology Reporter 20:347–356.
- Després C., C. Chubak, A. Rochon, R. Clark, T. Bethune, D. Desveaux, P.R. Fobert (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA. The Plant Cell 15:2181-2191.

- Enyedi A. J., N. Yalpani, P. Silverman, I. Raskin (1992). Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. Proc. Nat. Acad. Sci. Plant Biology 89:2480-2484.
- Farinati S., G. DalCorso, S. Varotto, A. Furin (2010). The Brassica *juncea* BjCdR15, an ortholog of *Arabidopsis* TGA3, is a regulator of cadmium uptake, transport and accumulation in shoots and confers cadmium tolerance in transgenic plants. New Phytologist 185:964-978.
- Flaishman M. A., P. E. Kolatrukudy (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. Proc. Nati. Acad. Sci. Plant Biology 91:6579-6583.
- Fujita M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. Current Opinion in Plant Biology 9:436-442.
- Gaffney T., L. Friedrich, B. Vernooij, D. Negrotto, G. Nye, S. Uknes, E. Ward, H. Kessmann, J. Ryals (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. SCIENCE 261:754-756.
- Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 43:205–27.
- Hernández R. C., L. Bravo, M. Corona, P. VIIIa, S. Bautista, L. Barrera (2005). Caracterización morfocultural y sintomatológica de dos aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. de papayo (*Carica papaya* L.). 23(3): 223-231.
- Hoagland D. R., D. I. Arnon (1950). The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular 347:3-32.
- Holuigue L., P. Salinas, F. Blanco, V. Garretón (2007). Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. *In*: Salicylic acid-a plant hormone.
 Hayat S., A. Ahmad (eds.). Springer. p.210.
- Horbach R., A. R. Navarro, W. Knogge, H. B. Deising (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. Journal of Plant Physiology 168:51-62.
- Jakoby M., B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J. V. Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj, F. Parcy (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science 7(3):106-111.

- Kalendar R., D. Lee, A.H. Schulman (2009). FastPCR Software for PCR primer and probe design and repeat search. Genes, Genomes and Genomics 3(1):1-14.
- Kim H. S., T. P. Delaney (2002). Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in Arabidopsis thaliana to Peronospora parasitica. The Pant Journal 32:151-163.
- Lakshmi B. K. M., P. N. Reddy, R. D. Prasad (2011). Cross-infection potential of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Isolates Causing Anthracnose in Subtropical Fruit Crops. Tropical Agricultural Research 22(2):183-193.
- Lam E, Y. K. Lam (1995). Binding site requirements and differential representation of TGF factors in nuclear ASF-activity. Nucleic Acids Res. 23:3778-3785.
- Lam P.F., U. K. Bakar (1999). Isolation and characterization of a cDNA encoding glutathione transferase from ripe Eksotika 2 papaya. J. Trop. Agric. Food Sci. 27:201-207.
- Li S., A. Lauri, M. Ziemann, A. Busch, Bhave, S. Zachgo (2009). Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell 21:429-441.
- Li S., N. Gutsche, S. Zachgo (2011), The ROXY1 C-Terminal L**LL Motif Is Essential for the Interaction with TGA Transcription Factors. Plant Physiology 157: 2056-2068.
- Libault M., J. Wan, T. Czechowski, M. Udvardi, G. Stacey (2007). Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. MPMI 20(8):900–911.
- Maier A. T., S.S. Sun, S. L. Offenburger, J. U. Lohmann (2011). The bZIP transcription factor PERIANTHIA: a multifunctional hub for meristem control. Frontiers in Plant Science 2:1-17.
- Matsuoka M, Y. Ohashi (1984). Biochemical and serological studies of pathogenesisrelated proteins of *Nicotiana* Species. J. gen. Virol. 65:2209-2215.
- McDowell J.M, J. L. Dangl (2000). Signal transduction in the plant immune response. Trends Biochem. Sci. 25:79-82.
- Miao X., E. Liu Lam (2004). TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 25:1-11.
- Murmu J., M. J. Bush, C. DeLong, S. Li, M. Xu, M. Khan, C. Malcolmson, P. R. Fobert, S. Zachgo, S. R. Hepworth (2010). *Arabidopsis* basic leucine-zipper transcription

factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. Plant Physiology 154:1492-1504.

- Ndamukong I., A. Al Abdallat, C. Thurow, B. Fode, M. Zander, R. Weigel, C. Gatz (2007). SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. The Plant Journal 50:128-139.
- Peraza-Echeverria S., J. M. Santamaría, G. Fuentes, M. A. Menéndez-Cerón, M. A. Vallejo-Reyna, V. A. Herrera-Valencia (2012). The NPR1 family of transcription cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. Genes and Genomics 34 in press.
- Pontier D., I. Privat, Y. Trifa, J. Zhou, D.F. Klessig, E. Lam (2002). Differential regulation of TGA transcription factors by post-transcriptional control. The Plant Journal 32:641-653.
- Porter B. W., Y. J. Zhu, D. A. Christopher (2009). Carica papaya genes regulated by Phytophthora palmivora: A model system for genomic studies of compatible Phytophthora-plant iInteractions. Tropical Plant Biol. 2:84-97.
- Porter B. W., K.S. Aizawa, Y.J. Zhu, D.A. Christopher (2008). Differentially expressed and new non-protein-coding genes from a *Carica papaya* root transcriptome survey. Plant Science 174:38-50.
- Prusky D., R. A. Plumbley (1992). Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. *In:* Colletotrichum: Biology, Pathology and Control. Bailey A. J., M. J. Jeger. (eds). CABI publishing.
- Rauscher M., A. L. Adam, S. Wirtz, R. Guggenheim, K. Mendgen, H. B. Deising (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. The Plant Journal 19(6):625-633.
- Reddy A.,V. Subba (2001). Calcium as a messenger in stress signal transduction. *In*: Handbook of plant and crop physiology. Pessarakli M. (ed). Marcel Dekker, Inc. Second Edition, p. 697.
- Running M. P., E. M. Meyerowitz (1996). Mutations in the PERIANTHIA gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern. Development 122:1261-1269.
- Santamaría F., E. Sauri, F. Espadas y Gil, R. Díaz, A. Larqué, J. M. Santamaría (2009). Postharvest ripening and maturity indices for Maradol papaya. Interciencia. 34(8):583-588.

Schulze E., E. Beck, K. Müller-Hohenstein (2002). Plant Ecology. Springer. pp. 250,251.

- Shearer H., L. Wang, C. DeLong, C. Despres, P. R. Fober (2009). NPR1 enhances the DNA binding activity of the *Arabidopsis* bZIP transcription factor TGA7. Botany 87:561–570.
- Spoel S. H., A. Koornneef, S. M. C. Claessens, J. P. Korzelius, J. A. Van Pelt, M. J. Mueller, A. J. Buchala, J. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L. C. Van Loon, X. Dong, C. M. J. Pieterse (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. American Society of Plant Biologists. The Plant Cell 15:760-770.
- Uknes S, S. Dincher, L. Friedrich, D. Negrotto, W. Shericca, H. Thompson-Taylor, S. Potter, E. Ward, J. Ryals (1993). Regulation of pathogenesis-related gene expression in tobacco. The Plant Cell 5:159-169.
- Uquillas C., I. Letelier, F. Blanco, X. Jordana, L. Holuigue (2004). NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. MPMI 17(1):34-42.
- Ward E. R., S. J. Uknes, S. C. Williams, S. S. Dincher, D. L. Wiederhold, D. C. Alexander,
 P. Ahl-Goy, J. Métraux, J. A. Ryals (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. The Plant Cell 3:1085-1094.
- Xiang C., Z. Miao, E. Lam (1997). DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology. 403-415.
- Zhu Y. J., X. Qiu, P. H. Moore, W. Borth, J. Hud, S. Ferreira, H. H. Albert (2003). Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. Physiological and Molecular Plant Pathology 63:237-248.
- Zimmermann P., M. Hirsch-Hoffmann, L. Hennig, W. Gruissem (2004). GENEVESTIGATOR *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. Plant Physiology 136:2621-2632.
CAPÍTULO IV

TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE Carica papaya var. Maradol CON EL SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE POR ETANOL ALC

4.1 INTRODUCCIÓN

La sobre expresión de un gen se define como el uso de un promotor fuerte con la finalidad de inducir la transcripción constitutiva de la secuencia codificante del gen, el efecto final es conseguir niveles altos y estables de proteína (Lloyd 2003). Aplicaciones importantes de la sobre expresión incluyen la producción aumentada de metabolitos secundarios y la generación de fenotipos tolerantes al estrés abiótico y biótico.

El gen de la chalcona isomerasa CHI de petunia sobre expresado en tomates transgénicos promovió la acumulación de flavonol (antioxidante) hasta setenta veces más que en las plantas silvestres (Muir *et al.* 2001).

En plantas de tabaco transgénico Mukhopadhyay *et al.* (2004) sobre expresaron el gen OSISAP1 (*O. sativa* subspecies *indica* stress-associated protein) regulado por el promotor 35S y se incrementó la tolerancia de las transformantes al frío, deshidratación y salinidad disminuyendo las lesiones cloróticas y de muerte celular asociadas con estos tipos de estrés. Al sobre expresar un antiporte vacuolar de Na⁻/H⁺, Apse *et al.* (1999) consiguieron evitar la clorosis, la reducción del tamaño de hoja y la inhibición en el crecimiento de plantas transgénicas de *A. thaliana* expuestas a concentraciones de hasta 200 mM de NaCl. Cao *et al.* (1998) obtuvieron plantas transformadas de *A. thaliana* resistentes a *Pseudomonas syringae* ES4326 y *Peronospora parasitica* Noco sobre expresando una única copia del gen NPR1 regulada por el promotor 35S.

El mantenimiento de genes de resistencia conlleva un "costo" en el bienestar de la planta. Tian *et al.* (2003) demostraron que en plantas transgénicas de *A. thaliana* la expresión del gen RPM1 (que codifica para una proteína periférica de la membrana plasmática capaz de reconocer a *Pseudomonas syringae*) reducía el número de silicuas por planta, el número de semillas por silicua y la biomasa seca en relación con plantas susceptibles a *P*. *syringae* DC3000:AvrRpm1. Para evitar efectos pleiotrópicos Gatz (1997) destaca el uso de sistemas inducibles para la expresión de transgenes.

Existen muchos promotores caracterizados que se utilizan en la transformación de plantas, la elección de un promotor en particular depende del objetivo del proyecto de transformación (Potenza *et al.* 2004).

Roslan *et al.* (2001) usando un cassette alcR:alcAGUS determinaron que la concentración óptima de etanol al 2% suministrado por riego en plantas transgénicas de Arabidopsis, promovió una mayor actividad de GUS luego de 16 horas de la inducción.

Sweetman *et al.* (2002) generaron plantas transgénicas de papa y registraron actividad de GUS 24 horas después de la inducción con etanol 0.7 M, respuestas similares a bajas concentraciones de etanol se obtuvieron en tabaco y colza. El tratamiento con vapores de etanol fue más efectivo que la atomización y el riego. El sistema se consideró efectivo para la activación de genes particularmente en la postcosecha.

Deveraux *et al.* (2003) obtuvieron plantas transgénicas de Arabidopsis que contenían cassettes compuestos por un promotor tejido-específico, el sistema alcR-palcA y el gen marcador GFP. Las plantas inducidas con vapor de etanol durante un día generaron fluorescencia durante tres días, al cuarto día la fluorescencia empezó a decrecer y al séptimo día era indetectable.

Hasta el momento no se han reportado trabajos referidos al uso de promotores inducibles para sobre expresar o reprimir genes en papaya, este es el primer trabajo en el cual se ha planteado la sobre expresión de un gen relacionado con la defensa y regulado con un promotor inducible por etanol en este caso como herramienta biotecnológica para el mejoramiento genético de papaya Maradol.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pRB35SAIcR Y pRB35SAIcRGUS

Los plásmidos identificados como pRB35SAlcR (Figura 4.1) y pRB35SAlcRGUS fueron gentilmente donados por el Dr. Frederik Börnke (previamente aprobado por SYNGENTA)

del Departamento de Bioquímica en la Friedrich-Alexander Universität de Erlangen, Nürnberg en Alemania.



Figura 4.1 Mapa de restricción de pRB-35SAIcR (basado en Börnke F.). Se observa el tamaño del plásmido, el promotor constitutivo CaMV35S, la región de ADNc codificante para AIcR, y terminador OCS (octopino sintasa). Sitios de restricción de enzimas, genes de resistencia para selección bacteriana, Sp (espectinomicina) y Sm (estreptomicina). Gen de resistencia para selección de plantas transformadas Kan (kanamicina), BI borde izquierdo, BD borde derecho.

Una vez recibidos los plásmidos pRB35sAlcRGUS y pRB35SAlcR secos en un papel filtro estéril se resuspendieron en 200 µL de agua ultra pura estéril. Posteriormente se realizó la transformación de la cepa *E. coli* DH10B, para ello se mezclaron en tubos diferentes 20 µL de los plásmidos pRB35sAlcRGUS y pRB35SAlcR con 100 µL de células competentes de *E. coli* DH10B. Se dejó incubar 20 min en hielo, posteriormente se dio un choque térmico de 55 s a 42°C en un termoblock y se pasaron a hielo nuevamente durante 3 min. Se añadieron 900 µL de medio SOC y se incubó durante una hora y media a 37°C en agitación a 220 rpm.

Se centrifugaron las células competentes de *E. coli* DH10B transformadas con los plásmidos pRB35sAlcRGUS y pRB35SalcR durante 3 min a 6000 rpm, se retiró el sobrenadante y se plaquearon las células competentes transformadas en cajas Petri sobre medio Luria-Bertani (LB) sólido suplementado con el antibiótico correspondiente, espectinomicina en ambos casos a una concentración de 150 mg mL⁻¹.

Se picaron las colonias que crecieron en el medio sólido y se suspendieron dentro de tubos cónicos en 5 mL de medio de crecimiento LB líquido con el mismo antibiótico e igual concentración.

Para la purificación de los plásmidos se utilizó el procedimiento descrito en el manual de High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Se homogenizaron por agitación ligera de los tubos cónicos las suspensiones de colonias bacterianas de E. coli DH10B transformadas con los plásmidos pRB35sAlcRGUS y pRB35SAlcR. Se tomó 1 mL de cada suspensión por separado y se centrifugaron los tubos a 14000 rpm durante 1.5 min. Se desechó el sobrenadante de cada tubo y se agregaron 250 uL de amortiguador de suspensión ARNasa y resuspendieron las pastillas con la punta de la micropipeta. Se añadieron 250 µL de amortiguador de lisis, se mezcló por inversión y se dejó reposar por no más de cinco minutos. Se añadieron 350 µL de amortiguador de unión, mezclaron los tubos por inversión y dejaron reposar durante 5 min en hielo. Se centrifugaron los tubos a 14000 rpm durante 10 min. Se tomaron 800 µL del sobrenadante de cada tubo y se transfirió a los tubos con filtro. Se centrifugaron a 14000 rpm durante un minuto. Se añadieron 500 µL de amortiguador de lavado I y se volvió a centrifugar los tubos a la misma velocidad y tiempo. Se añadieron 700 μL de amortiguador de lavado II y se centrifugó a 14000 rpm durante tres minutos. Luego se añadieron 50 µL de amortiguador de elución y centrifugó a máxima velocidad durante minuto y medio para colectar el plásmido purificado. Finalmente se verificó la introducción de los plásmidos pRB35sAlcRGUS y pRB35SAlcR en E. coli DH10B por digestión del ADN extraído de sus respectivas suspensiones mediante una doble digestión con HindIII y EcoRI.

4.2.2 TRANSFORMACIÓN DE A. tumefaciens LBA4404 CON LOS PLÁSMIDOS pRB35SAIcR Y pRB35SAIcRGUS

Se utilizaron cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 que poseen el plásmido pLBA4404. Se mezclaron en tubos diferentes 5 μ L de los plásmidos pRB35SAlcRGUS y pRB35SAlcR con 100 μ L de la cepa bacteriana *A. tumefaciens* LBA4404, la cual se transformó por choque térmico y se plaqueó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Se inocularon las colonias y se dejaron crecer las bacterias en 5 mL de medio YM líquido durante 24 horas en oscuridad y agitación (220 rpm).

Se centrifugó 3 min a 6000 rpm, se retiró el sobrenadante y se plaqueó e incubaron en cajas de vidrio sobre medio Luria-Bertani suplementado con el antibiótico correspondiente, espectinomicina en ambos casos a concentración de 150 mg mL⁻¹. Con la finalidad de verificar la transformación de *A. tumefaciens*, se purificaron los plásmidos de las cepas bacterianas mediante High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Finalmente se realizó una PCR utilizando 5 μ L de cada plásmido purificado como templado y una mezcla de reacción por cada tubo compuesta de 1.0 μ L de primer F y 1.0 μ L de primer R específicos para GUS. 5 μ L de amortiguador 10xPCR. 1.5 μ L MgCl₂ (50mM). 1.0 μ L dNTPs (10 mM). 0.2 μ L TaqPol (50 mM) y agua ultrapura suficiente para ajustar el volumen a 50 μ L. El programa de PCR consistió de una etapa de desnaturalización a 95 °C (3min), seguido de 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C (30 s), extensión 72 °C (2 min) y una etapa de extensión final a 72 °C (5 min).

4.2.2.1 CULTIVO DE CEPAS DE A. tumefaciens transformadas

Se colocaron 5 mL de medio líquido LB con los antibióticos de selección apropiados dentro de un tubo cónico de 50 mL. Se inoculó el tubo mediante 1.5 μ L una colonia única de *A. tumefaciens* con el plásmido de interés. La suspensión de *A. tumefaciens* inoculada se dejó incubar en a 28 °C durante 24 horas con agitación entre a 150 rpm hasta que el cultivo estuviese turbio. Pasado este tiempo se tomó 1 mL del cultivo, se añadió a 50 mL de medio líquido LB y se dejó nuevamente incubar durante 24 horas bajo las mismas condiciones descritas. Finalmente se determinó espectrofotométricamente la densidad óptica a 600 nm. Una vez que la densidad óptica alcanzó un valor de aproximadamente uno, se centrifugaron los 50 mL a 5000 rpm durante 20 min. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de bacterias en medio MS al 50 %, sacarosa 70 g L⁻¹, glutamina 0.4 g L⁻¹, 2,4-D 10 mg mL⁻¹ suplementado con acetosiringona 100 μ L mL⁻¹. Se dejó incubar la suspensión de *A. tumefaciens* transformada durante 1.5 horas a 25 °C en agitación a 110 rpm y finalmente se midió la densidad óptica de la suspensión. Si el valor era aproximadamente de uno, se utilizó para agroinfectar el tejido vegetal.

4.2.3 TRANSFORMACIÓN DE TEJIDOS PROVENIENTES DE C. papaya var Maradol

Para la transformación de *C. papaya* var. Maradol se utilizó el siguiente procedimiento. El tejido se sumergió dentro del medio que contenía las cepas bacterianas y acetosiringona, se infiltró al vacío (25 mmHg durante 2 minutos) y se incubó durante 30 minutos con agitación (110 rpm) en oscuridad a temperatura ambiente. Posterior a la infección los explantes se transfirieron al medio sólido de inducción (suplementado con acetosiringona) luego de retirar el exceso de *Agrobacterium* mediante toallas absorbentes y se cultivó en oscuridad entre 24 a 26 °C durante 72 horas.

Se transferió el tejido vegetal en medio fresco de inducción sólido suplementado con 300 mg mL⁻¹ de cefotaxima. Cuando el crecimiento de *Agrobacterium* fue excesivo, se lavaron los callos dentro del medio de inducción que contenía 300 mg mL⁻¹ de cefotaxime y se secaron con toallas absorbentes de papel antes de la transferencia al medio sólido.

Con la finalidad de estandarizar el protocolo de transformación, se utilizaron diferentes tejidos de papaya Maradol.

- Callos no embriogénicos y embriogénicos
- Células en suspensión
- Explantes, hojas y tallos de plántulas
- Embriones cigóticos

4.2.3.1 TRANSFORMACIÓN DE CALLOS DE C. papaya var Maradol

Los callos embriogénicos y no embriogénicos de papaya Maradol fueron originalmente obtenidos por la M.C. Anabel Solís en el laboratorio de fisiología vegetal molecular del CICY. Los callos se mantuvieron en medio sólido compuesto por sales MS al 50 %, sacarosa 70 g L⁻¹, glutamina 0.4 g L⁻¹, 2,4-D 10 mg mL⁻¹ y agar 8 g L⁻¹ hasta su transformación.

4.2.3.2 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE C. papaya var Maradol

Se utilizó medio líquido MS al 50% con 10 mg mL⁻¹ de 2,4-D para inducir la embriogénesis somática. Se utilizó callo embriogénico de papaya Maradol que se transformó con células de *A. tumefaciens* que contenían los plásmidos pCAMBIA1305.1 como control positivo, pRB35SAlcR ó pLBA4404 como controles negativos y pRB35SAlcRGUS.

El cultivo de bacterias se realizó de acuerdo con el protocolo establecido hasta el momento, sin embargo se usó una densidad óptica de 0.8. El co-cultivo fue de 48 horas en agitación. Se realizó la prueba de tinción por GUS. En un ensayo subsecuente se procedió con la remoción de *A. tumefaciens* mediante cefotaxime a concentración de 250 mg mL⁻¹ durante cuatro semanas, se refrescó el medio dos semanas posteriores al co-cultivo. Los callos se filtraron y se colocaron en medio MS al 100% y 8g L⁻¹ de agar.

4.2.3.3 TRANSFORMACIÓN DE EXPLANTES DE C. papaya var Maradol

Semillas de papaya Maradol se germinaron en invernadero, en Agrolita-Peat Moss 1:1 y posteriormente se utilizaron plántulas de 21 días de edad. Las plántulas se lavaron vigorosamente con agua y detergente, luego se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos. Se tomaron como explantes los tallos, peciolos e hipocotilos de las plantas.

Para el caso de plántulas y callos de papaya Maradol se utilizaron tres cepas bacterianas de *A. tumefaciens* transformadas respectivamente con los plásmidos pRB35SAlcR como control negativo, pCAMBIA 1305.1 que posee el cassette de expresión gen *uidA* (GUSPlus) como control positivo y pRB35SAlcRGUS.

4.2.3.4 TRANSFORMACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE C. papaya var Maradol

Los embriones cigóticos se aislaron de frutos inmaduros de papaya Maradol (Figura 4.2). Los frutos se lavaron con abundante agua y detergente, se desinfectaron por inmersión en etanol al 70% (3 min) seguido de inmersión en hipoclorito de sodio al 10% (10 min). Se extrajeron las semillas del fruto dentro de una campana de flujo laminar, se desinfectaron mediante el mismo procedimiento. PARACICIN DE CELULAS EN SUBPENSION DE C MOION



Figura 4.2 Procedimiento para extracción de embriones cigóticos a) desinfección de frutos inmaduros de papaya Maradol en solución de hipoclorito de sodio al 10% b) corte transversal de fruto inmaduro de papaya Maradol y semillas c) embrión cigótico de papaya Maradol aislado a partir de semillas d) embriones cigóticos en agua destilada estéril previo a la agro infección.

Posteriormente se dejaron secar sobre papel absorbente y se aislaron los embriones. Finalmente se pasaron a su respectivo medio de cultivo bacteriano. Se transformaron con *A. tumefaciens* que contenían los plásmidos pRB35SAlcRGUS, pCAMBIA1305.1 y pLBA4404.

4.2.4 LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE GUS

La inducción con etanol se realizó por inmersión del tejido dentro de tubos para microcentrífuga, las concentraciones de etanol utilizadas fueron de 0.1% y el tiempo de incubación fue de aproximadamente 24 horas.

El amortiguador que contenía el sustrato X-GlcA para GUS se preparó de acuerdo con el boletín técnico del β-Glucuronidase Reporter Gene Staining Kit de Sigma-Aldrich[®] reemplazando el metanol por Tritón X-100 a una concentración de 0.1 % (v/v). La reacción se efectuó de acuerdo con Zhu *et al.* (2006). Se transfirió el tejido a tubos para microcentrífuga, se llenaron los tubos con la solución amortiguadora. Se removió el aire mediante vacío (25 mm Hg durante 2 minutos) y se taparon los tubos para microcentrífuga. Se incubaron los tubos a 37 °C por 24 h. Se removió la solución amortiguadora y reemplazó con EtOH al 70 %. Se reemplazó la solución de etanol para remover la clorofila y que la coloración azul sea claramente visible.

4.2.5 PROTOCOLO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS DE C. papaya var Maradol

El protocolo consta de cuatro etapas, se utilizaron tres tipos de medio de cultivo de acuerdo con el protocolo establecido por Cai *et al.* (1991) para generación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos en papaya.

Etapa I, medio de inducción

- Sales MS al 50%
- 2,4-D 10 mg mL⁻¹
- Agar 8 g L⁻¹
- Mioinositol 50 mg mL⁻¹
- Ácido nicotínico, clorhidrato de piridoxina y clorhidrato de tiamina cada uno a concentración de 0.5 mg mL⁻¹
- Glicina 2 mg mL-1
- glutamina 400 mg mL⁻¹
- Sacarosa 60 g L⁻¹.

Etapa II, medio de maduración

Idéntico al anterior pero no contiene 2.4-D.

Etapa III, medio de germinación

- Sales MS al 100%
- Agar 8 g L⁻¹ de agar
- Mioinositol 100 mg mL⁻¹¹
- Clorhidrato de tiamina 0.4 mg mL⁻¹
- Sacarosa 30 g L⁻¹.

Etapa IV, aclimatación

El sustrato utilizado fue una mezcla de Agrolita-Peat Moss 1:1 estéril y húmedo.

Se partió de semillas de papaya Maradol a las que se les extrajo el embrión y se colocaron en medio de inducción durante cuatro a seis semanas, posteriormente se transfirieron al medio de maduración en el cual se dejan los embriones hasta que elonguen y adquieran coloración verde, finalmente se pasan al medio de germinación en el que empiezan a desarrollar raíces previo a su traspaso a sustrato.

Las plantas obtenidas *in vitro* se pasaron en condiciones asépticas a vasos de poliuretano con sustrato suficiente y se recubrieron con bolsas de celofán, se ajustó la bolsa con una liga de goma y se sellaron con celofán.

Se dejaron para su aclimatación a temperatura constante de 25 °C bajo régimen de luz natural.

Una semana después de haber sido transferidas las plantas, se cortó uno de los extremos de cada bolsa, se hicieron cuatro perforaciones pequeñas a cada vaso y se colocaron sobre un vaso de polipropileno transparente para colectar el exceso de agua. Se empezaron a regar las plantas con aproximadamente 30 mL de agua destilada estéril conforme se requería. A la semana siguiente se cortó el otro extremo de la bolsa y finalmente a la tercera semana se cortó la parte superior de la bolsa de forma longitudinal. Se mantuvieron las plantas bajo esas condiciones alrededor de sesenta días antes de traspasarse las plantas a bolsas de polietileno negras y llevarse a invernadero. El sustrato utilizado para rellenar las bolsas fue el mismo pero no fue esterilizado previamente. Algunas de las plantas se mantuvieron a 25 °C durante más de sesenta días, hasta que la temperatura estacional no superara los 40 °C.

En invernadero, las plantas se regaron a diario con agua destilada y cada semana se regaron con solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). Las plantas se pasaron a bolsas más grandes con aproximadamente dos kilogramos de sustrato, de acuerdo con lo que se requirió para cada planta en particular.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 GENERACIÓN DE CEPAS DE *A. tumefaciens* TRANSFORMADAS CON LOS PLÁSMIDOS pRB35SAICR Y pRB35SAICRGUS

De la doble digestión del ADN de los plásmidos aislados de las cepas de *E. coli* DH10B transformadas con las enzimas HindIII y EcoRI, se obtuvo una banda de aproximadamente 2800 pb (Figura 4.3) que concuerda con la esperada de 2712 pb según

el mapa de restricción del plásmido identificado como pRB35SAlcR. Para el plásmido pRB35SAlcRGUS también se obtuvo una banda en la misma ubicación y otra banda a aproximadamente 2000 pb presumiblemente debido a que el gen *uidA* poseía sitios de restricción adicionales para HindIII y EcoRI.



Figura 4.3 Fragmentos esperados para los productos de la doble digestión con HindIII y EcoRI de los plásmidos pRB35SAlcRGUS y pB35SAlcR

4.3.2 VERIFICACIÓN DE LA INSERCIÓN DEL CASSETTE DE EXPRESIÓN EN A. tumefaciens

En el gel de los productos de PCR para el cassette de expresión 35S::AlcR::GUS y el control positivo *uidA* (GUSPlus) se observaron bandas únicas a 1200 pb correspondientes al tamaño del amplicón comprendido entre los oligonucleótidos sentido y antisentido para el gen *uidA* (GUSPlus) con lo que se confirmó la presencia del gen *uidA* en la cepa de *Agrobacterium*. El control negativo no presentó ninguna banda (Figura 4.4).

Copitulo P

Capítulo IV

 PM
 pRE35S
 pRE35S
 pCAMBIA

 10000
 8000
 6000
 6000

 5000
 5000
 4000
 4000

 3000
 3000
 4000
 4000

 1000
 3000
 4000
 4000

 1000
 3000
 4000
 4000

 1000
 3000
 4000
 4000

 1000
 3000
 4000
 4000

 1000
 3000
 4000
 4000

 1000
 3000
 4000
 4000

Figura 4.4 Gel de los productos de PCR para el cassette de expresión 35S::AlcR::GUS y el control positivo el gen *uidA* (GUSPlus) que presentaron una banda única de 1200 pb

4.3.3 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN CALLOS DE *C. papaya* var Maradol CON EL PLÁSMIDO pRB35SAIcRGUS

A partir de callos transformados con el plásmido pRB35SAlcRGUS se verificó la acumulación de 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo posterior a la inducción con etanol a diferentes concentraciones. En callos no inducidos con etanol, no se observó la coloración azul típica de la reacción de hidrólisis de X-GlcA catalizada por GUS (Figura 4.5).



Figura 4.5 Callos no embriogénicos de papaya Maradol transformados transitoriamente con el plásmido pRB35SAlcRGUS. Callo no inducido (concentración de etanol 0.0 % v/v) y callos inducidos con diferentes concentraciones de etanol.

4.3.4 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN CALLOS DE C. papaya var Maradol CON LOS PLÁSMIDOS pRB35SAIcR Y pRB35SAIcRGUS

La prueba histoquímica de GUS fue positiva para los explantes que fueron transformados con los plásmidos pRB35SAlcRGUS y pCAMBIA1305.1 (control positivo) en callos tratados con o sin infiltración (Figura 4.6).



Controles negativos Controles positivos

Figura 4.6 Expresión transitoria de *uidA* (GUSPlus) callos no embriogénicos de papaya Maradol. **Controles negativos** callos de papaya Maradol no transformados, **controles positivos** hojas de *N. tabaccum* transformadas de forma estable con el gen reportero *uidA* (GUSPlus) I con infiltración al vacío, **N** sin infiltración al vacío.

4.3.5 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE C. papaya var Maradol

Se consiguió la expresión transitoria de cultivo de células en suspensión, la verificación se efectuó mediante la prueba histoquímica de GUS (Figura 4.7)

Capitalia (V

Capítulo IV



Figura 4.7 Transformación transitoria de callos embriogénicos de papaya Maradol y ensayo histoquímico de GUS a) callos embriogénicos de papaya Maradol en suspensión en medio líquido MS al 50% con 10 mg mL⁻¹ de 2,4-D b) callos embriogénicos transformados con el plásmido pRB35SAlcRGUS en medio MS al 100% c) vista al estereomicroscopio de callos transformados con el plásmido pRB35SAlcRGUS inducidos con etanol d) e) y f) controles positivos, callos transformados con el plásmido pCAMBIA 1305.1 f) vista al estereomicrosco control positivo inducido con etanol, g) y h) controles negativos, callos transformados con el plásmido pRB35SAlcR i) y j) controles negativos, callos sin transformar E inducido con etanol, S no inducidos con etanol.

De los callos embriogénicos en suspensión posterior a la agro infección, se obtuvo una caja con alrededor de 1 g de callo que respondió favorablemente (*Agrobacterium* que poseía el plásmido pRBAlcRGUS) y se obtuvieron embriones somáticos de acuerdo con lo que se aprecia en la Figura 4.8. Debido a la proliferación de *Agrobacterium* los demás callos no sobrevivieron. Posteriormente durante la segunda re-siembra en medio fresco, se observaron escasos brotes que presentaron clorosis, finalmente el callo no sobrevivió.



Figura 4.8 Transformación transitoria de callos embriogénicos de papaya Maradol a) callos embriogénicos de papaya Maradol en suspensión transformados con los plásmidos pRB35SAlcRGUS, pLBA4404 y pCAMBIA1305.1 b) callos embriogénicos filtrados, previamente transformados con el plásmido pCAMBIA1305.1 c) callos transformados con el plásmido pRB35SAlcRGUS en medio sólido MS al 100% con 250 mg mL⁻¹ cefotaxime d) callos transformados con el plásmido pCAMBIA1305.1 en medio sólido MS al 100% con 250 mg mL⁻¹ cefotaxime d) callos transformados con el plásmido pCAMBIA1305.1 en medio sólido MS al 100% con 250 mg mL⁻¹ cefotaxime e) embriones somáticos (flecha roja) en estado de corazón observados sobre callos transformados con el plásmido pRB35SAlcRGUS en medio sólido MS al 100% con 250 mg mL⁻¹ cefotaxime e) embriones somáticos (flecha roja) en estado de corazón observados sobre callos transformados con el plásmido pRB35SAlcRGUS en medio sólido MS al 100% con 250 mg mL⁻¹ cefotaxime.

Debido a que en apenas una ocasión se logró obtener callo embriogénico (presumiblemente transformado) y subcultivarlo por una sola vez antes de que el tejido se perdiera totalmente, se decidió probar un protocolo alterno de embriogénesis somática en papaya Maradol.

4.3.6 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA EN EXPLANTES DE C. papaya var Maradol CON LOS PLÁSMIDOS pRB35SAIcR Y pRB35SAIcRGUS

Se consiguió la transformación transitoria en hojas y tallos de *C. papaya* var Maradol por agro infección, por infiltración (al vacío) y sin infiltración (Figura 4.9).

Para los tejidos transformados con el plásmido pRB35SAlcR no se observó coloración en hoja con o sin infiltración al vacío (Figura 4.9).



Controles negativos Controles positivos

Figura 4.9 Expresión transitoria de *uidA* (GUSPlus) en hojas (con peciolo) de plántulas de papaya Maradol de aproximadamente 21 días de edad provenientes de invernadero **Controles negativos** hojas y tallos de plantas de papaya Maradol no transformadas, **controles positivos** hojas de *N. tabaccum* transformadas de forma estable con el gen reportero *uidA* (GUSPlus) I con infiltración al vacío, N sin infiltración al vacío.

Dos explantes de tallos generaron callo 24 días después de la transformación, posteriormente se observaron hojas pequeñas sobre la superficie del callo (Figura 4.10)

THE PERISPONNATION TRANSITORIA EN EXPLANTES DE C. MUNIT VA

En curalguto la transformación transitiona en riojas y taltos de C. papaya var Maradol por agro mitesción, por mitración (al vacio) y ain mitración (Figure 4.9).



Figura 4.10 Transformación transitoria de tallos de papaya Maradol **a)** hojas y peciolos (izq. de la caja Petri) callos no embriogénicos (derecha de la caja Petri) **b)** brotes en medio sólido (fresco) MS al 100% con cefotaxime 300 mg mL⁻¹ generados a partir de tallos posterior a la agro infección.

La presencia de *A. tumefaciens* evitó que los brotes pudieran desarrollarse adecuadamente, los brotes presentaron clorosis y no respondieron a un subcultivo con medio fresco.

4.3.7 TRANSFORMACION TRANSITIORIA DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE C. papaya var Maradol

Se verificó la transformación de embriones cigóticos transformados mediante cepas de *A. tumefaciens* que poseen los plásmidos pRB35SAIcRGUS, pLBA4404 y pCAMBIA1305.1.

El ensayo histoquímico de GUS resultó positivo para pRB35SAlcRGUS y pCAMBIA 1305.1, y negativa para pLBA4404 (Figura 4.11) lo que indica que se pudo transformar embriones cigóticos de papaya Maradol con los plásmidos referidos.



Figura 4.11 Ensayo histoquímico de GUS en embriones cigóticos de papaya Maradol transformados con bacterias que poseen los plasmidos pRB35SAlcRGUS, pLBA4404 y pCAMBIA1305.1

4.3.8 PROTOCOLO ALTERNATIVO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS DE C. papaya var Maradol

Con la finalidad de obtener callo embriogénico de mejores características a los utilizados inicialmente y probar un protocolo efectivo para la regeneración de plantas, se siguió el protocolo de embriogénesis somática para transformación y regeneración de transformantes, originalmente descrito para papaya Sunrise por Cai *et al.* (1991).

Se obtuvo respuesta positiva en la generación de callo embriogénico a partir de embriones cigóticos aislados de semillas de papaya Maradol (Figura 4.12), de forma sorprendente en los primeros callos pudieron observarse embriones cigóticos a partir del quinto día de haber sido traspasados al medio de inducción.



Figura 4.12 Embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos de *C. papaya* Var Maradol. La primera fila se refiere a tejido vegetal en medio de inducción. La segunda en medio de maduración y la tercera en medio de germinación. a) Embrión cigótico original, b y c) al quinto día dentro del medio de inducción d) a los 15 días e) a los 30 días, formaciones embrionarias visibles, f) callo embriogénico en medio de maduración a los 71 días posteriores a la siembra inicial g) a los 86 días h) estructuras verdes y elongadas a los 142 días, i) explantes con raíz, hojas y tallo visibles en medio de germinación a los 145 días j) a los 157 días k) a los 164 días.

De los 70 embriones cigóticos sembrados en el medio de inducción, 34 (50.82%) formaron callo y desarrollaron embriones somáticos 15 días después de haber sido sembrados. En la siguiente etapa, 57 (81.42%) callos se transfirieron al medio de maduración a los 71 días de haberlos mantenido dentro del medio de inducción.

Se observó la formación de embriones somáticos en la superficie del callo generado alrededor del embrión cigótico dentro del medio de inducción con 2,4-D (Figura 4.12), callo fue ganando peso, los embriones somáticos se podían observar a simple vista en el medio de inducción. Una vez que se pasaron los callos al medio de maduración, los embriones empezaron a reverdecer y crecer, finalmente al ser pasados a medio de germinación, los embriones empezaron a generar raíces, elongar sus tallos y se observó la aparición de hojas, finalmente se obtuvieron plántulas pequeñas de aproximadamente 1.5 cm de longitud que fueron re-sembradas en medio de germinación.



Figura 4.13 Plántulas *in vitro* de *C. papaya* var Maradol obtenidas a partir de embriogénesis somática en medio de germinación a) a los 180 días posteriores a la siembra inicial b) a los 253 días en medio de germinación.

Dentro del medio de germinación las plántulas fueron creciendo a partir de las tres semanas posterior al traspaso a este medio, y se re-sembraron cada mes en el mismo medio de germinación dentro de cajas Magenta (Figura 4.13) se observaron plántulas normales, con hojas palmeadas típicas de papaya y raíces abundantes.

4.3.9 ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE C. papaya var Maradol

Una vez que las plantas alcanzaron una altura aproximada de 7 cm, se traspasaron a sustrato estéril (Figura 4.14). En total se traspasaron 21 plantas diferentes en función de su crecimiento dentro de magentas en el medio de germinación



Figura 4.14 Plantas de *C. papaya* var Maradol traspasadas a sustrato estéril durante la etapa de aclimatación a) planta *in vitro* previo al traspaso a sustrato estéril b) planta *in vitro* traspasada en sustrato c) planta lista para aclimatación.

De 21 plantas totales, el 57.14% sobrevivió alrededor de tres meses la etapa de aclimatación, 43% murieron principalmente por contaminación y 8 plantas se sacaron a invernadero (Figura 4.15).



Figura 4.15. Plantas de *C. papaya* var Maradol en invernadero, obtenidas a partir de embriogénesis somática: a) y b) plantas de 308 días de edad, c) planta de 382 días de edad.

De forma general el tiempo total invertido en la obtención de plantas por embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos en papaya Maradol fue de 397 días, los tiempos se resumen en la tabla 4.1.

 Tabla 4.1 Tiempo de respuesta de embriones somáticos de papaya Maradol y período de subcultivo en cada etapa del protocolo alternativo de embriogénesis somática.

Etapa	Respuesta observada (días)	Período de subcultivo (días)
I.	5	71
П	7	71
III	7	119
IV	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	136
	total	397

4.4 DISCUSIÓN

4.4.1 TRANSFORMACIÓN DE A. tumefaciens CON LOS PLÁSMIDOS pRB35SAIcR Y pRB35SAIcRGUS EN LBA4404

Como un primer indicio positivo de la transformación de células de *E. coli* DH10B se consideró el crecimiento de las células en medio LB sólido suplementado con espectinomicina (150 mg mL⁻¹). De acuerdo con el mapa de restricción de pRB-35SAlcR (Figura 4.1) este plásmido posee un gen de resistencia a espectinomicina. El segundo indicio se obtuvo partir de la doble digestión del ADN de plásmido purificado de las células transformadas (Figura 4.3), los fragmentos coinciden con los esperados para este par de plásmidos. Toda vez que se obtuvieron células transformadas de *E. coli* como vector de clonación, el plásmido purificado se transfirió a células de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa pLBA4404 por choque térmico. El procedimiento originalmente descrito por Cohen *et al.* (1972) involucró la transferencia del factor R (resistencia a antibióticos) a células de *E. coli* cepa C600 mediante CaCl₂ y un pulso de 42 °C, este procedimiento ha sido utilizando desde entonces con modificaciones (Li *et al.* 2010; Roychoudhyry *et al.* 2009), o se usan otros protocolos como la electroporación o la sonicación con ultrasonido de baja frecuencia (Hayer 2010). En nuestro experimento, las células bacterianas transformadas

también fueron resistentes a la espectinomicina suplementada en los medios de cultivo, para confirmar la transferencia del plásmido que contiene el gen de resistencia a espectinomicina, se realizó la extracción del ADN bacteriano y se efectuó la PCR descrita en la Figura 4.4. Para el efecto se utilizaron oligonucleótidos del gen *uida*.

4.4.2 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE TEJIDOS DE *C. papaya* var Maradol MEDIANTE *A. tumefaciens*

Se lograron transformar de forma transitoria hojas, peciolos y tallos de plántulas de *C. papaya* var Maradol y callos no embriogénicos bajo las condiciones del laboratorio. En el procedimiento descrito por Cai *et al.* (1991) se transformaron embriones somáticos que podían observarse a simple vista, en el callo embriogénico utilizado en esta tesis no se observaron embriones y la consistencia del callo en comparación con el no embriogénico es sustancialmente diferente.

Se ha utilizado cefotaxime 250 mg mL⁻¹ para remover *A. tumefaciens* (Zhu *et al.* 2006) y en contraste con los resultados obtenidos en ese estudio, no se ha conseguido eliminar la bacteria. Los callos embriogénicos presentaron contaminación aun después de lavados con la solución de antibiótico. De todos los ensayos realizados, muy poco tejido libre de *Agrobacterium* reverdeció, probablemente el antibiótico no sea el adecuado para este tipo de tejido en particular. Yu *et al.* (2001) co-cultivaron segmentos de raíz en suspensión de células de *A. tumefaciens* durante dos días y se determinaron las concentraciones óptimas de antibióticos, 125 mg mL⁻¹ de carbenicilina o 250 mg mL-1 de cefotaxime para la formación de embriones somáticos en explantes transformados de raíz de papaya. Sin embargo se obtuvieron más embriones en el medio suplementado con carbenicilina y de estos un menor número de embriones eran anormales en relación con los obtenidos en medio suplementado con cefotaxime. Adicionalmente los escasos explantes que reverdecieron, necrosaron al poco tiempo y no sobrevivieron en el medio sólido suplementado con cefotaxime.

La inducción con etanol dio respuesta positiva a la exposición a una solución de etanol al 0.1%, resultado que concuerda por lo descrito con Salter *et al.*, (1998) quienes demostraron la sensibilidad del sistema alcor a concentraciones bajas incluyendo la dosis utilizada en el presente ensayo, en plántulas de tabaco cultivadas por hidroponía.

4.4.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE C. papaya var Maradol

Se conocen algunos métodos para desarrollar embriogénesis somática en papaya, a partir de raíces (Chen et al. 1987), óvulos (Litz y Conover, 1982) o segmentos internodales (Yie y Liaw, 1977), sin embargo se escogió el protocolo desarrollado por Cai et al. (1991) debido a que este protocolo fue optimizado para la transformación de papaya. Los embriones de papaya Maradol se observaron entre 5 y 45 días dentro del medio de inducción lo que concuerda con el tiempo referido por Cai et al. (1999) de cuatro a cinco semanas, en las etapas de maduración y germinación subsiguientes, el tiempo de respuesta de los explantes fue similar. A diferencia del protocolo de Cai et al. (1999) los tiempos de mantenimiento en cada etapa fueron mayores, con re-siembras frecuentes. En el presente trabajo, el 50.82% de formación de callos con embriones (dos semanas posteriores a la siembra), supera al 43% de callos con embriones somáticos reportados en la cuarta semana posterior a la siembra según el protocolo de Cai et al. 1991. Las plantas obtenidas a partir de este protocolo, desarrollaron raíces abundantes con tallos y hojas normales, el porcentaje de supervivencia en aclimatación es cercano al 60% similar al obtenido a partir de embriogénesis somática por Farzana et al. (2008). Sin embargo este porcentaje no se compara con la supervivencia de más del 90% reportada por Manshardt y Drew (1998). De forma general se conoce que la papaya presenta baja rizogénesis in vitro y una alta mortalidad durante la aclimatación (Misrha et al. 2007) es por tanto necesario mejorar las condiciones de aclimatación de las plantas obtenidas in vitro.

REFERENCIAS

- Apse M. P., G. S. Aharon, W. A. Snedden, E. Blumwald (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na1/H1 antiport in *Arabidopsis*. Science 285:1256-1258.
- Cai W., C. Gonzalves, P. Tennant, G. Fermin, M. Souza, N. Sarindu, F. Jan, H. Zhu, D. Gonzalves (1991). A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35:614.
- Cao H., X. Li, X. Dong (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. Plant Biology 95: 6531-6536.
- Chen M H., P. J. Wang, E. Maeda (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. Plant Cell Reports 6:348-351.
- Deveraux Y., A. Peaucelle, G. R. Roberts, E. Coen, R. Simon, Y. Mizukami, J. Traas, J. A.
 H. Murray, J. H. Doonan, P. Laufs (2003). The ethanol switch: a tool for tissuespecific gene induction during plant development. The Plant Journal 36:918-930.
- Gatz C. (1997). Chemical control of gene expression. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108.
- Goranson S. J., J. L. Erbe (2003). Restriction analysis of recombinant plasmids *In: E. coli* plasmid vectors, methods and applications. Casali N., A. Preston A. (eds.). Humana Press. p.175-182.
- Hayer K. (2010). The effect of ultrasound exposure on the transformation efficiency of Escherichia coli HB101. Bioscience Horizons 3(2):141-147.
- Hoagland D. R., D. I. Arnon (1950). The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular 347:3-32.
- Li X., X. Sui, Y. Zhang, Y. Sun, Y. Zhao, Y. Zhai, Q. Wang (2010). An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. AJB 9:(50)8549-8554.
- Litz R E., R A. Conover (1982) In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. Plant Science Letters 26:153-158.
- Lloyd A. (2003). Vector construction for gene overexpression as a tool to elucidate gene function. *In*: Plant functional genomics (2003). Grotewold E. Humana Press Inc. Methods in Molecular Biology 236:329-344.

- Mishra M., N. Shukla, R. Chandra (2007). Micropropagation of Papaya (*Carica papaya* L.). *In:* Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Jain S. M., H. Häggman (Eds). Springer, pp. 437–441.
- Muir S. R, G. J. Collins, S. Robinson, S. G. Hughes, A. G. Bovy, C. H. de Vos, A. J. van Tunen, M. E. Verhoeyen (2001). Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing dramatically increased levels of flavonols. Nat Biotech 19:470-474.
- Mukhopadhyay A., S. Vig, A. K. Tyagi (2003). Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. PNAS. 101(16):6309-6314.
- Potenza C., L. Aleman, C. Sengupta-Gopalan (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: Promoters used in plant transformation. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 40:1-22.
- Roychoudhury A., S. Basu, D. N. Sengupta (2009). Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors. IJBB. 46:395-400.
- Salter M. G., J. A. Paine, K. V. Riddell, I. Jepson, A. J. Greenland, M. X. Caddick, A. B. Tomsett (1998). Characterization of the ethanol-inducible *alc*gene expression system for transgenic plants. The Plant Journal 16(1):127-132.
- Sweetman J. P., C. Chu, N. Qu, A. J. Greenland, U. Sonnewald, I. Jepson (2002) Ethanol vapor is an efficient inducer of the *alc* gene expression system in model and crop plant species. Plant Physiology 129:943-948.
- Tian D., M. B. Traw, J. Q. Chen, M. Kreitman, J. Bergelson (2003). Fitness costs of Rgene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. Nature 423:74-77.
- Yie S., S I. Liaw (1977). Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. In Vitro.13:564-567.
- Yu T., S. Yeh, J. Yang (2001). Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Bot. Bull. Acad. Sin. 42:281-286.
- Zhu Y. J., M. M. M. Fitch, P. H. Moore (2006). Papaya (*Carica papaya* L.). *In:* Methods in Molecular Biology. Wang K. Agrobacterium Protocols. Second Edition. Humana Press Inc. USA. Vol. 344 pp.209-217.

CAPÍTULO V

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

En la presente tesis se identificaron *in silico* seis genes homólogos de *TGA* en *C. papaya* var SunUp denominados *CpTGA1*, *CpTGA2*, *CpTGA3*, *CpTGA4*, *CpTGA5* y *CpTGA6* y un homólogo a *bZIP* denominado *CpTGA7* que comparte algunos de los dominios exclusivos de factores transcripcionales tipo TGA. Las secuencias CpTGA de nucleótidos traducidos mostraron altos porcentajes de identidad respecto a las diez secuencias de AtTGA usadas como referencia. La diferencia entre el número de secuencias de genes de papaya y *Arabidopsis* es consistente con el hecho de que papaya divergió del ancestro común que compartían con *Arabidopsis* antes de que el genoma de *Arabidopsis* presentará dos eventos de duplicación total de su genoma (Bowers *et al.* 2003) Ming *et al.* (2008) confirmaron que papaya posee menor número de genes que *Arabidopsis*.

Los bZIP de todos los miembros CpTGA identificados poseen sus dominios de unión a ADN y el zipper de leucina comúnmente encontrados en estas proteínas según Vinson *et al.* (1989). El dominio de unión a ADN se ubicó en el extremo N terminal de forma similar a AtTGA1 de acuerdo con Katagiri *et al.* (1990). Residuos fosforilables de Glu, Ala y Ser de la región básica de bZIP (Kirchler *et al.* 2010) se ubicaron en posiciones equivalentes en CpTGA. El zipper de leucina para los miembros CpTGA consta de 28 aminoácidos, casi todos los aminoácidos encontrados dentro de esta región coinciden con los correspondientes aa en sus homólogos AtTGA. Se conoce por ejemplo que las posiciones *a* de AtTGA contienen residuos cargados (Deppmann *et al.* 2004) que coincide con lo encontrado para las posiciones *a* en los heptámeros *H*1, *H*2 y *H*3 de los CpTGA identificados en esta tesis.

Los dominios de activación transcripcional de AtTGA (Chuang *et al.* 1999, Schindler *et al.* 1992) al igual que la firma característica para miembros bZIP del grupo D descrita por Jakoby *et al.* (2002) se identificaron en las secuencias CpTGA, con excepción de CpTGA7.

Se generó un árbol filogenético en el cuál se observó la agrupación de CpTGA1 y CpTGA3 dentro del subclado I junto con miembros de AtTGA1, AtTGA4 (resistencia basal Kesarwani *et al.* 2007) y AtTGA3, AtTGA7 (activación transcripcional de genes *PR-1*,

Shearer *et al.* 2009). CpTGA2, CpTGA4 y CpTGA7 se agruparon dentro del subclado II, formando una politomía junto con los homólogos AtTGA2, AtTGA5 y AtTGA6 descritos por Kesarwani *et al.* (2007) y Shearer *et al.* (2009) como activadores o represores del gen *PR-*1. Dentro del mismo subclado CpTGA4 se agrupó con AtPAN relacionado con el desarrollo floral en *Arabidopsis* (Chuang *et al.* 1999). Finalmente CpTGA5 y CpTGA6 se agruparon con AtTGA9 y AtTGA10 relacionados con desarrollo floral en *Arabidopsis* (Murmu *et al.* 2010).

Se determinó la expresión basal de los siete miembros de *CpTGA* en diferentes tejidos de papaya.

De forma general, el contenido de ARN por tejidos fue el mayor en hojas y decreció en pétalos, peciolos y frutos. Comparativamente el ARN del mesocarpio de frutos sanos, fue mayor que el obtenido a partir de frutos enfermos infectados con *C. gloeosporioides*. Previamente Dean *et al.* (2002) reportaron la degradación progresiva de ARN proveniente de plantas de *N. benthamiana* infectadas con *C. destructivum*.

Dentro del subclado I, *CpTGA1* y *CpTGA3* mostraron un patrón de expresión similar en peciolos, hojas, pétalos, frutos maduros e inmaduros pétalos. Previamente Pontier *et al.* (2002) detectaron en hojas maduras de *Arabidopsis*, la proteína AtTGA2 pero no detectaron AtTGA1 o AtTGA3. Adicionalmente en *Arabidopsis*, Miao *et al.* (2004) no encontraron expresión de *AtTGA3* en silicuas maduras por hibridación Northern.

En el subclado II *CpTGA2* se expresó fuertemente en todos los tejidos excepto en peciolo en cambio para el otro homólogo de *CpTGA2*, Xiang *et al.* (1997) encontraron expresión de AtTGA6 en peciolos pero muy baja expresión en silicuas inmaduras.

CpTGA7 se expresó en todos los tejidos aunque lo hizo en menor medida en fruto inmaduro.

CpTGA4 presentó expresión basal uniforme en todos los tejidos, en *Arabidopsis* su homólogo AtPAN (relacionado con desarrollo floral) se expresó de acuerdo Running *et al.* (1996) en meristemos.

En el subclado III *CpTGA5* se expresó en pétalos y peciolos, al respecto Porter *et al.* (2008) lo asoció probablemente con desarrollo de raíz mientras que en *Arabidopsis* su homólogo AtTGA9 mostró expresión en silicuas y hojas (Murmu *et al.* 2010). Adicionalmente *CpTGA5* fue identificado previamente por Porter *et al.* (2008) como un bZIP (número de accesión EF12305) y lo asociaron con el desarrollo de raíz.

Finalmente dentro del mismo subclado *CpTGA6* se expresó en todos los tejidos, incluido hojas y frutos inmaduros, mientras que su homólogo en *Arabidopsis*, AtTGA10 no mostró expresión en hojas ni en silicuas Murmu *et al.* 2010).

Es probable que las diferencias entre las especies (papaya y *Arabidopsis*) y las condiciones ambientales, edad, tipo de explante, condiciones de cultivo promovieron las diferencias encontradas entre los patrones de expresión de *CpTGA* y *AtTGA*.

Se verificó la expresión de genes *CpTGA* hasta doce días después de la inducción con SA. De forma general, la expresión de miembros *CpTGA* es constitutiva con ligeros cambios posteriores a la inducción con SA. La detección constitutiva de transcritos de *AtTGA* en diferentes tejidos se asocia con la regulación post transcripcional de estos factores transcripcionales (Portier *et al.* 2000; Lam y Lam, 1995). Los homólogos identificados en papaya probablemente se regulan de la misma forma, a nivel post transcripcional, lo que explicaría los resultados obtenidos.

La expresión de *CpTGA1* no fue alterada por la inducción con SA, tal como se reportó previamente por Zimmermann *et al.* (2004). Al respecto Després *et al.* (2003) reportaron que la aplicación de SA no aumentó la expresión en *Arabidopsis* de su homólogo *AtTGA1* pero promovió la interacción entre AtNPR1 y AtTGA1. Probablemente esta misma regulación ocurra en papaya. La expresión aumentada de *CpTGA3* observada en respuesta a SA es concordante con la expresión de *AtTGA3* en plantas tratadas con SA según lo reportado por Farinati (2010).

CpTGA2 no aumentó su expresión en respuesta a SA, esto contrasta con lo observado en *Arabidopsis*, donde la expresión de *AtTGA2* aumentó en respuesta a la aplicación con INA (Kim y Delaney, 2002). En cambio la expresión aumentada de *CpTGA4* posterior a la aplicación con SA es inesperada debido a que su homólogo *AtPAN* se ha relacionado más a procesos de desarrollo (Maier *et al.* 2011). *CpTGA4* y *AtPAN* posiblemente compartieron un ancestro común con homólogos TGA relacionados con defensa, por tanto desde la divergencia con *Arabidopsis*, ambas funciones (defensa y desarrollo) posiblemente permanecieron conservadas para *CpTGA4*. De igual manera *CpTGA5* no se expresó posterior a la inducción con SA, mientras que *CpTGA6* si se expreso, sus respectivos homólogos se asocian con procesos de desarrollo (Murmu *et al.* 2010).

Debido a que los genes tipo *CpTGA* pertenecen a una familia de factores transcripcionales, es probable que estos FT pueden regular diferentes tipos de genes Todos aquellos genes que posean dentro de su promotor regulatorio secuencias del tipo *as-1*, podrían estar regulados por los TGAs independientemente de su relación con la defensa en plantas. Mueller *et al.* (2008) determinaron que de entre 54 genes inducidos por PPA1 (fitoprostano involucrado en respuestas a detoxificación, estrés, transporte, ciclo celular entre otros) 26% de los genes poseen el elemento *as-1*, entre estos se incluyen genes como el de Citocromo P450 (At3g28740) y GST6 (At2g47730). Y además, el 19% de genes inducidos por SA.

La expresión de CpNPR1 y CpPR-1d aumentaron posterior a la aplicación con SA, lo que concuerda con lo reportado por Zhu *et al.* (2003) para estos genes en papaya. En esta tesis se reportó por primera vez el aumento en la expresión del gen *CpGST1* en respuesta a SA.

Se evaluó también la expresión de genes *CpTGA* al ser retados en frutos de papaya Maradol contra el patógeno *C. gloeosporioides*. Finalizado el experimento de exposición de frutos al patógeno los frutos que no fueron expuestos a *C. gloeosporioides* presentaron ligeros síntomas similares a los que produce el hongo, esto se atribuye a la posible presencia de patógeno de forma endógena en los frutos. De acuerdo con Prusky y Plumbley (1992) el apresiorio de *C. gloeosporioides* permanece latente en frutos inmaduros, adicionalmente el etileno involucrado en la maduración de los frutos de papaya pudo inducir la germinación y formación de apresiorios de *C. gloeosporioides*, efecto que ha sido descrito previamente por Flaishman y Kolattukudy (1994).

En el subclado I los miembros CpTGA1 y CpTGA3 mostraron patrones de expresión equivalentes en los motos S_0 , S_0 , M y Cg, sin embargo la expresión fue aparentemente

menor en frutos Cg, en estos frutos la elevada presencia de acérvulos propios de la fase necrotrófica (Horbach *et al.* 2011) sugiere que los genes CpTGA1 y CpTGA3 no responden adecuadamente a la elevada presencia del patógeno, probablemente *C. gloeosporioides* reduce la expresión de genes de defensa como estrategia para colonizar el tejido infectado. De forma inesperada se observó un patrón de bandeo similar para CpTGA6 cuyo homólogo en *Arabidopsis*, *AtTGA10* de acuerdo con Murmu *et al.* (2010) se asocia con aspectos de desarrollo. Interesantemente CpTGA7 fue el único en el que se observó mayor intensidad de la banda en frutos *Cg* respecto a los frutos **S**₀, **S**₉ y **M**, pero no posee un homólogo definido en *Arabidopsis* con el cuál se pueda comparar. Los otros miembros CpTGA2, CpTGA4 y CpTGA5 aparentemente no se relacionan en la defensa en contra de *C. gloeosporioides*.

De forma general en la presente tesis se consiguió por primera vez la expresión transitoria en callos no embriogénicos de papaya, hojas y tallos provenientes de plántulas de papaya. Adicionalmente se ha conseguido la regeneración de plantas no transformadas mediante embriogénesis somática a partir de semillas de *C. papaya* var Maradol.

Se efectuó una PCR con oligonucleótidos para detectar la presencia del gen *uidA* con la finalidad de verificar la inserción del cassette de expresión 35S::AlcR::GUS en células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa pLBA4404) transformadas por choque térmico.

Mediante estas células que poseen el gen reporteo *uidA* regulado por un promotor inducible por etanol se transformó de forma transitoria callos, células en suspensión, explantes (hojas y tallos) y embriones cigóticos de *C. papaya var* Maradol.

Los ensayos de localización histoquímica de GUS resultaron positivos para tejidos inducidos con etanol demostrando la inserción del gen *uidA* regulado por el promotor inducible por etanol. La inducción con etanol a una concentracion baja de 0.1% concuerda con lo descrito por Salter *et al.*, (1998). Sin embargo, durante la transformación de callo embriogénico de papaya Maradol, el tejido aparentemente no resistió el proceso de transformación con *A. tumefaciens*. El material vegetal se necrosó en etapas subsecuentes a la transformación, se presentó dificultad para remover *A. tumefaciens* del tejido transformado aunque se utilizó antibiótico en la concentración previamente reportada para esta especie (cefotaxime 250 mg mL⁻¹, Zhu *et al.* 2006).

Con la finalidad de obtener un tejido que pudiera resistir la eventual transformación con *A. tumefacien*, se siguió el protocolo descrito por Cai *et al.* (1991) específico para generar embriones somáticos a partir de embriones cigóticos de papaya.

El protocolo de embriogénesis somática generó respuesta de forma muy rápida y evidente, más del 50% de embriones cigóticos de papaya Maradol desarrollaron embriones somáticos 15 días después de la siembra inicial, lo que contrasta con el 43% reportado por Cai *et al.* (1991), en etapas subsiguientes se pudieron obtener plantas regeneradas de papaya Maradol mediante este procedimiento. De 21 plantas evaluadas, el 57.14% sobrevivieron en los tres primeros meses durante la etapa de aclimatación, 8 de estas plantas se sacaron a invernadero.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

De la información generada en la presente tesis, se pueden concluir lo siguiente:

• *C. papaya* var Maradol posee seis secuencias de factores transcripcionales del tipo bZIP pertenecientes al grupo D denominadas *CpTGA1*, *CpTGA2*, *CpTGA3*, *CpTGA4*, *CpTGA5* y *CpTGA6* y un homólogo a *bZIP* denominado *CpTGA7*.

• Las secuencias CpTGA de nucleótidos traducidos son homólogas a secuencias de AtTGA de *Arabidopsis*, tienen altos porcentajes de identidad y comparten dominios característicos entre sí.

• Con las secuencias CpTGA y AtTGA se puede obtener un árbol filogenético que describe la relación evolutiva entre estos factores transcripcionales.

• El árbol forma subclados definidos donde miembros de CpTGA se agrupan con AtTGA en función de su posible relación con aspectos de defensa y desarrollo.

• Dentro del subclado I CpTGA1 y CpTGA3 se agrupan con AtTGA1, AtTGA4, AtTGA3 y AtTGA7 involucrados en la defensa de *Arabidopsis* contra patógenos. En el subclado II CpTGA2, CpTGA4 y CpTGA7 se unen formando una politomía no resuelta, y se agrupan con AtTGA2, AtTGA5 y AtTGA6, activadores o represores del gen *PR-1*. Dentro del mismo subclado CpTGA4 se agrupó con AtPAN relacionado con el desarrollo

floral en *Arabidopsis* y finalmente CpTGA5 y CpTGA6 forman un subclado con AtTGA9 y AtTGA10 relacionados con desarrollo floral en *Arabidopsis*.

 CpTGA5 es un TGA de papaya, previamente había sido reportado como un bZIP sin especificar cuál.

• Los genes *CpTGA* tienen patrones de expresión basal variables en peciolos, hojas, pétalos, frutos maduros e inmaduros. De forma general, *CpTGA1* y *CpTGA3* se expresan en todos estos tejidos. *CpTGA2* se expresa fuertemente en todos los tejidos excepto en peciolo *CpTGA4* y *CpTGA7* se expresan en todos los tejidos. *CpTGA5* se expresa únicamente en pétalos y peciolos mientras que *CpTGA6* se expresa en todos los tejidos estas tejidos ensayados.

• La expresión de genes *CpTGA* es constitutiva por tratarse de factores transcripcionales pueden regular genes bajo diferentes estímulos, la regulación de los *CpTGA* podría ser de tipo post transcripcional.

• *C. gloeosporioides* podría reducir la expresión de los genes *CpTGA1* y *CpTGA3* los cuales no responden adecuadamente a la elevada presencia del patógeno, probablemente *C. gloeosporioides* reduce la expresión de genes de defensa como estrategia para colonizar el tejido infectado.

• *CpTGA2*, *CpTGA4* y *CpTGA5* parecen no estar involucrados con la defensa en contra de *C. gloeosporioides*.

• Es posible que *CpTGA7* se relacione con la defensa en contra de *C.* gloeosporioides en papaya.

• Es posible transformar callos, células en suspensión, explantes (hojas y tallos) y embriones cigóticos de *C. papaya* var Maradol mediante una cepa de *A. tumefaciens* que posea un gen reportero *uidA* regulado por un promotor inducible por etanol.

• De forma transitoria el gen *uidA* regulado por un promotor inducible por etanol, se expresa en callos, células en suspensión, explantes (hojas y tallos) y embriones cigóticos de papaya Maradol a concentraciones bajas de inductor.

• Es posible obtener plantas regeneradas de papaya Maradol de forma eficiente a partir de embriogénesis somática de embriones cigóticos.

5.3 PERSPECTIVAS

El aporte de la presente tesis ha sido significativo, como perspectivas derivadas del presente trabajo se mencionan las siguientes:

• Determinar la expresión basal de los *CpTGA* descritos en esta tesis en tejidos que no se consideraron en la presente tesis, especialmente los del subclado III, *CpTGA5* y *CpTGA6* podrían probarse en todos los órganos florales. De igual manera el homólogo a *AtPAN*, *CpTGA4* potencialmente comparte las mismas funciones que su homólogo en *Arabidopsis*.

• Hay evidencia de que *CpTGA5* se relaciona con el desarrollo de raíz podría determinarse la expresión basal en raíces de papaya Maradol.

• Aislamiento de las secuencias tipo TGA de papaya, su secuenciación y análisis posterior (comparación con las secuencias obtenidas *in silico*).

• Estandarizar las condiciones para la utilización de PCR cuantitativa con la finalidad de evaluar la expresión de genes.

 Generar plantas de papaya Maradol hasta edad adulta, libres de patógenos, con la finalidad de obtener frutos que puedan utilizarse como modelo de estudio relacionado con enfermedades como la antracnosis en papaya.

• Evaluar la expresión de los genes *CpTGA* en función temporal durante toda la etapa de maduración del fruto, considerando frutos infectados con *C. gloeosporioides* y

frutos sanos con la finalidad de conocer el progreso de la enfermedad y su influencia sobre la expresión de los *CpTGA*.

• Caracterizar el sistema de plántulas de papaya Maradol infectadas con el patógeno *C. gloeosporioides*, en particular este procedimiento serviría para desarrollar experimentos relacionados con estrés biótico usando como modelo a papaya.

 Derivado de esta tesis, se tiene un protocolo con potencial para ser usado específicamente en transformación genética de papaya y regeneración de transformantes, es por tanto importante continuar con el trabajo de obtención de embriones somáticos a partir de este protocolo.

• Se consiguió expresión transitoria en embriones cigóticos de papaya Maradol, cabe la posibilidad de generar a partir de estos embriones, callos embriogénicos y finalmente regenerar plantas transformadas.

• Proceder a la construcción de los cassettes de expresión del sistema regulado por un promotor inducible por etanol, debido a las diversas respuestas obtenidas en la expresión de los FT tipo *CpTGA*, probar con todos los miembros de la subfamilia y evaluar el gen que promueva una resistencia mayor a *C. gloeosporioides*.

REFERENCIAS

- Bowers J. E., B.A. Chapman, J. Rong, A.H. Paterson (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. Nature 422:33-438
- Cai W., C. Gonzalves, P. Tennant, G. Fermin, M. Souza, N. Sarindu, F. Jan, H. Zhu, D. Gonzalves (1991). A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35:614.
- Chuang C., M. P. Running, R. W. Williams (1999). The PERIANTHIA gene encondes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev.13:334-344.
- Dean J. D., P. H. Goodwin, T. Hsiang (2002). Comparison of relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of β-1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* Infected with *Colletotrichum destructivum*. Plant Molecular Biology Reporter 20:347–356.
- Deppman C., A. Acharya, V. Rishi, B. Wobbes, S. Smeekens, E. J. Taparowsky, C. Vinson (2004). Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in *Arabidopsis thaliana*: a comparison to Homo sapiens B-ZIP motifs. Nucleic Acids Research 11:3435-3445.
- Després C., C. Chubak, A. Rochon, R. Clark, T. Bethune, D. Desveaux, P. R. Fobert (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA. The Plant Cell 15: 2181–2191.
- Farinati S., G. DalCorso, S. Varotto, A. Furin (2010). The *Brassica juncea* BjCdR15, an ortholog of *Arabidopsis* TGA3, is a regulator of cadmium uptake, transport and accumulation in shoots and confers cadmium tolerance in transgenic plants. New Phytologist 185:964-978.
- Flaishman M. A., P. E. Kolatrukudy (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. Proc. Nati. Acad. Sci. Plant Biology 91:6579-6583.
- Horbach R., A. R. Navarro, W. Knogge, H. B. Deising (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. Journal of Plant Physiology 168:51-62.
- Jakoby M., B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J. V. Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj, F. Parcy (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science 7(3):106-111.
- Katagiri F., K. Yamazaki, M. Horikoshi, R. G. Roeder, N. Chua (1990). A plant DNAbinding protein increases the number of active preinitiation complexes in a human in vitro transcription system. Genes Dev. 4:1899-1909.
- Kesarwani M. J. Yoo, X. Dong (2007). Genetic Interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 144:336–346.
- Kim H. S., T. P. Delaney (2002). Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in Arabidopsis thaliana to Peronospora parasitica. The Pant Journal 32:151-163.
- Kirchler T., S. Briesemeister, M. Singer, K. Schutze, M. Keinath, O. Kohlbacher, J. Vicente-Carbajosa, M. Teige, K. Harter, C. Chaban (2010). The role of phosphorylatable serine residues in the DNA-binding domain of *Arabidopsis* bZIP transcription factors. European Journal of Cell Biology 89:175-183.
- Maier A. T., S.S. Sun, S. L. Offenburger, J. U. Lohmann (2011). The bZIP transcription factor PERIANTHIA: a multifunctional hub for meristem control. Frontiers in Plant Science 2:1-17.
- Miao X., E. Liu Lam (2004). TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 25:1-11.
- Ming R, S. Hou, Y. Feng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J. H. Saw, P. Senin, W. Wang, B. V. Ly, K. L. Lewis, S. L. Salzberg, L. Feng, M. R. Jones, R. L. Skelton, J. E. Murray, C. Chen, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R. E. Paull, T. P. Michael, K. Wall, D. W. Rice, H. Albert, M. L. Wang, Y. J. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R. A. Acob, P. Guan, A. Blas, C. M. Wai, C. M. Ackerman, Y. Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J. K. Na, E. V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J. E. Bowers, A. R. Gschwend, A. L. Delcher, R. Singh, J. Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Irikura, M. Paidi, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, R. Navajas-Pérez, M. J. Torres, F. A. Feltus, B. Porter, Y. Li, A. M. Burroughs, M. C. Luo, L. Liu, D. A. Christopher, S. M. Mount, P. H. Moore, T. Sugimura, J. Jiang, M. A. Schuler, V. Friedman, T. Mitchell-Olds, D. E. Shippen, C. W. dePamphilis, J. D. Palmer, M. Freeling, A. H. Paterson, D. Gonsalves, L. Wang, M. Alam (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). Nature 452(24):991-996.

- Mueller S., B. Hilbert, K. Dueckershoff, T. Roitsch, M. Krischke, M. J. Mueller, S. Berger (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. The Plant Cell 20:768-785.
- Murmu J., M. J. Bush, C. DeLong, S. Li, M. Xu, M. Khan, C. Malcolmson, P. R. Fobert, S. Zachgo, S. R. Hepworth (2010). *Arabidopsis* basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. Plant Physiology 154:1492-1504.
- Pontier D., I. Privat, Y. Trifa, J. Zhou, D.F. Klessig, E. Lam (2002). Differential regulation of TGA transcription factors by post-transcriptional control. The Plant Journal 32:641-653.
- Porter B.W., K.S. Aizawa, Y.J. Zhu, D.A. Christopher (2008). Differentially expressed and new non-protein-coding genes from a *Carica papaya* root transcriptome survey. Plant Science 174:38-50.
- Prusky D., R. A. Plumbley (1992). Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits. *In:* Colletotrichum: Biology, Pathology and Control. Bailey A. J., M. J. Jeger. (Eds). CABI publishing.
- Running M. P., E. M. Meyerowitz (1996). Mutations in the PERIANTHIA gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern. Development 122:1261-1269.
- Salter M. G., J. A. Paine, K. V. Riddell, I. Jepson, A. J. Greenland, M. X. Caddick, A. B. Tomsett (1998). Characterization of the ethanol-inducible *alc*gene expression system for transgenic plants. The Plant Journal 16(1):127-132.
- Schindler U. H., H. Beckmann, A. R. Cashmore. (1992) TGA1 and G-Box binding factors: Two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-boxlike element TGACGTGG. The Plant Cell 4:1309-1319.
- Shearer H., L. Wang, C. DeLong, C. Despres, P. R. Fober (2009). NPR1 enhances the DNA binding activity of the *Arabidopsis* bZIP transcription factor TGA7. Botany 87:561–570.
- Vinson C. R., P. B. Sigler, S. L. McKnight (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of Leucine zipper proteins. Science 246:911-916.
- Xiang C., Z. Miao, E. Lam (1997). DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology. 403-415.

- Zhu Y. J., M. M. M. Fitch, P. H. Moore (2006). Papaya (*Carica papaya* L.). *In:* Methods in Molecular Biology. Wang K. Agrobacterium Protocols. Second Edition. Humana Press Inc. USA. Vol. 344 pp.209-217.
- Zhu Y. J., X. Qiu, P. H. Moore, W. Borth, J. Hud, S. Ferreira, H. H. Albert (2003). Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. Physiological and Molecular Plant Pathology 63:237-248.
- Zimmermann P., M. Hirsch-Hoffmann, L. Hennig, W. Gruissem (2004). GENEVESTIGATOR *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. Plant Physiology 136:2621-2632.

ħ.,

Parte de los datos referidos en la presente tesis fueron incluidos dentro del artículo:

Idrovo Espín F. M., S. Peraza-Echeverria, G. Fuentes, J. M. Santamaría (2012). *In silico* cloning and characterization of the TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) transcription factors subfamily in *Carica papaya*. Plant Physiology and Biochemistry 54:113-122.

and the second se

The second secon

CONTRACTOR AND A DESCRIPTION OF A DESCRI

Plant Physiology and Biochemistry 54 (2012) 113-122



Research article

In silico cloning and characterization of the TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) transcription factors subfamily in Carica papaya

Fabio Marcelo Idrovo Espín, Santy Peraza-Echeverria, Gabriela Fuentes, Jorge M. Santamaría*

Unideal de Biotecnología, Centra de Investigación Científica de Vacado, Celle 43 Nº 130, Colonia Chalavrol de Hisiolgo, CP 97200, Mérida, Vacadón, Mexico

ARTICLE INFO

Article Metery: Received 30 September 2011 Accepted 7 February 2012 ble online 22 February 2012

Reywards: bZIP Basic Leucine zioner

ABSTRACT

The TGA transcription factors belong to the subfamily of bZIP group D that play a major role in diseas resistance and development. Most of the TCA identified in Arabidopsis Interact with the master regulator of SAR, NPR1 that controls the expression of PR genes.

As a first approach to determine the possible involvement of these transcription factors in papaya defense, we characterized Arabidopsis TCA orthologs from the genome of Carica papaya cv. SunUp. Six orthologs OrTGA1 to OrTGA6, were identified. The predicted OpTGA proteins were highly similar to AtTGA sequences and probably share the same DNA binding properties and transcriptional regulation features. The protein sequences alignment evidenced the presence of conserved domains, characteristic of this group of transcription factors. The phylogeny showed that CpTGA evolved into three different subclades associated with defense and floral development. This is the first report of basal expression patterns assessed by RT-PCR, from the whole subfamily of CpTGA members in different tissues from papaya cv. Maradol mature plants. Overall, CpTCA1, CpTCA3 CpTCA6 and CpTCA4 showed a basal expression in all tissues tested; CpTGA2 expressed strongly in all tissues except in petioles while CpTGA5 expressed only in petals and to a lower extent in petioles. Although more detailed studies in anthers and other floral structures are required, we suggest that CoRGAS might be tissue-specific, and it might be involved in papaya floral development. On the other hand, we report here for the first time, the expression of the whole family of CpTGA in response to salicylic acid (SA). The expression of CpTGA3, CpTGA4 and CpTGA6 increased in response to SA, what would suggest its involvement in the SAR response in papaya.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Papaya probably had its origins In Mexico and Costa Rica and nowadays is cultivated in tropical climates around the world. The fruit is consumed fresh, has a high content of vitamin A and B and contains the proteolytic enzyme papaine used as meat softener. Papaya is the first tropical fruit genetically modified (cv. SunLip, PRSV resistant) and was recently sequenced [1].

Resistance genes (R) mediate the recognition of pathogens or pathogen proteins [2]; this recognition induces the early production of reactive oxygen species (ROS) necessary for hypersensitive response (HR) that confines the pathogen in necrotic cells avoiding

its dispersion through the plant and limiting the pathogen to access of water and nutrients [3,4]. The activation of salicylic acid (SA) dependent signaling pathway, drives strong expression of pathogenesis related (PR) genes that contribute to the plant resistance [3]. SA defensive function is well documented in dicot plants in which salicylic acid (SA) is necessary to promote the basal resistance against pathogens and Systemic Acquired Resistance (SAR) [5]. SAR is a plant defense system comprised of local and systemic immunity against a wide range of pathogens, SA accumulates in affected and unaffected tissue, showing a long lasting protecting effect in subsequent challenges [4,6].

The subfamily of TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) transcription factors are members of the family G-box binding factors, class Leucine zipper, and superclass of basic domains [7]. In mammals, bZIP are involved in development, circadian rhythm, learning, memory, response to stress and radiation. The basic/ Leucine zipper (bZIP) is a region formed by two domains. First, the basic region formed by positively charged amino acids (Arginine or Lysine) that directly interacts with the DNA. And second, the zipper formed by 30 to 40 residues containing Leucines spaced regularly

Abbreviations: NPR1, non-expressor of pathogenesis related gene; PMH, PEE-ANTHIA; PR, pathogenesis related; QI(QII, Clutamine rich domains I and IE; II, resistance genes: SA salkylic acid: SAR, Systemic Acquired Resistance. * Corresponding author. Tel: +52 999 942 83 30x215; fax: +52 999 961 39 00. *E-mail* addresses: madBbis@cig.ms (FML istrovo Esglo), santyp@cicy.mx (S. Peraza-Echeverria), gfuentes@cicy.ms (G. Fuentes), jorgesm@cicy.mx (LM. Santamaria)

^{0981-6428/5 -} see front matter © 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved, doi: 10.1016/j.jdaphy.2012.02.011

EM. Mnovo Espin et al. / Plant Physiology and Biochemistry 54 (2012) 113-122

2. Results and discussion

every seven amino acids (LXXXXXXLXXXXXLXXXXXL) repeated at least three times. This domain is involved in dimerization [8–11].

In Arabidopsis, bZIP members mostly homodimerize, the Leucine repeats are termed heptads, each of the seven positions of amino acids is designated with a letter a, b, c, d, e, f and g. Positions a, d, e and g determine dimerization specificity. Charged amino acids in position a inhibit homodimer formation, Leucines usually are placed in position a stabilizing the dimer, finally amino acids in positions e and g interact and dimerize two transcription factors. If the interaction occurs between oppositely charged amino acid, it promotes homodimerization but if the interaction is between similarly charged amino acids the homodimerization is inhibited [11–13].

In plants, genes associated with these transcription factors are glutathione transferase (induced in general oxidative stress events). NPRI and PR genes [14–17].

Non-expressor of pathogenesis related-1 (NPR1) is an important component of SA signal pathway, NPR1 acts as a SA transductor later on pathogen attack. Inside the cytosol, a change in redox potential promotes de-polymerization of NPR1 in monomers that migrate into the nucleus where it finally interact with TGA transcription factors to induce a strong expression of *I*R genes (collectively known as SAR genes) [4,18,19]. The transcriptional activation domains is formed by Glutamine rich domains QI and QII and acidic amino acids [20,21]. The interaction affinity of TGA members for NPR1 was assessed with a yeast two-hybrid system [22]. TGA3 had the highest affinity to NPR1 followed by TGA2, TGA5 and TGA6. On the contrary, TGA1 showed the lowest affinity while for TGA4 affinity was not detected.

Després et al. [23] determined that TGA1 and TGA4 bind NPR1 after induction with SA. Two oxidized Cys residues, 260 and 266, prevented the interaction between TGA1 and NPR1, but their reduced state promoted the interaction, SA reduces the residues and the interaction with NPR1 proceeds. These residues where located within Glutamine rich domain QI, responsible for the transcriptional activation [20].

In Arabidopsis 10 members of TGA transcription factors are known, placed in group D of the classification proposed by Jakobi et al. [24]. The amino acid consensus signature of the bZIP members of group D in the C terminal is Yx2RL[RO]ALSS[LS]W [24].

AtTGA transcription factors regulate differentially the expression of PR defense genes [25], according to the similarity of their protein sequences, AtTGA involved in defense gene expression where grouped in subclades.

Subclade I is formed by AtTGA1 and AtTGA4: AtTGA1 is involved in basal resistance and is partially redundant with AtTGA4 [25,26].

Subclade II is formed by AtTGA2, AtTGA5 and AtTGA8. AtTGA2 is a PRI repressor or activator, depending of the as-1 domain to which it binds, and shares redundant function of PRI activator with AtTGA5 and AtTGA6 [25–28]. PAN controls the floral meristem identity, the size of the meristem and the floral organ number [20,29].

Subclade III is formed by AtTGA3 and AtTGA7. AtTGA3 is involved in basal and induced resistance and is the major transcriptional activator of PR genes. AtTGA7 also regulates the defense gene activation [25,26,28]. AtTGA9 and AtTGA10 have overlapping functions during anther development, their proteins interact with two CC-glutaredoxins ROXY1 and ROXY2, expressed in flower and involved in anther development. Although PAN is related to floral development,

The present study describes (a) the identification in silico of TGA transcription factors found in Carlca papaya cv. SunUp genome, (b) the basal expression of TGA homolog genes in C papaya cv. Maradol in different tissues and (c) possible changes in the expression of TGA homolog genes in leaves of C papaya cv. Maradol, after being challenged with SA.

2.1. Papaya genome posseses six CpTGA genes, orthologs to AtTGA subfamily

Six new genomic sequences showing homology to Arabidopsis TGA transcription factors were found within the genome of C papaya cv. SunUp. The predicted TGA proteins were highly similar to TGA sequences from Arabidopsis thaliana (Table 1). The protein sequences named hereinafter CpTGA1, CpTGA2, CpTGA3, CpTGA4, CpTGA5, CpTGA5 were classified and named based on the homology and phylogeny with A, thaliana TGA members.

Translated nucleotide alignment between 10 AtTGA and 6 CpTGA members, showed conserved amino acids in equivalent positions along the 16 sequences considered (Figs. 1 and 2).

The pair-wise comparison analysis of the predicted protein sequences of CpTGA1. AtTGA1 and AtTGA4, showed identity percentages higher than 82%. For the homolog CpTGA2 was more related to AtTGA2 (80.1% identity), than to AtTGA5 or AtTGA6 (76.9 and 79.4%, respectively). CpTGA3 showed identity percentages of 77.9% for AtTGA3 and 75.8% for AtTGA7. CpTGA4 showed 76.5% identity with AtTGA9 and finally CpTGA6 showed identity percentages of 79.4% with AtTGA9 and finally CpTGA6 showed 81.5% identity with AtTGA10 (Table 2.).

There are less CpTGA sequences in comparison with TGA sequences reported for A. thaliana, result that is consistent with the absence of genome duplication of C. papaya referred by Ming et al. [1]. Papaya diverged from Arabidopsis, before Arabidopsis undergone two sequential whole genome duplication (WGD) events [30], as a result, many genes found in Arabidopsis are redundant including AtTGA members [25,31].

2.2. The CpTGA predicted proteins shows the characteristic structural domains

2.2.1. The bZIP domain in CpTGA sequences, shares conserved amino acids found in AtTGA members

Transcription factors such as the TGA sub-family, bind specific DNA sequences and are capable of activating or repressing transcription. They are formed by modular proteins with functionally distinct domains and are responsive in specific tissue, cell type, in a translent or stimulus-dependent manner [32]. Previous alignments of TGA transcription factors have shown conserved domains among subfamily members involved in transcription regulation [9,21,24,33].

The bzip in CpTGA proteins was formed by two domains, the DNA binding domain and the Leucine zipper as it was described for this proteic structure Vinson et al. [11]. DNA binding domain of CpTGA sequences were located in the N terminal as it was reported previously for AtTGA1 [34].

Within the DNA binding domain all the homologs had Glutamine, Alanine and Serine residues regularly spaced by three amino acids QxxxxxS (Fig. 1), this residues are located in equivalent positions of putative phosphorylatable residues previously

Table 1

Six new genomic sequences showing homology to Arabidopsis TGA transcription factors, found within the genome of C, papaya cv. SunUp.

Name	Accession number	E-value	% identity	Length (aa)	
CpTCA1	DS981620	1 × 10-123	77 93 (82%)	427	
CoTGA2	DS981525	3 × 10-70	67/92 (72%)	438	
CpTCA3	DS981569	6 × 100-00	75 95 (78%)	349	
CoTCA4	DS981521	4 × 10-78	56 95 (69%)	492	
COTGAS	EF12305, Cu25	1 × 10-101	70'92 (75%)	516	
CpTCA6	D\$981605	1 × 10-100	64/92 (69%)	514	

ANEXO

115



Fig. 1. A spanness of full length TGA amino acid sequences of A. Evaluane and C. papage. DNA binding domain, underb ned with a baid double Line. Gustamine residues, black inverted manger. Alasine residues, gray inverted triangle. Serine residues, while inverted Hangle. Laudine apper Leucnes and Gycine spacel regularly. Asserials, Gustamine residues, black inverted domains QI and QII bold lines. Cysteine residues for AfTGA1 and AfTGA4, vertical arrows characteristic signature Yx2RI, RQ1ALSS, LSTW from group ID, dotted in: Adjentione was made with MEGA3 (63) and edition was made with BioEdit. (64) dentical arrow acids are enclased in black rectanging, similar arrive acids in gray while the other amino acids are different.





Fig. 2. Schematic representation of predicted CpTGA proteins based on previous alignment performed with MEGAS [63], Members of CpTGA, protein length (parenthesis), Black inverted triangles (glutamine, Alanine and serine residues), Boxes illustrate positions of the DNA binding domain (DBD). Leucine zigner (LeuZP): Calutamine rich acid domains (QI and QII). Characteristic signature of gnoup D (S). Cysteine residues (C) involved in the interaction with NFRI are represented for CpTGA1.The numbers and arrows over each sequence show the position of the nuclear export signals. The bars are proportional to the length of the sequences.

described by Kirchler et al. [35] commonly found in the basic region of bZIP proteins.

Certain motifs were identified as possible nuclear export signals (NES). On CpTGA1 a single Leucine placed within DBD in position 114. On CpTGA2 the motif LEXXLKL and a Leucine in positions 179 and 313, respectively. The motif LEXXLKL and a Leucine in positions 16 for CpTGA3 and finally the motif LFLXL for CpTGA6 in position 96 for CpTGA3 endy motif predicted outside the DBD. No nuclear export signals were predicted for CpTGA4 or CpTGA5 (Fig. 2).

It is well known that protein phosphorylation of transcription factors is involved in the regulation of gene expression in plants [36], within the basic region, the Ser¹³ residues found in all CpTGA members are placed in equivalent positions as Ser¹⁹ in Arabidopsis known to mediate phosphorylation [14,35]. Phosphorylation of this residue results in DNA binding impediment [37] and may be involved in repulsion of the transcription factor from the promoter [35]. Therefore, phosphorylation could be responsible for a fine tune regulation of papaya genes, modulated by CpTGA members.

The Leucine zipper of AtTGA, formed by 28 amino acid residues, is well conserved in all CpTGA. As it was reported previously. AtTGA Leucine zippers contain charged amino acids in all α positions [12].

Our results showed that the Leucine zipper of CpTGA members (Figs. 2 and 3) is formed of heptads (H) 0, 1, 2 and 3. In position & Leucine residues were found for heptads 0 and 1, however for heptads 2 and 3, Valine and Glutamic acid residues were found.



Fig. 3. Amino acid composition of heptade (0-3) and positions (a-g) in Leszine zipper of the six members of CpTGA and 10 members of AEGA-based on alignment performed with MEGAS [63]. The different amino acid types (alightetic, basic, acidic and hydroxylic) are also indicated.

Positions g are hydroxylic for heptad 0 (except for CpTGA3 where was placed a H) and heptad 1, and aliphatic (heptads 2 and 3). Positions e are acidic for heptads 0 and 2, aliphatic for heptad 3, and mainly hydroxylic for heptad 1. Almost the same residues are present in equivalent positions for AtTGA subfamily members.

For papaya, our results show almost the same amino acid composition pattern not only in g position but in all positions of heptads that form the Leucine zipper in CpTGA. Only the residues of H2 in position e are acidic, but no more charged amino acids were found in any g position. Therefore, the attractive interactions of residues in positions g and e are probably inhibited for CpTGA, making difficult the formation of heterodimers. In comparison to H1 for At5g42910 (bZIP group A) [24], position g is occupied by Glutamic acid, while position e has a Lysine, a basic amino acid residue promoting the attractive interaction and homodimer formation [12,13].

Homodimerization of CpTGA1 (Fig. 4) showed two Leucines, one Valine and one Glycine placed in the inner region of the coiled coil diagram. The amino acid residues Tyrosine, Serine, Leucine and Alanine were placed in position g of the upper helix and faced the amino acid residues Glutamic acid, tooleucine, Glutamic acid and Leucine in position e' of the lower helix.

2.2.2. The Glutamine rich acid domains are found within CpTGA sequences

All of the CpTGA sequences possessed connecting domains of variable length that linked the DNA binding domains to their respective transcriptional activation domains, composed by Glutamine rich acid domains QI and QII [20,33]. Both domains were identified in all CpTGA members. For ArtGA members the average number of glutamine residues within QI was 27% and for CpTGA

Te	della	-	2

116

Pairwise identity percentage between AtTCA and CpTCA aminoacid sequences, the highest percentage is enclosed in a gray box.

	A. thuliana									
	TCAI	TGA2	TGA3	TGA4	TGAS	TCAS	TGA7	PAN	TGA9	TGAID
CETCAL	MARK 17 MARK	50.4	70.8		50 8	58.7	70.1	55.9	55.9	52.0
CpTGA2	57.7	80. 0	59.4	59.4	110	724	57.7	72.6	63.0	62.6
CpTGA3	69.8	60.5	170	70.1	60.5	59.8	75.8	54.1	55.2	55.2
CpTGA4	55.2	74.4	56.5	55.9	70.8	73.7	55.2	78.9	60 1	59.4
CoTGA5	54.8	60.1	55.2	53.4	60.5	60.9	53.7	59.1	784	62.3
CpTGA6	50.9	63.7	\$7.7	52.7	62.6	63.0	55.2	59.8	64.8	215

131

F.M. Idrovo Bapin et al. / Plant Physiology and Biochemistry 54 (2012) 113-122



Fig. 4. Homodimerization achematic representation of CpTGA1 Leucine zopper, the chemical characteristics of the amino acids are represented by black, white and gray spheres. Positions of amino acid residues are detailed on the right side of the upper and lower helio. Based on Virson et al. [67].

members was 28%. However, in QII the average percentage for AtTGA members was 23% and 32% for CpTGA.

The first Glutamine rich domain QJ (Figs. 1, 2 and 5a) showed the following consensus sequence Qx3[VI][CY]x1Lx1[QH]Sx1Q[QE]AE [DE]AL[SY]QGx1[ED]x1L[QN]Q. The predicted consensus sequence (Figs. 1, 2 and 5b) of the second Glutamine rich domain QII was [QR] ADx1LR[QH][QE][T1]L[QH]x1[ML]x1[RQ][IV]LTx1RQ.

Our results showed that Glutamine domains in all CpTGA members were placed on C terminal as it was suggested for AtTGA3 and AtPAN by Meng et al. [33] and Chuang et al. [20], respectively. Within domains QI and QII from AtTGA members, the average number of Glutamine residues in each domain was almost the same for their orthologs CpTGA. For papaya, we found 27.8% and 24.6% Glutamine residues for QI and QII respectively, compared with,

27.3% and 23.8% reported for *A. thaliana*, respectively. Domains enriched with Glutamine or acidic residues are involved in activation of transcription factors as reported previously by Katagirl et al. [34] and Schwechheimer et al. [38].

2.2.3. Cysteine residues could act as binding sites for NPR1

Within QI predicted domain, two Cis residues were located in CpTGA1 (CXXXXC) in equivalent positions of Cis260 and Cis266 previously reported for AtTGA1, involved with the interaction between AtTGA1 and NPR1 after SA induction [23]. Oxidized Cysteines frequently form disulfide bonds involved in stabilization of proteins and regulation of biological activity [39]. The observation that CpTGA1 possess two Cysteine residues (Cys²⁴⁰ and Cys²⁴⁰) within the Glutamine rich domain QL suggests that this transcription factor could be dependent of redox conditions and controlled by SA during interaction with NPR I. This was previously reported for AtTGA1 that forms an intramolecular disulfide bond in the Cys residues under oxidizing conditions preventing the interaction with NPR1, In contrast, under further SA induction, AtTGA1 is reduced and interacts with NPR1 [23]. The remaining members lack these residues on the activation domain QL therefore SA regulates the interaction with NPR1 by alternative mechanisms. Recently Boyle et al. [40] suggested that SA dissemble the AtTGA2 oligomer prior to the interaction with NPR1, Although it is not clear if AtPAN is regulated by an intermolecular disulfide bridge or by S-glutathionylation, AtPAN interacts constitutively with colactors BOP1 and BOP2 by means of Cys³⁴⁰ equivalent to Cys²⁰⁰ in AtTGA1 [26]. BOP1 codifies for a BTB/POZ domain protein with ankyrin repeats involved in leaf morphogenesis, in fact NPR1 belongs to the same family of BOP1 [41].

The floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 involved in anther development are probably redox-regulated by ArTGA9 and



Fig. 3. Logo figures of conserved domains in CpIGA members (a) Glutamine rich domain QI (b) Glutamine rich domain QII (c) Characteristic signature of MIP group D. Logo was generated from Weblago 2.8.2 (84).

EM. Idrawa Espin et al. / Plant Physiology and Biochemistry 54 (2012) 113-122

AtTGA10. Oxidized C-terminal Cys residues could form a dithiol bridge that inhibits AtTGA9-AtTGA10 complex transcription factor activity, upon redox change the reduction of Cys residues could initiate ROXY1 and ROXY2 biosynthesis [26]. CpTGA5 and CpTGA6 share Cys residues in equivalent positions to those of AtTGA9 and AtTGA10, that are presumably involved in redox regulation.

Finally, all CpTGA members possess on the C-terminal, the characteristic signature identified for AtTGA Group D, and described by Jakoby et al. [24]. The predicted consensus sequence was Yx2RLR[AT]LSSLW (Fig. 5c), despite showing this signature, until the present date, this is not associated with a particular biological function.

2.3. CpTGA are grouped within three phylogenetic subclades

Based on the sequences alignment (Fig. 1), a phylogenetic tree was generated to evaluate the evolutionary relationships of Arabidopsis TGA members and their orthologs in papaya. All AtTGA and CpTGA homologs, grouped within three subclades (Fig. 6).

Previously, Shearer et al. [28] also identified three clades associated with defense in A. thaliana. At least one TGA in papaya can be grouped in each of the clades I, II or III, mentioned above. However, this classification did not consider TGA members involved in development.

More recently, Murmu et al. [26] provided a phylogeny where three main subclades were defined. In accordance with this new classification:

CpTGA1 and CpTGA3 were grouped in subclade L CpTGA1 grouped along with AtTGA1 and AtTGA4, known to be involved in basal resistance [25]. While CpTGA3 was grouped with AtTGA3 and AtTGA7, involved in the transcriptional activation of PR genes [28], therefore CpTGA3 could act similarly.

CpTGA2 and CpTGA4 were grouped in subclade IL CpTGA2 was grouped with AtTGA2, AtTGA5 and AtTGA6 and it might be involved in transcriptional activation or repression of PRI gene, as described by Kesarwani et al. [25] and Shearer et al. [28]. CpTGA4 also grouped with AtPAN, perhaps as a result of an earlier evolutionary divergence (Fig. 6). As AtPAN is known to be involved in floral development [20], it might be then possible that CpTGA4 might play a dual function in plant defense as well as in floral development in papaya.

CpTGA5 and CpTGA6 were grouped in subclade III along with AtTGA9 and AtTGA10, respectively, those transcription factors are related to flower development in Arabidopsis, Additionally, CpTGA5 grouped along with AtTGA9, that has also been reported to be



Pig. 6. Neighbor joining phylogenetic tree of TGA amino acid sequences from Arabidoptis thalians and Cerica papaya cv. SunUp showing the formed subclades. CpTGA are highlighted by black circles. Phylogeny was generated with MEGAS (63). highly expressed during senescence, but also expressed as a response against Pseudomonas syringae, in Arabidopsis [42].

2.4. Expression of CpTGA genes

2.4.1. CpTGA genes showed different basal expression in different tissues from C. papaya cv. Maradol

Differences were detected in the basal expression of the six CpTCA members among the different tissues tested (Fig. 7). In four of the CpTCA genes (TGA1, TG3, TGA4 and TGA5) basal expression was detected in all tissues tested. In CpTGA2, expression was detected in all tissues except in petioles while for CpTCA5, basal expression was only detected in petals and to a lower extent in petioles.

CpTGA1 showed uniform band intensity in petioles, leaves, petals and mature fruits but a band of lower intensity in immature fruits, CpTGA3 had also uniform band intensity in leaves, petals, immature and mature fruits, but showed a band with slightly higher intensity for petioles. The similar expression patterns shown by CpTGA1 and CpTGA3 might suggest that they share the same regulatory control. CpTGA2 showed uniform intense bands in ieaves, petals, immature and mature fruits but no band was observed in petioles. CpTGA4 showed diffuse bands in petiole, leaves, petals and immature fruits and a band of slightly higher intensity in mature fruits. As mentioned above, CpTGA5 showed an intense band in petals and a diffuse band in petioles, while CpTGA6 showed bands in all tissues, although the intensity of the bands was higher in petioles and petals, lower in immature fruits and much lower in leaves and mature fruits.

Some of our results contrast with those reported elsewhere for A, thaliana. For instance, we found basal expression for CpTGA1. CpTGA2 and CpTGA3 in mature leaves and young flower petals. In contrast, Pontier et al. [43] only detected AtTGA2 protein in Arabidopsis mature leaves but they did not detect AtTGA1 or AtTGA3. Also, we did not find expression of CpTGA2 (high identity percentage with AtTGA6; Table 2) in petiole, but we found high expression in immature fruit. In contrast, Xiang et al. [27] found expression of AtTGA6 in Arabidopsis petioles but very low



Pig. 7. RT-PCR basal expression patterns of CpTGA. P Petioles, L Leeves, Pt Petals, If Immature fruits, Mf Mature fruits from C popoyo cv. Maradol adult plants. The last three rows show RT-PCR controls. Positive control using Elongation Factor 1-alpha (EF1c), negative controls, with or without cOAt template, and with ar without par of forward and reverse EF1c oligonucleotides. Agarose concentration 1.28 w/v, electrophonesis was set to 55 min at 75 V. Expected amplicon sizes (bp) are detailed in careenthesis.

118

F.M. Morovo Espin et al. / Plant Physiology and Machemistry 54 (2012) 113-122

expression in immature siliques. In the case of CpTGA3 we found expression of CpTGA3 in papaya mature fruits while in Arabidopsis, Miao et al. [44] did not find expression of AtTGA3 in mature siliques with Northern hybridization.

In the case of CpTCA4, we found diffuse but uniform basal expression in all tissues tested including petals. In Arabidopsis the expression of its closest homolog AtPAN, has been observed in meristems [29] and it has been involved in the regulation of the number of perlanth organs in Arabidopsis [20] as well as been shown to regulate AGAMOUS (AG), related to floral patterning in Arabidopsis [45]. In papaya, we analyzed the expression of CpTGA4 in petals from flowers in early developmental stages and further analysis should be made in other floral organs in more mature flowers.

In the case of CpTGA5 we found basal expression only in petals and to a lower extent in petioles. In Arabidopsis, in contrast, its ciosest homolog AtTGA9 had shown expression in siliques and leaves [26]. On the other hand, our results suggest that CpTGA5 is the same as the one reported previously for C. papaya (as sequence EF12305: CP25); Identified by Porter et al. [46] as a clone similar to liguleless2 (lg2), gene that encodes for a basic Leucine zipper protein in maize, probably associated with root development. In our experiments no data on the expression of this TGA in roots are available and it should be further investigated. In the case of CpTGA6, we found basal expression in all tissues including leaves and Immature fruits, while its homolog in Arabidopsis, AtTGA10, showed no expression in leaves nor in siliques [26].

These differences might be partly attributed to differences in age and environmental condition of both systems. For Arabidopsis most of the assays were made in seedlings or small plantlets, while in papaya we used samples from mature plants from the field, where plants are exposed to a wide range of environmental conditions.

2.4.2. CpTGA genes are responsive to SA

As a first approach to determine the possible involvement of CpTGA transcription factors in C. papaya cv. Maradol defense, we assessed the expression of all OpTGA members after application of SA (1 mM). As a reference for SAR, the changes in the expression of CpPR1-d [47] and CpNPR1 [48] were also evaluated in the same experiment, It is well known that the establishment of SAR is driven by endogenous SA that leads to a conformational change of a NPR1 inactive oligomer form to an active monomer; this monomer reaches the nucleus of the induced plant cells, interacts with TGA transcription factors and finally promote PR1 proteins biosynthesis [16,49]. Mutant npr1-1 Arabidopsis plants showed reduced PR1 expression after induction with t-zeatin [50], transgenic plants expressing NohG, gene that encodes for a bacterial salicylate hydroxylase (converts SA to catechol) showed no accumulation of PR-1 transcripts after pathogen infection and SAR disruption [51]. The exogenous application of SA could also trigger SAR response, the accumulation of PR1 in tobacco leaves increased parallel to the concentration of exogenous SA [52].

In our experiment, in terms of CpTGA, leaves from untreated plants showed a weak basal expression in all CpTGA genes except for CpTGA5 (Fig. 8; day 0) before being treated with SA. At the fourth day after the application of SA, the expression of CpTGA2, CpTGA4 and CpTGA6 increased, while the expression of CpTGA2 and CpTGA1 remained unchanged. In the case of CpTGA5, its expression in leaves was not induced after application of SA.

The increased expression of CpTGA3 in response to SA is in line with previous reports in A, thaliana where the expression of AtTGA3 also increased almost five-fold when treated with SA compared with non induced plants [53]. On the other hand, the increased expression of CpTGA4 following SA treatment was somehow unexpected as its A, thaliana ortholog, AtPAN has been more related



Fig. 8. RT-PCR expression patterns of CpTGA1-6. QtMPR1, QpPR-1d, CpCST1 and Cp6F1a from A3 day-old C, papage ev. Maradol acedings, at 0. 4. 8 and 12 days after treatment with SA (1 mM), Agarone concentration 1.28 w/w, electrophonesis was set to 55 min at 75 V. Expected anglicon sites (bp) are detailed in parenthesis.

to developmental processes [54]. However, the increased expression of CpTGA4 following SA treatment in papaya might be explained by the fact that CpTGA4 and AtPAN possibly shared a common ancestor with TGA homologs related with defense (AtTGA2, S, 6 and CpTGA2; Fig. 6), it is therefore possible that since the divergence with Arabidopsis, both functions (defense and development) remained conserved for CpTGA4. The increased expression of CpTGA6 as a response to SA induction in C, papaya, might also appear somehow unexpected as its Arabidopsis homolog AtTGA10, has been more associated to developmental processes [26], However, to our knowledge, experiments assessing the expression of AtTGA10 after induction with SA have not being conducted.

The fact that the expression of CpTGA1 was not altered by the exposure to SA, is in agreement with previous report for AtTGA1 in A, thaliang [42]. The expression of AtTGA1 is not increased by SA but. SA still drives the interaction of AtAPRI and AtTGAI [23] it is plausible that the same regulation could be achieved in papaya, its ortholog CoTGA1 could have constitutive expression and not increase in response to SA (Fig. 8) but yet SA might be driving the interaction of the already expressed CoTGA1 and CoNPR1 to eventually induce the expression of PR1 genes. The fact that the expression of CpTGA2 did not change in response to SA in C. papayo, is in contrast with the slight increased expression of AtTGA2, three days after application of INA (a SA analog) reported previously in leaves of A. thaliana [55]. The fact that the expression of CpTGAS was not induced by SA in our experiment is in line with reports where its ortholog AtTGA5 showed no expression 3 days after application of INA [55].

As expected, CpPR-1d was not expressed in untreated plants but expression was induced 4 days after SA treatment (Fig. 8). The expression of CpPR-1d in our SA assay suggests the onset of SAR in

F.M. Idravo Espin at al. / Plant Physiology and Biochemistry 54 (2012) 113-122

our papaya seedlings exposed to SA. Four members of PR-1 genes have been identified in C. papaya but only CpPR-1d showed high upregulated expression 3 h after induction with BTH, expression that further increased 14 days after induction [47,56].

The increased expression of *CpNPR1* following SA treatment (Fig. 8), is in line with previous reports for papaya where *CpNPR1* was expressed in the absence of BTH (analog of SA) but increased its transcript levels almost twofold after induction with BTH [47]. In the case of *CpGST1* increased expression in response to SA, this gene was originally described for *C* papaya cv. Eksotika 2, as being slightly expressed in leaves but highly expressed in ripe fruit [57] but no further report exist documenting its expression in response to SA in papaya. In Arabidopsis however, *AtGST25* was induced further SA application and is considered as an early SA response gene, independent of *AtNPR1* [58]. Therefore, *CpGST1* probably could be also used as a SAR marker in papaya. Finally, as expected, the house-keeping control gene *EF1a*, remained unaltered before and after SA treatment.

In conclusion, this is the first report that describes the presence of genes that encode for TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) transcription factors within the genome of C popoyo cv. SunUp. The in silico characterization described such genes and their predicted properties, this knowledge is useful for understand the complex system of transcriptional regulation of these protein sub-family involved in defense and development. Six nucleotide sequences of CpTGA genes were isolated in silico. These genes showed variable expression in different tissues in C. papaya cv. Maradol, a commercially important variety. We have also demonstrated that CpTGA subfamily was formed by 6 genes, fewer than in A. thaliana that has 10 members. This is consistent with the reduction in member's number of various gene families found in C. papaya when compared to A. thaliana. These genes in C. papaya encoded the proteins named CoTGA1, CoTGA2, CoTGA3, CoTGA4, CoTGA5 and CoTGA6, Their predicted protein sequences were highly similar and shared all the main attributes than those reported for A. thaliana TGA proteins, including their distinctive signature. The phylogenetic analysis revealed that CpTGA1 to CpTGA6 were grouped in three subclades previously identified to contain Arabidopsis TGA sequences involved in defense. We also found that 5 of those OpTGA were expressed in plants from commercial plantations of C papaya cv. Maradol in various tissues. As defense and development genes probably shared a common ancestor, is feasible that these genes posses a common regulatory mechanisms in papaya. For the first time, we report the expression of the whole family of TGA transcription factors in papaya after induction with SA using C papaya cv. Maradol seedlings. The evidence suggests that CpTGA3, CpTGA4 and CpTGA6 respond to SA and they might be the CpTGA members involved in the SAR response in papaya. Although further studies are needed, the fact that CpTGA5 did not expressed in leaves or fruits, but showed a strong expression in petals, might suggest that CpTGA5 could have a tissue-specific expression, and it might be involved on floral developmental processes in papaya.

3. Methods

3.1. In stitco cloning

The Arabidopsis TGA coding sequences obtained from TAIR database [59] were subjected to protein-translated nucleotide TBLASTN [60] compared with the genome from C papaya cv. SunUp accession numbers (DS981520 to DS984726). Sorting and identification of the sequences with higher identity was made with Blast Parser v1.2 (http://geneproject.altervista.org/) [61].

Coding sequences with E values lower than 10⁻⁴ and identity percentage higher than 25% within the C papaya genome were retrieved from the sequence database and analyzed with the algorithm software of gene prediction FGENESH (http://linux1. softberry.com/all.htm). To test the presence of TGA genes in C. papaya cv. Maradol, we designed specific oligonucleotides for RT-PCR from TGA homolog genes of C. papaya cv. SunUp, Primers were designed with the assistance of FastPCR software [62].

3.2. Protein alignment and phylogenetic analysis

The multiple sequence alignment and the phylogenetic tree of the predicted proteins from C papaya cv. SunUp and the retrieved proteins from Arabidopsis were performed with MEGA5 [63]. The phylogeny was obtained by neighbor-joining (NJ) distance based method with 1000 bootstrap replications, and the calculated evolutionary distances were obtained from the Poisson correction evolutionary model, gaps and missing data were treated with palrwise deletion. Edition of the alignment was performed with BioEdit [64] (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit/html).

Logos were generated for the Glutamine rich acid domains and Group D signature with WebLogo ver. 2.8.2 [65]. Prediction of the Nuclear Export Signals was performed with NetNES [66].

3.3. Plant material

C papaya cv. Maradol samples were collected from the field in the commercial plantation "Rancho Alegre" located in Yucatin, México (N 21*18.219'; W 087*46.179'). Five plants of approximately one year old were selected, from each plant petioles, leaves, petals from unopened flowers, immature and mature fruits were removed from the plants and frozen in liquid nitrogen and stored at --80 °C until processed. For the SA assay, green house grown 43 day-old C. papaya cv. Maradol seedlings, were used.

3.4. RNA isolation and RT-PCR

Tissue samples were ground to fine powder in liquid nitrogen and weighted up to 500 mg, RNA was isolated with CTAB buffer extraction protocol standardized in our laboratory. The RNA concentration was measured with a NanoDrop¹⁴ 1000 Spectrophotometer, RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis.

RT-PCR reactions were performed with an Eppendorf thermocycler as follows: First denaturalization step, 95 °C for 3 min; 38 cycles with denaturalization at 95 °C (30 s), alignment at 56 °C (30 s), extension 72 °C (1 min) and final extension at 72 °C (10 min). Electrophoresis of RT-PCR was made on agarose gel (1.2%) during 1 h at 75 V.

3.5. SA treatment assay

For the SA assays (5 plants per treatment) of 43 day-old C popaya cv. Maradol seedlings grown in trays containing Agrolite-Peat Moss (1:1) substrate under greenhouse conditions, were used. Untreated seedlings were harvested at day 0 and frozen in liquid nitrogen. An equivalent group of seedlings were treated with 30 mL of a solution containing 1 mM salicylic acid (Sigma, USA) by root drenching. Leaf samples were then taken 4, 8 and 12 days after SA application, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until processed.

Acknowledgments

We thank Dr. Jorge Humberto Ramirez-Prado and Dr. Luisa López-Ochoa (CICY, México) for their expert advises and useful comments. We wish to thank Mr. José Arjona (Rancho Alegre, Yucatán, México) for providing plant material of C. papaya cv.

Maradol, for our analysis. This research was supported by CON-ACYT, Project Nº CB83829 and CONACYT scholarship FIE228112 granted to FL

References

- [1] R.R. Ming, S. Hou, Y. Peng, Q. Yu, A. Dionne-Laporte, J.H. Sew, P. Senin, W. Wang, R.V. Ly, K.L.T. Lewis, S.L. Satzberg, L. Feng, M.R. Jones, R.I. Skelton, Jan E. Marray, C. Oren, W. Qian, J. Shen, P. Du, M. Eustice, E. Tong, H. Tang, E. Lyons, R.E. Paul, T.P. Michael, K. Wall, D.W. Rice, H. Albert, M. Wang, Y. Zhu, M. Schatz, N. Nagarajan, R.A. Kochi, P. Guan, A. Blas, C. Man Wai, C.M. Acherman, Y. Ren, C. Liu, J. Wang, J. Wang, J. Na, E.V. Shakirov, B. Haas, J. Thimmapuram, D. Nelson, X. Wang, J.E. Bowers, A.R. Gachwend, A.L. Delcher, B. Singh, J.Y. Suzuki, S. Tripathi, K. Neupane, H. Wei, B. Iriliura, M. Paidi, A. Sing, J. Stechet, S. Injami, K. Perspine, H. Wei, a trianet, M. Pilot, N. Jiang, W. Zhang, G. Presting, A. Windsor, E. Navajas-Pétrez, M.J. Torres, F.A. Feltas, B. Porter, Y. Li, A.M. Burroughs, M. Luo, L. Lin, D.A. Onvistopher, S.M. Mount, P.H. Moore, T. Sugimura, J. Jiang, M.A. Schuller, V. Friedman, Y. Micchell-Olds, D.E. Shippen, C.W. dePamphilis, J.D. Patners, M. Freeling, A.H. Paterson, D. Gonaslver, L. Wang, M. Alam, The draft genome of the composition of the statement of the statement of the statement. transgenic tropical liuit tree papaya (Cerica popaya Linnasus), Nature 452 (2008) 991-997.
- [2] S. Chisholm, G. Coaker, B. Day, B.J. Staskawers, Host-Microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response, Call 124 (2006) 802-814.
- [3] J. Clazebrook, Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens, Annual Review of Phytopathology 43 (2005) 205-227
- [4] R. Weigel, U.M. Pfizzner, C. Catz, Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates
- PR gene expression in Arabidopsis, The Plant Cell 17 (2005) 1279-1291. [5] R. Chaturvedi, J. Shah, Sabcylic acid in plant disease resistance, in: S. Hay at resista A. Ahmad (Eds.), Salicylic Acid: a Plant Hormone, Springer, Dordrecht, 2007,
- P. Annual (car), Sanaya Car, Caesanna, J.P. Korzeńsu, J.A. Van Pak, M.J. Mueiler, A.J. Buchala, J. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L.C. Van Laon, X. Dong, C.M.J. Pieterse, NPR1 modelates cross-talk between salicylate- and talkers. monate-dependent defense pathways through a novel function in the tosol. The Plant Cell 15 (2003) 760-770. iterno.
- cycsics, the Plant Cell 13 (2003) 760-770.
 [7] E. Wingender, X. Chen, E. Pricke, R. Cellers, R. Hebi, I. Lebich, M. Krull, V. Matya, H. Michael, R. Ohmilioaer, M. Prijk, F. Schacherer, S. Thiele, S. Urbach, The TRANSFAC system on gene expression regulation, Nucleic Acid Research 29 (2001) 281-283. [8] W.H. Landschulz, P.F. Johnson, E.Y. Adashi, Isolation of a recom
- inant copy of
- the gene encoding C/EIP, Cenes and Development 2 (1966) 765-600. [9] W.H. Landshuliz, P.F. Johrson, S.L. McKnight, The Leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA hinding proteins, Science 240 (2014) 1970-1970. (1996) 1758-1764.
- [10] A. Schiermeyer, C. Thurow, C. Gatz, Tobacco bZIP factor TGA10 is a novel mber of the TCA family of transcription factors, Plant Molecular Biology 51 (2003) #17-629
- (2013) 817-629.
 [11] C.R. Vinson, P.B. Sigler, S.L. McKnight, Scissons-grip model for DNA neorgastion by a family of Leurine sipper proteins, Science 246 (1989) 911-916.
 [12] C. Deppmann, A. Acharya, V. Rishi, B. Wobbes, S. Smeekens, E.J. Taparowsky, C. Vinson, Dimerization specificity of all 67 %-20 motifs in Arabidopus chall-mer: a comparison to Honso saplens B-ZIP motifs, Nucleic Acids Research 11 (2004) 3435-3445.
- [2006] 3433-3445.
 [13] C. Degmann, R.S. Alvania, E.J., Taparowsky, Cross-species annotation of basic leacine zipper factor interactions: insight into the evolution of closed inter-action networks, Molecular Biology and Evolution 8 (2006) 1480-1482.
 [14] G.D. Amoutzna, A.S. Vevon, J. Wener III, M. Robinson-Reschavi, E. Bornberg-Baser, S.G. Oliver, D.L. Robertson, One Billion Years of bZIP Transcription factor evolution: conservation and charge in dimenzation and DNA-Binding site specificity, Molecular Biology and Evolution 3 (2006) 827-835.
 [15] D.P. Dixon, A. Lapitorn, R. Edwards, Plant glutathione transferates, Genome
- Biology 3 (2002) 1-10. [16] C. Johnson, E. Boden, J. Arias. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of
- prons-activating TCA factors to a defense gene promoter in Arabidopsia, The Plant Cell 15 (2003) 1846-1858.
- Plant Cell 15 (2003) 1840–1858.
 [17] Y. Zhang, W. Fan, M. Kankensa, X. Li, X. Dong. Interaction of NPR1 with basic Leucine sipper protein transcription factors that bind sequences required for satisfic acid induction of the PR-1 gene, Plant Biology 96 (1999) 6523–6528.
 [18] H. Cao, S.A. Bowling, A.S. Conton, X. Dong, Characterization of an Arabidopsis
- mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. The
- anz Cell 6 (1994) 1583-1592 R. Ward, S.J. Liknes, S.C. Williams, S.S. Dincher, D.L. Wiederhold, [191 E.R. D.C. Alexander, P. Ahi-Coy, J. Métraux, J.A. Ryals, Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acousted resistance. The Plant Cell 3 (1991) 1085–1084.
- [20] C. Chuang, M.P. Ronning, R.W. Williams, The PERIANTHIA gene encond
- [20] C. Chang, M.Y. Antonny, K.Y. Wanani, The Productive gene incomes a IGDP protein involved in the determination of Boral organ number in Am-aidopsis thations, Cenes and Development 13 (1999) 334–344.
 [21] U.H. Schindler, H. Beckmann, A.R. Cashmore, TGAI and G-Box binding factors: two distinct classes of Arabidopsis leactine zipper proteins compete for the G-Box-line element TGACETGC, The Plant Cell 4 (1992) 1309–1318.

- [22] J. Zhou, Y. Trifa, H. Silva, D. Portsier, E. Larn, J. Shah, D.F. Klesseig, NPR1 Differentially insertacts with members of the TCA/OBF family of transcription factors that bind an elements of the PR-1 gene required for induction by sal-kylic acid, Molecular Plant-Microbe Interactions 2 (2000) 191-202.
- [23] C. Després, C. Chubak, A. Sochon, R. Clark, T. Berhane, D. Desves ux, P.R. Fobert, The Arabidapsis NPR1 disease resistance protein is a novel collector that confers redux regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA, The Plant Ceil 15 (2003) 2181-2191. [24] M. Jakoby, B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J.V. Carbajosa, J. Tiedemann,
- n. T. Kroj. sa, J. Tiede F. Parcy, bZIP transcription factors in Arabidopeis, Trends in Plant Science 3 (2002) 106-131.
- [2002] 105–111.
 [25] M. Kesarwani, J. Yoo, X. Dong, Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis, Plant Physiology 144 (2007) 335–246.
 [26] J. Murrun, M.J. Bash, C. Delcong, S. Li, M. Xu, M. Khan, C. Malcohnson, P.R. Fohert, S. Zachgo, S.R. Hepvorth, Arabidopsis basic leacine-sipper tran-scription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins RDIV1 and RDV12 and are redundarity required for anther development, Plant Physiology 154 (2010) 1482–1504.
 [27] C. Xiang, Z. Miao, E. Lam, DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZP tran-scription factors in Arabidopsis theliane, Plant Molecular Biology 34 (1997) 403–415.
- 403-415.
- H.J. Snearer, L. Wang, C. DeLong, C. Despres, P.R. Fohert, NPR1 enhances the DNA binding activity of the Arabatopsis bZIP transcription factor TCA7, Rotany 87 (2009) 561-570.
 M.P. Running, E.M. Neyerovciz, Mutations in the PERIANTHIA gene of Am-
- bidopsis specifically alter flora) organ number and initiation pattern, Development 122 (1996) 1261-1269.
- [30] J.E. Bowers, B.A. Chapman, J. Rong, A.H. Paterson, Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal doplication events, Nature 422 (2003) 433–438.
- [31] Y. Zhang, MJ. Tessaro, M. Lastene, X. Li. Knockosst analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA8 reveals their reductiant and essential noise in systemic acquired resistance. The Plant Cell 15 (2003) 2647-2653
- [32] N.M. Lucombe, S.E. Austin, H.M. Berman, J.M. Thornton, An ove
- Jack Landmann, Sur Assentiation, Fast, Minister, Jak, Horiman, Joh Weiterwert & Generative Structures of procession-DNA complexens, Centrone Biology 1 (2000) 1–10.
 X.B. Meng, W. S. Zhan, R.M. Lon, M. Wang, Y.L. Peng, Identification of a movel Rice b219-type consortiption factor gene, Oak2P7, Involved in response to inflation of Integration of Integrating Integration of Integration of Integration of Integration o 301a-301m. [34] F. Katagiri, K. Yamazaki, M. Horikoshi, R.G. Roeder, N. Chua, A plant DNA-
- nding protectio increases the number of active preinitiation complexes to human in vitro transcription system, Genes Development 4 (1990) A hor 1909-1909
- T. Kirchler, S. Briesemeister, M. Singer, K. Schattze, M. Keinath, Q. Kohlbacher, J. Vicente-Carbajosa, M. Treige, K. Harter, C. Chaban, The role of phosphory yutable serine residues in the DMA-binding domain of Arabidopsis b27P transcription factors, European Journal of Cell Biology 89 (2010) 175-183.
 L.A. Sarokin, N.H. Chua, Binding sites for two novel phosphornetims, 3APS and 3AP3, are required for rbcS-3A expression. The Plant Cell 4 (1992)
- 473-483. [37] T. Meshi, I. Moda, M. Missami, M. Okanami, M. Iwahach, Conserved Ser re
- dues in the basic region of the bZIP-type transcription factor HBP-1a(17): importance in DNA binding and possible targets for phosphorylation, Plant Molecular Biology 36 (1998) 125-136.
- (a) Instruction motion of the second seco
- [39] C.M. Niroshini, C. I Cles, C. Jacob, Multiple roles of cysteine in biocatalysis, Biochemical and Biophysical, Research Communications 300 (2003) 1–4.
- [40] P. Boyle, E. Le Su, A. Rachon, H.J. Shearer, J. Alarmu, J. Yan Chu, The BTB/POZ utomain of the Arabidopsis disease resistance protein NPR1 Interacts with the represeion domain of TGA2 to registe its function, The Plant Cell 21 (2008) 1705-1713
- 37/00-3712. [41] C.M. Hu, J.L. Jun, H.G. Nana, J.C. Flettcher, BLADG-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/ PO2 domain protein required for leaf morphogenesis in Arabidopsic thaliane, Plant Cell Physiology 45 (2004) 1361–1370. [42] P. Zimmerraam, M. Hirsch-Follomann, L. Hennig, W. Groissern, GENEVESTI-CATOR, Arabidopsis microarray database and analysis toolbox, Plant Physi-burgh Colon bata, 2000.
- plogy 136 (2004) 2621-2632.
- [43] D. Pontser, I. Privat, Y. Trifa, J. Zhou, D.F. Klessig, E. Lam, Differential regulation of TGA transcription factors by post-transcriptional control, The Plant Journal 32 (2002) 641-653.
- [44] Z. Miao, K. Liu, E. Lam, TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZP transcription factors in Arabidepsis thalians, Plant Molecular Biology 25 (2004) 1-11.
- Maier, S. Stehsing-Sun, H. Weilmann, M. Demar, R.I. Hong, Duel roles of the bZIP transcription factor PERIANTHIA in the control of floral architecture and homeotic gene expression, Development 136 (2009) 1613--1620,
 B.W. Portler, K.S. Alzava, Y.J. Zhu, D.A. Christopher, Differentially expressed and new non-protein-exciting genes from a Carlos papinge raot transcriptione narvety, Plant Science 174 (2008) 38-50.

F.M. Idravo Espin et al. / Plant Physiology and Biochemistry 54 (2012) 113-122

- [47] Y.J. Zhu, X. Qiu, P.H. Moore, W. Borth, J. Hu, S. Perreira, H.H. Albert, Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya, Physiological and Molecular Plant Pathology 63 (2003) 237-248.
 [48] S. Perzaz-Echsverri, J. M. Santamaria, C. Fuentes, M. A. Menéndez-Cerón, M. A. Vallejo-Reyna, V. A. Herrerz-Valencia, The NPRI family of transcription in the intermetation and intermetation.
- cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. Genes and Genomics 34 (2012) in press.
- Genes and Centomics 36 (2012) in press.
 [40] Z. Mou, W. Fan, X. Dong, Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes, Cell 113 (2003) 935–944.
 [50] J. Choi, S.U. Huh, M. Kojiema, R. Sakalibara, K. Paek, L Hwang, The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/ NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis, Developmental Cell 19 (2010) 284–295.
- [51] T.P. Delanye, S. Ulores, B. Vermooij, I., Priedrich, K. Weymann, D. Negrozzo, T. Caffney, M. Guellella, H. Kessmann, E. Ward, J. Ryalst, A central role of salicytic acid in plant disease resistance, Science 266 (1994) 1247--1250.
 [52] N. Yalpani, P. Silverman, T.M.A. Wilson, D.A. Kleier, I. Raskin, Salicyfic acid is a systemic signal and an inducer of Pathogenesis-Related proteina in virus-infected tobacco, The Plant Cell 3 (1991) 809-818.
 [53] S. Farnati, G. DalCorao, S. Varotto, A. Furin, The Brossice juncee BjCdR15, an extended of enheticity 76.23 is an employee in and intervalue for the second and
- [53] S. Farinati, G. DalCorso, S. Varotto, A. Furin, The Brassica junces BjCdR15, an ortholog of Arabidopsis TGA3, is a regulator of cadmium uptake, transport and accumulation in shoots and confers cadmium tolerance in transgenic plants, New Phytologist 185 (2010) 964-978.
 [54] A.T. Maier, S.S. Sun, S.L. Offenburger, J.U. Lohmann, The bZIP transcription factor PERIANTHIA: a multifunctional hub for meristem control, Frontiers in Plant Science 2 (2011) 1-17.
 [55] H.S. Kim, T.P. Delaney, Over-expression of TGAS, which encodes a bZIP tran-scription factor that Interacts with NIM1/NPR1, confers SAB-independent resistance in Arabidopsis thaliene to Peromospore parasition, The Pant Journal 32 (2002) 151-163.
- 32 (2002) 151-163.
- [56] X. Qiu, P. Guan, M. Wang, P.H. Moore, Y.J. Zhun, J. Hu, W. Borth, H.H. Albert, Identification and expression analysis of 8TH induced genes in papaya, Physiological and Molecular Plant Pathology 65 (2004) 21–30.

- [57] P.F. Lam, U.K. Abu Bakar, Isolation and characterization of a cDNA encoding glutathione transferase from ripe Ekotika 2 papays, Journal of Tropical Agriculture and Food Science 27 (1999) 201-207.
 [58] F. Blanco, V. Garretón, N. Frey, C. Dominguez, T. Pierzs-Acke, D. Van der Straeten, X. Jordana, L. Hokugue, Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salkylic acid treatment in Arabidopsis, Plant Molecular Biology 59 (2005) 527-944.
 [59] D. Swarbreck, C. Wills, P. Lamesch, T.Z. Berardini, M. Garcia-Hernandez, N. Foerster, D. Li, T. Meyer, R. Muller, I. Ploetz, A. Radenbaugh, S. Singh, V. Swing, C. Tissier, P. Zhang, E. Hual, The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation, Nucleic Acids Research 38 (2009) 10009-01014

- (TAIR): gene structure and function annotation, Nucleic Acids Research 38 (2008) D1009-D1014.
 (80) S.F. Attachul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, journal of Molecular Biology 215 (1990) 402-410.
 (61) M. Cerreras, R. Bosotti, A. New Interactive and Fully Automated Tool for Parsing BLAST Output (2006).http://geneproject.altervista.org/.
 (82) R. Kalendar, D. Lee, A.H. Schulman, RasPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. Genes, Genomes and Cenomics 3 (2009) 1-14.
 (83) K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stacher, M. Nei, S. Kumar, MECAS:
- [63] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGAS: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolu-tionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28 (2011) 2731-2739.
 [64] T.A. Hall, Bioldit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 85/98/NT (1999).http://www.mbio.ncsu.edu/ Bioldit/bioedit.html.
 [65] G. Crooka, G., Hon, J. Chassionia, S. Brenner, WebLogo: a sequence logo generator, Genome Research 14 (2004) 1188-1190.
 [66] T. La Cour, L. Klemer, A. Melgaard, R. Gupta, K. Skriver, S. Bruna, Analysis and prediction of Leucine-rich nuclear export signals, Protein Engineering, Design and Selection 17 (2004) 527-536.

- and Selection 17 (2004) 527-536.
- [67] C. Vinson, A. Acharya, E.J. Taparowsky, Deciphering B-ZP transcription factor interactions in vitro and in vivo, Biochimica et Biophysica Acta 1759 (2006) 4-12