



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización de la sobreexpresión del gen
WRKY2 de *Arabidopsis thaliana* en respuesta al
estrés abiótico**

Tesis que presenta

Fermín Gutiérrez Hernández

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización de la sobreexpresión del gen WRKY2 de Arabidopsis thaliana en respuesta al estrés abiótico**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Fermín Gutiérrez Hernández** y aprobada el veintiséis de enero del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Director de la tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial

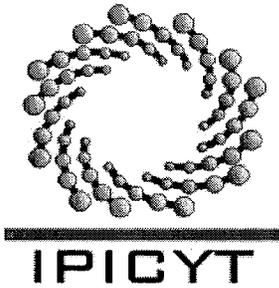
Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas, de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y con fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales 2015, 2015-01-414.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. de registro 590377 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 178 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 26 días del mes de enero del año 2018, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Secretaria	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Fermín Gutiérrez Hernández

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización de la sobreexpresión del gen WRKY2 de Arabidopsis thaliana en respuesta al estrés abiótico

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de enero de 2018.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



Dedicatorias

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por el apoyo institucional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por su dirección, apoyo y tiempo.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por su asesoría y comentarios acertados.

A la Dra. Martha Leticia Santos Martínez por su asesoría.

A la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano por su apoyo técnico.

A la M.C. Alicia Becerra Flores por su apoyo técnico.

A mis compañeros del laboratorio 7.

Contenido

Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Abreviaturas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción	1
Materiales y Métodos	5
Líneas y condiciones de crecimiento	5
Extracción de ácidos nucleicos	5
Generación de la líneas de <i>Arabidopsis</i> que sobreexpresan el factor de transcripción <i>WRKY2</i>	6
RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) de <i>ABI3</i> , <i>ABI5</i> y <i>WRKY2</i> en la presencia de ABA	6
Ensayo de germinación bajo estrés salino y tratamiento con hormonas.	7
Análisis estadístico	8
Resultados	9
Generación de líneas sobreexpresantes del factor de transcripción <i>AtWRKY2</i> en <i>Arabidopsis</i> .	9
Análisis de sensibilidad a la fitohormona ABA en la germinación de la línea sobreexpresante 35S:: <i>AtWRKY2-1</i>	9
Evaluación de la línea sobreexpresora Ow2-1 del gen <i>WRKY2</i> bajo estrés salino.	11
Evaluación de plántulas de la línea sobreexpresora del gen <i>WRKY2</i> en altas concentraciones de ABA.	12
Nivel de expresión de los genes <i>ABI3</i> y <i>ABI5</i> en las líneas Col-0, mutante nula <i>wrky2</i> y la sobreexpresante Ow2-1 de <i>Arabidopsis</i> .	12
Nivel de expresión del gen <i>WRKY2</i> en la línea mutante <i>abi5</i> y línea sobreexpresante <i>ABI5</i> (OABI5)	14
Discusión	15
Referencias	18

Tablas

Tabla 1. Tabla de oligonucleótidos empleados en qRT-PCR	22
--	-----------

Figuras

Figura 1. Esquema del plásmido pMDC32-WRKY2.	23
Figura 2. Nivel de expresión de WRKY2 en líneas Col-0, mutante wrky2 y sobreexpresantes WRKY2 (OW).	24
Figura 3. Sensibilidad al ABA en la germinación de las líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2.	25
Figura 4. Análisis de cotiledones verdes en las líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2 bajo tratamientos de ABA.	26
Figura 5. Sensibilidad a estrés salino en la germinación de las líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2	27
Figura 6. Análisis de cotiledones verdes de las líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2 en respuesta al estrés salino.	28
Figura 7. Sensibilidad a ABA en plántulas de líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2.	29
Figura 8. Nivel de expresión de ABI3 en las líneas Col-0, mutante wrky2 y sobreexpresante WRKY2 bajo diferentes tratamientos de ABA a 12 y 24 h.	30
Figura 9. Nivel de expresión de ABI5 en las líneas Col-0, mutante wrky2 y sobreexpresante WRKY2 bajo diferentes tratamientos de ABA a 12 y 24 horas.	31
Figura 10. Nivel de expresión de WRKY2 en Col-0, mutante abi5 y sobreexpresante OA5-8.	32

Abreviaturas

FTs Factores de Transcripción

ABA Ácido Abscísico

WRKY Aminoácidos W (Triptofano), R (Arginina), K (Lisina), Y (Tirosina)

ABI3 Abscisic Acid-Insensitive 3

ABI5 Abscisic Acid-Insensitive 5

UBQ5 Ubiquitin-40S ribosomal protein

Ow2 Over-expressed *WRKY2*

OA5 Over-expressed *ABI5*

Col-0 ecotipo Columbia 0 de *Arabidopsis thaliana*

MS Murashige y Skoog

DNA Deoxyribonucleic Acid

T-DNA Transfer DNA, de *Agrobacterium*

cDNA complementary DNA

RNA Ribonucleic Acid

35S Promotor constitutivo, del Virus del mosaico de la Coliflor

Resumen

Caracterización de la sobreexpresión del gen *WRKY2* de *Arabidopsis thaliana* en respuesta al estrés abiótico.

Las proteínas WRKY son importantes factores de transcripción (FTs) involucrados en diversos procesos en plantas como crecimiento, desarrollo, estrés biótico y abiótico. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* existen estudios limitados para factores WRKY involucrados en la ruta de señalización mediada por ABA, la cual es importante para el desarrollo y latencia de la semilla, y en diversas respuestas a estrés. Los genes *ABI1*, *ABI2*, *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* son importantes reguladores transcripcionales de diversos genes involucrados en esta ruta. Estos factores de transcripción están sujetos a su vez a regulaciones por otros factores de transcripción como los factores WRKY. En este trabajo demostramos que la sobreexpresión del *AtWRKY2* presenta un fenotipo de insensibilidad a ABA en comparación con la línea control, y además muestra un incremento en la tolerancia a estrés salino. Adicionalmente, cuando medimos el nivel de expresión de los genes *ABI3* y *ABI5* se incrementa en la línea sobreexpresante de *AtWRKY2* bajo la aplicación exógena de ABA.

Palabras clave: *AtWRKY2*, Factores de Transcripción, ABA, estrés abiótico.

Abstract

Characterization of the overexpression of the gene *AtWRKY2* in response to abiotic stress.

WRKY proteins are important transcription factors (FTs) involved in many plant processes like growth, development, biotic and abiotic stresses. In the model *Arabidopsis thaliana* only a few studies had described a role for certain WRKY transcription factors, some WRKY proteins had proposed to be involved on ABA signaling pathway, which is important for seed development and dormancy, and in plant responses to various environmental stresses. The genes *ABI1*, *ABI2*, *ABI3*, *ABI4* and *ABI5* are important transcriptional regulators of the expression of genes involve in this pathway. Such ABI transcription factors are under regulation of other transcription factors like WRKY. In this work we described that the overexpression of the *AtWRKY2* protein showed an ABA-insensitive phenotype in comparison to the wild-type line, and also exhibit an increased tolerance to salt stress. Furthermore, in *AtWRKY2* overexpressing line we observed that the expression of *ABI3* and *ABI5* genes increased in presence of ABA.

Key words: *AtWRKY2*, Transcription factors, ABA signaling, abiotic stress.

Introducción

Las plantas se encuentran expuestas a una gran variedad de estímulos, los cuales tienen un efecto directo en las diferentes etapas de desarrollo y crecimiento de la planta; para contrarrestar estímulos negativos, las plantas han desarrollado mecanismos en respuesta a diferentes condiciones de estrés. Estos mecanismos involucran cascadas de señalización mediadas por factores de transcripción (FTs); en el caso de *Arabidopsis thaliana* se han descrito la presencia de 1,800 FTs lo cual indica la importancia en la regulación genética en este organismo modelo (Guo et al. 2005). Los FTs interactúan con elementos específicos en cis en la región promotora de genes involucrados en respuesta a estrés y el desarrollo, lo que lleva a que cascadas de transducción de señales se activen en respuesta a los estímulos bajo los que se encuentra la planta. Un ejemplo de FTs que responde a estrés son los pertenecientes a la superfamilia WRKY, que cuenta con 74 genes en *A. thaliana* y reciben su nombre por su dominio de unión a DNA, el cual es llamado dominio WRKY. Este dominio WRKY comprende una región de 60 aminoácidos altamente conservado que incluye la secuencia de aminoácidos WRKYGQK en el extremo N-terminal y una firma tipo dedo de zinc en el extremo C-terminal (Ciolkowski et al, 2008; Duan et al, 2007). El dominio WRKY de unión a DNA se une a la caja del promotor denominada "W-box", la cual tiene una secuencia de consenso de TTGACC/T (Eulgem et al, 2000; Yamasaki et al, 2005).

Los FTs WRKY están involucrados en la respuesta a la tolerancia al estrés abiótico y en la señalización de hormonas como el ácido abscísico (Eulgem et al. 2000; Rushton et al. 2010). El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que desempeña un papel clave en la respuesta a estrés abiótico en plantas, como

pueden ser sequía, alta salinidad y cambios en la temperatura. ABA se acumula en las plantas bajo estrés hídrico, promueve el cierre de estomas en células y regula la expresión de genes cuya función es la adaptación a las diferentes condiciones ambientales (Chinnusamy et al, 2004). Además del papel en la respuesta al estrés, el ABA tiene una función fundamental en los estadios de desarrollo como en la maduración y latencia de la semilla (Umezawa et al. 2010).

Líneas mutantes “knockout” de diferentes factores de transcripción WRKY como *Atwrky18*, *Atwrky40* y *Atwrky60* mostraron ser hipersensibles a la aplicación exógena de ABA. Estas mutantes wrky presentaron diversos fenotipos como un lento crecimiento e inhibición de la germinación de la semilla, lo que indica que podrían participar en la regulación negativa de la señalización del ABA (Shang et al, 2010). Por otro lado, se sabe que *AtWRKY40* se une *in vivo* a los promotores de genes involucrados en respuesta a ABA como son los factores de transcripción *ABI4* y *ABI5*, entre otros. (Chen et al. 2010; Liu et al 2012). Otro factor importante es *AtWRKY2* cuya mutación nula tiene como fenotipo problemas en la germinación de la semilla y el crecimiento de la plántula, con la excepción que la mutante no se ve afectada en el cierre estomático (Jiang and Yu, 2009). El análisis de la expresión del gen *AtWRKY2* en líneas insensibles a ABA como *abi5*, *abi3*, *aba2* y *aba3* indican que la acumulación del transcrito *AtWRKY2* durante la germinación y el crecimiento de la plántula requieren de *ABI5*, *ABI3*, *ABA2* y *ABA3*, lo que sugiere un ciclo de autoregulación entre *ABI3*, *ABI5* y *AtWRKY2* (Jiang and Yu, 2009). Se sabe también, que la expresión de *AtWRKY2* es inducida en la presencia de NaCl y manitol; de todos los tejidos se encontró mayor inducción de *AtWRKY2* en las hojas mientras que en las flores y tallos fue donde se encontró una menor expresión de

AtWRKY2 (Jiang and Yu, 2009). Los factores de transcripción WRKY funcionan como componentes importantes en la compleja red de señalización de ABA y en las respuestas de estrés abiótico. Tomando en cuenta el gran número de factores de transcripción tipo WRKY, sus diversos blancos y aún los que faltan por descubrir bajo estímulos ambientales complejos, hace un tema atractivo para la biología molecular de plantas el estudio de los TFs tipo WRKY en la señalización del ABA y en respuesta al estrés, en donde, el conocer cada una de sus funciones y la fina regulación de estos TFs los hace candidatos potenciales para el mejoramiento de cultivos en la agricultura (Chen et al. 2012).

En este trabajo nos dimos a la tarea de caracterizar una línea sobreexpresante del gen *AtWRKY2* (35S::*AtWRKY2*), con el objetivo de analizar su fenotipo bajo la aplicación exógena de la fitohormona ABA, así como bajo estrés salino. Nosotros encontramos que la línea sobreexpresante del gen *AtWRKY2* (Ow2-1) mostró un fenotipo de insensibilidad a ABA en comparación con línea parental Col-0. Además, nosotros observamos que la línea transgénica Ow2-1 fue más tolerante al estrés salino que la línea mutante del gen *AtWRKY2* ($\Delta w2$) y la línea parental Col-0. Por otro lado, cuando evaluamos la expresión tanto en las líneas que sobreexpresan *AtWRKY2* como en la mutante ($\Delta w2$) encontramos que el gen *ABI3* y *ABI5* aumentan su expresión a las 12 y 24 h bajo la aplicación exógena de ABA. En este mismo sentido, cuando evaluamos la expresión de *AtWRKY2* sin la aplicación exógena de ABA en una línea mutante o sobreexpresante del gen *ABI5* vemos que el nivel de expresión de *AtWRKY2* se ve reprimido en ambas líneas lo

cual difiere con lo sugerido en Jiang and Yu 2009, donde *AtWRKY2* requiere de *ABI5*.

Materiales y Métodos

Líneas y condiciones de crecimiento

La línea mutante de *AtWRKY2* (*dw2*) y las líneas transgénicas sobreexpresoras del gen *AtWRKY2* (*Ow*) usadas en este estudio fueron generadas en el ecotipo Columbia 0 (*Col-0*) de *Arabidopsis thaliana*. La línea con la inserción de T-DNA para el gen *AtWRKY2* (*At5g56250*) fue obtenida del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (Alonso et al, 2003). Todas las semillas utilizadas para los experimentos fueron colectadas al mismo tiempo. Las semillas fueron esterilizadas en una solución con 20% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (6% cloro libre) durante 7 minutos, después se realizaron lavados con agua destilada por 5 minutos cinco veces. Las semillas fueron germinadas y crecidas en placas con medio Murashige y Skoog (MS) 0.5X suplementadas con 7g/L phytigel y 1.5% sacarosa (Murashige and Skoog, 1962). Las placas se mantuvieron a 4° C por 48 horas y después se incubaron a 22±2° C por 10 días en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz/8h oscuridad.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de RNA de las líneas *Col-0*, mutante *Atwrky2* y línea sobreexpresora *Ow2-1* se realizó utilizando el reactivo Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -70° C hasta los análisis posteriores. Para remover el DNA genómico, las muestras de RNA se trataron con DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Generación de la líneas de Arabidopsis que sobreexpresan el factor de transcripción WRKY2

Se adquirió el plásmido pENTR-sfi 223.1 que contiene el marco de lectura abierto del gen *AtWRKY2* (At5g56270) de *Arabidopsis thaliana*, (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu>). Con esta construcción se realizó una recombinación sitio específica al plásmido destino pMDC32 (Curtis and Grossniklaus, 2003) usando Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* fue transformada por electroporación con el plásmido pMDC32-*AtWRKY2*, y esta cepa se utilizó para transformar plantas de *A. thaliana* WT (Col-0) por el método floral dip (Zhang et al., 2006). Las líneas transgénicas (35S::*AtWRKY2*) fueron seleccionadas en medio MS 0.5X suplementado con 50 mg/mL de higromicina. La generación T2 de las plantas transgénicas fue transferida a macetas con tierra y se crecieron en cámaras de crecimiento en condiciones controladas para producir semillas. La generación T3 de las plantas transgénicas se creció en macetas con mezcla Sunshine comercial mezcla #3: vermiculita: perlita (3:1:1) en condiciones de crecimiento controladas. Las líneas homocigotas (T3) fueron usadas para los ensayos de germinación de semillas y los ensayos de estrés en plántula.

RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) de la expresión de ABI3, ABI5 y WRKY2 en la presencia de ABA

Se obtuvo RNA total de *A. thaliana* de plántulas como se describió previamente, el cual fue usado para los ensayos de qRT-PCR. Para remover la posible contaminación de DNA se usó DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La concentración de RNA se midió en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-

Vis (NanoDrop Technologies) antes y después del tratamiento con DNase I. La síntesis de cDNA y el análisis por qRT-PCR fue realizado usando el ensayo de un solo paso Power SYBR Green RNA to CT One-Step Kit (Applied Biosystems, USA). Para cada muestra de RNA, tres replicas biológicas fueron analizadas con sus respectivas réplicas técnicas. El gen *ubiquitin 5 (UBQ5)* fue usado como control de expresión. Los niveles de expresión de los genes *ABI3* y *ABI5* bajo tratamientos exógenos de ABA fueron realizados en plántulas de *A. thaliana* con 12 días de edad. Las plántulas fueron transferidas a medio MS 0.5X líquido suplementado con ABA (0.3, 3 y 10 μM) por 12 y 24 h. Los oligonucleótidos utilizados para este experimento se encuentran listados en la Tabla 1.

Ensayo de germinación bajo estrés salino y tratamiento con hormonas.

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* Col-0, mutante nula de *AtWRKY2*, la línea sobreexpresora *35S::AtWRKY2* (Ow2-1), mutante nula de *Atabi5* y sobreexpresora *35S::AtABI5* (OA5-8) fueron germinadas bajo diferentes tratamientos. El efecto del estrés salino en la germinación fue evaluado en medio MS 0.5X suplementado con NaCl 0, 150 y 175 mM. Para evaluar el efecto con tratamiento con ABA, las semillas fueron germinadas en presencia de ABA (0, 0.1, 1, 1.5 y 3 μM). Los ensayos de germinación se realizaron con 15 semillas por tratamiento. Las semillas germinaron y crecieron verticalmente en cajas Petri y se contó cuando la radícula había emergido de la semilla. Adicionalmente se contaron el número de cotiledones verdes después de 10 días en los tratamientos con ABA y NaCl. Los datos corresponden al promedio ($n=15$) de siete réplicas biológicas. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces y dieron resultados similares.

Análisis estadístico

Los datos presentados en este trabajo fueron examinados mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de Tukey utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Los datos representan la desviación estándar ($n=5$). Los datos que difieren de $p=0.05$ fueron considerados como significativos.

Resultados

Generación de líneas sobreexpresantes del factor de transcripción *AtWRKY2* en *Arabidopsis*.

Uno de los factores de transcripción tipo WRKY que se ha propuesto que participa en la regulación de la ruta de señalización de la fitohormona ácido abscísico (ABA) es el factor *WRKY2*. Para estudiar el papel del factor de transcripción *AtWRKY2* en la vía del ABA, nosotros generamos líneas sobreexpresantes de *Arabidopsis* del gen *AtWRKY2*, bajo el promotor constitutivo 35S (ver Materiales y Métodos). Después de obtener diversas líneas transgénicas 35S::*AtWRKY2*, nos dimos a la tarea de cuantificar los niveles de expresión del gen *AtWRKY2* en dichas líneas transgénicas mediante qRT-PCR. Se observó que para todas las líneas sobreexpresantes generadas un aumento en el nivel de expresión del gen *AtWRKY2* en comparación con la línea parental Col-0 y la mutante nula *wrky2* (Figura 2). Para el caso de la línea 35S::*AtWRKY2*-5 (OW2-5) se obtuvo un aumento en la expresión de 30 veces, para las líneas 35S::*AtWRKY2*-2 (OW2-2) y 35S::*AtWRKY2*-9 (OW2-9) el incremento fue de 18 veces, y finalmente para las líneas 35S::*AtWRKY2*-8 (OW2-8) y 35S::*AtWRKY2*-1 (OW2-1) el aumento fue de 16 y 6 veces, respectivamente.

Análisis de sensibilidad a la fitohormona ABA en la germinación de la línea sobreexpresante 35S::*AtWRKY2*-1

Dada la importancia de la fitohormona ABA en el desarrollo y la respuesta al estrés en las plantas, nosotros llevamos a cabo un ensayo de germinación bajo diferentes concentraciones de ABA con la línea sobreexpresante del gen *AtWRKY2* (OW2-1) para determinar el grado de tolerancia o sensibilidad al ABA de esta

sobreexpresante. Para ello, semillas de la línea sobreexpresante OW2-1, de la parental Col-0, y de una línea mutante insercional de T-DNA del gen *AtWRKY2* ($\Delta w2$) se colocaron en cajas Petri en medio MS con ABA 0, 0.1 μM , 1 μM , 1.5 μM y 3 μM . Además en estos análisis se incluyeron la línea mutante del gen *Abi5* (*abi5*) y la línea sobreexpresante del gen *ABI5* (OA5-8), donde la línea mutante *abi5* presenta un fenotipo de insensibilidad, al contrario de sobreexpresante *ABI5* (OA5-8) que es hipersensible a ABA. Para todos los ensayos se evaluaron siete réplicas (n=7), y con esos datos se calculó el porcentaje de germinación al día 4 (Figura 3). Cuando las semillas fueron germinadas en MS a la concentración más alta de ABA (3 μM), encontramos diferencias estadísticamente significativas, al día 4 se observó que la línea sobreexpresante 35S::*AtWRKY2*-1 presentó la mayor tasa de germinación con un 94.2%, siendo la línea que mostró una mayor insensibilidad al ABA, seguida de la línea *abi5* (62.8%), con respecto a la parental Col-0. Respecto a la línea mutante $\Delta w2$ y OA5-8 no presentaron diferencias estadísticas en comparación a la Col-0, a la concentración de 3 μM de ABA a los 4 días.

Además, se determinó el número de cotiledones verdes de cada placa al día 10 del ensayo de germinación registrando las fotografías y analizándolas con el programa ImageJ. En la Figura 4, se puede observar diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones de ABA 1.5 y 3 μM . A la concentración de 1.5 μM de ABA, las líneas que mostraron mayor porcentaje de cotiledones verdes fueron la sobreexpresante de *WRKY2* (OW2-1) y la mutante *abi5*. En el mismo sentido, estas dos líneas fueron las que obtuvieron el mayor porcentaje de cotiledones verdes a la concentración más alta de ABA (3 μM), en donde la línea

OW2-1 logró un 44.7%, y la línea *abi5* un 73.3%, en comparación a la línea parental Col-0 que solo obtuvo un 20.9% (Figura 4).

Con base en los resultados anteriores, nosotros podemos concluir que la línea sobreexpresante del gen *WRKY2* (OW2-1) mostró un fenotipo de insensibilidad al ABA en la germinación y en el desarrollo de la plántula, por el contrario la línea mutante $\Delta w2$ que mostró un comportamiento similar al de la línea parental Col-0.

Evaluación de la línea sobreexpresante Ow2-1 del gen WRKY2 bajo estrés salino.

Para determinar el papel del factor de transcripción *WRKY2* en salinidad, se realizaron ensayos de germinación bajo estrés salino. Las semillas estratificadas de Col-0, la línea mutante $\Delta w2$, la línea sobreexpresante Ow2-1, la línea mutante *abi5* y la línea sobreexpresante del gen *ABI5* (OA5-8) fueron transferidas a medio MS, MS con NaCl 150 mM, y MS con NaCl 175 mM. En la Figura 5, se muestran los datos de germinación al día 5, en donde podemos observar que a las concentraciones más altas de NaCl, la línea sobreexpresante Ow2-1 presentó el mayor porcentaje de germinación, por ejemplo con NaCl 175 mM alcanzó el 65.5% de germinación.

Respecto a los cotiledones verdes, se registró el conteo al día 10 del ensayo de germinación, y se analizaron las fotos con el programa ImageJ. Todas las líneas en ambas concentraciones de NaCl (150 y 175mM), casi no mostraron cotiledones verdes debido al daño que presentaron por efecto de las concentraciones de la sal, excepto la línea *abi5* a la concentración más baja de NaCl 150 mM con un 43.8% (Figura 6). La sobreexpresión del gen *WRKY2* generó una mayor tolerancia al estrés

salino en la germinación de las semillas de la línea Ow2-1, en comparación con las líneas mutantes $\Delta w2$ así como la Col-0.

Evaluación de plántulas de la línea sobreexpresante del gen WRKY2 en altas concentraciones de ABA.

Después de la caracterización de la línea sobreexpresante de *WRKY2* en los ensayos de germinación, se realizaron ensayo con plántulas para evaluar el efecto en el desarrollo a altas concentraciones de ABA. Para ello, se tomaron plántulas de las líneas Col-0, la línea mutante $\Delta w2$, la línea sobreexpresante Ow2-1, la línea mutante *abi5* y la línea sobreexpresante del gen *ABI5*, las cuales se crecieron 10 días en medio MS y después fueron transferidas 3 plantas de cada línea a medio MS, MS con ABA 50 μM y 100 μM . Después de 12 días se registraron fotografías de las placas y se tomó el peso de cada línea en grupos de 3 plantas (Figura 7). Para cada ensayo se realizaron siete réplicas ($n=7$). El peso de cada una de las líneas en los diferentes tratamientos MS y MS con ABA 50 μM fue similar, y no hubo diferencias estadísticas significativas, excepto a la concentración más alta de ABA 100 μM las líneas mutante y sobreexpresante del gen *WRKY2* mostraron un peso menor en comparación con las líneas Col-0, mutante *abi5* y OA5-8. El tratamiento exógeno de ABA 100 μM en las líneas mutante y sobreexpresante del gen *WRKY2* mostró un efecto negativo similar en el crecimiento de plántulas de 10 días de ambas líneas (Figura 7).

Nivel de expresión de los genes ABI3 y ABI5 en las líneas Col-0, mutante nula wrky2 y la sobreexpresante Ow2-1 de Arabidopsis.

Previamente se había reportado el papel de *WRKY2* en la ruta de señalización de ABA, empleando la mutante insercional de T-DNA *wrky2*. Por lo que decidimos

analizar la expresión de genes clave que codifican para factores de transcripción como *ABI3* y *ABI5* en las líneas sobreexpresante de *WRKY2* (Ow2-1) y en la mutante *wrky2*, para determinar que efecto tiene la sobreexpresión y pérdida de función de este factor de transcripción Wrky2.

El patrón de expresión se evaluó por el método de qRT-PCR en plántulas de 10 días de las líneas Col-0, la mutante *wrky2* y la línea sobreexpresante Ow2-1, las cuales fueron transferidas a medio MS, MS + ABA 0.3 μM , 3 μM y 10 μM durante 12 y 24 h (Figura 8).

A las 12 h de todos los tratamientos con ABA, se observó una represión del gen *ABI3* en la línea mutante *wrky2* y sobreexpresante Ow2-1 en comparación con la línea Col-0, excepto a la concentración de ABA 10 μM en donde hubo una inducción para la sobreexpresante Ow2-1. De igual manera, a las 24 h la línea sobreexpresante Ow2-1 mostró un aumento en la expresión de *ABI3* en MS y a las concentraciones de ABA de 0.3 μM y 10 μM , y la línea mutante *wrky2* tuvo una disminución de *ABI3* a 10 μM de ABA en comparación con la línea parental Col-0 (Figura 8).

En el caso de los niveles de expresión del gen *ABI5* a las 12 h para los tratamientos con de ABA 3 y 10 μM las líneas mutante *wrky2* y sobreexpresante Ow2-1 mostraron una represión de *ABI5*, en comparación a la Col-0. A las 24h, para las líneas mutante y sobreexpresante de *WRKY2* observamos represión en MS, y con 3 μM de ABA, pero a las concentraciones de ABA 0.3 y 10 μM mostraron un aumento en la expresión de *ABI5*, en comparación con la línea Col-0 (Figura 8).

Nivel de expresión del gen WRKY2 en la línea mutante abi5 y línea sobreexpresante ABI5 (OABI5)

Nuestro siguiente paso fue cuantificar la expresión del gen *WRKY2* en la línea sobreexpresante OABI5-8 y la mutante *abi5*, en plántulas de 15 días en medio MS. Encontramos que el gen *WRKY2* se encuentra reprimido 1.75 veces en la línea mutante del gen *abi5* en comparación con Col-0 y en la línea sobreexpresante OABI5-8, *WRKY2* se encuentra reprimido 3.26 veces en comparación con Col-0.

Discusión

Debido al papel que juega la fitohormona ABA en el desarrollo y respuesta al estrés abiótico en plantas, se han realizado diversos esfuerzos para caracterizar genes implicados en la vía de señalización para esta hormona, en donde se ha reportado que el factor de transcripción ABI3 es un regulador clave de la ruta de señalización del ABA. Sin embargo, poco se conoce de otros factores de transcripción que puedan modular la expresión de ABI3, tal es el caso del factor de transcripción WRKY2, el cual se tiene un reporte donde se propone que en *Arabidopsis* puede regular la expresión de ABI3 (Jiang and Yu, 2009). Los autores describieron que la mutante nula del gen *AtWRKY2* presenta un retraso en la germinación y en el crecimiento de la plántula bajo la aplicación exógena de ABA.

En este estudio nosotros reportamos que la línea OW2-1 sobreexpresante del gen *WRKY2* mostró insensibilidad a la aplicación exógena de ABA, tanto en la germinación como en el desarrollo de la plántula, en donde incluso a 3 μ M de ABA mostró mayor porcentaje de germinación que la línea mutante *abi5*. Estos datos concuerdan con lo descrito por Jiang and Yu 2009, en donde ellos proponen que *WRKY2* es un represor de *ABI3*.

Interesantemente, nosotros observamos que plántulas de las líneas mutante y sobreexpresante del gen *WRKY2* cuando se crecieron bajo un tratamiento de ABA 100 μ M mostraron una reducción en su peso fresco, por lo que la aplicación de altas concentraciones de la fitohormona ABA mostraron un efecto negativo tanto en la mutante como en la sobreexpresante del gen *WRKY2*.

Cuando analizamos la expresión del factor de transcripción *ABI3* en los fondos mutantes *wrky2* y sobreexpresante *Ow2-1*, observamos una tendencia de aumento en la expresión del gen *ABI3* en la línea sobreexpresante, en particular a la concentración más alta de ABA a las 12 y 24h. En relación al gen *ABI5*, identificamos un aumento en su expresión en ambos fondos, mutante y sobreexpresante a las 24h a las concentraciones de ABA 0.3 y 10 μ M. Lo anterior, nos sugiere que la ganancia y/o pérdida de función de un factor de transcripción como el *WRKY2* desregula a factores de transcripción de la vía de señalización del ABA.

Además, nosotros analizamos la expresión del gen *WRKY2* sin la aplicación exógena de ABA en las líneas mutante y sobreexpresante de *ABI5*, en donde observamos una represión en ambos fondos, aunque la represión fue mayor en la línea sobreexpresante *OABI5*. Esto podría sugerir un control de *ABI5* sobre *AtWRKY2* en condiciones normales de crecimiento. Por otro lado, Jiang and Yu (2009) describieron que el gen *WRKY2* se reprime en el fondo mutante *abi5* bajo la aplicación exógena de ABA, sugiriendo una regulación positiva que ejercería el factor de transcripción *ABI5* sobre *WRKY2* en condiciones de adición de ABA, en donde los autores proponen que *WRKY2*, *ABI3* y *ABI5* podrían estar regulados mutuamente.

Cuando la planta se encuentra bajo estrés hídrico, el cual está asociado a una alta salinidad, se afecta el desarrollo, la supervivencia y la productividad de las plantas; se ha reportado que los transcritos de dos factores de transcripción tipo *WRKY* como los genes *AtWRKY25* y *AtWRKY33*, los cuales están altamente relacionados a este tipo de estrés, incrementan su expresión en tratamientos con NaCl y bajo

sequía. Además, las mutantes nulas *atwrky33* y mutantes dobles *atwrky25/atwrky33* son más sensibles a tratamientos con NaCl (Jiang and Deyholos 2009, Li et al. 2011). En este sentido, nosotros observamos que en el caso de líneas transgénicas que sobreexpresan el gen *AtWRKY2*, mostraron un mayor porcentaje de germinación bajo la aplicación exógena de altas concentraciones de NaCl; lo anterior concuerda con lo reportado por Jiang and Yu (2009), en donde describen que el gen *AtWRKY2* se induce con la aplicación de NaCl y manitol.

Los factores de transcripción del tipo WRKY participan como componentes importantes en la compleja red de señalización de ABA y en las respuestas de estrés abiótico. A pesar de que es un reto descubrir el papel que juegan estos factores de transcripción en la respuesta al estrés, nuestro estudio aporta información valiosa respecto la línea sobreexpresante del gen *WRKY2* mostrando una mayor tolerancia al estrés salino y a la aplicación exógena de ABA.

Referencias

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657
- Chen H, Lai Z, Shi J, Xiao Y, Chen Z, and Xu X. 2010. “Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress.” *BMC Plant Biology* 10 (1): 281. doi:10.1186/1471-2229-10-281.
- Chen L, Yu S, Li S, Zhang L, Zou C, and Yu D Q. 2012. “The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses.” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819 (2). Elsevier B.V.: 120–28. doi:10.1016/j.bbagr.2011.09.002.
- Chinnusamy V, Schumaker K, and Zhu J K. 2004. “Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants.” *Journal of Experimental Botany* 55 (395): 225–36. doi:10.1093/jxb/erh005.
- Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl R P, and Somssich I E. 2008. “Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function.” *Plant Molecular Biology* 68 (1–2): 81–92. doi:10.1007/s11103-008-9353-1.
- Curtis MD, Grossniklaus U. 2003. A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Plants. *Plant Physiology*. 133(2):462-469. doi:10.1104/pp.103.027979.
- Duan M, Nan J, Liang Y, Mao P, Lu L, Li L, Wei C, Lai L, Li Y, and Su X. 2007. “DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of arabidopsis

- thaliana WRKY1 protein." *Nucleic Acids Research* 35 (4): 1145–54. doi:10.1093/nar/gkm001.
- Eulgem T, Rushton P, Robatzek S, and Somssich I E. 2000. "The WRKY superfamily of plant transcription factors." *Trends in Plant Science* 5 (5): 199–206. doi:10.1016/S1360-1385(00)01600-9.
- Guo A, He K, Liu D, Bai S, Gu X, Wei L, and Luo J. 2005. "DATF: A database of arabidopsis transcription factors." *Bioinformatics* 21 (10): 2568–69. doi:10.1093/bioinformatics/bti334.
- Jiang W, and Yu D. 2009. "Arabidopsis WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid." *BMC Plant Biology* 9: 96. doi:10.1186/1471-2229-9-96.
- Jiang W, and YU D. 2009. "Arabidopsis WRKY 2 transcription factor may be involved in osmotic stress response." *Acta Botanica Yunnanica* 31 (5): 427–432.
- Jiang Y, and Deyholos M K 2009. "Functional characterization of arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses." *Plant Molecular Biology* 69 (1–2): 91–105. doi:10.1007/s11103-008-9408-3.
- Li S, Fu Q, Chen L, Huang W, and Yu D. 2011. "Arabidopsis thaliana WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance." *Planta* 233 (6): 1237–52. doi:10.1007/s00425-011-1375-2.
- Li S, Fu Q, Huang W, and Yu D. 2009. "Functional analysis of an arabidopsis transcription factor WRKY25 in heat stress." *Plant Cell Reports* 28 (4): 683–93. doi:10.1007/s00299-008-0666-y.
- Li S, Zhou X, Chen L, Huang W, and Yu D. 2010. "Functional characterization of arabidopsis thaliana WRKY39 in heat stress." *Molecules and Cells* 29 (5): 475–

83. doi:10.1007/s10059-010-0059-2.

Liu Z-Q, Yan L, Wu Z, et al. Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(18):6371-6392. doi:10.1093/jxb/ers293.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, and Shen Q J. 2010. “WRKY transcription factors.” *Trends in Plant Science* 15 (5). Elsevier Ltd: 247–58. doi:10.1016/j.tplants.2010.02.006.

Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q and Wu FQ. 2010. “The Mg-Chelatase H subunit of arabidopsis antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition.” *The Plant Cell* 22 (6): 1909–35. doi:10.1105/tpc.110.073874.

Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. 2010. “Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport.” *Plant and Cell Physiology* 51 (11): 1821–39. doi:10.1093/pcp/pcq156.

Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki M, Yabuki T and Aoki M. 2005. “Solution structure of an arabidopsis WRKY DNA binding domain.” *The Plant Cell* 17 (3): 944–56. doi:10.1105/tpc.104.026435.

Zhang Y, and Wang L. 2005. “The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants.” *BMC Evolutionary Biology* 5: 1.

doi:10.1186/1471-2148-5-1.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006).

“Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method”. *Nature protocols*, 1(2), 641-646.

Tablas

Tabla 1. Tabla de oligonucleótidos empleados en qRT-PCR

Sitio de hibridación	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>ABI3</i>	ABI3 Fw	CACAGCCAGAGTTCCTTCCTT
	ABI3 Rv	ATGTGGCATGGGACCAGACT
<i>ABI5</i>	ABI5 Fw	GGAGGTGGCGTTGGGTTTG
	ABI5 Rv	GTTATCCACTTGTCCATGTCC
<i>UBQ5</i>	UBQ5 Fw	TCGACGCTTCATCTCGTCCT
	UBQ5 Rv	CGCTGAACCTTTCCAGATCC
<i>WRKY2</i>	WRKY Fw	GTGTTTCTTTGGGTTACGATGG
	WRKY Rv	GCACAACAACCTTTGGCTC

Figuras

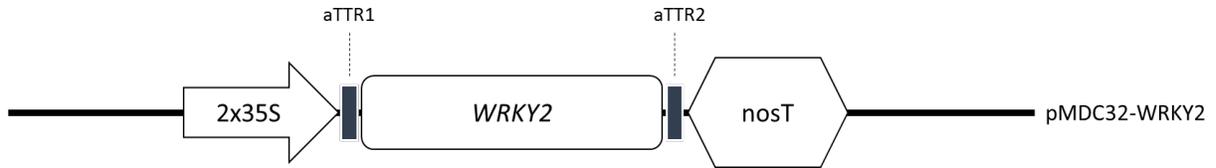


Figura 1. Esquema del plásmido pMDC32-WRKY2.

La secuencia codificante del gen *WRKY2* fue insertada a través de los sitios de recombinación aTTR1 y aTTR2 quedando flanqueada por un promotor 2x35S y el terminador *NOS*. Esto generó el plásmido pMDC32-WRKY2 que fue utilizado para generar plantas sobreexpresantes del gen *WRKY2*.

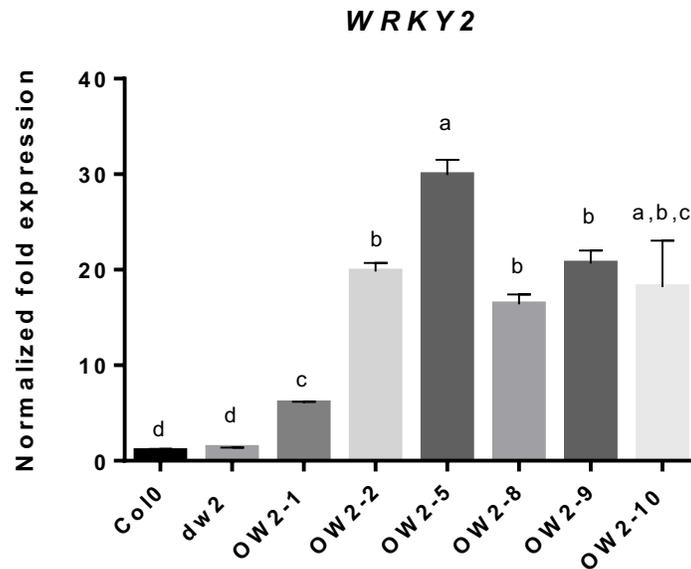


Figura 2. Nivel de expresión de WRKY2 en líneas Col-0, mutante wrky2 y sobreexpresantes WRKY2 (OW).

Se utilizaron plántulas de 10 días en medio MS fueron usadas. El nivel de expresión de WRKY2 fue determinada con qRT-PCR utilizando SYBR Green. Los datos están expresados como mRNA relativo comparado con la línea Col-0 y fueron normalizados usando el gen *ubiquitin 5* de *A. thaliana*. Las barras representan el promedio (n=3). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).

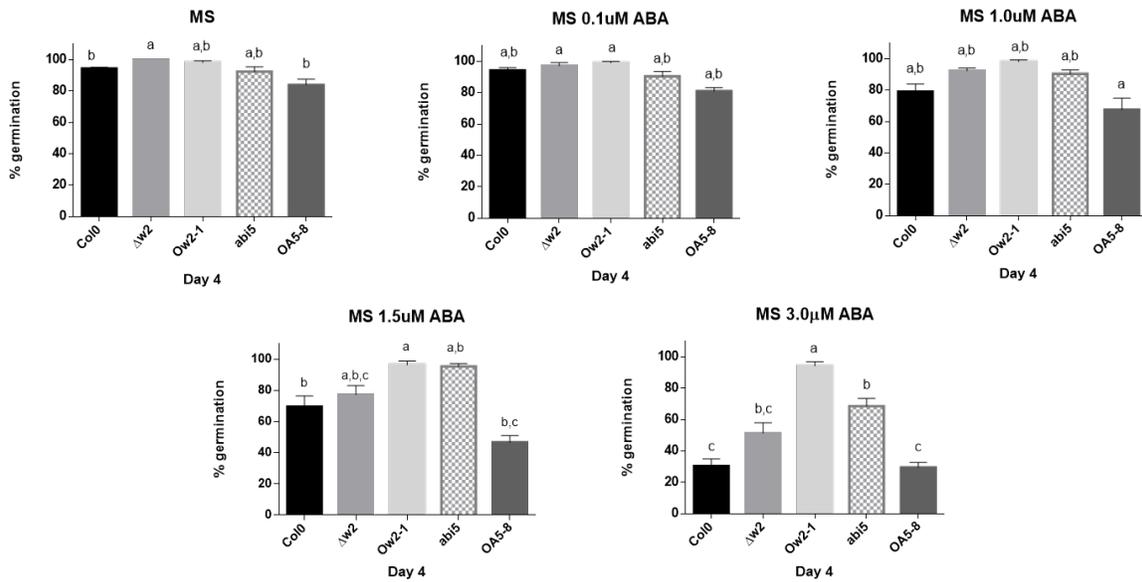


Figura 3. Sensibilidad al ABA en la germinación de las líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2.

A. Ensayo de germinación. Semillas estratificadas fueron transferidas a medio MS, MS+ABA 0.1 μ M, MS+ ABA 1 μ M, MS+ ABA 1.5 μ M y MS+ ABA 3 μ M; los porcentajes de germinación mostrados corresponden al día 4 del ensayo. Los datos mostrados son el promedio (n=7). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p<0.05$).

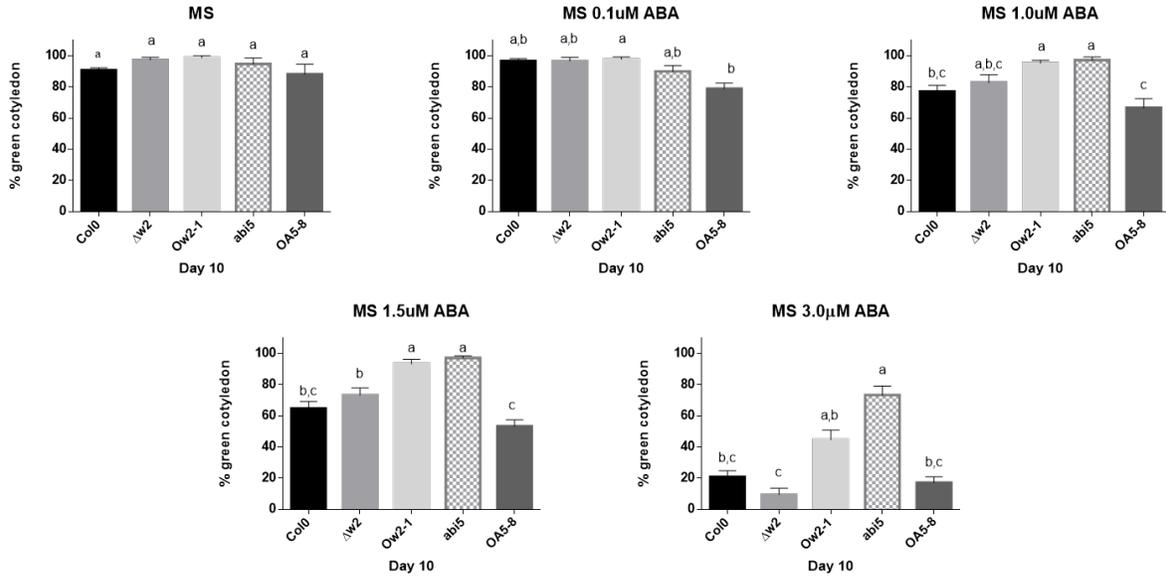


Figura 4. Análisis de cotiledones verdes en las líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2 bajo tratamientos de ABA.

La cuenta de cotiledones se realizó el día 10 del ensayo de germinación. Se muestran los porcentajes de cada línea en cada tratamiento. Los datos mostrados son el promedio (n=7). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).

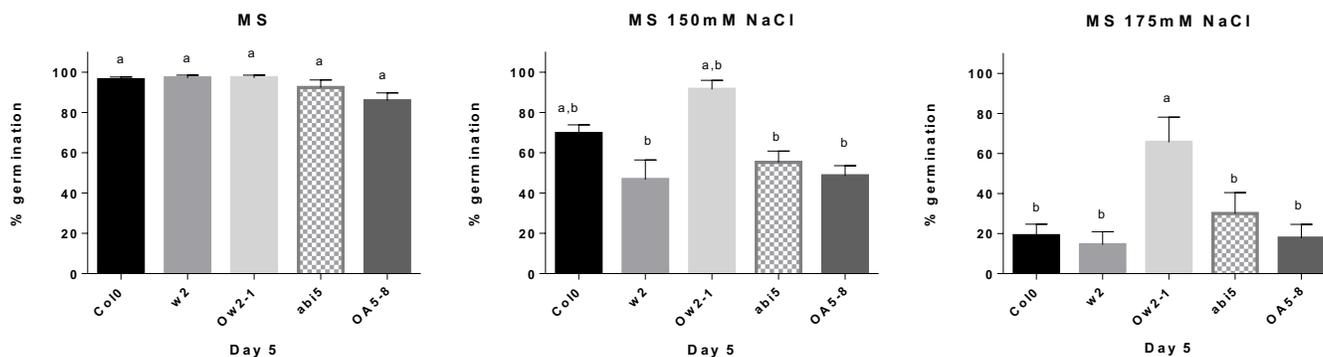


Figura 5. Sensibilidad a estrés salino en la germinación de las líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2

Ensayo de germinación. Semillas estratificadas fueron transferidas a medio MS, MS+ NaCl 150 mM y MS+ NaCl 175 mM; los porcentajes de germinación mostrados corresponden al día 5 del ensayo. Los datos mostrados son el promedio (n=7). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).

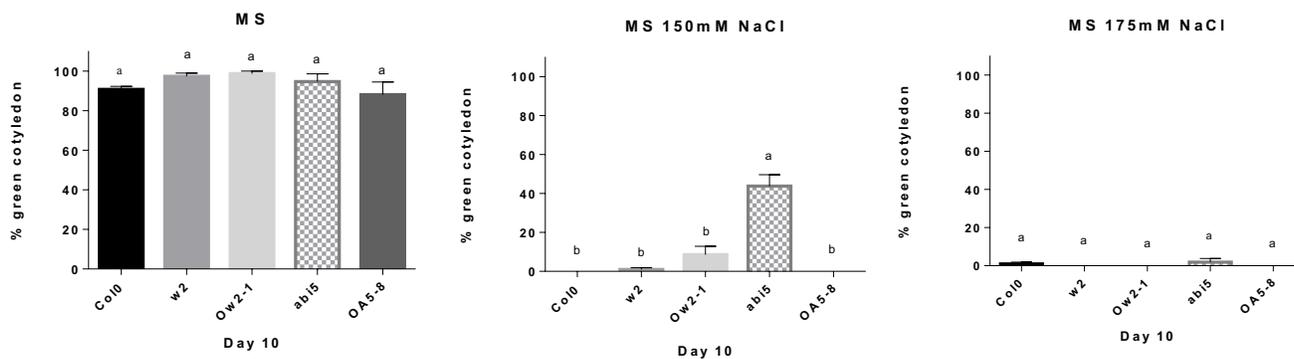


Figura 6. Análisis de cotiledones verdes de las líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2 en respuesta al estrés salino.

El cálculo del porcentaje cotiledones verdes se realizó el día 10 del ensayo de germinación. Se muestran los porcentajes de cada línea en cada tratamiento. Los datos mostrados son el promedio (n=7). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).

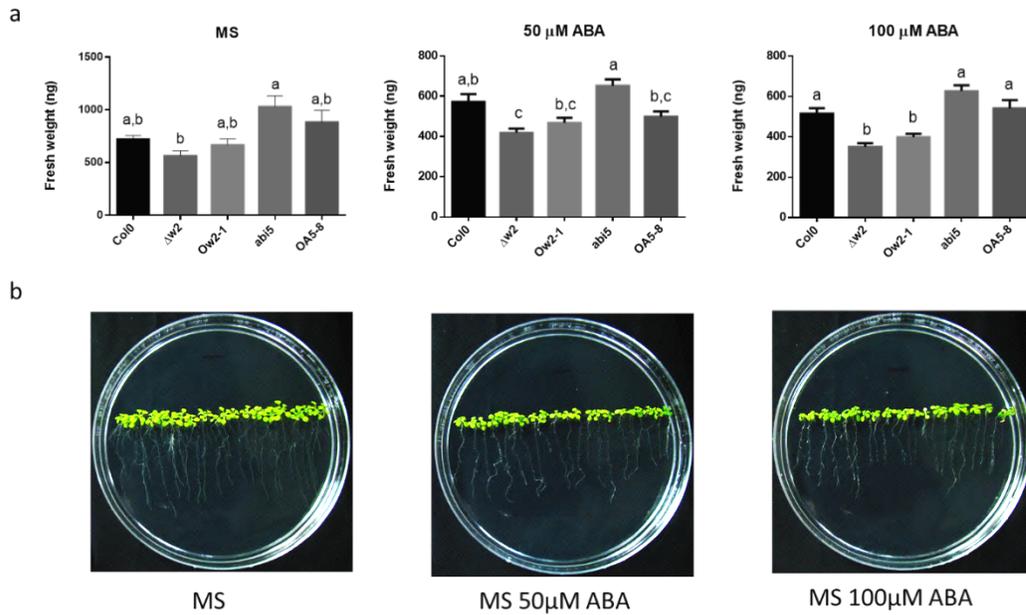


Figura 7. Sensibilidad a ABA en plántulas de líneas mutantes y líneas sobreexpresantes de WRKY2.

a. Se transfirieron plántulas de 10 días de las diferentes líneas fueron transferidas (3 plántulas por línea) a medio MS, MS+ ABA 50 μ M y 100 μ M. Después de 12 días de los tratamientos, se pesaron las plántulas (en grupos de 3 plántulas). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$). **b.** Comparación fenotípica de las diferentes líneas 12 días después de los tratamientos.

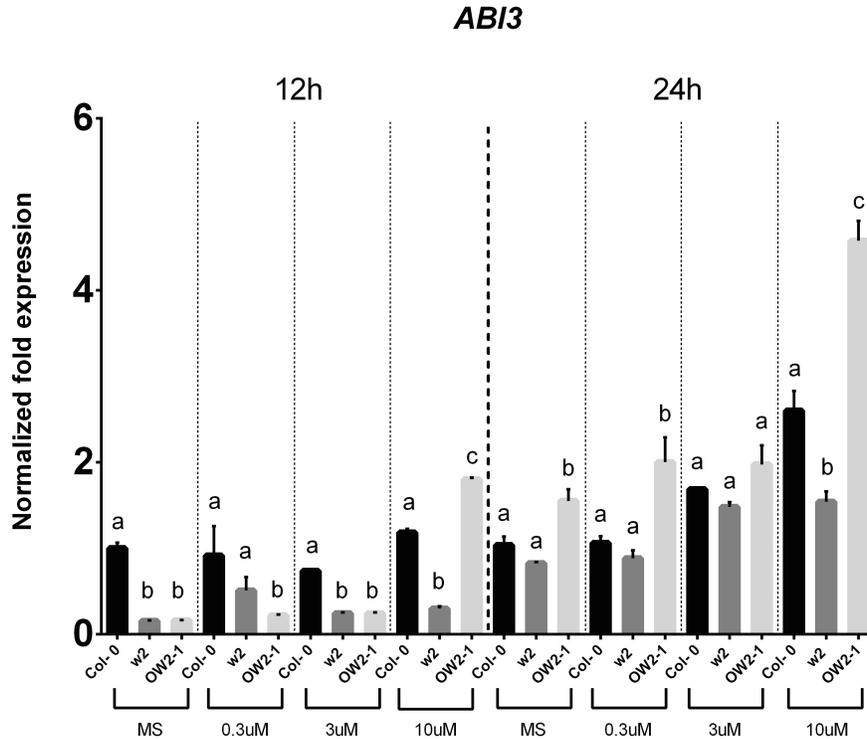


Figura 8. Nivel de expresión de *ABI3* en las líneas *Col-0*, mutante *wrky2* y sobreexpresante *WRKY2* bajo diferentes tratamientos de ABA a 12 y 24 h.

Plántulas de 10 días de las líneas *Col-0*, mutante *wrky2* y sobreexpresante *WRKY2* fueron transferidas a medio MS, MS + ABA 0.3 μ M, 3 μ M y 10 μ M. El análisis se llevo a cabo a las 12 y 24 horas. El nivel de expresión de *ABI3* fue determinada con qRT-PCR usando SYBR Green. Los datos están expresados como mRNA relativo comparado con *Col-0* y fueron normalizados usando el gen *ubiquitin 5* de *A. thaliana*. Las barras representan el promedio (n=3). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).

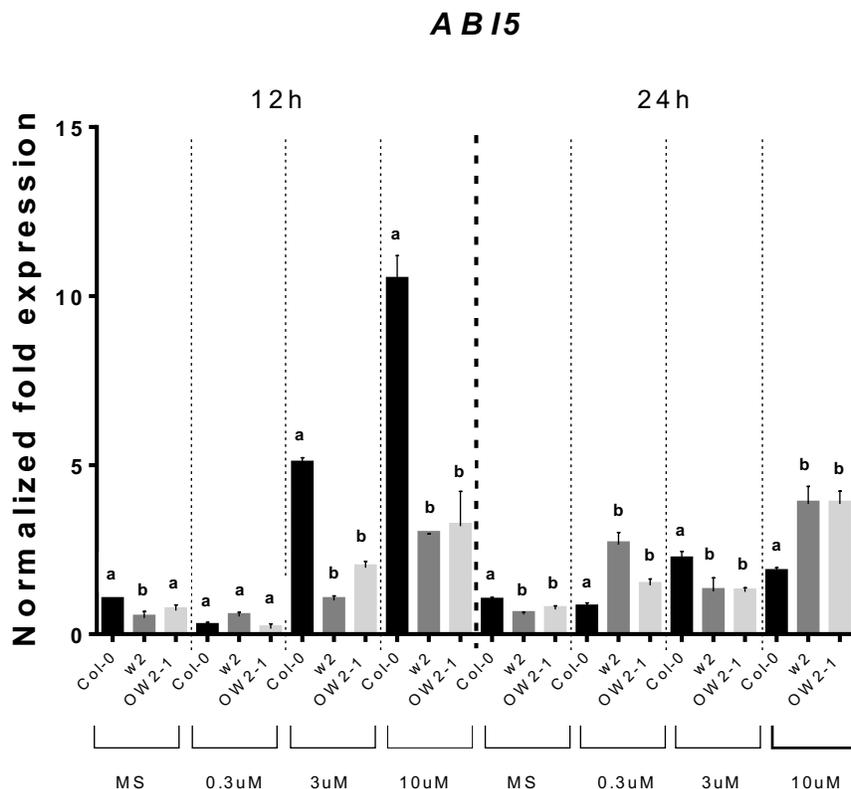


Figura 9. Nivel de expresión de ABI5 en las líneas Col-0, mutante *wrky2* y sobreexpresante *WRKY2* bajo diferentes tratamientos de ABA a 12 y 24 horas.

Plántulas de 10 días de las líneas Col-0, mutante *wrky2* y sobreexpresante *WRKY2* fueron transferidas a medio MS, MS + ABA 0.3 μ M, 3 μ M y 10 μ M. El análisis se llevo a cabo a las 12 y 24 h. El nivel de expresión de *ABI5* fue determinada con qRT-PCR usando SYBR Green. Los datos están expresados como mRNA relativo comparado con Col-0 y fueron normalizados usando el gen *ubiquitin 5* de *A. thaliana*. Las barras representan el promedio (n=3). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).

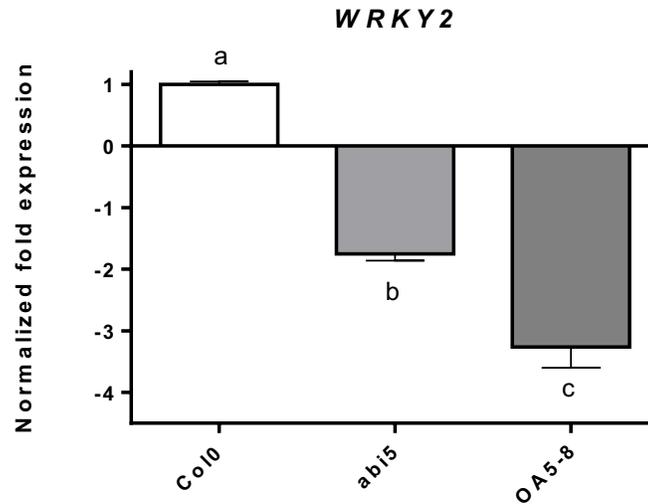


Figura 10. Nivel de expresión de WRKY2 en Col-0, mutante *abi5* y sobreexpresante OA5-8.

Plántulas de 15 días de las líneas Col-0, mutante *abi5* y sobreexpresante OA5-8 en medio MS. El nivel de expresión de *WRKY2* fue determinado con qRT-PCR usando SYBR Green. Los datos están expresados como mRNA relativo comparado con Col-0 y fueron normalizados usando el gen *ubiquitin 5* de *A. thaliana*. Las barras representan el promedio (n=3). Las letras sobre las barras indican la diferencia significativa mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ($p < 0.05$).