

PRESENCIA DE GENES (WRKY) ASOCIADOS A LA RESPUESTA AL ESTRÉS BIÓTICO EN CACAO DE NICARAGUA¹

Iván Marín-Argüello², Sara Negaresh³

RESUMEN

Presencia de genes (WRKY) asociados a la respuesta al estrés biótico en cacao de Nicaragua. El presente estudio se desarrolló en el periodo octubre 2007- enero del 2008, con el objetivo de evaluar la presencia de genes WRKY en genotipos de cacao de la colección del germoplasma del Centro Experimental El Recreo perteneciente al Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA), Managua, Nicaragua. Se logró detectar en cinco genotipos de cacao, la presencia de los locus WRKY vinculados a la resistencia al estrés biótico.

Palabras claves: Germoplasma, locus, enfermedades, patógenos, cultivo.

ABSTRACT

Presence of genes (WRKY) associated to the response of cacao to biotic stress in Nicaragua. The current research was developed between October 2007 and January 2008 at El Recreo Experiment Station, Nicaraguan Institute of Agricultural Technology (INTA), Managua, Nicaragua. The presence of five genotypes and of WRKY genes associated to tolerance to biotic stress in cacao was detected.

Keywords: Germplasm, locus, diseases, pathogens, crop.



INTRODUCCIÓN

En Nicaragua la producción de cacao es de 1.000 toneladas métricas al año, con expectativa de crecimiento a 2.000 toneladas/año, producidas en 495.000 manzanas destinadas al cultivo (Menocal 2006). A pesar que el país tiene potencial para el cultivo del cacao, hay factores que actualmente están incidiendo negativamente en el rendimiento (0,12 - 0,25 t/ha) (Menocal 2006). Entre éstos mencionamos la poca asistencia técnica, así como la incidencia de factores abióticos y bióticos (plagas y enfermedades).

Las principales enfermedades que afectan los cacaotales en Nicaragua, son la *Moniliophthora roreri*, conocida como moniliasis, *Phytophthora palmivora* (mazorca negra), *Calonectria rigidiuscula* (Bubas) y *Ceratocystis fimbriata* (Mal de Machete) (Menocal 2006). El poder contrarrestar el efecto de estas enfermedades conlleva a destinar recursos y tiempo, por lo que es necesario caracterizar molecularmente el germoplasma nacional. En este punto el estudio propone la caracterización molecular para identificar determinadas regiones del genoma del cacao vinculadas con la presencia de genes de resistencia a ciertos

¹ Recibido: 9 de junio, 2008. Aceptado: 20 de marzo, 2009.

² Laboratorio Tecnología de los Alimentos. POLISAL II, 2do Piso. Recinto Rubén Darío, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN) - Managua. ivmarinarguello@gmail.com

³ Departamento de Química, Facultad de Ciencias e Ingenierías UNAN-Managua. sarita_305@yahoo.com

patógenos (Chen y Chen 2000, Eulgem *et al.* 2000, Hara *et al.* 2000, Dong *et al.* 2003, Borrone y Kuhn 2004, Steven y Schnell 2005).

Investigaciones realizadas para la caracterización de los genes de la familia WRKY (Hara *et al.* 2000, Eulgem *et al.* 2000, Borrone y Kuhn 2004) han permitido establecer relación entre la presencia de éstos y los mecanismos para contrarrestar el estrés biológico desarrollados por las plantas. Aunque todavía se sabe muy poco sobre el papel que juega cada miembro de esta familia en la regulación y desarrollo de dichos mecanismos de respuesta al estrés.

La diversidad genética del cacao está presente, pero debido al desconocimiento de las particularidades moleculares del genotipo de cada especie, en los programas de mejoramiento genético se ha utilizado una estrecha base genética lo que ha limitado en ofrecerle al productor un genotipo con mejor tolerancia al estrés biótico (Motamayor *et al.* 2002, Sereno *et al.* 2006).

Los genes pertenecientes a la familia WRKY participan en la respuesta de la planta al estrés biótico (heridas producidas por insectos o infecciones desarrolladas por patógenos). Éstos codifican para factores de transcripción ((Ulker y Somssich 2004), que a su vez regulan la respuesta fisiológica de la planta produciendo metabolitos secundarios que provocan la hidrólisis de la pared celular de microbios, reforzando la pared celular de la planta, interfiriendo en el sistema digestivo de los insectos o estimulando la liberación de metabolitos secundarios (Hara *et al.* 2000). Las proteínas WRKY contienen un dominio de 60 aminoácidos definido por la secuencia WRKYGQK, que tiene la capacidad de poder reconocer y unirse a sitios específicos del ADN. Todas las proteínas WRKY tienen una o dos copias de dominios altamente conservadas. Son clasificadas en tres grupos y son diferenciadas por la posición de un intron que es conservada (Borrone y Kuhn 2004). Si bien en *Arabidopsis thaliana* se han logrado identificar 74 genes WRKY (Eulgem *et al.* 2000) en el *Theobroma cacao* se reportan 16 genes WRKY (Borrone y Kuhn 2004).

El período de crecimiento, de cuatro a cinco años, requerido por el árbol de cacao para alcanzar su primera producción y la necesidad de seleccionar variedades resistentes a las enfermedades más importantes, motivaron al presente estudio cuyo fin es establecer la presencia de los genes WRKY en la colección de germoplasma del Centro Experimental El Recreo del

Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Las muestras fueron obtenidas de la colección de germoplasma de cacao conservada en el Centro Experimental El Recreo del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) localizado a 300 km de Managua. El muestreo se desarrolló en octubre del 2007 y el proceso del análisis molecular se efectuó en enero del 2008, en el Laboratorio Tecnología de los Alimentos de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN), Managua. La selección de las muestras se desarrolló en dos áreas: un área correspondiente a los once híbridos y a los nueve criollos (Cuadro 1). Los árboles en cada una de las áreas fueron seleccionados al azar.

Las muestras de cacao fueron referenciadas satelitalmente con un GPS (Garmin) lo que permitió construir un mapa de la ubicación de cada árbol, los cuales se encuentran distribuidos en tres parcelas en el Centro Experimental El Recreo, INTA.

Cada árbol fue etiquetado con una cinta de plástico resistente, conteniendo información sobre el número de la muestra y fecha del muestreo. De cada árbol de cacao, se tomó una muestra de hoja, preferentemente de las hojas más jóvenes. Todas las muestras pertenecen a la colección de cacao manejada por el INTA, se tomaron 11 muestras de la colección de híbridos y 10 de la colección de cacao criollo. En total se muestrearon 21 árboles. Las muestras fueron procesadas inmediatamente y el remanente de la hoja fue conservada a -20 ° C en un banco de ADN perteneciente al laboratorio Tecnología de los Alimentos de la UNAN-Managua.

Extracción del ADN

Se tomó de cada muestra de hoja un disco foliar entre 15-20 mg de peso y se colocó en un tubo de 1,5 ml de Eppendorf. Cada tubo fue sumergido en nitrógeno líquido por espacio de 10-15 segundos y triturado con un mortero Kontes. Seguidamente se le añadió 300 μ l de solución de extracción (100mM de Tris-HCl, 1.4 M de NaCl, 20 mM de EDTA y 0,2

Cuadro 1. Descripción de los genotipos (híbridos y criollos) empleados para determinar la presencia de alelos vinculados al estrés biótico. Laboratorio Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Nicaragua, Managua, Nicaragua. Enero, 2008.

Muestra	Genotipo	Ubicación
1	UF296	N12 10.288 W84 18.827
2	UF29	N12 10.282 W84 18.835
3	POUN12	N12 10.279 W84 18.845
4	ICS8	N12 10.270 W84 18.849
5	UF667	N12 10.262 W84 18.858
6	IMC67	N12 10.252 W84 18.862
7	EET28	N12 10.256 W84 18.873
8	UF221	N12 10.261 W84 18.902
9	GS36	N12 10.268 W84 18.897
10	UF668	N12 10.276 W84 18.895
11	EET400	N12 10.270 W84 18.878
12	Cr12	N12 10.206 W84 18.938
13	Cr13	N12 10.204 W84 18.944
14	Cr14	N12 10.201 W84 18.949
15	Cr15	N12 10.201 W84 18.947
16	Cr16	N12 10.203 W84 18.944
17	Cr 17	N12 10.201 W84 18.945
18	Cr18	N12 10.202 W84 18.945
19	Cr19	N12 10.198 W84 18.944
20	Cr20	N12 10.209 W84 18.943

Las siglas con que están descritos los clones de cacao en Centro Experimental El Recreo del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) se refieren a los nombres de los centros de investigación de donde se originaron o fueron evaluados estos materiales. Algunos hacen referencia al apellido del investigador que aportó en la generación y descripción del material.

Simbología: - = ausencia del locus; √ = presencia del locus; Cr: criollo; ICS: Imperial Collage Selección, Origen Trinidad, River Estate; UF: United Fruit Company, Costa Rica; IMC: Isla Morocha Cocha (Perú); GS36: Granada Sellalection; EET: Estación Experimental Tropical, Ecuador; POUND: apellido del investigador peruano (F.J. Pound) que originó importantes aportes en investigaciones sobre el cacao.

% β-mercaptoetanol, 2% CTAB, 1% PVP, pH 8.0) conteniendo 20 μg de Proteinasa K. El tejido se maceró hasta alcanzar la homogeneidad. Posteriormente se incubó a 55° C por 1 hora, con frecuente agitación, invirtiendo el tubo. Se aplicó fenol:cloroformo:isoamyl alcohol para la extracción y se resuspendió el ADN en 50 μl de TE pH 8,0 conteniendo 10 μl de ARNasa

incubándolas a temperatura ambiente por 30 min. La pureza y cantidad del ADN fue determinada con la ayuda de un espectrofotómetro.

Cuantificación del ADN

Para cuantificar y determinar la pureza del ADN de las muestras se utilizó el espectrofotómetro Lambda EZ201 UV/VIS. De cada muestra se tomaron 5 μl de ADN las cuales fueron suspendidas en 2 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl y 1 mM de EDTA). La absorción de las muestras de ADN fue medida a 260 nm que es la longitud de onda óptima para medir la cantidad de ácidos nucleicos y a 280 nm que es la de longitud de onda a la cual absorben las proteínas. La relación entre los dos valores de OD obtenidos a 260 nm y 280 nm permite calcular la pureza de las muestras del ADN en relación con el porcentaje de proteínas presentes en la misma.

Condiciones del PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue desarrollada en el termociclador Eppendorf AG. Todas las reacciones del PCR se desarrollaron en un volumen total de 20 μl conteniendo 0,2 μM de cada cebador (IDT) (Cuadro 2), 200 μM de dNTPs (FISHER), 1X solución amortiguadora para PCR conteniendo 2,5 U Taq Polimerasa (NEB, FISHER, SIGMA) y 100 ng de ADN. Los productos del PCR fueron separados en una cámara de electroforesis horizontal con geles de agarosa al 1,5% y 3% (FISHER) en 0,5 X solución de TBE a un voltaje de 100-120V y visualizadas con Bromuro de Etidio. Las condiciones del termociclador fueron: (1) denaturalización inicial 94 °C 5 min, (2) 35 ciclos (94 °C x 40 seg denaturalización; 55 °C x 40 seg temperatura de alineación; 72 °C x 1 min. elongación), (3) 72 °C x 7 min. elongación final.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La hoja de cacao contiene una fuerte cutícula que recubre la epidermis foliar lo que dificulta la extracción del ADN. Esto obligó a experimentar dos métodos de extracción del ADN foliar.

En el proceso de caracterización del ADN del cacao y en la búsqueda de los respectivos alelos WRKY (WRKY-1, WRKY-8 y WRKY-14) se utilizó un juego de tres cebadores. Para el cebador WRKY-3

Cuadro 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los locus WRKY. Laboratorio Tecnología de los Alimentos, Managua, Nicaragua. Enero, 2008.

Locus	Secuencia	Tamaño de la banda (pb)	T _a (°C)	Grupo WRKY
TeWRKY-3	F: TCCTTACCCAAGGTAATGCCCTG R: TGCTTACGGACGTTGCATCCT	649	55	I
TeWRKY-8	F: GGATGCCCTGTCAAAAAGAAGGTACTG R: CGCTGAACCTAGAGCCAGATGA	284 /75	55	I
TeWRKY-14F	F: GCCCAGTTAGAAAACAGGTACTCCCA R: GGTGGTGATGAGGATTGTTCCGGT	437	50	II

T_a = Temperatura de alineación; pb= pares de bases; F= cebador delantero y R= cebador inverso
Fuente: Borrone y Kuhn *et al.* Theoretical Applied Genetic (2004).

se obtuvieron tres muestras positivas de las 20 muestras analizadas (genotipos 1CS8, UF667 y GS36). Esto se determinó por la presencia de una banda de 650 Kb establecida para este cebador (Cuadro 2 y Figura 1). De las tres muestras que se logró amplificar la región en estudio, todas corresponden a las variedades híbridas manejadas en la colección del germoplasma del Recreo.



Figura 1. Identificación del locus WRKY-3 en variedades híbridas. Laboratorio Tecnología de los Alimentos, Managua, Nicaragua. Enero, 2008.

Simbología: M= marcador molecular 100bp DNA Ladder (NEB); 1= UF296; 2=UF29; 3=POUND12; 4=ICS8; 5=UF667; 6=IMC67; 7=EET28; 8=UF221; 9=GS36; 10=UF668; EET400. Gel de agarosa al 1.5%. En calidad de control negativo se utilizó ADN de maíz no se muestra en la imagen. Laboratorio Tecnología de los Alimentos, Managua, Nicaragua. Enero, 2008.

Para el juego de los cebadores WRKY-8 se logró determinar la presencia del alelo en dos genotipos (POUN12 y UF221). Estas por igual corresponden a las variedades híbridas de la colección (Cuadro 1 y Figura 2). Según reporta la literatura (Borrone 2004) el tamaño de la banda amplificada utilizando el cebador WRKY-8 es de 284 pb pero en el germoplasma

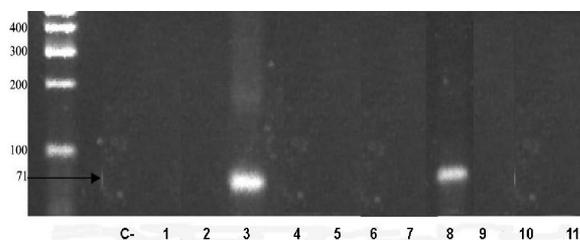


Figura 2. Identificación del locus WRKY-8 en variedades híbridas. Laboratorio Tecnología de los Alimentos, Managua, Nicaragua. Enero, 2008.

Simbología: marcador molecular 100bp DNA Ladder (NEB); C- =Control negativo conteniendo ADN de maíz; 1= UF296; 2= UF29; 3= POUND12; 4= ICS8; 5= UF667; 6= IMC67; 7= EET28; 8= UF221; 9= GS36; 10= UF668; 11= EET400. Gel de agarosa al 3%. Laboratorio Tecnología de los Alimentos, Managua (enero, 2008). Para descartar el efecto dímero de los cebadores se cargó un pozo sin ADN patrón, el resultado no se muestra en la imagen.

estudiado el tamaño de la banda amplificada fue de ~70 pb.

Si bien el cebador para WRKY-8 identifica la región blanco a ser amplificada, el tamaño de la banda reportada en la literatura con relación a tamaño obtenido en el presente estudio discrepan en tamaño significativamente. La variabilidad del tamaño es de un rango cerca de cuatro veces menor para el germoplasma estudiado (284bp/70bp=4). Es muy probable que el ADN de la muestra estudiada haya conservado la secuencia de los nucleótidos que se alinean con los cebadores utilizados para amplificar

el alelo WRKY-8, por lo que estaríamos observando una región de amplificación conservativa en el factor de transcripción WRKY-8, pero que difieren en la longitud de nucleótidos originando bandas con diferente tamaño. Es una secuencia de nucleótidos que se conserva independientemente de la variabilidad en el tamaño amplificado por la polimerasa.

La variabilidad en tamaño del alelo presentada en la longitud del factor de transcripción WRKY-8 podrían ser explicado con base en las siguientes hipótesis: (1) imprecisión en el proceso de la homología recombinante entre cromosomas pares; (2) presencia de secuencias de nucleótidos que marcan señales stop provocando la separación de la polimerasas de la secuencia del ADN blanco; (3) incorporación de sitios de mutación producto del cambio estructural de los nucleótidos esenciales o regiones de la replicación del ADN no reparadas; (4) incorporación de regiones transposómicas que abortan la transcripción. Sin embargo, todas las causas hipotéticas señaladas conducen a un solo resultado, acelerar la expresión del factor de transcripción WRKY-8. Entre más corto sea el número de nucleótidos a ser expresados en el factor de transcripción, más rápido puede responder la planta a la presencia de los factores bióticos, sencillamente, estamos hablando de la relación velocidad vs respuesta. A una mejor velocidad de respuesta mejor éxito de supervivencia, mejor capacidad de la planta de trasladar su material hereditario a la progenie.

En el caso del cebador específico para el locus WRKY-14 no se logró amplificar ninguna de las muestras analizadas. Los factores de transcripción corresponden a una amplia familia de genes, por lo que es muy justificable que el germoplasma en estudio no tenga la versión del alelo amplificado.

En relación a los datos obtenidos podemos concluir que se logró determinar la presencia de cinco alelos de genes WRKY en genotipos diferentes. Los resultados obtenidos no indican que los otros híbridos o criollos no cuentan con los factores de transcripción WRKY, estos genes representan una amplia familia y el presente estudio sólo monitoreó la presencia de tres genes de WRKY.

La información generada no pretende desplazar los caracteres morfológicos pero si lograr establecer el vínculo entre las manifestaciones morfológicas y la estructura molecular.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento por el financiamiento brindado por ASDI-SAREC-CNU, que contribuyeron a la realización del presente trabajo. Por igual, agradecemos al INTA por las actividades administrativas desarrolladas que facilitaron la recolección de las muestras en el Centro Experimental El Recreo.

LITERATURA CITADA

- Borrone, J; Kuhn, D. N. 2004. Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Genet.* 109: 494-507.
- Chen, C; Chen, Z. 2000. Isolation and characterization of two pathogen-and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 42: 387-396.
- Dong, J; Chen, C; Chen, Z. 2003. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant. Mol. Biol.* 51: 21-37.
- Eulgem, T; Rushton, PJ; Robatzek, S; Somssich, IE. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199-206.
- Hara, K; Yagi, M; Kusano, T; Sano, H. 2000. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol. Gen. Genet.* 263: 30-37.
- Menocal, O. 2006. El cacao: riqueza potencial de la tierra nica a la espera de ser explotada comercialmente en los mercados internacionales (Manual INTA). Producción INTA. p. 7.
- Motamayor, JC; Risterucci, AM; Lopez, PA; Ortiz, CF; Moreno, AL Lanaud, C. 2002. Cacao domestication: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Hereditas* 89: 380-386.
- Sereno, ML; Albuquerque, P; Vencovsky, R; Figueira, A. 2006. Genetic diversity and natural population

- structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. *Conservation Genetics* 7: 13-24.
- Steven, J; Schnell, RJ. 2005. Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 Population using SSR Markers and Candidates Genes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 130 (3): 336-373.
- Ulker, B; Somssich, E. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Science* 7: 491-498.