



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FILOGENÉTICA
DE GENES DE LA FAMILIA WRKY DE PLÁTANO
RELACIONADOS CON LA RESPUESTA AL ESTRÉS
BIÓTICO**

Tesis que presenta

SERGIO GARCÍA LAYNES

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

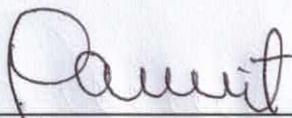
4 de julio de 2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Sergio García Laynes**, titulado "Caracterización estructural y filogenética de genes de la familia WRKY de plátano relacionados con la respuesta al estrés biótico", fue realizado en los laboratorios de Microalgas y Cultivos Tropicales, en la línea de Agrobiotecnología de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 6 de junio de 2018.

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 de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



I.B.Q. Sergio García Laynes

AGRADECIMIENTOS:

A mi asesor de tesis, Dr. Santy Peraza Echeverria, por la confianza que depositó en mí, por guiarme, aconsejarme y apoyarme a lo largo de este proyecto. Quiero agradecer su esfuerzo perseverante por ayudarme a cumplir este objetivo. Me siento afortunado de formar parte de su grupo de investigación.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Santy Peraza Echeverria, la Dra. Virginia Herrera Valencia y el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por sus comentarios y sugerencias que fueron imprescindibles en este trabajo.

A la Unidad de Biotecnología y al Laboratorio de Microalgas y Cultivos Tropicales, por el espacio y los equipos proporcionados en el proceso.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por la infraestructura y los servicios prestados durante mi estadía.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por financiar mi educación con la beca de maestría No. 252964. Y por el financiamiento del proyecto de ciencia básica con clave 252964.

A las técnicas del laboratorio Biól. Verónica Limones Briones y QBA. Ileana Borges Argaez, por facilitar los equipos, materiales y reactivos en la etapa experimental y por su amistad.

A todas las amistades que se generaron en este transcurso de tiempo y que han hecho mi estadía más placentera.

DEDICADA:

A Dios y mis padres Federico García Romero y Martha Laynes Valenzuela a quienes debo lo que soy.

Al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar quien me motivo y ayudo a iniciar mi carrera científica.

A mi hermano Federico García Laynes, mis amigos Gilberto Andrés Muñoz Pérez y José Ignacio Laines Hidalgo y, a mi novia Fanny Cámara Tzakún por su apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida.

“La verdadera educación consiste en desarrollar la facultad de pensar y hacer, en educar a los jóvenes para que sean pensadores, y no meros reflectores de los pensamientos de los demás”.

Elena G. Harmon

ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1 GENERALIDADES DEL PLÁTANO	3
1.1 ORIGEN Y TAXONOMÍA.....	3
1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	4
1.3 LIMITANTES EN LA PRODUCCIÓN.....	6
1.3.1 FACTORES ABIÓTICOS.....	6
1.3.2 FACTORES BIÓTICOS	6
1.4 MANEJO CONVENCIONAL DE LAS ENFERMEDADES DE PLÁTANO	9
1.4.1 GENERACIÓN DE HÍBRIDOS.....	9
1.4.2 CONTROL QUÍMICO	11
1.5 MEJORAMIENTO DEL PLÁTANO MEDIANTE INGENIERÍA GENÉTICA.....	12
1.6 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS	14
1.6.1 INMUNIDAD ACTIVADA POR PAMPs.....	15
1.6.2 INMUNIDAD ACTIVADA POR EFECTORES (ETI).....	16
1.6.3 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR)	16
1.7 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN GENÉTICA EN PLANTAS	19

1.8 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	20
1.9 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY	21
1.9.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN	21
1.9.2 FUNCIONES DE LOS GENES WRKY.....	23
1.9.3 FUNCIÓN EN LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS BIÓTICO	25
1.9.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY EN PLÁTANO.....	28
1.10 JUSTIFICACIÓN	29
1.11 HIPÓTESIS.....	30
1.12 OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	30
1.12.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
1.12.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
CAPÍTULO II.....	33
2.1 INTRODUCCIÓN	33
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
2.2.2 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A <i>OsWRKY45</i> Y <i>AtWRKY70</i> EN EL GENOMA DE PLÁTANO.....	35
2.2.3 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A <i>GSMUA_ACHR3T13440</i> , <i>GSMUA_ACHR7T05200</i> , <i>GSMUA_ACHR7T16090</i> Y <i>GSMUA_ACHR7T19340</i> DE PLÁTANO EN EL PROTEOMA DE <i>A. THALIANA</i>	36
2.2.4 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE PROTEÍNAS	36

2.2.5 PREDICCIÓN DE MOTIVOS Y DOMINIOS.....	36
2.2.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	37
2.2.7 PREDICCIÓN DE ELEMENTOS EN C/S REGULATORIOS DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LAS REGIONES PROMOTORAS	37
2.2.8 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y MAWRKY70.....	37
2.2.9 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	38
2.2.10 EXTRACCIÓN DE ARN.....	39
2.2.11 SÍNTESIS DE ADNc.....	39
2.2.12 AISLAMIENTO DE LOS EXTREMOS 3'UTR Y DE LAS REGIONES CODIFICANTES DE MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y MAWRKY70	40
2.2.13 CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	41
2.2.14 AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	42
2.2.15 SECUENCIACIÓN.....	43
2.2.16 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	43
2.2.17 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN.....	43
2.3 RESULTADOS.....	45
2.3.1 IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LAS SECUENCIAS HOMÓLOGAS A OsWRKY45 Y AtWRKY70 EN PLÁTANO	45
2.3.2 IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A GSMUA_ACHR3T13440, GSMUA_ACHR7T05200, GSMUA_ACHR7T16090 Y GSMUA_ACHR7T19340 EN A. <i>THALIANA</i> . 46	
2.3.3 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS.....	49
2.3.4 PREDICCIÓN DE MOTIVOS Y DOMINIOS DE MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y	

MAWRKY70.....	51
2.3.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS.....	53
2.3.6 REDICCIÓN DE LOS ELEMENTOS REGULATORIOS EN CIS DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	54
2.3.7 MODELAJE POR HOMOLOGÍA DE LA ESTRUCTURA EN 3D DEL DOMINIO WRKY DE MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRK60 Y MAWRKY70	55
2.3.8 EXTRACCIÓN DE ARN.....	57
2.3.9 MAPEO DE LOS EXTREMOS 3' UTRs DE MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y MAWRKY70.....	58
2.3.10 CLONACIÓN DE LOS EXTREMOS 3' UTR MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y MAWRKY70.....	59
2.3.11 MAPEO DE LOS EXTREMOS 3'UTRs DE MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y MAWRKY70.....	60
2.3.12 AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES DE LOS GENES MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y MAWRKY70	65
2.3.13 CLONACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES DE MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y MAWRKY70.....	67
2.3.14 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS REGIONES CODIFICANTES DE MAWRKY18, MAWRKY45, MAWRKY60 Y MAWRKY70.....	69
2.3.15 GENERACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN	82
2.4 DISCUSIÓN.....	84
2.4.1 POSIBLE FUNCIÓN DE MAWRKY45 Y MAWRKY70 EN EL MECANISMO DE DEFENSA DEL PLÁTANO HACIA EL ESTRÉS BIÓTICO.....	84
2.4.2 POSIBLE FUNCIÓN DE MAWRKY18 Y MAWRKY60 EN EL MECANISMO DE DEFENSA DEL PLÁTANO HACIA EL ESTRÉS BIÓTICO.....	88

2.4.3. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES Y LOS EXTREMOS 3'UTR.....	89
2.5 CONCLUSIONES	92
2.6 PERSPECTIVAS.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Clasificación de la familia <i>Musaceae</i>	3
Figura 1.2 Diversidad del plátano.....	4
Figura 1.3 Principales países exportadores de plátano.	5
Figura 1.4 Etapas de desarrollo de la enfermedad de la raya de la hoja negra o Sigatoka negra.	7
Figura 1.5 Aspersión de fungicida sobre una plantación de plátano en el sureste del archipiélago de Filipina en la isla de Mindanao.....	12
Figura 1.6 Transducción de señales del SAR.....	18
Figura 1.7 Transcripción del ADN.	20
Figura 1.8 Estructura del dominio WRKY de miembros representativos de la familia WRKY de <i>A. thaliana</i>	22
Figura 1.9 Múltiples funciones de los factores de transcripción de la familia WRKY.....	24
Figura 1.10 Plantas transgénicas sobre-expresando a <i>OsWRKY45</i> manifiestan alta tolerancia al tizón del arroz.	26
Figura 1.11 Interacciones proteicas entre miembros de la familia WRKY.....	27
Figura 1.12 Estrategia experimental implementada en el presente estudio.	31
Figura 2.1 Estrategia experimental para la subclonación de las ORFs de MaWRKY18 y MaWRKY70 en un vector de expresión derivado de pCAMBIA2200.....	44
Figura 2.2 Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de <i>OsWRKY45</i> , <i>AtWRKY18</i> , <i>AtWRKY 60</i> y <i>AtWRKY70</i> con sus putativos ortólogos en plátano.	50
Figura 2.3 Dominios y motivos estructurales predichos para los FsT WRKY de plátano.	52

Figura 2.4 Filogenia de los factores de transcripción <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> y <i>MaWRKY70</i>	53
Figura 2.5 Elementos regulatorios en <i>cis</i> de las regiones promotoras de la transcripción de los genes <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> y <i>MaWRKY70</i>	55
Figura 2.6 Estructura tridimensional modo cartoon del dominio WRKY.....	56
Figura 2.7 Extracción de ARN total a partir de hojas jóvenes de plátano (<i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pisang kra').....	57
Figura 2.8 Amplificación de los extremos 3' UTRs de los ADNc de <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> y <i>MaWRKY70</i>	59
Figura 2.9 Amplificación por PCR de los extremos 3'UTR de <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> y <i>MaWRKY70</i> clonados en pGEM-T Easy.....	60
Figura 2.10 Alineamiento de la región 3'UTR predicha de <i>MaWRKY18</i> con la región 3'UTR de la clona 18 aislada de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pisang kra'	61
Figura 2.11 Alineamiento de la región 3'UTR predicha de <i>MaWRKY45</i> con la región 3'UTR de la clona 2 aislada de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pisang kra'	62
Figura 2.12 Alineamiento de la región 3'UTR predicha de <i>MaWRKY60</i> con la región 3'UTR de la clona 2 aislada de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pisang kra'	63
Figura 2.13 Alineamiento de la región 3'UTR predicha de <i>MaWRKY70</i> con la región 3'UTR de la clona 2 aislada de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pisang kra'	64
Figura 2.14 Amplificación por PCR de las regiones codificantes de los genes <i>MaWRKY18</i> , <i>45</i> , <i>60</i> y <i>70</i>	66
Figura 2.15 Purificación de los productos de PCR de las regiones codificantes de los genes <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> y <i>MaWRKY70</i>	66
Figura 2.16 Verificación de clonación mediante amplificación por PCR de las regiones	

codificantes de los genes <i>MaWRKY18</i> , <i>45</i> , <i>60</i> y <i>70</i>	68
Figura 2.17 Alineamiento de la secuencia de ADN predicha de <i>MaWRKY18</i> con las secuencias aisladas <i>in vitro</i> ..	72
Figura 2.18 Región codificante y extremo 3'UTR de la secuencia obtenida de <i>MaWRKY18</i> de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pinsag kra'.	73
Figura 2.19 Alineamiento de la secuencia de ADN predicha de <i>MaWRKY45</i> con las secuencias aisladas <i>in vitro</i> ..	75
Figura 2.20 Análisis de la región codificante de <i>MaWRKY45</i>	76
Figura 2.21 Región codificante y extremo 3'UTR de la secuencia obtenida de <i>MaWRKY45</i> de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pinsag kra'..	77
Figura 2.22 Alineamiento de la secuencia de ADN predicha de <i>MaWRKY60</i> con las secuencias aisladas <i>in vitro</i> ..	78
Figura 2.23 Región codificante y extremo 3'UTR de la secuencia obtenida de <i>MaWRKY60</i> de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pinsag kra'..	79
Figura 2.24 Alineamiento de la secuencia de ADN predicha de <i>MaWRKY70</i> con la secuencia aisladas <i>in vitro</i> ..	80
Figura 2.25 Región codificante y extremo 3'UTR de la secuencia obtenida de <i>MaWRKY70</i> de <i>M. acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> 'Pinsag kra'.	81
Figura 2.26 Construcciones de expresión generadas para sobreexpresar el CDS de <i>MaWRKY18</i> y <i>MaWRKY60</i> en <i>Nicotiana benthamiana</i>	82
Figura 2.27 Digestión enzimática de los vectores de expresión.	83

INDÍCE DE TABLAS

Tabla 1.1 Principales enfermedades y plagas del plátano.....	8
Tabla 1.2 Características de híbridos desarrollados por FHIA.....	10
Tabla 1.3 Cultivares transgénicos tolerantes a <i>FOC</i> y <i>M. fijiensis</i>	14
Tabla 2.1 Diseño de oligonucleótidos.....	38
Tabla 2.2 Programa de PCR para la amplificación de las ORFs y los extremos 3'UTR...	40
Tabla 2.3 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software BioEdit usando como referencia la secuencia de aminoácidos de OsWRKY45 y el genoma de <i>M. acuminata</i>	45
Tabla 2.4 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software BioEdit usando como referencia la secuencia de aminoácidos de AtWRKY70 y el genoma de <i>M. acuminata</i>	46
Tabla 2.5 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software de phytozome usando como referencia la secuencia de aminoácidos de GSMUA_Achr3T13440 y el genoma de <i>A. thaliana</i>	47
Tabla 2.6 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software de phytozome usando como referencia la secuencia de aminoácidos de GSMUA_Achr7T05200 y el genoma de <i>A. thaliana</i>	48
Tabla 2.7 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software de phytozome usando como referencia la secuencia de aminoácidos de GSMUA_Achr7T16090 y el genoma de <i>A. thaliana</i>	48
Tabla 2.8 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software de phytozome usando como referencia la secuencia de aminoácidos de GSMUA_Achr7T19340 y el genoma de <i>A. thaliana</i>	49

RESUMEN

El plátano es el fruto tropical más consumido en el mundo, constituye la alimentación básica para 400 millones de personas en las regiones tropicales de Asia y África. Para México y varios países de Latinoamérica representa una fuente de empleos y divisas. Sin embargo, microorganismos patógenos como *Mycosphaerella fijiensis* y *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 4 amenazan con devastar la industria platanera como sucedió en el pasado con la variedad comercial 'Gros Michel'. La disponibilidad pública de la secuencia del genoma de plátano está facilitando la caracterización de genes de interés que puedan conferir resistencia o un alto grado de tolerancia a los cultivares de plátano contra microorganismos virulentos. En este sentido, en el presente trabajo se caracterizaron *in silico* cuatro factores de transcripción de la familia WRKY que fueron nombrados como MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 y MaWRKY70. Los análisis *in silico* proporcionan evidencia sobre su identidad de factores de transcripción y de su posible función en la red de señalización en respuesta al estrés biótico. Se identificaron los dominios WRKY, los sitios de localización nuclear y motivos de fosforilación. El análisis de la región promotora de los genes de estudio sugiere una relación entre las vías hormonales del jasmonato y el ácido salicílico. Se clonaron y secuenciaron las regiones codificantes y los extremos 3'UTR (Unstralated Region) a partir de una variedad silvestre resistente a la Sigatoka negra *Musa acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang Kra' y se validaron los resultados de los análisis obtenidos *in silico*. Finalmente, se realizaron dos construcciones de expresión para *MaWRKY18* y *MaWRKY70* con el fin de validar en un futuro su función en el mecanismo de defensa mediante su sobreexpresión en *Nicotiana benthamiana*.

ABSTRACT

Banana is a staple food for more than 400 million people in developing countries. In Mexico and many other Latin America countries, banana ranks among the most valuable primary agricultural commodities. However, fungal pathogens such as *Mycosphaerella fijiensis* and *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* race 4 threaten to destroy the banana industry. The public availability of the banana genome sequence is facilitating the identification of candidate genes that could be used for the genetic improvement of susceptible cultivars. The WRKY genes are interesting candidates to be used for plant biotechnology purposes since they are implicated in plant immunity. In this regard, this project aims to characterize four transcription factors from the WRKY family of banana. These genes were named as *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70*. *In silico* analysis provided substantial evidence about the proteins encoded by these genes and their possible function in the signal network triggered by pathogen microorganisms. We identified the WRKY domain, the nuclear localization signal and phosphorylation sites, among others. The promoter analysis of these four banana WRKY genes showed a possible crosstalk with the hormonal pathways jasmonate and salicylic acid. We isolated the cDNA coding sequences (CDSs) and the 3'UTRs for every single WRKY gene from a wild banana species (*M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang Kra'), which is resistant to black Sigatoka. Finally, we elaborated two cDNA constructs for *MaWRKY18* and *MaWRKY70* with the aim to evaluate their function in disease resistance in future studies.

INTRODUCCIÓN

El plátano es el fruto más consumido en el mundo. Para 400 millones de personas en el Sureste Asiático y África es un alimento de la canasta básica (FAO, 2017). Para los países latinoamericanos el plátano representa una fuente de ingresos y empleos. La industria bananera que se ha forjado en el trópico de América es la responsable del suministro de plátano a los países del primer mundo. México es el onceavo productor de plátano en el mundo con 2,150, 520 toneladas en el 2016 de las cuales el 20% se destina para el mercado de exportación, dejando una derrama económica de 2,109 millones de pesos mexicanos (SIAP, 2017). Sin embargo, la industria bananera se encuentra al borde de una crisis derivada de las enfermedades causadas por microorganismos fúngicos patógenos que amenazan con devastar las plantaciones como sucedió con la variedad 'Gros Michel' en la década de los 50s causada por el fitopatógeno *F. Oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 que es un microorganismo del suelo que coloniza las raíces del plátano, situación ventajosa para el microorganismo que hace difícil su control (Hwang y Ko, 2004). Actualmente solo los países latinoamericanos se encuentran libres de este patógeno y aunque se han tomado medidas para disminuir los riesgos de contaminación, sabemos que solo es cuestión de tiempo para que este microorganismo patógeno colonice nuestro continente. En México y en todos los países latinoamericanos la principal causa de pérdidas económicas hoy en día es la Sigatoka negra, enfermedad foliar originada por el hongo *M. fijiensis* (Ploetz *et al.*, 2015). No obstante, aunque este último puede ser controlado con el uso intensivo de fungicidas, se generan nuevas cepas resistentes como consecuencia de la presión evolutiva creada por el hombre mediante el uso indiscriminado de fungicidas y que además tiene efectos negativos en el medio ambiente y en la salud de las personas (Marin *et al.*, 2003).

En las últimas décadas la ingeniería genética ha demostrado ser eficiente en la generación de variedades de plantas resistentes a fitopatógenos. En este sentido, la caracterización de genes que codifican para proteínas que tienen un papel clave en la inducción de los mecanismos de defensa es imprescindible. Los factores de transcripción WRKY son una familia muy numerosa en plantas de los cuales varios miembros han demostrado estar involucrados en las cascadas de señalización en respuesta a la

infección por microorganismos patógenos. Regulan múltiples procesos celulares mediante la represión y la activación de la transcripción de numerosos genes que las plantas requieren para su buen funcionamiento (Rushton *et al.*, 2010). OsWRKY45 y AtWRKY70 son dos de los factores de transcripción más estudiados. OsWRKY45 participa en la cascada de señalización del ácido salicílico pero no dependiente de NPR1, y su sobreexpresión en hojas de arroz generó una alta tolerancia contra la enfermedad tizón del arroz causada por el hongo *Magnaporthe grisea* (Shimono *et al.*, 2007). Por otro lado AtWRKY70 es una proteína capaz de regular la comunicación cruzada entre la vía del ácido salicílico y del jasmonato en *Arabidopsis*, su sobreexpresión genera tolerancia contra la infección por *Pseudomonas syringae* activando la transcripción de los genes PR (Pathogenesis Related) y reprimiendo los genes relacionados con la síntesis de jasmonato (Li *et al.*, 2004). Tomando esto en consideración, se decidió buscar los posibles ortólogos de estos genes en una variedad silvestre de plátano resistente a la Sigatoka negra (*M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang Kra') y caracterizarlos con el fin de obtener genes con potencial para el mejoramiento genético de plátano. Se utilizó un segundo criterio para elegir genes candidatos en este trabajo. D'Hont *et al.* (2012) realizaron un análisis transcriptómico de la interacción Plátano-*M. fijiensis* y se encontró que hay una regulación positiva de algunos genes WRKY. Se decidieron tomar los genes WRKY con clave GSMUA_Achr3T13440 y GSMUA_Achr7T05200. Un total de cuatro proteínas WRKY fueron incluidas para su caracterización en este trabajo.

Los análisis *in silico* proveyeron información valiosa sobre la identidad de las proteínas de estudio, sobre su posible función y su regulación. Para complementar el trabajo *in silico* se realizó el aislamiento de las secuencias codificantes y de las regiones 3'UTR de cada uno de los genes. La información obtenida de estas secuencias fue analizada para validar los resultados obtenidos mediante análisis bioinformáticas de las secuencias predichas

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1 GENERALIDADES DEL PLÁTANO

1.1 ORIGEN Y TAXONOMÍA

El banano y el plátano son plantas herbáceas gigantes monocotiledóneas que pertenece al género *Musa* (Figura 1.1). Fueron clasificados en el orden Zingiberales por Hutchinson y en el orden Scitamineae por Bentham y Hooker en su libro *Genera Plantarum* (Menon, 2016; Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007). *Musa* pertenece a la familia Musaceae que consiste de dos géneros *Musa* y *Ensete*. El género *Musa* es dividido en cuatro secciones, dos de las cuales contienen cromosomas con $2n=20$; estos son *Callimusa* y *Australimusa*. Las otras dos secciones *Eumusa* y *Rhodochlymus* tienen $2n=22$ cromosomas. Todos los cultivares comestibles evolucionaron a partir de la sección *Eumusa* y su grupo de especies (Simmonds, 1962).

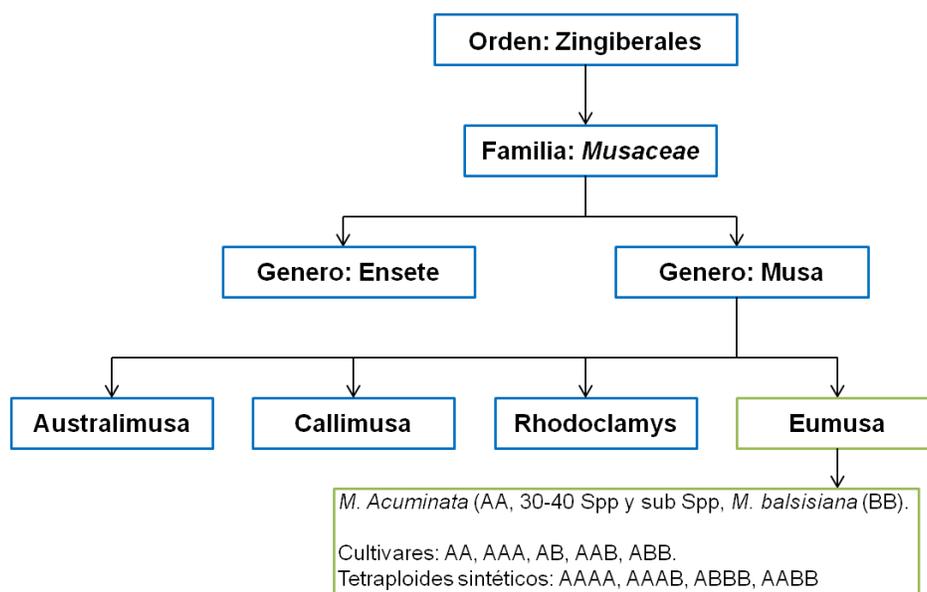


Figura 1.1 Clasificación de la familia *Musaceae* (Menon, 2016; Simmonds, 1962).

Es bien aceptado que el plátano (banano y plátano) evolucionó en el archipiélago malayo situado al sur de la India debido a que allí se localizaron 4 de 5 subespecies de *Musa acuminata* (Menon, 2016). Históricamente, la domesticación del plátano se dio por la migración del hombre en áreas donde el plátano encontró un nicho ecológico para su diversificación y la interacción entre diferentes genotipos originó un sin número de híbridos naturales (Figura 1.2) (Pierrier *et al.*, 2011). Los cultivares comestibles derivan específicamente de las especies diploides silvestres; *M. acuminata* y *M. balbisiana* y son de naturaleza estéril, con frutos partenocarpicos, diploides o triploides y son propagados de forma vegetativa (Ploetz, 2015). A pesar de la riqueza en diversidad genética y fenotípica, son pocos los cultivares que en la actualidad dominan el mercado internacional de exportación en el mundo.

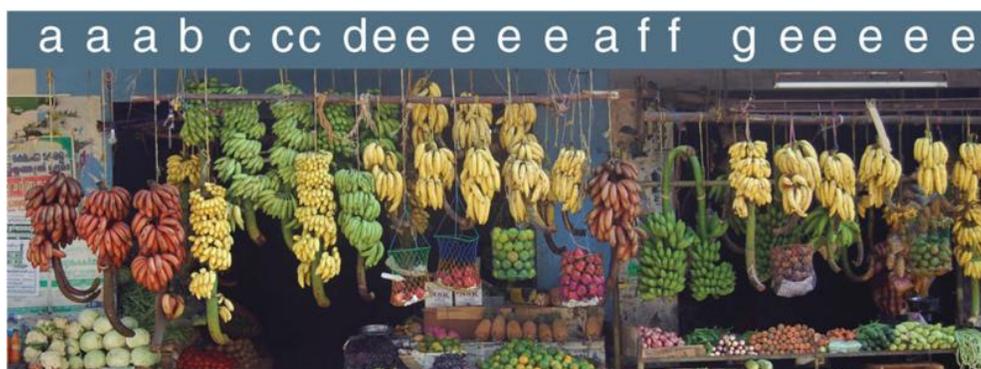


Figura 1.2 Diversidad del plátano. Plátanos en venta en un establecimiento comercial en el Sur de la India (Estado Kerala, Varkala) con diferentes tipos de genomas. Los cultivares están señalados con letras sobre los racimos: letra a, cultivar 'rojo' (genoma AAA). b, 'Palayam Codan' (AAB). c, 'Njalipoovan' AB. d, 'Robusta' ('Cavendish' group, AAA); cultivar 'Cavendish' frutos maduros sin cambiar a color amarillo (maduración verde) cuando la temperatura esta por encima de 22 °C. e, 'Nendran' (AAB), se usa para cocinar y hacer frituras. f, 'Peyan' (AAB). g, 'Poovan' (AAB) (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007).

1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA

El plátano es el fruto comercial más popular y consumido que se cultiva en más de 120 países alrededor del mundo, principalmente en las regiones tropicales de África, Asia, y América Latina, generando una producción de 145 millones de toneladas anuales y con un valor de producción de 44.10 billones de dólares. Se sitúa en el cuarto lugar como el cultivo más importante a nivel mundial solo detrás del arroz, trigo y maíz. De la producción

total el 15% se destina al mercado de exportación y el 85% restante es para el consumo local en sus países de origen (Ploetz *et al.*, 2015). La India es el mayor productor de plátano, mientras que Ecuador es el mayor exportador de banano, vendiendo aproximadamente un tercio del total de banano exportado en el (FAO, 2017).

México es el onceavo productor mundial de plátano con una producción de 2150520 toneladas (2.2% del volumen total mundial) es el decimocuarto exportador del mundo (Figura 1.3) exportando una de cada cinco toneladas que se producen nacionalmente. Los principales estados productores son: Chiapas, Tabasco, y Veracruz. Y dentro de las principales variedades cultivadas destacan el Enano Gigante (63% del volumen total) y Macho (16%) (SIAP, 2017). Por tal motivo, el cultivo del plátano en México representa una fuente importante de ingresos para muchas familias.

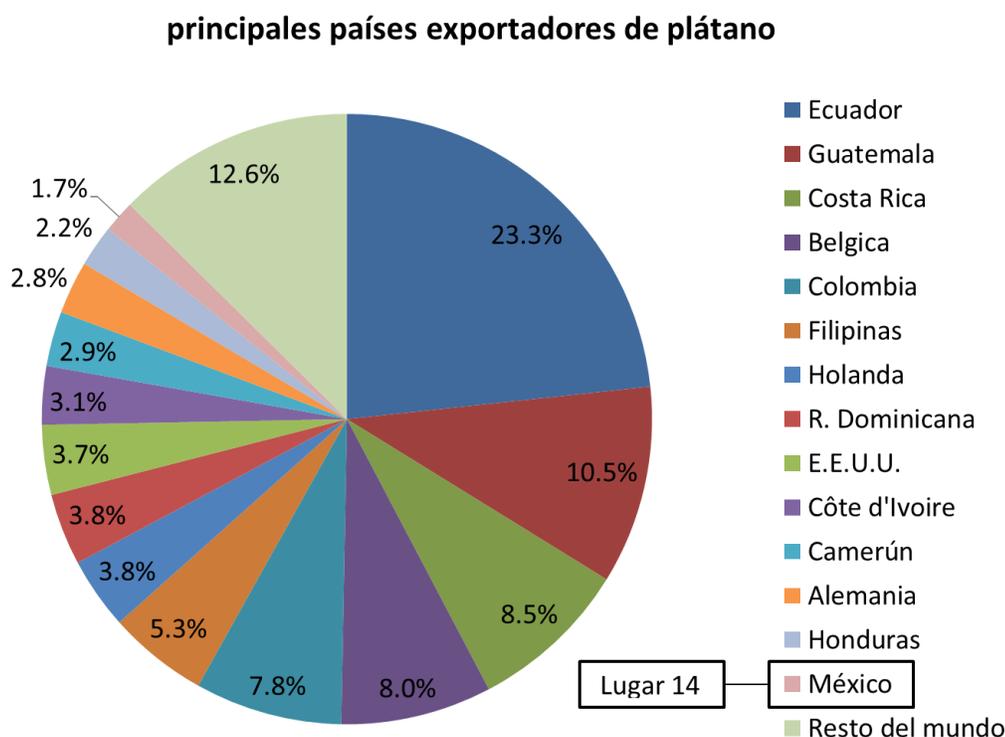


Figura 1.3 Principales países exportadores de plátano (modificado de FAO, 2017).

1.3 LIMITANTES EN LA PRODUCCIÓN

El cultivo de plátano afronta una diversidad de factores que afectan negativamente su producción y que por lo tanto, pone en riesgo la seguridad alimentaria de millones de personas. Diversos factores abióticos y bióticos constituyen un problema serio para la producción de plátano (Peña *et al.*, 2002; Jones, 1999). Los monocultivos de unos cuantos cultivares de plátano dominan el mercado de exportación, pero son menos comunes en la producción a menor escala por pequeños agricultores, donde diferentes variedades de plátano son cultivadas. Aunque el manejo y el cuidado de la producción pueden ser complicados en las interplantaciones, la presión por enfermedad es a menudo considerablemente baja que en los monocultivos. Los factores más significativos que influyen en la producción del plátano son: a) el estado nutricional de las plantas y suelos; b) drenaje e irrigación; c) tipo de cultivar; d) densidad de plantación y rizoma; y e) microorganismos patógenos e insectos plaga (Ploetz *et al.*, 2015; Stover, 1962).

1.3.1 FACTORES ABIÓTICOS

El estrés hídrico, inundaciones y erosión del suelo son los ejemplos más comunes de factores abióticos que impactan negativamente la producción de plátano. Estos factores tienen un mayor impacto para los pequeños productores que no tienen los medios para implementar tecnologías de irrigación y fertilización, sistema de drenaje, deshielo, protección del fruto, cobertores de suelos, y herbicidas que son utilizados por los grandes productores que destinan su producción a la exportación. Por lo tanto, los pequeños productores que constituyen más del 80% de la producción mundial obtienen bajos rendimientos de producción (van Asten *et al.*, 2011; Wairegi y van Asten, 2011; Carr, 2009).

1.3.2 FACTORES BIÓTICOS

Los cultivares de plátano son también afectados por diversos microorganismos patógenos, nematodos, e insectos (Tabla 1.1) como los virus, bacterias, hongos, y nematodos ocasionan enfermedades que en muchos casos conlleva a la devastación del

cultivo y, en consecuencia, pérdidas millonarias. En la lista de los microorganismos e insectos más agresivos se encuentra *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (FOC), *Colletotrichum musae*, *Radopholus similis*, *Guignardia musae* y *Mycosphaerella musicola* y *M. fijiensis* (Ploetz et al., 2015).

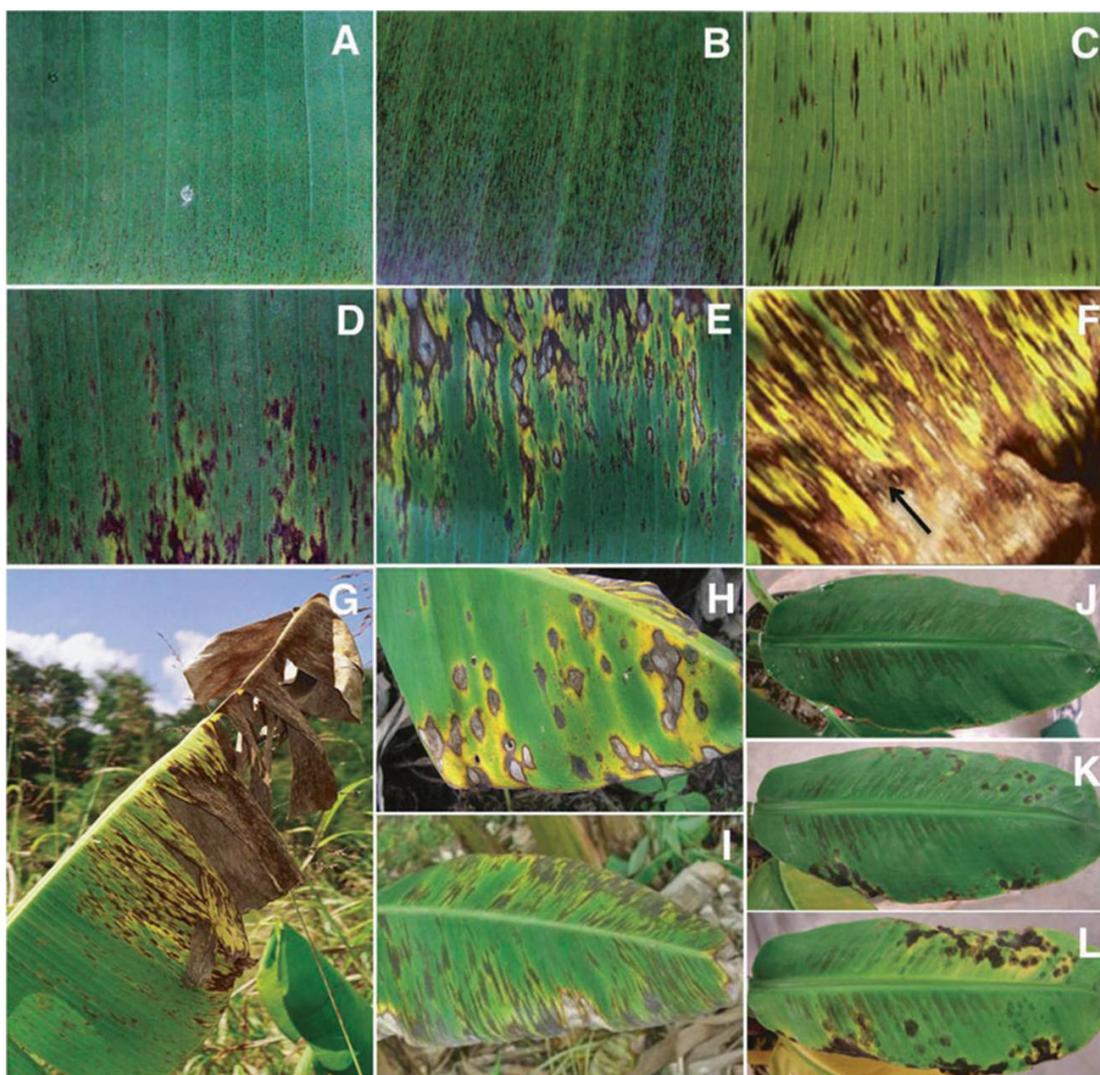


Figura 1.4 Etapas de desarrollo de la enfermedad de la raya de la hoja negra o Sigtoka negra. (A) Estadio 2, aparecen las primeras rayas. (B) Estadio 3, se considera como la segunda fase de las rayas. (C) Estadio 4, primera fase de la mancha. (D) Estadio 5, segunda fase de la mancha. (E) Estadios 5 y 6, se presenta la fase de manchas maduras. (F) Coalescencia de rayas y manchas de las hojas infectadas. (G) Todos los estadios presentes en una hoja de una planta infectada. (H, I) Lesiones ovaladas, y lesiones de rayas muy cercanas presentes en las hojas jóvenes de los colinos de plátano. (J-L) Curso en el tiempo del desarrollo de la sintomatología en una planta 'Enano Gigante' incubada en una cámara de crecimiento (Menon, 2016).

Entre las enfermedades causadas por hongos, la Sigatoka negra (Figura 1.4) causada por el hongo *M. fijiensis* es la enfermedad foliar más importante en el mundo por su distribución geográfica en casi todas las regiones tropicales y que causa una pérdida de 30 a 50% de productividad si no se controla a tiempo (Menon, 2016). El mal de panamá causado por *FOC* es considerada como la enfermedad más destructiva que se haya registrado en la historia causando la pérdida del 100% de la producción del cultivar ‘Gros Michel’ en todo el mundo (Hwang y Ko, 2004). Por otra parte, emergió *FOC* raza tropical 4 (TR4, por sus siglas en inglés) que es una forma extremadamente virulenta a la cual se estima que un 80% de los cultivares de plátano son susceptible incluyendo los cultivares provenientes del subgrupo Cavendish que es la fuente del 99% de las exportaciones mundiales de plátano (Pérez *et al.*, 2014). En México y los países latinoamericanos, la enfermedad más importante que merma la producción es la Sigatoka negra, sin embargo, estamos conscientes que solo es cuestión de tiempo para que *FOC* raza 4 llegue a nuestro continente e infecte nuestras plantaciones.

Tabla 1.1 Principales enfermedades y plagas del plátano (Menon, 2016).

Enfermedades y plagas del plátano	
I. Enfermedades	
i. Enfermedades por hongo	
Sigatoka amarilla	<i>Mycosphaerella musicola</i>
Sigatoka negra	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
Mancha foliar Eumusae	<i>Mycosphaerella eumusae</i>
Enfermedad Mal de Panamá	<i>Fusarium oxysporum f.sp.cubense</i>
ii. Enfermedades bacterianas	
Pudrición del rizoma	<i>Erwinia</i> sp.
iii. Enfermedades virales	
Banana bunchy top virus	BBTV
Banana brac mosaic virus	BBMV
Virus mosaico del pepino	CMV, por sus siglas en ingles
Banana streak virus	BSV
iv. Insectos plaga y nematodos	
El gorgojo del rizoma	<i>Cosmopolites sordidus</i>
El gorgojo del seudotallo	<i>Odoiporus longicollis</i>
Áfido del plátano	<i>Pentalonia nigronervosa</i>
Nematodos	<i>Radopholus similis, Meloidogyne incognita</i>

1.4 MANEJO CONVENCIONAL DE LAS ENFERMEDADES DE PLÁTANO

Las enfermedades devastadoras del plátano hicieron su aparición a principios del siglo XIX paralelamente al inicio de su comercialización mundial. Desde entonces se han desarrollado programas de mejoramiento convencional (hibridación, clonación, etc.) para generar cultivares resistentes a las diferentes enfermedades (Akankwasa *et al.*, 2013). Así mismo, las buenas prácticas agrícolas y el control biológico son utilizados por los agricultores. Sin embargo, el control químico es el más utilizado por los grandes agricultores de la industria bananera de exportación, mediante la aspersión de millones de toneladas de fungicidas al año (Churchill, 2011).

1.4.1 GENERACIÓN DE HÍBRIDOS

El desarrollo de cultivares con alto rendimiento de producción y resistentes y/o tolerantes a los diferentes factores bióticos y abióticos son el principal enfoque de los diferentes programas de mejoramiento del plátano (Menon, 2016).

Cuando *FOC* raza 1 destruyó el plátano de exportación ('Gros Michel') se generaron cultivares resistentes como 'Bodles Altafort' que es un híbrido entre 'Gros Michel' y 'Pisang Lilin' (Jones, 2000). Posteriormente se generó el subgrupo 'Cavendish' que es un híbrido resistente a *FOC* raza 1 y que hoy día representa cerca del 50% de la producción mundial de plátano y el 99% del producto de exportación (Pérez *et al.*, 2014). Varias instituciones como: el Colegio Imperial de Agricultura Tropical (ICTA, por sus siglas en inglés) de Jamaica, la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD) de Francia han generado un amplio repertorio de híbridos con características agronómicas sobresalientes como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Características de híbridos desarrollados por FHIA (Jones, 1994).

Hibrido	Genealogía	Características
FHIA-01 (AAAB)	'Prata Anã' (AAB) x SH-3142 (AA)	Altamente tolerante a la sigatoka negra, raza 1 y 4 de FOC y nematodos, tolerante a bajas temperaturas y condiciones no favorables de lluvias y fertilidad del suelo, plantas vigorosas, racimos grandes y frutos con buena textura y sabor.
FHIA-02 (AAAA)	'Williams' (AAA) x SH-3393 (AA)	Alta tolerancia a la sigatoka negra, presenta la misma estatura que 'Valery', sin embargo las características de los racimos son inferiores a este cultivar.
FHIA-03 (AABB)	SH-3386 (ABB) x diploid SH-3320 (AA)	Generado de la clona Gaddatu ABB, es más rustica y productiva que Bluggoes. Presenta baja estatura y racimos que alcanzan los 50 kg y tolerante a la enfermedad del moko y sequía.
FHIA-15 (AAAB)	Descendiente del híbrido Maqueño Highgate (AAA) (mutante de 'Gros Michel'), híbrido Prata Anã (AAB).	Tolerantes a la raza 1 de FOC, presenta tolerancia a la sigatoka negra. Racimos con características deseables, resistente a la raza 1 de FOC y tolerancia a la sigatoka negra, plantas más altas que el Grande Naine. Alta productividad, resistente a la sigatoka amarilla y negra, los frutos presentan buen sabor.
FHIA-17 (AAAA)		
FHIA-18 (AAAB)		
FHIA-21 (AAAB)	Plátano híbrido francés (AAB).	Tolerancia a la sigatoka negra y produce racimos grandes.
FHIA-23 (AAAA)	Híbrido Highgate (AAA) (mutante de 'Gros Michel').	Racimo con características deseables, tolerante a la raza 1 de FOC y más tolerante a la sigatoka negra que el Grande Naine.
AVP-67 (AAAB)	Cruce entre el plátano francés tipo (AAB) and Maqueño (ABB).	Tolerante a la raza 1 de FOC y tolerante a la sigatoka negra.

Aun cuando la generación de híbridos con características agronómicas de interés son y seguirán siendo imprescindibles para combatir las dificultades que el cultivo de plátano enfrenta. Es claro que esta tecnología por sí sola no puede contrarrestar la enorme ola de situaciones que amenazan con destruir los cultivares de plátano. Generar un cultivar con el fenotipo deseado toma más de 10 años cuando se tiene éxito. Los cultivares de plátano

son poliploides, estériles, y con frutos partenocárpicos, lo que hace más difícil su manejo en el mejoramiento genético convencional (Ssebuliba *et al.*, 2009 y 2006; Ortiz y Vuylsteke, 1995).

1.4.2 CONTROL QUÍMICO

Además del mejoramiento convencional, los químicos son ampliamente utilizados para el control de microorganismos patógenos en los cultivares de plátano (Figura 1.5) (Marin *et al.*, 2003; Nwauzoma *et al.*, 2002). El uso de insecticidas y fungicidas ha pasado de ser una alternativa a una necesidad en el manejo y control de insectos plaga y hongos patógenos. La enfermedad de la Sigatoka negra causada por el ascomiceto *M. fijiensis* es controlada mediante el uso extensivo de fungicidas tales como: benzimidazoles, morfolinas, triazoles, y estrobilurinas (Marin *et al.*, 2003; Fouré y Grisoni, 1984). Anualmente se realizan más de 50 aplicaciones fungicidas sobre las hojas de plátano que equivale a más del 30% del costo de producción total (Churchill, 2011). El uso de enormes cantidades de fungicidas conlleva efectos adversos para el medio ambiente y la salud de los trabajadores y personas que viven en los alrededores de las plantaciones, además incrementa el costo de producción y hace inaccesible el uso de esta tecnología para los pequeños productores que representan más del 80% de la producción total (The guardian, 2016). Aunado a esto, *M. fijiensis* se torna cada vez más resistente a los fungicidas debido a la alta tasa de mutación causada por la presión selectiva de los fungicidas (Wesseling *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2000). Por tal motivo, urge la generación y aplicación de nuevas estrategias que faciliten el manejo de las diferentes enfermedades del plátano.



Figura 1.5 Aspersión de fungicida sobre una plantación de plátano en el sureste del archipiélago de Filipina en la isla de Mindanao. (The guardian, 2016).

1.5 MEJORAMIENTO DEL PLÁTANO MEDIANTE INGENIERÍA GENÉTICA

El plátano, es el fruto más consumido en el mundo, enfrenta problemas serios a causa de los microorganismos patógenos (*M. fijiensis* y *FOC*, por ejemplo) que amenazan la salud de las plantas (Usharani *et al.*, 2016). En nuestros días, el hombre no ha sido capaz de contrarrestar eficientemente las enfermedades que afectan el plátano mediante las estrategias convencionales. La presión evolutiva parece favorecer a los microorganismos patógenos que cada vez se muestran más agresivos. Estos han desarrollado estrategias moleculares especializadas para evadir los sistemas de defensa de las plantas. Sin embargo, el desarrollo de cultivares resistentes a través de estrategias no convencionales como la ingeniería genética ofrecen una alternativa promisorio que promete ser amigable y segura para el medio ambiente, sustentable, eficiente, y económicamente redituable (Kovács *et al.*, 2013; Passos *et al.*, 2013; Swennen, 2002). Hoy día, existen varios casos de cultivares transgénicos de plátano que muestran cierto grado de tolerancia a varios de los patógenos que afectan a la industria de plátano (Tabla 1.3), resultado de la generación y la aplicación del conocimiento científico (Menon, 2016). En todos estos casos se utilizaron genes de otras especies para evaluar su efecto en la tolerancia. Hasta el

momento, aún no se ha evaluado el desempeño de estas plantas transgénicas en campo. Una excepción es el trabajo recientemente publicado por Dale *et al.* (2017) en el cuál se realizó una evaluación por tres años en campo de plantas transgénica del subgrupo Cavendish susceptible a *FOC* raza 4 transformadas con el gen de resistencia RGA2 aislado de una variedad de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* resistente a *FOC* raza 4. Así se demostró la transferencia de la resistencia a partir de una variedad resistente a una susceptible.

La estrategia más frecuentemente utilizada para la generación de plantas resistentes a hongos mediante ingeniería genética es a través de la sobreexpresión de péptidos antimicrobiales (Hancock y Lehrer, 1998; Boman, 1991). Cammue *et al.* (1993) demostraron la eficacia de sobreexpresar genes que codifican para péptidos con actividad antifúngica contra *Mycosphaerella* spp. en condiciones *in vitro*. Vishnevetsky *et al.* (2011) coexpresaron en el cultivar Grand Nain, el gen de la quitinasa del hongo *Trichoderma harzianum* (TnEn-42) y el gen de la estilbeno sintasa (StSy, por sus siglas en inglés) de uva bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S y el promotor inducible PR-10 (Patogenesis related protein-10), respectivamente, junto con el gen de la superóxido dimutasa (CuZn-SOD) aislada de tomate, y bajo el control del promotor de ubiquitina. Las líneas transgénicas mostraron un nivel reducido de síntomas significativo durante los 4 años que se evaluaron en el campo, además no mostraron cambios en la calidad y rendimiento del fruto.

Tabla 1.3 Cultivares transgénicos tolerantes a *FOC* y *M. fijiensis*.

Cultivar	Transgen sobreexpresado	Carácter	Referencia
Resistencia al marchitamiento por <i>Fusarium</i>			
Furenzhi	Endoquitinasa (<i>chit 42</i>)	Tolerancia a la enfermedad del marchitamiento causada por <i>FOC</i> raza 4, aún después de dos meses de postinoculación.	Hu <i>et al.</i> , 2013
Rasthali	β - 1 - 3 - <i>endoglucanase</i>	Tolerancia a <i>FOC</i> raza 1	Maziah <i>et al.</i> , 2007
Rasthali	Defensinas florales <i>phdef1</i> y <i>phdef2</i>	Tolerancia a la enfermedad del marchitamiento por <i>FOC</i> raza 1.	Ghag <i>et al.</i> , 2012
Taijiao	Gen de la lisozima humana	Tolerancia a <i>FOC</i> raza 1	Pei <i>et al.</i> , 2005
Rasthali	(HIGS). Secuencia parcial de los genes <i>VeA</i> , <i>VelB</i> y <i>VosA</i> y el factor de transcripción 1 de <i>FOC</i> (<i>factor de transcripción1</i>)	Tolerancia significativa a <i>FOC</i> raza 1.	Ghag <i>et al.</i> , 2014
Nangka	thaumatin-like protein (<i>tlp</i>)	Incremento en la tolerancia a <i>FOC</i> raza 4.	Mahdavi <i>et al.</i> , 2012
Resistencia a la sigatoka negra			
Grand Nain	<i>TnEn-42</i> (endoquitinasa) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>StSy</i> (estilbeno sintasa)	Tolerancia a <i>M. fijiensis</i> . Se evaluó la resistencia <i>in vivo</i> en invernadero por 4 años.	Vishnevetsky <i>et al.</i> , 2011
Navolean	AP24 (osmotina)	Alta tolerancia a los síntomas foliares causados por <i>M. fijiensis</i>	Kosky <i>et al.</i> , 2010
Gros Michel	<i>RCC2</i> y <i>RCG3</i> (quitinasas tipo I) aisladas de arroz.	Tolerancia significativa a la sigatoka negra	Kovács <i>et al.</i> , 2013

1.6 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

Una planta se considera sana, o normal, cuando esta es capaz de ejecutar sus funciones fisiológicas lo mejor posible que su potencial genético lo permita (Agrios, 1997). Sin embargo, las plantas están constantemente expuestas a una serie de factores bióticos (virus, bacterias, hongos, etc.) y abióticos (radiación solar, pH, viento, nutrientes, etc.) que se encuentran en su entorno (Muthamilarasan y Prasad, 2013). Aunque son organismos

sésiles, las plantas cuentan con mecanismos moleculares sofisticados que les permiten adaptarse y sobrevivir en el ambiente hostil y variable que nos rodea. Por ejemplo, para combatir microorganismos patógenos han desarrollado diversos mecanismos de defensa que le permiten contrarrestar la infección. Desde barreras físicas y químicas hasta sofisticados mecanismos moleculares que se desencadenan por medio de receptores transmembranales o intracelulares que reconocen patrones moleculares y moléculas efectoras de los microorganismos. Dentro de estos mecanismos se encuentran la “Inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos” (PTI, por sus siglas en inglés) (Mur *et al.*, 2008), la inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés) (Cui *et al.*, 2015), y la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Fu y Dong, 2013).

1.6.1 INMUNIDAD ACTIVADA POR PAMPs

Existen en las plantas barreras de defensa que las protegen antes de que el patógeno pueda llegar a la membrana celular de las células. Estructuras preformadas como la pared celular, la cera epicuticular y la cutícula impiden el acceso de los microorganismos hacia el espacio inter e intracelular. También existen compuestos moleculares que se producen constitutivamente como los péptidos y los metabolitos antimicrobiales sin que los microorganismos se hallen presentes (Muthamilarasan y Prasad, 2013).

Algunos microorganismos logran en algún momento superar la primera línea de defensa mediante la generación de nuevos mecanismos moleculares que le confieren esta ventaja. En esta instancia, las plantas dependen completamente de su sistema inmune innato. La protección de las células de las plantas se basa en el reconocimiento por medio de receptores transmembranales (PRRs, por sus siglas en inglés) especializados en el reconocimiento específico de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) tales como la flagelina de las bacterias, lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Este reconocimiento desencadena una respuesta en el sitio de infección también conocida como respuesta de hipersensibilidad (Zurbriggen *et al.*, 2010; Mur *et al.*, 2008). Después del reconocimiento de PAMPs comienza un proceso conocido como muerte celular localizada (MCL) que se da en el sitio de infección de la planta con el fin de

restringir el avance de microorganismos biotróficos o hemibiotróficos (Muthamilarasan y Prasad, 2013; Zurbriggen *et al.*, 2010). Lo anterior, es la evidencia de que el patógeno fue reconocido exitosamente por las células de la planta localizadas en el sitio de infección. Posteriormente, la MCL induce la resistencia sistémica adquirida (SAR).

1.6.2 INMUNIDAD ACTIVADA POR EFECTORES (ETI)

Muchos microorganismos patógenos han coevolucionado con las plantas a través del tiempo y han generado estrategias virulentas con el propósito de evadir la primera línea de defensa (PTI). Baterías de factores virulentos conocidos como efectores son introducidos dentro de las células del hospedero para suprimir a PTI y poder infectar a las células exitosamente (Cui *et al.*, 2015; Fu y Dong, 2013). Por ejemplo, un efector tipo III de *Pseudomonas syringae*, AvrPtoB, funciona como una ligasa E3 y ubiquitina solo al receptor de la flagelina FLS2 para que este sea degradado por el proteosoma 26S (Göhre *et al.*, 2008). Sin embargo, las plantas han generado una estrategia de contraataque. ETI es la última barrera de defensa que tienen las plantas para neutralizar la infección por microorganismos patógenos. Su fundamento se basa en el reconocimiento intracelular de un efector AVR (Avirulencia) del patógeno por receptores intracelulares (proteínas R) del hospedero. Esto desencadena una respuesta robusta de defensa, reinstala y amplifica los programas basales de transcripción de PTI y enciende la defensa antimicrobiana y muy a menudo está relacionada a la MCL o también conocida como respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) (Jones y Dangl, 2006).

1.6.3 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR)

PTI y ETI son mecanismos de defensa localizados en el sitio de infección. Además de estos mecanismos, las plantas cuentan con un tipo de resistencia sistémica (SAR) que se propaga a todos los tejidos de las plantas (Figura 1.6), incluidos los tejidos no afectados (Gao *et al.*, 2015). Esto es causado por la producción y transporte de señales de defensa desde el sitio de infección a todas las partes de las plantas. Ácido salicílico (AS), ácido metil salicílico (AMS), ácido azelaico (AAz), glicerol-3-fosfato (G3P), y abietano

diterpenoide dehidroabietinol (DA) son las señales responsables del fenómeno conocido como SAR resultando en una expresión sistémica de genes antimicrobianos *PR* (*Pathogenesis-related*) (Wendehenne *et al.*, 2014). La concentración de AS regula la homeóstasis de NPR1 (Nonexpressor of pathogenesis-related proteins1) que es el regulador maestro del SAR. NPR1 es un coactivador que forma un complejo con factores de transcripción de la familia TGA y WRKY que actúan como reguladores transcripcionales de genes de resistencia (Rochon *et al.*, 2006). Un ejemplo bien conocido de regulación ocurre cuando las concentraciones de AS se incrementan como resultado de las infecciones localizadas, NPR1 forma complejos con los factores de transcripción TGA2 cambiando de esta manera la conformidad estructural de la proteína, lo que provoca que pierda su actividad represora y se ejecuta así la transcripción de los genes R (Kuai *et al.*, 2015). Es importante destacar que una vez activado el SAR este puede durar activo por semanas, meses e incluso existe evidencia de que las plantas graban un tipo de memoria inmunológica que protege a su progenie contra infecciones similares por medio de la remodelación de la cromatina en la que participan algunas proteínas de la reparación del ADN como RAD51 y BRCA2a (Fu y Dong, 2013).

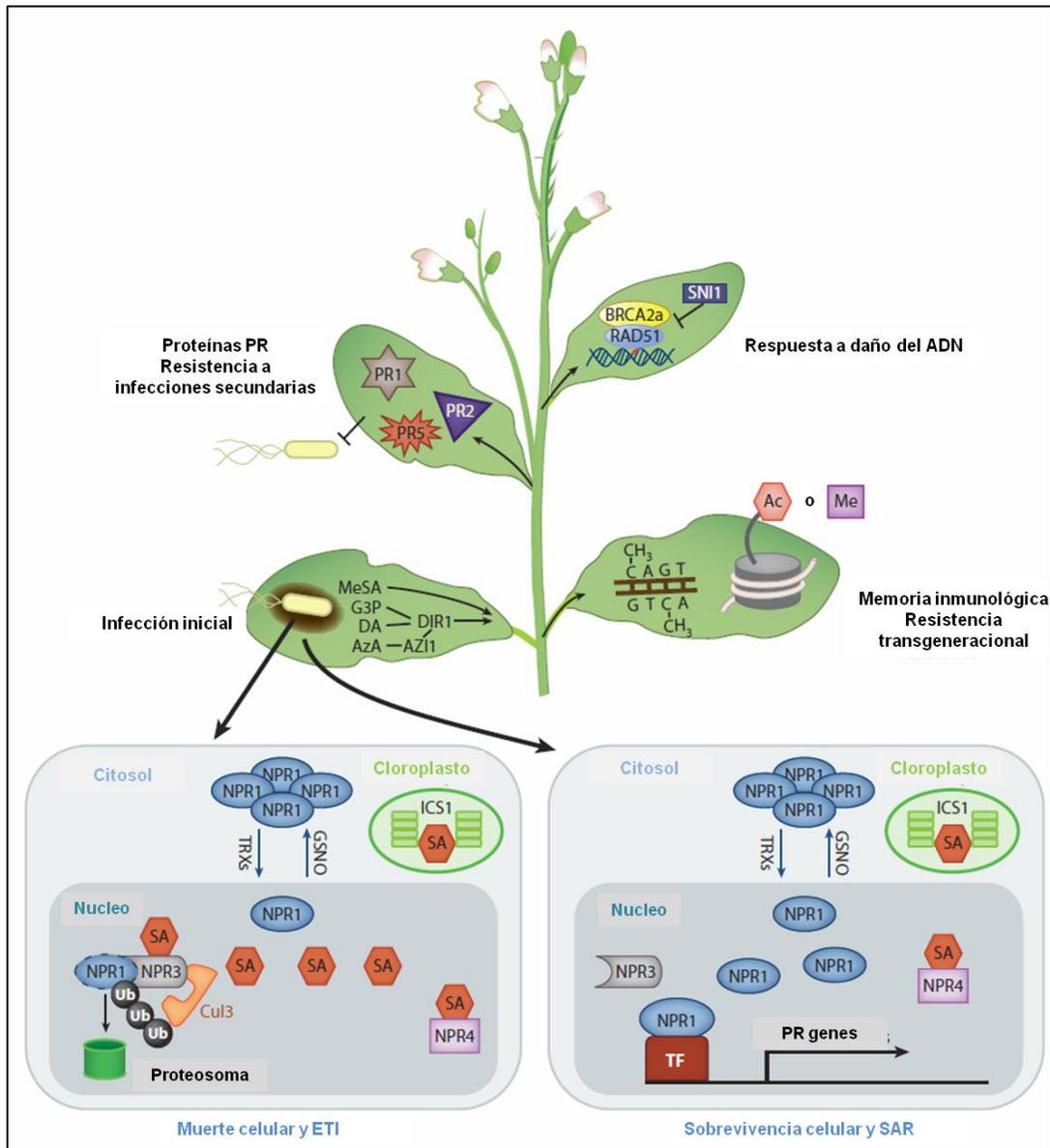


Figura 1.6 Transducción de señales del SAR. Inicialmente una infección local puede no solo disparar a ETI, el cual está a menudo relacionado con la MCL de las células infectadas, sino que también la producción de la fitohormona AS en los cloroplastos por acción de la enzima isocorismato sintasa (ICS1). También se producen señales inmunes de desplazamiento, incluido el ácido azelaico (AzA), glicerol-3-fosfato (G3P), ácido metil salicílico (MeSA), y el diterpenoide abietano dihydroabietinol (DA). AzA regula la expresión de *AZI1*, el cual codifica para la proteína predicha inhibidor/seed-storage/lipid-transfer. AzA, G3P, y DA requieren a *DIR1* para sus funciones, que es una proteína putativa relacionada con la transferencia de lípidos. La acumulación de AS afecta la concentración celular redox y la traslocación nuclear de NPR1 a través de la S-nitrosoglutation (GSNO) y las tiorredoxinas (TRXs). La concentración nuclear de NPR1 es controlada por los niveles de AS a través de las proteínas receptoras NPR3 y NPR4. La alta concentración de AS en el sitio local de infección promueve la interacción de NPR1-NPR3 y la posterior degradación

de NPR1 para permitir que ocurran la MCL y ETI, mientras en las células adyacentes, el nivel intermedio de AS interrumpe la interacción NPR1-NPR4, resultando en la acumulación de NPR1. Posteriormente, NPR1 puede interactuar con factores de transcripción para activar la expresión de genes antimicrobiales *PR* tales como *PR1*, *PR2*, *PR5*; y de esta manera resistir a infecciones secundarias. La impresión de un tipo de memoria del SAR está asociada con la acetilación de la histona H3K9 y la metilación de H3K4 en los promotores de los genes relacionados al SAR. Además, la metilación del ADN y las proteínas que afectan la arquitectura de la cromatina (SNI1 por ejemplo) y la reparación del ADN (RAD51 y BRCA2) pueden tener la capacidad de generar un tipo de memoria en los genes de defensa de las plantas con el fin de proteger la estabilidad genómica no solo de la presente generación sino también de la progenie. (Fu y Dong, 2013).

1.7 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN GENÉTICA EN PLANTAS

El control de la expresión génica en las plantas es un proceso biológico esencial para el crecimiento, desarrollo, e interacción con el medio ambiente. La transcripción del material genético a un segundo código de ARN tiene como protagonistas a la ARN polimerasa, proteínas regulatorias conocidas como factores de transcripción que son capaces de reconocer motivos específicos de ADN que se encuentran en la secuencia promotora de la transcripción del gen (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014; Yilmaz y Grotewold, 2010). En las plantas la transcripción es realizada por tres diferentes polimerasas, las cuales se encuentran estructural y funcionalmente relacionadas (Cramer *et al.*, 2008). La ARN polimerasa II (ARNPII) es la responsable de la transcripción de los genes que codifican para proteína y de muchos ARNs no codificantes, incluyendo pequeños ARN nucleares (snARNs), precursores de microARNs (miARN), y ARNs crípticos inestables (CUTs). La ARN polimerasa I transcribe los ARNs ribosomales (rARN), y la ARN polimerasa III transcribe ARNs no codificantes como los ARNs de transferencia (tARNs), y el ARN ribosomal 5S. La transcripción básicamente consiste de tres principales etapas: iniciación, elongación, y terminación (Richard y Manley, 2009).

El proceso de transcripción (Figura 1.7) conlleva a la desnaturalización de la doble cadena de ADN y la síntesis química de ARN, usando una de las dos hebras de ADN genómico como templado (Yilmaz y Grotewold, 2010). En la etapa de iniciación, la ARNP II se ensambla con diferentes factores de transcripción para formar un complejo de pre-iniciación en la secuencia promotora de ADN. Seguidamente ocurre la elongación y

terminación de la transcripción que genera un transcrito primario que desfilará por eventos de procesamiento antes de ser transportado fuera del núcleo para su traducción (Barberis y Petrascheck, 2003).

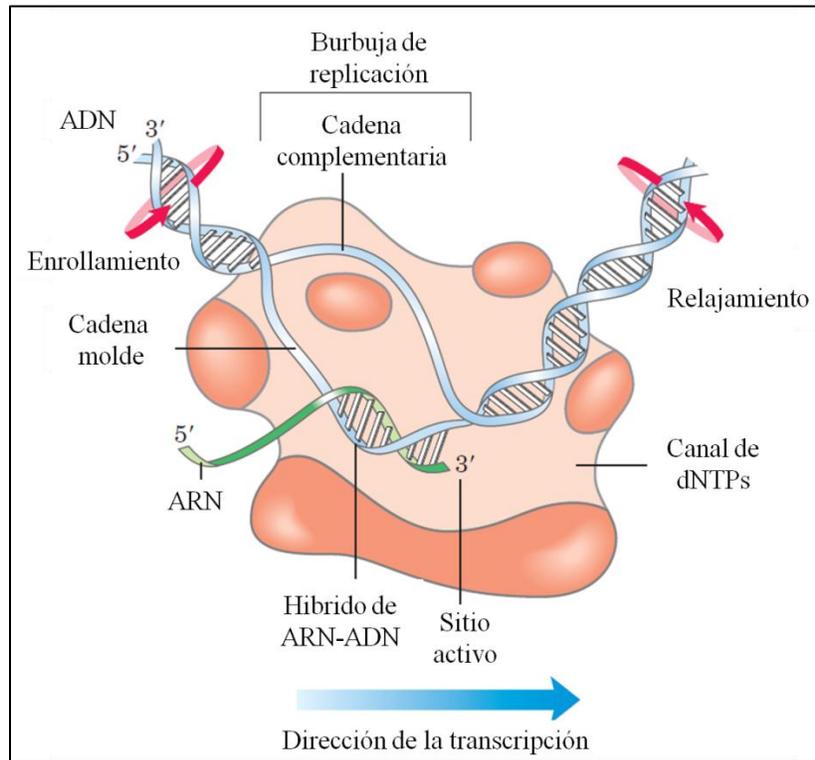


Figura 1.7 Transcripción del ADN. Primero la enzima ARN polimerasa se une al ADN molde en la secuencia promotora. Luego, durante el proceso de elongación, la doble hélice de ADN se desenrolla y la ARN polimerasa polimeriza desoxinucleótidos al extremo 3' del nascente transcrito de ARN. Finalmente, la ARN polimerasa reconoce la secuencia de terminación en la hebra molde de ADN y el transcrito de ARNm y la ARN polimerasa se desensamblan del complejo terminando la transcripción (Nelson *et al.*, 2008).

1.8 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Un factor de transcripción es una proteína que se une a una secuencia específica del ADN de 6 a 12 nucleótidos aproximadamente en la región del promotor que la precede y que promueve la transcripción de genes mediante la generación de complejos con la ARN polimerasa II (Spitz y Furlong, 2012). En organismos sésiles como las plantas existe un

mayor número de factores de transcripción que en animales y se han identificado diversas familias que participan en la regulación de la expresión de diferentes procesos fisiológicos y de adaptación al estrés (Licausi *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2002). Algunas de las familias de factores de transcripción más estudiadas en plantas son los ERF, bZIP, Dof, NAC, MYB, bHLH y WRKY (Feng *et al.*, 2012). La expresión de los genes a proteínas funcionales o estructurales pasa por un proceso sistemático que consta de al menos tres pasos: La transcripción, la traducción y las modificaciones postraduccionales. En el nivel transcripcional son los factores de transcripción quienes orquestan y reprograman la expresión de los genes mediante una intrincada red de interacciones proteicas que regulan la activación o la represión de conjuntos de genes en respuesta a un estímulo.

1.9 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY

1.9.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Han transcurrido más de 20 años desde que Ishiguro y Nakamura (1994) aislaran el ADNc del primer factor de transcripción de la familia WRKY de *Ipomoea batatas* y que nombraron como *SPF1*. En la actualidad sabemos que los factores de transcripción WRKY son una de las familias más grandes de reguladores transcripcionales en plantas, con 74 genes en *Arabidopsis thaliana* (Eulgem y Somssich, 2007), 102 en arroz (*Oryza sativa*) (Ross *et al.*, 2007), 97 en girasol (*Helianthus annuus*) (Giacomelli *et al.*, 2010), 46 en canola (*Brassica napus* L.) (Yang *et al.*, 2009), y 187 en frijol (*Glycine max*) (Schmutz *et al.*, 2010). La familia WRKY forma parte integral en las redes de señalización que modulan muchos procesos celulares tales como respuesta a estrés biótico y abiótico, senescencia de las hojas, desarrollo y metabolismo secundario (Feng *et al.*, 2012). Su principal característica es la capacidad que tienen para unirse al ADN, específicamente al elemento en *cis* nombrado como W-box (TTGACC/T) mediante su dominio de aproximadamente 60 residuos de aminoácidos y que tiene la firma conservada de los aminoácidos WRKYGQK y una estructura de dedo de zinc hacia el extremo C terminal (Figura 1.8) (Rushton *et al.*, 2010). Basado en el número de dominios WRKY y el tipo de dedo de zinc, los factores de transcripción WRKY pueden ser divididos en 3 grupos: el grupo I contiene dos dominios WRKY y un motivo de dedos de zinc tipo C2H2 o C2HC; el

grupo II tiene un dominio WRKY y un motivo de dedo de zinc tipo C2H2; y el grupo III tiene un dominio WRKY y un motivo de dedo de zinc tipo C2HC en el C terminal (Feng *et al.*, 2012). Adicionalmente se ha encontrado que poseen dominios de localización nuclear que es una característica común de los factores de transcripción, así como zippers de leucina, regiones ricas en aminoácidos serina/treonina, regiones ricas en glutamina, regiones ricas en prolina, dominios de unión a calmodulina, dominios quinasas y dominios TIR-NBS-LRR (Chen *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2005). La estructura tridimensional del dominio WRKY está conformada por cuatro láminas betas antiparalelas de las cuales la lámina conformada por los aminoácidos WRKYGQK interactúa directamente con el surco mayor del ADN en el promotor. En la actualidad con la llegada de las tecnologías de secuenciación masivas varios genomas de plantas se han secuenciado y se han caracterizado *in silico* las familias completas de factores de transcripción WRKY.



Figura 1.8 Estructura del dominio WRKY de miembros representativos de la familia WRKY de *A. thaliana*. Nótese la conservación del motivo WRKYGQK (línea negra) y del motivo dedos de zinc (resaltado en café con letras blancas) en el dominio WRKY. En rojo se resaltan todos los aminoácidos conservados. Los triángulos en negro señalan la posición de intrones en su secuencia de ADN (Eulgem *et al.*, 2000).

1.9.2 FUNCIONES DE LOS GENES WRKY

En la última década se ha generado la mayor cantidad de información concerniente a la funcionalidad de los factores de transcripción WRKY. *A. thaliana* y *O. sativa* son las especies de plantas de las que se tiene el mayor número de registros de estudios funcionales de los genes WRKY. En estos casos se han utilizado diferentes estrategias para elucidar su función como sobreexpresión, silenciamiento por ARN de interferencia (ARNi) y mutagénesis.

Se ha documentado que los factores de transcripción de la familia WRKY se encuentran involucrados en diversos procesos celulares de desarrollo y crecimiento, así como también en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés (Figura 1.9). En aspectos del desarrollo se tienen como ejemplos al gen *OsWRKY78* que regula la elongación del tallo y el desarrollo de la semilla en arroz (Zhang *et al.*, 2011). También está el caso de los genes *AtWRKY6* y *AtWRKY56* que están involucrados en el desarrollo de las hojas en *A. thaliana* (Robatzek y Somssich, 2001). *AtWRKY71* controla el desarrollo de los brotes meristemáticos mediante la regulación transcripcional de los factores de transcripción RAX (Guo *et al.*, 2015). También se han identificado factores de transcripción WRKY en *A. thaliana* que participan en la fase G1 y G2 del ciclo celular (Nayeri, 2014). En la senescencia *AtWRKY53* y *AtWRKY70* (Ülker *et al.*, 2007) regulan negativamente este proceso mientras que en arroz *OsWRKY23* lo regula positivamente (Jing *et al.*, 2009).

Por otro lado, también se han identificado factores de transcripción WRKY involucrados en procesos moleculares de respuesta a estrés biótico y abiótico. *OsWRKY71* modula la homeostasis de fósforo (Pi), inanición por Fe y el estrés a bajas temperaturas en arroz (Dai *et al.*, 2016). *FcWRKY70* está involucrado en la tolerancia al estrés hídrico en *Fortunella crassifolia* (Gong *et al.*, 2015) y *OsWRKY89* protege a las plantas de la radiación UV (Phukan *et al.*, 2016).

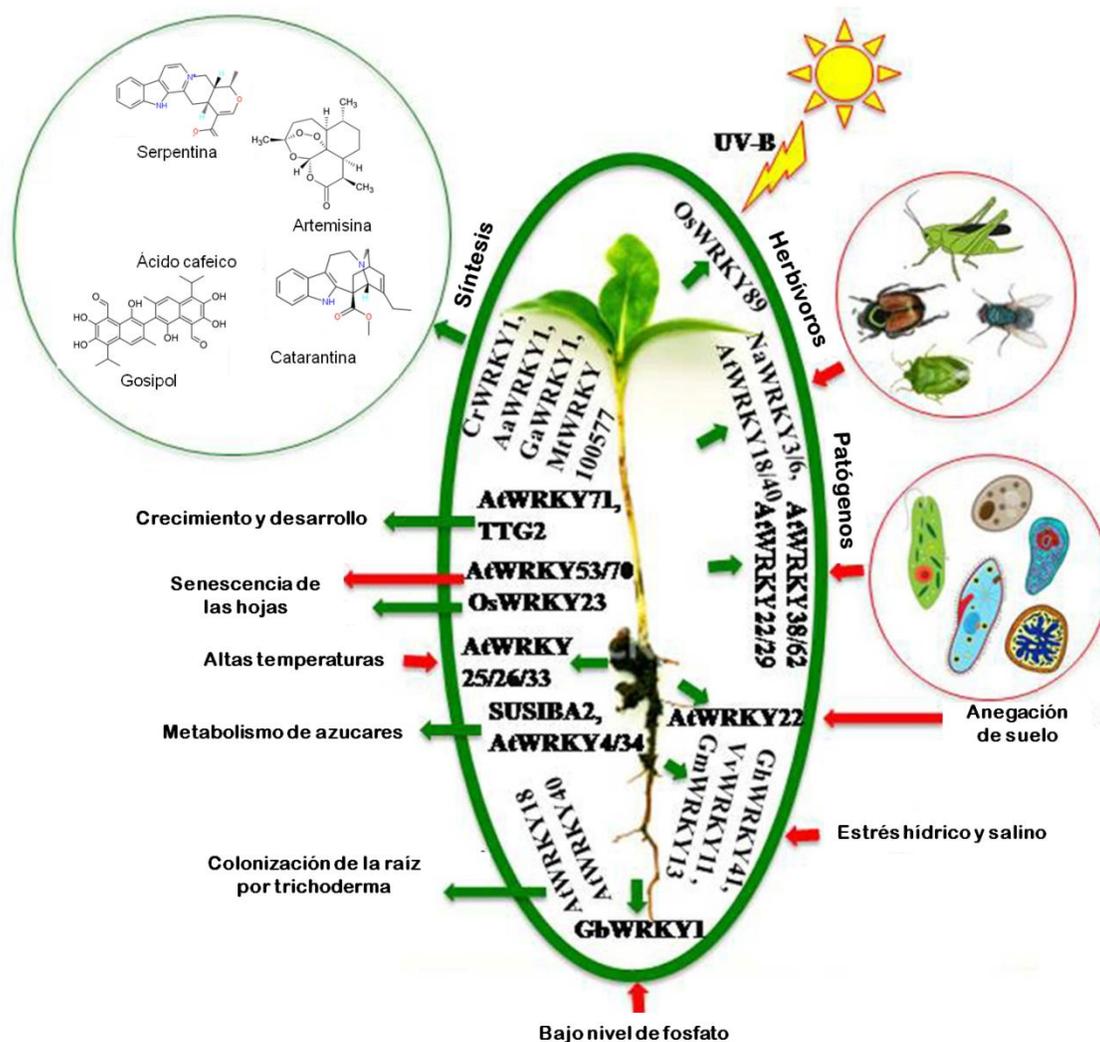


Figura 1.9 Múltiples funciones de los factores de transcripción de la familia WRKY. En respuesta a los diferentes estímulos las plantas utilizan varios factores de transcripción WRKY para regular la expresión genética. Las flechas en verde indican una regulación positiva o benéfica mientras que las flechas rojas indican una regulación negativa (Rushton, 2010)

AtWRKY52 actúa en sinergismo con RPS4 y confiere resistencia al patógeno fúngico *Colletotrichum higginsianum* y al patógeno bacteriano *P. syringae* (Narusaka *et al.*, 2009). La sobreexpresión de *OsWRKY45* confiere resistencia de amplio espectro contra *Magnaporthe oryzae* y es inducible a la fitohormona ácido salicílico (Shimono *et al.*, 2007). De igual modo, la sobreexpresión de *AtWRKY70* incrementa la resistencia contra *P.*

syringae pv *tomato* cepa DC3000. El cluster AtWRKY18, 40 y 60 regulan la resistencia de *A. thaliana* sobre *P. syringae* (Phukan *et al.*, 2016). En la Figura 1.9 se muestran algunos ejemplos de las funciones que regulan los factores de transcripción de la familia WRKY.

1.9.3 FUNCIÓN EN LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS BIÓTICO

De los factores de transcripción WRKY que se han caracterizado funcionalmente muchos están involucrados en las vías moleculares de defensa de las plantas en respuesta al estrés biótico. En el 2007, Shimono *et al.* demostraron que OsWRKY45 participa en mecanismo de defensa inducido por BTH (análogo de AS) y que la sobreexpresión de éste confiere resistencia al hongo *Magnophorte grisea* (Figura 1.10) y a la bacteria patógena *P. syringae tomato* DC3000 (Qiu y Yu, 2009). Estudios de epistaxis sugieren que OsWRKY45 no parece ser dependiente de NH1 de arroz que es un ortólogo de NPR1 en *A. thaliana*. Este caso es el primer reporte de una vía alterna del SAR no dependientes de NPR1.

El factor de transcripción AtWRKY70 pertenece al grupo III de la familia WRKY en *A. thaliana*. A diferencia de OsWRKY45, AtWRKY70 se sitúa corriente abajo de NPR1 en la vía del SAR (Li *et al.*, 2004). AtWRKY70 actúa como un nodo de convergencia entre las vías de señalización mediadas por ácido salicílico y jasmonato. La sobreexpresión de AtWRKY70 y la generación de mutantes demuestran que tiene un papel clave en la regulación de la respuesta de *A. thaliana* contra microorganismos patógenos (Ülker *et al.*, 2007).

Se sabe que los factores de transcripción WRKY pueden interaccionar entre si y conformar homodímeros o heterodímeros para regular la transcripción de genes diana (Figura 1.11). El clúster AtWRKY18, 40 y 60 forman un complejo mediante los motivos zipper de leucina. AtWRKY18 estimula la síntesis de AS y aumenta la tolerancia contra *P. syringae* mientras que su coexpresión con AtWRKY40 incrementan su susceptibilidad dado que este dímero estimula la vía de señalización del Jasmonato vía la supresión de los represores JAZ (Jasmonate-Zim Domain). AtWRKY60 interactúa con AtWRKY18 y AtWRKY40 formando un cluster que está involucrado en la regulación transcripcional de

los *ABFs/AREBs* por unión al elemento en *cis* W-Box que se encuentran en sus promotores (Antoni *et al.*, 2011).

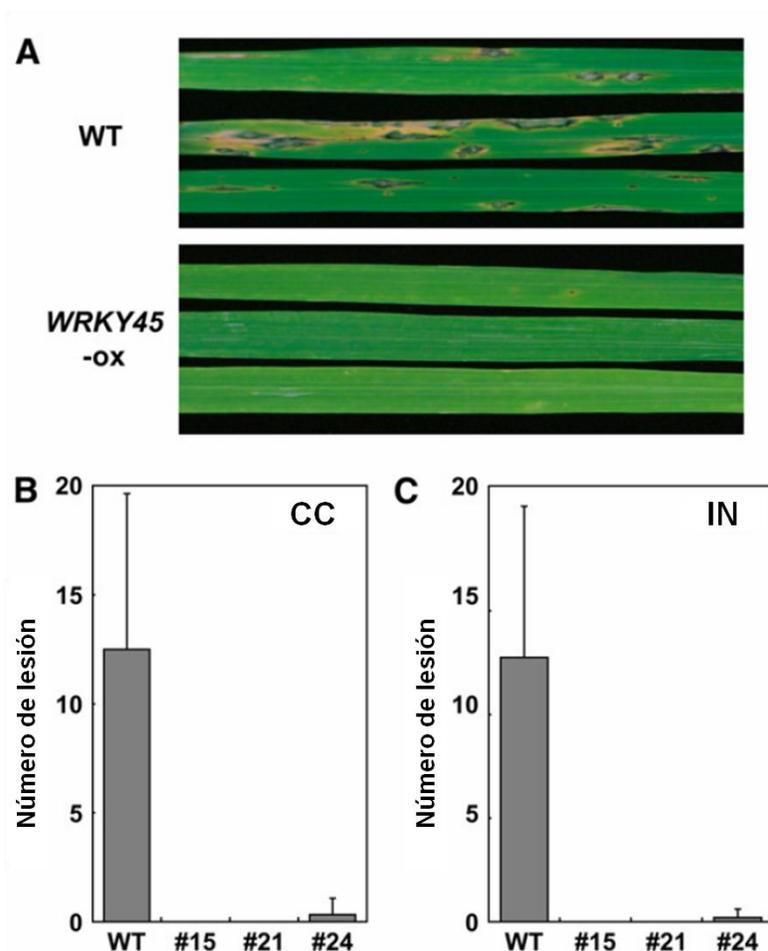


Figura 1.10 Plantas transgénicas sobre-expresando a *OsWRKY45* manifiestan alta tolerancia al tizón del arroz. Plantas transgénicas homocigotas T3 (tercera generación) y plantas silvestres control dispuestas en una cámara de crecimiento (A y B) o en un invernadero (C) fueron inoculadas con *M. grisea* (raza 007.0) en el estado de cinco a seis hojas, y los signos de la enfermedad fueron caracterizados a los 7 días post-inoculación. **(A)** Signos de la enfermedad en las plantas silvestres y transgénicas (Línea 15) *OsWRKY45-ox* mantenidas en una cámara de crecimiento. **(B)** y **(C)** Número de lesiones de las plantas crecidas en una cámara de crecimiento (CC) y en un invernadero (IN). Las barras representan el número de lesiones en 10 cm de la región central de las seis hojas de cada planta T3 *WRKY45-ox* (Líneas: 15, 21, y 24) y silvestres. La desviación estándar se realizó con los promedios de 5 a 10 plantas. Las condiciones de invernadero fueron de 28/23 °C (día/noche) con luz natural en diciembre. Resultados similares fueron obtenidos cuando las plantas fueron crecidas en marzo (Shimono *et al.*, 2007).

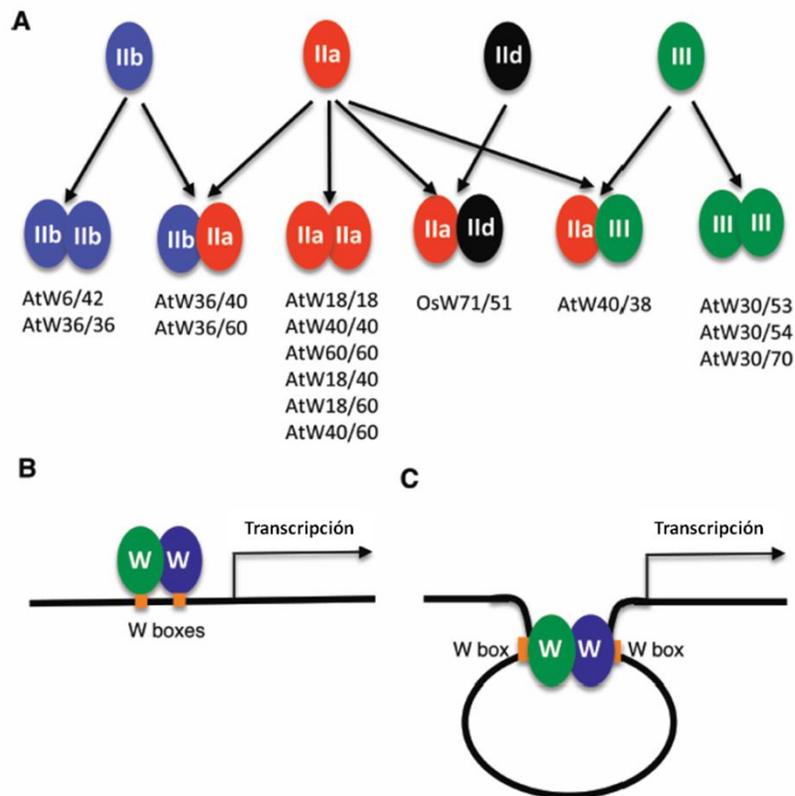


Figura 1.11 Interacciones proteicas entre miembros de la familia WRKY. (A) Proteínas WRKY pertenecientes a varias subclases (IIa, IIb, IIId y III) pueden interactuar con ellas mismas y con otras para formar homo- y hetero-complejos. Pares de proteínas WRKY cuya interacción ha sido demostrada experimentalmente están enlistadas. (B) Elementos W-boxes cercanos (color naranja) en un promotor de un gen diana pueden ser reconocidos por un complejo específico de proteínas WRKY para una regulación cooperativa o antagonista de la transcripción genética. (C) Elementos W-box distantes en el promotor de un gen pueden ser reconocidos por las proteínas WRKY que conforman el complejo posiblemente a través de la formación de un bucle de ADN. La estructura de bucle inducida por el complejo WRKY podría estar regulando la expresión de un gen diana afectando la unión de otros factores de transcripción de unión al ADN y la organización de la cromatina en la región del bucle. Estas regiones involucradas en la formación del bucle podrían proveer comunicación a larga distancia entre los elementos W-box y potenciadores (enhancers) de la transcripción de un gen (Chi *et al.*, 2013).

1.9.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY EN PLÁTANO

Las múltiples funciones de los factores de transcripción de la familia WRKY y principalmente su papel clave en el control de las vías de señalización de defensa en respuesta al estrés biótico y abiótico han impulsado los estudios de esta familia en plátano. D'Hont *et al.* (2012) secuenciaron el genoma de plátano (*Musa acuminata* ssp. *malaccensis* 'DH-Pahang') y realizaron el primer estudio transcriptómico a partir de discos de hojas de plátano asperjadas con micelio de *M. fijiensis*. Las variedades que se utilizaron fueron 'DH-Pahang', 'Pisang madu' y 'Pisang pipit' que son resistente, parcialmente resistente y susceptible, respectivamente a la infección por *M. fijiensis*. Cuatro factores de transcripción de la familia WRKY del subgrupo IIa se expresaron diferencialmente de manera positiva en las variedades 'Pisang madu' y 'Pisang pipit'. Recientemente se realizó un estudio en plátano sobre la expansión evolutiva de los genes de la familia WRKY y de su perfil de expresión durante la infección en lesiones radiculares por el nematodo *Pratylenchus coffeae*. Se encontraron a) factores de transcripción WRKY que participan en el mecanismo de defensa general contra *P. coffeae*. b) factores de transcripción WRKY que tal vez participan beneficiando al patógeno mediante la supresión del PTI. c) factores de transcripción WRKY que probablemente contribuyen en el sistema de defensa del hospedero como activadores del PTI. d) finalmente tres factores de transcripción WRKY (MaWRKY52, 69 y 92) que son específicos contra *P. coffeae* que pueden actuar como activadores o represores en las vías de defensa (Kaliyappan *et al.*, 2016).

1.10 JUSTIFICACIÓN

El plátano es el cuarto cultivo alimentario más importante y el quinto en términos económicos a nivel mundial (Ploetz *et al.*, 2015). Sin embargo, los cultivares de plátano son susceptibles a diversos microorganismos patógenos (virus, bacterias y hongos) que merman la producción y que amenazan con destruir la industria del plátano (Johnson, 2000). *M. fijiensis* y FOC raza 4 son los hongos ascomicetos más devastadores de los cultivares de plátano. La aplicación intensiva de pesticidas es el método de control convencional más utilizado, no obstante, este sistema de control tiene efectos colaterales negativos en los ecosistemas (Menon, 2016).

Por otra parte, la ingeniería genética, es una herramienta biotecnológica capaz de proporcionar características agronómicas de interés a los cultivos de forma eficiente y versátil en comparación con otras tecnologías convencionales (Passos *et al.*, 2013; Swennen *et al.*, 2003). Los factores de transcripción WRKY constituyen una familia numerosa en plantas cuyas funciones están relacionadas en múltiples procesos de crecimiento, desarrollo y en la respuesta al estrés abiótico y biótico. OsWRKY45 y AtWRKY70 son dos factores de transcripción que tienen la capacidad de conferir una alta tolerancia a microorganismos patógenos mediante la sobreexpresión de los correspondientes ADNc. Por otro lado, la transcriptómica aplicada al estudio de la interacción de plátano con *M. fijiensis* ha sido crucial en la identificación de genes WRKY que muy probablemente estén participando en la vía de señalización del mecanismo de resistencia.

Tomando en consideración la función relevante que desempeñan los genes WRKY en el sistema inmune de las plantas y que son candidatos con un amplio potencial para el mejoramiento genético de cultivos agrícolas, en el presente trabajo se reporta la caracterización estructural y filogenética de cuatro genes WRKY de plátano, así como la elaboración de construcciones de expresión como un primer paso para evaluar su función en la resistencia contra *M. fijiensis* y otros patógenos importantes de este cultivo.

1.11 HIPÓTESIS

1. Los genes *OsWRKY45* y *AtWRKY70* que codifican para factores de transcripción de la familia WRKY de plantas están involucrados en la respuesta al estrés abiótico en arroz y *Arabidopsis*. Por lo tanto, Estos genes cuentan con ortólogos en el genoma de plátano con características estructurales similares y relaciones filogenéticas cercanas.
2. Los genes WRKY GSMUA_Achr7T05200 y GSMUA_Achr3T13440 de plátano aumentan su expresión en respuesta a *M. fijiensis*. En este sentido, la estructura y secuencia de estos genes es similar a la de genes WRKY de *Arabidopsis* involucrados en la resistencia al estrés biótico y presentan relaciones filogenéticas cercanas.

1.12 OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

1.10.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la estructura y filogenia de cuatro factores de transcripción de la familia WRKY de una variedad de plátano resistente a la Sigatoka negra (*Musa acuminata* ssp. *malaccensis* 'Pisang kra') y generar vectores de expresión para la evaluación funcional.

1.10.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar *in silico* la estructura, filogenia, y elementos en *cis* regulatorios de la transcripción de los factores de transcripción WRKY GSMUA_Achr7T05200, GSMUA_Achr3T13440 y ortólogos de *OsWRKY45* y *AtWRKY70* en *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* 'Pisang kra'.
2. Aislar y caracterizar la estructura de los ADNc que codifican para los factores de transcripción de estudio
3. Generar dos vectores de expresión con los ADNc que codifican para los factores de transcripción de estudio.

1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

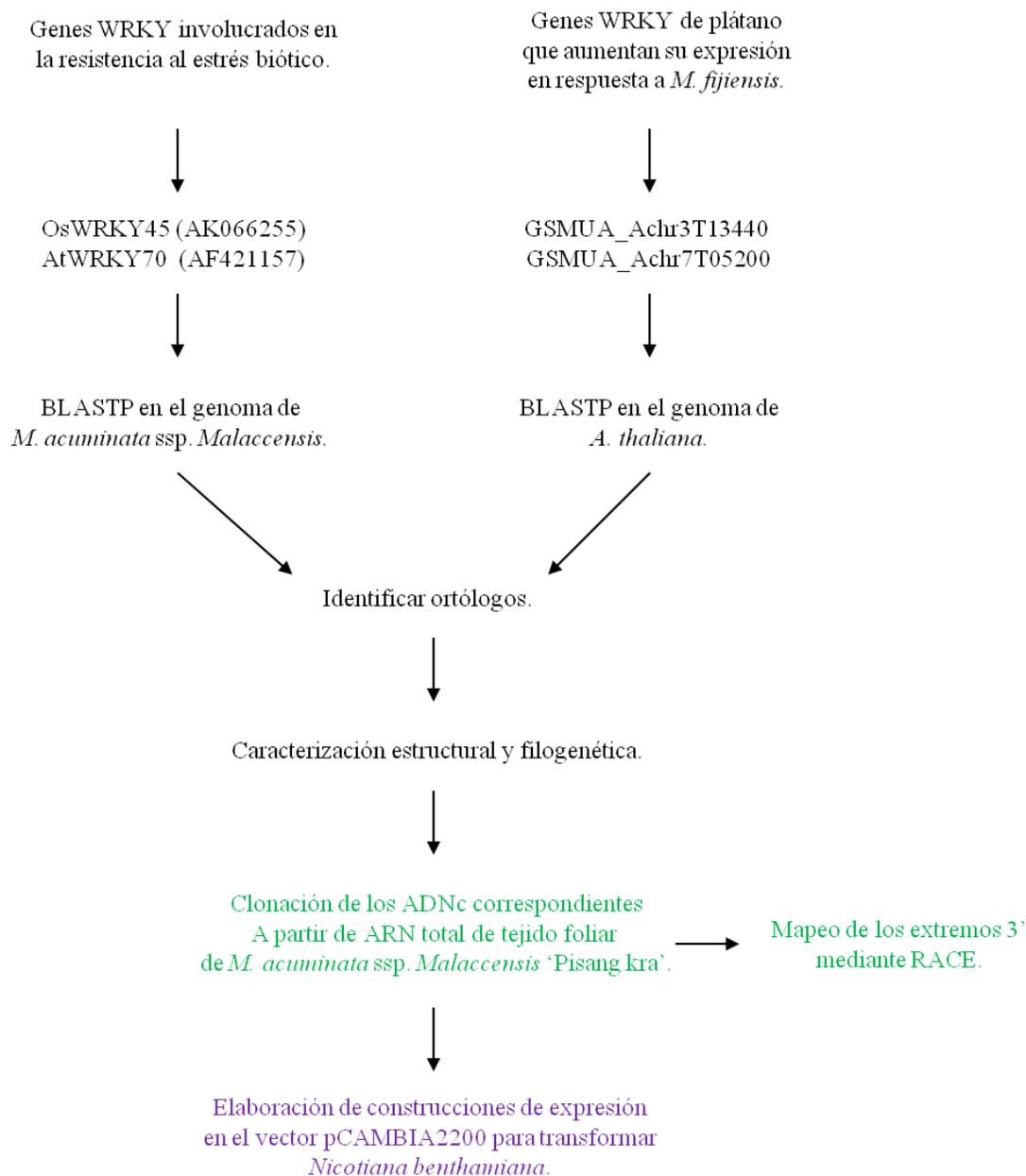


Figura 1.12 Estrategia experimental implementada en el presente estudio.

CAPÍTULO II

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* DE GENES DE LA FAMILIA WRKY DE PLÁTANO, Y ELABORACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN

2.1 INTRODUCCIÓN

El plátano es el fruto más consumido en el mundo. Para 400 millones de personas en el sureste asiático y África es un alimento básico y principal fuente de nutrientes y divisas (FAO, 2017). Para los países latinoamericanos el plátano representa una fuente de ingresos y empleos. La industria bananera que se ha forjado en el trópico de América es la responsable del suministro de plátano a los países del primer mundo. México es el onceavo productor de plátano en el mundo con 2,150, 520 toneladas en el 2016 de las cuales el 20% se destina para el mercado de exportación, dejando una derrama económica de 2,109 millones de pesos mexicanos (SIAP, 2017). Sin embargo, la industria bananera se encuentra al borde de una crisis derivada de las enfermedades causadas por patógenos fúngicos que amenazan con devastar las plantaciones como sucedió con la variedad 'Gros Michel' en la década de los 50s causada por el fitopatógeno *F. oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 (Menon, 2016). Otros microorganismos patógenos como *M. fijiensis* causan la enfermedad foliar sigatoka negra y aunque se puede controlar con el uso de fungicidas, el uso indiscriminado acarrea efectos colaterales en el medio ambiente y la salud de las personas (Sowmya *et al.*, 2016).

En las últimas décadas la ingeniería genética ha demostrado ser eficiente en la generación de variedades de plantas resistentes a fitopatógenos, actualmente no existe ninguna variedad comercial de plátano que sea resistente o tolerante a enfermedades. En este sentido, la caracterización de genes que codifican para proteínas que tienen un papel clave en la inducción de los mecanismos de defensa en plátano es imprescindible. Los factores de transcripción WRKY son una familia muy numerosa en plantas de los cuales varios miembros han demostrado estar involucrados en las cascadas de señalización en respuesta a la inducción de defensa de las plantas. Estos se caracterizan

por tener un dominio WRKY de ~60 aminoácidos conformado por un motivo WRKYGQK y un motivo dedos de zinc que es capaz de unir un ion de zinc. Este dominio reconoce el elemento en *cis* TTGACC(T) que se encuentra en la región promotora de la transcripción de los genes diana. Miembros de la familia WRKY son activados en las cascadas de señalización inducida por microorganismos patógenos y conducen la transcripción de un conjunto de genes (por ejemplo, proteínas antimicrobiales) en respuesta a la infección (Rushton *et al.*, 2010). En este trabajo se tomaron dos criterios para la elección de los miembros de la familia WRKY que se desean caracterizar en plátano. El primer criterio se basa en la búsqueda de ortólogos de OsWRKY45 y AtWRKY70 en plátano. OsWRKY45 es el factor de transcripción más estudiado de esta familia y se ha demostrado que está involucrado en la vía de señalización del AS no dependiente de NPR1 y tiene un papel clave en la inducción de la respuesta al estrés biótico (Qiu y Yu, 2009; Shimono *et al.*, 2007). Por otro lado, AtWRKY70 media la comunicación entre la vía del jasmonato y la vía del AS (Knoth *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004) lo hace un candidato para ser utilizado en la generación de plantas resistentes o tolerantes a enfermedades. El segundo criterio de elección deriva de los resultados de un transcriptoma de la interacción *M. fijiensis*-*M. acuminata* realizado por el mismo grupo que secuenció el genoma de plátano (D'Hont *et al.*, 2012). En este estudio se observó un incremento en la transcripción de algunos genes de la familia WRKY que posiblemente estén participando en la cascada de señalización.

La disponibilidad pública del genoma de plátano está permitiendo facilitar la caracterización de genes clave en la respuesta al estrés biótico mediante el uso de herramientas bioinformáticas. El objetivo de este capítulo del proyecto fue identificar y caracterizar estructuralmente genes de plátano que sean ortólogos a los genes de OsWRKY45 y AtWRKY70 de arroz y *Arabidopsis*, respectivamente, así como también aislar los genes WRKY (GSMUA_Achr7T05200 y GSMUA_Achr3T13440) de plátano cuya expresión se indujo en respuesta a *M. fijiensis* (D'hont *et al.*, 2012). El aislamiento *in vitro* de los ADNc de estos cuatro genes permitirá en estudios posteriores evaluar su función.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo se utilizaron plantas *ex vitro* de *M. acuminata* subsp. , *malaccensis* 'Pisang kra' que son resistentes a la Sigatoka negra y se encuentran localizadas junto a los invernaderos del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Por otro lado, para trabajos de clonación de material genético se utilizaron células competentes de la cepa *Escherichia coli* DH10B.

2.2.2 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A *OsWRKY45* Y *AtWRKY70* EN EL GENOMA DE PLÁTANO

La identificación *in silico* de las secuencias ortólogas a *OsWRKY45* y *AtWRKY 70* en plátano se realizó con la ayuda del programa BioEdit versión 7.0.0 que es un editor de secuencias biológicas. Previamente se cargó la información del proteoma predicho para el genoma secuenciado de *Musa acuminata* subespecie *malaccensis* 'DH-Pahang' (D'Hont *et al.*, 2012) a BioEdit (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997). La búsqueda se efectuó mediante BLASTP (BLAST de proteína) utilizando la secuencia de aminoácidos de los genes *OsWRKY45* (número de accesión: AK066255) y *OsWRKY70* (número de accesión: AF421157) que se encuentran disponible en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las proteínas ortólogas fueron nombradas MaWRKY45 y MaWRKY70 respetando el número de su homólogo en *O. sativa* y *A. thaliana* y su secuencia de aminoácidos fue descargada de la base de datos Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

2.2.3 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A GSMUA_Achr3T13440, GSMUA_Achr7T05200, GSMUA_Achr7T16090 Y GSMUA_Achr7T19340 DE PLÁTANO EN EL PROTEOMA DE *A. THALIANA*.

Basados en la información suplementaria del proyecto de secuenciación de plátano de D'Hont *et al.* (2012), se seleccionaron a las secuencias WRKY con números de accesión GSMUA_Achr3T13440, GSMUA_Achr7T05200, GSMUA_Achr7T16090 Y GSMUA_Achr7T19340 por presentar un perfil de expresión inducible en respuesta a la presencia de *M. fijensis*. Estas secuencias fueron descargadas de la base de datos de phytozome y posteriormente en esta misma plataforma se realizaron búsquedas BLASTP con la finalidad de determinar sus homólogos en *A. thaliana*.

2.2.4 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE PROTEÍNAS

Para el alineamiento de secuencias de proteínas se utilizaron las secuencias de plátano previamente descritas y secuencias de proteínas representativas de la familia WRKY de *A. thaliana* y *O. Sativa*. Se utilizó el programa clustalX v2.0 con los parámetros preestablecidos (Larkin *et al.*, 2007). Los residuos de amino ácidos idénticos fueron sombreados en el alineamiento con color negro y los aminoácidos con características físico-químicas parecidas con color gris empleando el programa en línea Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

2.2.5 PREDICCIÓN DE MOTIVOS Y DOMINIOS

El escrutinio de motivos y dominios de cada una de las secuencias proteicas de interés se realizó utilizando el programa en línea “ScanProsite Tool” de Expsy Bioinformatic Resource Portal (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>), este programa contiene la mayoría de los dominios y motivos que se han reportado. Para la predicción de los Sitios de Localización Nuclear (SLN) se empleó el programa en línea “NLS Mapper” (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) que identifica la existencia de potenciales SLN basándose en la similitud de secuencias de nuestras proteínas contra su base de datos de SLN reportados (Kosugi *et al.*, 2009).

2.2.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El árbol filogenético fue construido utilizando el método de “Neighbor joining” (NJ) (Saitou y Nei, 1987) y empleando el algoritmo de NJ incluido en el programa bioinformático “Molecular Evolutionary Genetic Analysis” (MEGA) versión 5 (Tamura *et al.*, 2011). Se utilizó un Bootstrap de 1000 réplicas para evaluar el grado de soporte para los patrones de agrupamiento dentro del árbol filogenético. Se emplearon las cuatro secuencias WRKY de plátano, 74 secuencias de la familia WRKY de *A. thaliana* y 7 secuencias de diferentes especies de plantas para las cuáles se ha comprobado experimentalmente su participación en el mecanismo de defensa al estrés biótico. Un total de 85 secuencias proteicas fueron procesadas para la elaboración del análisis filogenético.

2.2.7 PREDICCIÓN DE ELEMENTOS EN CIS REGULATORIOS DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LAS REGIONES PROMOTORAS

A partir de la secuencia del genoma de plátano DH-Pahang reportado en la plataforma Phytozome v12.1 se tomó una secuencia de 1500 nucleótidos corriente arriba a partir del codón de inicio (ATG) que codifica para la metionina de inicio de la traducción para cada uno de los cuatro genes *WRKY* de plátano. Se utilizaron las plataformas en línea de PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) y PlantPan (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/>) para el análisis de los elementos en *cis* putativos de las regiones promotoras de la transcripción de los genes de interés.

2.2.8 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 Y MaWRKY70

El modelaje modo “Cartoon” de la estructura tridimensional de las secuencias proteicas se realizó por homología mediante el uso del programa Swiss-Model Workspace v8.05 (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) (Bordoli *et al.*, 2009). Este programa realiza una predicción del modelo tridimensional de las proteínas de interés basándose en la similitud que comparten con proteínas cuyas estructuras ya se conocen a partir de datos experimentales (ej. datos cristalográficos). La estructura ya conocida de estas proteínas

se encuentran depositadas en la base de datos del Banco de Información de Proteínas o PDB por sus siglas en inglés (<https://www ww p d b . o r g />) cuya información se encuentra ligada al programa Swiss-Model. Los modelos tridimensionales de las proteínas fueron editados usando el programa Pymol v1.4.1. (<https://www . p y m o l . o r g />).

2.2.9 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para aislar la región codificante (CDS, por sus siglas en inglés) y mapear los extremos 3' UTR (Unstrated Regions) de los ADNc de cada uno de los cuatro genes *MaWRKY* se diseñaron oligonucleótidos y se adquirieron de la casa comercial SIGMA-ALDRICH. Los oligonucleótidos fueron diseñados siguiendo los parámetros establecidos en el kit GeneRacer™ de invitrogen™ para el aislamiento de los extremos 3' UTR y para el aislamiento de las regiones codificantes se diseñaron en los extremos. Además, se utilizaron los oligonucleótidos que proporciona el estuche GeneRacer™ de invitrogen™. En la Tabla 2.1 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos empleados.

Tabla 2.1 Diseño de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)
Oligonucleótidos para RACE 3'		
GSPWRKY18-OD	acagccagccttctcaggtc	65.9
NGSPWRKY18-OD	aggtcttcgcatccaagtc	65.4
GSPWRKY45-OD	aagatgcagcgagcaatctgacc	70.6
NGSPWRKY45-OD	ttcctgctaccagcgaccgag	70.7
GSPWRKY60-OD	accggagatggagtcg	59.7
NGSPWRKY60-OD	tcgtgtcgggaagatccagc	67.6
GSPWRKY70-OD	tggcgtcggagtcgatctactc	70.5
NGSPWRKY70-OD	acagactcggactcggagatcacc	71.5
Oligonucleótidos para amplificación de las ORFs		
MaWRKY18-ORF-OD	tattcaggatccaggcctactagtgtaccaacaatgggatcggcttggtg	86.1
MaWRKY18-ORF-OR	tattcagtcgaccgcgggttaagcatcatcccggaaatg	84.8
MaWRKY45-ORF-OD	tattcaaggcctactagtgtaccaacaatggaacacacgcctgttg	82.7
MaWRKY45-ORF-OR	tattcagtcgaccgcgggtcatcggaagaactcgtcg	85.7
MaWRKY60-ORF-OD	tattcaaggcctactagtgtaccaacaatggggtcaagttggttg	82.3
MaWRKY60-ORF-OR	tattcaggatccgtcgaccgcgggttagctagttcgcaggggaag	87.8
MaWRKY70-ORF-OD	tattcaaggcctactagtgtaccaacaatgggagcagcacagg	83.3
MaWRKY70-ORF-OR	tattcaggatccgtcgaccgcgggtcaggagaagaagctcgagg	88.8

NGSP: Nested Gene Specific Primer; OD: Oligonucleótido directo; OR: Oligonucleótido reverso.

El diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de las ORFs contiene sitios de restricción para facilitar la subclonación en vectores de expresión (Figura 2.1). También se adicionó la secuencia TIS (Translation Initiation Sequence) AACA justo antes del codón que codifica para la metionina de inicio de la traducción que es una secuencia que se sabe potencia la traducción de los ARNm.

2.2.10 EXTRACCIÓN DE ARN

Se pesó 200 mg de tejido foliar joven (hoja contigua a la hoja cigarro) de plantas de plátano (*M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang Kra') disponibles en el CICY, A.C. La extracción de ARN se realizó utilizando el estuche comercial DNA extraction PHYTOPURE™ de la casa comercial Ilustra, siguiendo el protocolo provisto por el fabricante (<http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/TL200.pdf>). Con esta estrategia de extracción se obtienen los ácidos nucleicos ADNg (ADN genómico) y ARN total. De los 40 µL del extracto ADN/ARN obtenidos, se tomaron 20 µL y fue tratado con el estuche Turbo DNA-free™ de ThermoFisher Scientific™ para digerir el ADN y recuperar el ARN total 2 µL de Turbo DNasa se agregaron juntamente con 5 µL del amortiguador 10X y se aforo a 50 µL, la reacción se incubo a 37° C por 45 minutos. Posteriormente, se agregó 10 µL del reactivo de inactivación de la DNasa y se incubo a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos, luego se centrifugó la reacción a 10,000 x g (gravedades) por 2 minutos. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL con el cuidado de no llevar trazas del buffer de inactivación.

Para evaluar la integridad del ARN se fraccionarán 2 µL de la extracción en un gel de agarosa al 1.2% a 90 volts y con una concentración de 1 mg·mL⁻¹ de bromuro de etidio. El gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Gel Doc™ EZ Imager, BIO-RAD). La concentración y pureza del ARN se midió con el espectrofotómetro SmartSpect plus de BioRad.

2.2.11 SÍNTESIS DE ADNc

Se utilizaron 5 µg de ARN total y 1 µL de oligo dT (50 µM). Esta mezcla se incubo a 75 °C por 5 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo por 3 minutos. Posteriormente se le

agrego 2 μL de DTT 0.1M (0.01 M), 2 μL de dNTP's 10 mM (1 mM), 1 μL de inhibidor de RNasa 40 U· μL (Invitrogen), 1 μL de Superscript III (Transcriptasa reversa, TR) 200 U· μL^{-1} (Invitrogen), 4 μL de amortiguador 5 \times strand (1X) y se aforó con agua ultrapura a 20 μL . Se incubó a 55 °C por 90 minutos y se inactivo la enzima a 75 °C por 15 minutos. Después se agregaron 2 μL de ARNsa A (1 mg·mL⁻¹) y se incubo a 37 °C por dos horas. Finalmente, se realizó una dilución 1:4 con agua ultrapura y se almaceno a -20 °C.

Para corroborar la integridad de la biblioteca de ADNc se realizó una PCR (Polymerase Chain Reaction) con oligonucleótidos específicos de actina. Los oligonucleótidos esta diseñados de tal manera que en región codificante un intrón fue dejado intencionalmente dentro del diseño, esto facilita descartar la contaminación por ADN genómico.

2.2.12 AISLAMIENTO DE LOS EXTREMOS 3'UTR Y DE LAS REGIONES CODIFICANTES DE *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* Y *MaWRKY70*

Las amplificaciones de los extremos 3' de los genes *MaWRKY18/45/60/70* se realizaron mediante dos rondas de PCR utilizando la estrategia de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

Se tomaron 5 μL de la dilución de la síntesis de ADNc, 2 μL del oligonucleótido GeneRacer™ 3' Primer (10 μM), 1 μL oligo específico (10 μM), 5 μL de amortiguador 10 \times , 1.5 μL de MgCl⁺² (50 mM), 1 μL de *Thermus aquaticus* polimerasa recombinante (200 U· μL^{-1}) de invitrogen y se aforó con agua ultrapura a un volumen total de 50 μL . Las mezclas para la reacción de PCR fueron colocadas en el termociclador C1000 touch™ de BIO-RAD utilizando el programa que se muestra en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Programa de PCR para la amplificación de las ORFs y los extremos 3'UTR.

93 °C – 3 min	93 °C – 1 min 65 °C – 30 seg 72 °C – 1 min	93 °C – 1 min 60 °C – 30 seg 72 °C – 1 min	72 °C – 10 min
1 ciclo	5 ciclos	25 ciclos	1 ciclo

Al finalizar el programa de PCR se realizó una segunda ronda de PCR tomando 1 μL del producto de la primera ronda de PCR y 1 μL de los oligonucleótidos anidados NestedGeneRacer™ 3' Primer (10 μM) y el específico anidado de la región codificante (10 μM). Se siguieron los parámetros establecidos para la primera ronda. Posteriormente, 7 μL de cada reacción fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, 90 volts y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. El gel se visualizó en el fotodocumentador de BIO-RAD previamente mencionado.

Para el aislamiento de las regiones codificantes de los genes WRKY se decidió también realizar dos rondas de PCR. Tomando en cuenta los ADNc tiene el Oligo dT en el extremo 3', se decidió utilizar el oligonucleótido reverso del estuche de RACE NestedGeneRacer™ 3' Primer (10 μM) como el oligonucleótido reverso en la primera ronda de PCR. Los demás componentes de la reacción fueron: 1 μL de oligonucleótido directo, 5 μL de amortiguador 10 \times , 1.5 μL de MgCl_2 (50 mM), 1 μL de *Thermus aquaticus* polimerasa recombinante (200 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de invitrogen y se aforó con agua ultrapura a un volumen total de 50 μL . Las condiciones del programa de PCR que se siguieron para las dos rondas de PCR fueron las mismas descritas para el aislamiento de los extremos 3'UTR. De igual manera los productos de las reacciones fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, 90 volts. y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. El gel se visualizó en el fotodocumentador.

Los gels de agarosa donde se fraccionaron los productos de la PCR para amplificar los CDSs y las regiones 3'UTR de los genes fueron visualizados en un transluminador UV a 312 nm. Los amplicones se escindieron del gel con la ayuda de un escalpelo estéril y se colocaron en un tubo eppendorf en hielo. Luego se purificó con la ayuda del estuche comercial Gel extraction QIAquick® de QIAGEN (http://www.indiana.edu/~lchenlab/protocol_files/agarose_gel_extraction.pdf). La concentración del ADN purificado fue cuantificada en un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo-SCIENTIFIC™).

2.2.13 CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se realizaron reacciones de ligación para clonar en un vector de clonación los productos purificados. La reacción se realizó en un volumen total de 10 μL ; 5 μL del amortiguador 2x Rapid Ligation T4 ADN Ligase, 1 μL de vector pGEM[®]-T Easy (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de T4 ADN Ligase (3 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), y el ADN de interés (5 veces más producto purificado que vector) y se aforó con agua ultrapura a 10 μL . La reacción se incubó a 5 °C por 12 horas.

Se mezclaron gentilmente 10 μL de la reacción de ligación y 100 μL de células competentes de *E. coli* DH10B previamente descongeladas. Se incubó en hielo por 20 minutos, seguidamente se sometió a un choque térmico de 42 °C por 50 segundos y de inmediato se incubó en hielo por 5 minutos. Luego se adicionaron 900 μL de medio LB (Luria-Bertani) líquido y se incubó a 37 °C por 90 minutos a 200 rpm (revoluciones por minuto). Después se efectuó una centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos y se resuspendió la pastilla en 100 μL de medio LB. Las células resuspendidas se sembraron en medio sólido LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), IPTG (0.5mM) y X-Gal (80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en cajas Petri, con la ayuda de un asa de Drigalsky se extendió el inóculo en toda la superficie. Para su crecimiento las placas fueron colocadas en una incubadora a 37 °C por 16 horas y luego se dejaron a 4 °C.

2.2.14 AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

Las colonias blancas fueron puestas a crecer en 4 μL de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) en tubos de ensaye por 16 horas a 200 rpm y 37 °C. Luego se resguardaron 300 μL de cada una de las soluciones bacterianas en glicerol (80% glicerol, 20% inóculo) en el unltracongelador a -80 °C. Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron siguiendo las instrucciones del protocolo provisto en el estuche High Pure Plasmid Isolation de Roche[™] (https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/General_Information/1/high-pure-plasmid-isolation-kit.pdf) que se basa en el principio de lisis alcalina y el uso de columnas de sílica para adherir el ADN mediante diferencia de cargas electrostáticas en presencia de un agente caotrópico.

2.2.15 SECUENCIACIÓN

Se enviaron 500 ng de plásmido mezclados con 25 pmoles del oligonucleótido universal M13 a la compañía Macrogen Inc. en Seoul Corea del Sur para su secuenciación por el método de Sanger (Sanger y Coulson, 1977). Cada una de las clonas fueron enviadas con el oligonucleótido directo y reverso por separado.

2.2.16 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se utilizó el programa SeqMan de ADNSTAR Lasergene 7 para realizar los alineamientos, eliminar las secuencias que pertenecen al vector pGEM[®]-T Easy y descartar los errores de secuenciación mediante los cromatogramas que vienen incluidos en el reporte de secuenciación. Luego, las secuencias de las clonas fueron alineadas con las secuencias predichas en Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) de los genes *MaWRKY18/45/60/70* utilizando el programa clustal x v2.0 con los parámetros preestablecidos (Larkin *et al.*, 2007). Los nucleótidos idénticos fueron sombreados en el alineamiento con color negro empleando el programa en línea Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Se realizó también la traducción del marco abierto de lectura utilizando el programa de BioEdit versión 7.0.0.

2.2.17 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

Se generaron dos vectores de expresión con las regiones codificantes de *MaWRKY18* y *MaWRKY70*. Los CDSs fueron subclonados del vector pGEM-T Easy a un vector de expresión derivado de pCAMBIA2200 (8,895 pb). Este vector de expresión derivado de pCAMBIA contiene en su sitio múltiple de clonación el clúster de expresión 35S::MaRARI::NOS. La estrategia que se utilizó para realizar la subclonación de las ORFs esta resumida en la Figura 2.2.1.

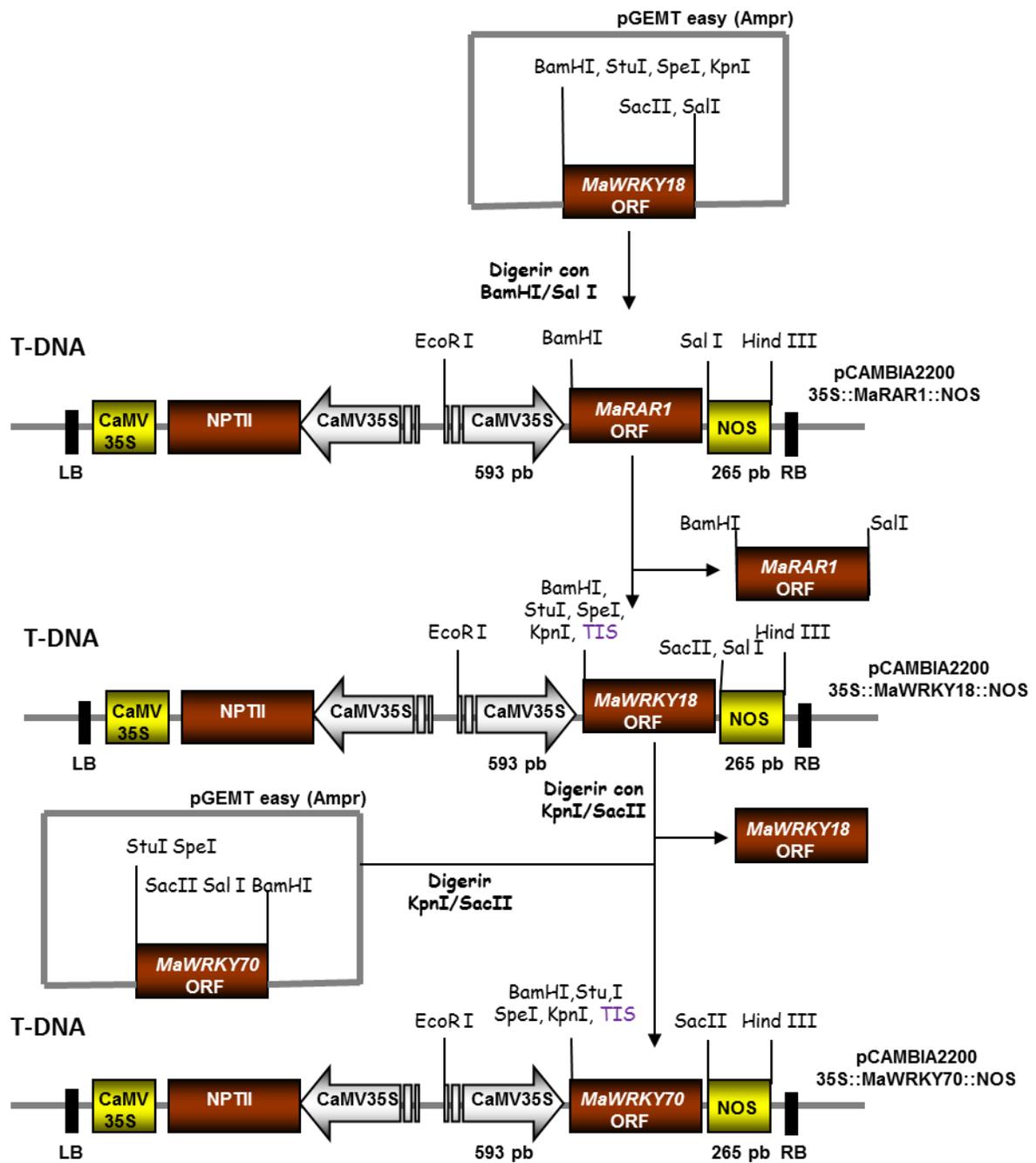


Figura 2.1 Estrategia experimental para la subclonación de las ORFs de MaWRKY18 y MaWRKY70 en un vector de expresión derivado de pCambia2200.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS HOMÓLOGAS A OsWRKY45 Y AtWRKY70 EN PLÁTANO

La búsqueda de proteínas homólogas a OsWRKY45 y AtWRKY70 en plátano se realizó mediante un BLASTP. A partir de la búsqueda por similitud se tomaron los cinco primeros hits con mayor puntaje (número de aminoácidos que alinean por similitud o identidad) y menor valor E (probabilidad de que el alineamiento haya ocurrido al azar).

En la Tabla 2.3 se muestran los cinco primeros hits obtenidos mediante el BLASTP utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos de OsWRKY45. Las cinco secuencias obtenidas pertenecen a la familia de transcripción de la familia WRKY. El primer hit (en verde olivo) identificado con la clave GSMUA_Achr5P07490_001 tiene el mayor puntaje con 152 bits, 38% de identidad, 55% de similitud, y un valor E igual a 3e-037. Las cuatro secuencias restantes fueron identificadas como proteínas putativas con alta similitud a OsWRKY69, AtWRKY70, AtWRKY55 y AtWRKY41 respectivamente. Se seleccionó la secuencia de aminoácidos del primer hit como proteína homóloga a OsWRKY45 y a la cual nombramos como MaWRKY45 por pertenecer a la especie *Musa acuminata*. MaWRKY45 presentó una longitud de 335 residuos de aminoácidos.

Tabla 2.3 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software BioEdit usando como referencia la secuencia de aminoácidos de OsWRKY45 y el genoma de *M. acuminata*.

Locus	Puntaje (score/bits)	Identidad %	Similitud %	Valor (E)
GSMUA_Achr5P07490	152	38	55	3e-037
GSMUA_Achr6P05710	103	34	50	2e-022
GSMUA_Achr1P27980	100	30	48	1e-021
GSMUA_Achr8P01730	97.8	43	53	7e-021
GSMUA_AchrUn_randomP24820	97.8	28	47	7e-021

Tabla 2.4 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software BioEdit usando como referencia la secuencia de aminoácidos de AtWRKY70 y el genoma de *M. acuminata*.

Locus	Puntaje (score/bits)	Identidad %	Similitud %	Valor (E)
GSMUA_Achr1T27980	103	33	52	1e-022
GSMUA_Achr5T07490	102	50	64	3e-022
GSMUA_Achr6T05710	100	37	50	1e-021
GSMUA_Achr8T01730	99.4	35	56	2e-021
GSMUA_Achr7T14140	96.3	31	44	2e-020

Por otra parte, en la Tabla 2.4 se muestran de igual modo las cinco proteínas predichas cómo homólogas de AtWRKY70 en plátano mediante BLASTP. El primer hit (en verde olivo) identificado con la clave GSMUA_Achr1T27980 tiene un número de puntaje de 103, 33% de identidad, 52% de similitud, y un valor E de 1e-022. La diferencia en el puntaje es mínima entre cada una de las cinco secuencias predichas. El segundo hit identificado como GSMUA_Achr5T07490 está solo un punto por debajo del primer hit y tiene un porcentaje mayor de identidad (50%) y similitud (64%) que el primer hit, no obstante, está proteína corresponde al homólogo de OsWRKY45 como lo mostramos en la Tabla 2.2 como primer hit. Las cuatro secuencias restantes pertenecen también a la familia de factores de transcripción WRKY. En este sentido de igual manera el primer hit fue reconocido como la secuencia más parecida a AtWRKY70 y se nombró como MaWRKY70. La longitud de la proteína predicha fue de 310 aminoácidos.

2.3.2 IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A GSMUA_Achr3T13440, GSMUA_Achr7T05200, GSMUA_Achr7T16090 Y GSMUA_Achr7T19340 EN *A. THALIANA*.

En las Tablas 2.4-2.7 se muestran los primeros cinco hits de cada BLASTP que se realizó para encontrar los posibles homólogos de las proteínas identificadas como GSMUA_Achr3T13440, GSMUA_Achr7T05200, GSMUA_Achr7T16090 Y GSMUA_Achr7T19340 que tuvieron una regulación positiva en el transcriptoma de la

infección *M. acuminata*-*M. fijiensis*.

En la Tabla 2.5 se observan los primeros cinco hits del BLASTP tomando como referencia la secuencia de GSMUA_Achr3T13440. Todos los hits pertenecen a miembros de la familia WRKY en *A. thaliana*. Sin embargo, el primer y segundo hit (en verde olivo) son ortólogos putativos de AtWRKY18 (AT4G31800.2) con una identidad del 41.2% y similitud del 52%. Es importante mencionar que también se encuentran AtWRKY40 y AtWRKY60 como tercer y cuarto hit respectivamente.

Tabla 2.5 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software de phytozome usando como referencia la secuencia de aminoácidos de GSMUA_Achr3T13440 y el genoma de *A. thaliana*.

Locus	Puntaje (score/bits)	Identidad %	Similitud %	Valor (E)
AT4G31800.2	183.7	41.2	52	3.06945e-55
AT4G31800.1	183.3	41.2	52	4.81819e-55
AT1G80840.1	176.8	39	52.5	1.16525e-52
AT2G25000.1	172.2	45.5	57	3.61999e-51
AT1G62300.1	102.4	63.5	79.4	3.17567e-24

Por otro lado, en la Tabla 2.6 identificamos al homólogo de la secuencia proteica identificada como GSMUA_Achr7T05200. El primer hit corresponde a AtWRKY60 y obtuvo el puntaje más alto con 188 puntos y una identidad del 49%. En este caso también encontramos a AtWRKY18 y AtWRKY40 dentro de los cinco hits.

Tabla 2.6 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software de phytozome usando como referencia la secuencia de aminoácidos de GSMUA_Achr7T05200 y el genoma de *A. thaliana*.

Locus	Puntaje (score/bits)	Identidad %	Similitud %	Valor (E)
AT2G25000.1	188	49	60.5	3.28583e-57
AT4G31800.2	186.4	42.4	55.1	3.71652e-56
AT4G31800.1	181.4	42.2	54.9	2.73255e-54
AT1G80840.1	178.3	43.2	58.3	3.51972e-53
AT1G68150.1	105.1	49.5	60.6	8.84799e-26

En la Tabla 2.7 y 2.8 observamos que el primer hit para ambas secuencias GSMUA_Achr7T16090 y GSMUA_Achr7T19340 corresponde a la misma proteína, AtWRKY40, con un porcentaje de identidad del 43% en los dos casos. Interesantemente, también encontramos a AtWRKY18 y AtWRKY60 dentro de los primeros cinco hits. Es de notarse un patrón en el que se observa una similitud en la secuencia proteica de AtWRKY18/40/60.

En este trabajo se nombraron a las proteínas de plátano como MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 y MaWRKY70 respetando el nombre de las proteínas WRKY que se identificaron en el primer hit para cada BLASTP, únicamente se cambiaron las iniciales At (*A. thaliana*) por Ma (*M. acuminata*).

Tabla 2.7 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software de phytozome usando como referencia la secuencia de aminoácidos de GSMUA_Achr7T16090 y el genoma de *A. thaliana*.

Locus	Puntaje (score/bits)	Identidad %	Similitud %	Valor (E)
AT1G80840.1	168.3	43.1	61.9	4.49769e-50
AT4G31800.2	166.4	53.8	67.9	2.33184e-49
AT4G31800.1	166.4	53.8	67.9	2.38834e-49
AT2G25000.1	163.3	53	66.5	1.60814e-48
AT4G22070.1	96.7	52.6	69.7	9.23267e-23

Tabla 2.8 Cinco primeros hits obtenidos mediante BLASTP local en el software de phytozome usando como referencia la secuencia de aminoácidos de GSMUA_Achr7T19340 y el genoma de *A. thaliana*.

Locus	Puntaje (score/bits)	Identidad %	Similitud %	Valor (E)
AT1G80840.1	188.7	43.4	56.2	2.23467e-58
AT4G31800.2	178.3	59.3	74	2.17179e-54
AT4G31800.1	178.3	59.3	74	2.20359e-54
AT2G25000.1	173.7	46.8	57.2	5.50407e-53
AT1G62300.1	104.8	53	67.5	6.69768e-26

2.3.3 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS

Se realizó un alineamiento múltiple CLUSTALX con las secuencias de aminoácidos de OsWRKY45, AtWRKY18, 60, 70 y sus homólogos en plátano MaWRKY18, 45, 60 y 70. En la Figura 2.2 se observa la conservación del dominio WRKY en todas las secuencias. El motivo WRKYGQK (resaltado en verde) es invariable y la estructura del motivo dedos de zinc para los factores de transcripción MaWRKY18 y MaWRKY60 es Cx5Cx23HxH, mientras tanto para MaWRKY45 y MaWRKY70 es Cx7Cx23HxC. Es muy notable también la conservación de los residuos de aminoácidos (sombreados en color negro) que flanquean al motivo WRKY y al motivo dedos de zinc de MaWRKY18 y MaWRKY60 y que sin embargo, difiere de las secuencias conservadas que flanquean a ambos motivos en MaWRKY45 y MaWRKY70. El resto de las secuencias proteicas no muestra similitud alguna salvo en el caso de MaWRKY18 y MaWRKY60 que tiene un motivo conservado al final del extremo C-terminal y un motivo GKRK próximo al dominio WRKY que muy probablemente pertenezca a la SLN por ser rico en arginina y lisina.

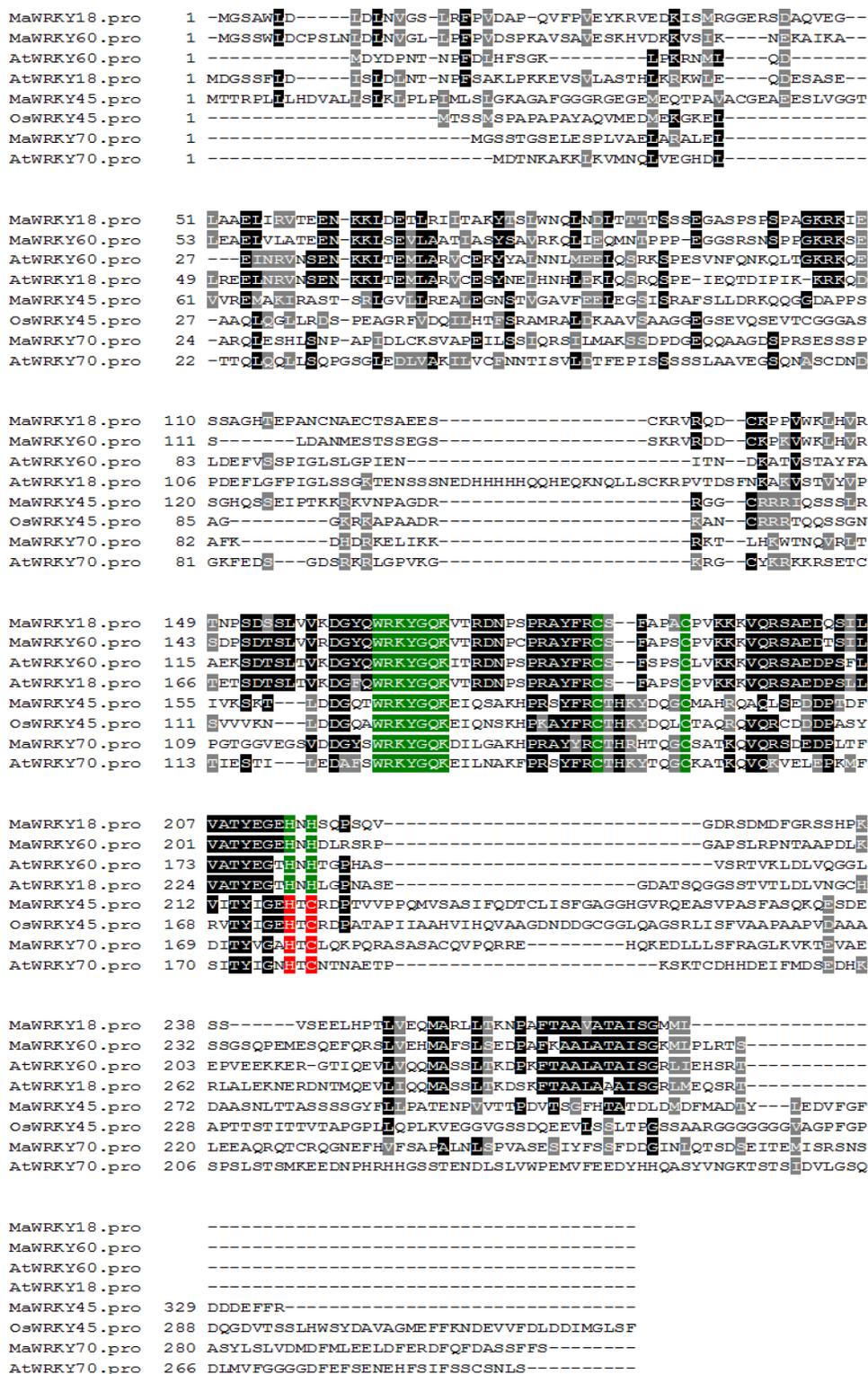


Figura 2.2 Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de OsWRKY45, AtWRKY18, AtWRKY 60 y AtWRKY70 con sus putativos ortólogos en plátano.

2.3.4 PREDICCIÓN DE MOTIVOS Y DOMINIOS DE MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 y MaWRKY70

En la Figura 2.3 se muestra un esquema detallado de los motivos y dominios estructurales predichos *in silico*. Primeramente, se localizó un dominio WRKY en cada una de las proteínas de estudio. En el caso particular de MaWRKY18 el dominio WRKY (66 aminoácidos) comienza en el residuo 153 y termina en el 259. En MaWRKY45 el dominio WRKY (60 aminoácidos) se localiza desde el residuo 121 al 181. Para MaWRKY60 el dominio WRKY (66 aminoácidos) va del residuo 147 al 213. Y finalmente, MaWRKY70 tiene un dominio WRKY (62 aminoácidos) que se extiende desde los residuos 118 a 180. Los dominios WRKY de MaWRKY18, 60 y 70 se sitúan en la región C-terminal no así en MaWRKY45 que se localiza en el centro de la secuencia proteica.

Se localizaron los SLN potenciales en los cuatro MaWRKYs. En MaWRKY18 se encontró un SLN monopartita (PAGKRKIESS; residuo 102 al 112), en MaWRKY45 un SLN bipartita (KRKVNPA GDRRG GCRRI; residuo 91 a 108), MaWRKY60 contiene un SLN bipartita (RSNSPPGKRKSESLDANMESTSSEGSSKRVRDD; residuo 99 al 132) y MaWRKY70 un SLN monopartita (RKELIKRKT LHKW; residuo 88 a 102). Todos los SLN se sitúan en la región N terminal a unos pocos residuos de aminoácidos de distancia del dominio WRKY en el rango de los residuos 100 a 140 y están constituidos por ~10 residuos de aminoácidos ricos en argininas (R) y Lisinas (K).

Se identificaron múltiples sitios putativos de fosforilación a lo largo de la secuencia proteica de los cuatro factores de transcripción MaWRKY. Se encontraron tres tipos de sitios de fosforilación que pueden ser fosforilados por la enzima cinasa C, caseína cinasa II y la cinasa dependiente de cAMP (AMP cíclico) y cGMP (GMP cíclico). La mayoría de los sitios susceptibles a fosforilación se encuentran distribuidos en la región N-terminal excepto en MaWRKY45 que contiene a la mayoría en la región C-terminal. En la secuencia que comprende el dominio WRKY se observan también sitios potenciales de fosforilación. Por otro lado, MaWRKY60 contiene un motivo hélice súper enrollada y MaWRKY70 un péptido señal, ambos en la región N-terminal. Además, se localizaron sitios susceptibles a modificaciones postraduccionales de glicosilación en MaWRKY18 y 45, sitios de miristilación en los cuatro factores de transcripción MaWRKY y sitios de amidación en MaWRKY18 y 60.

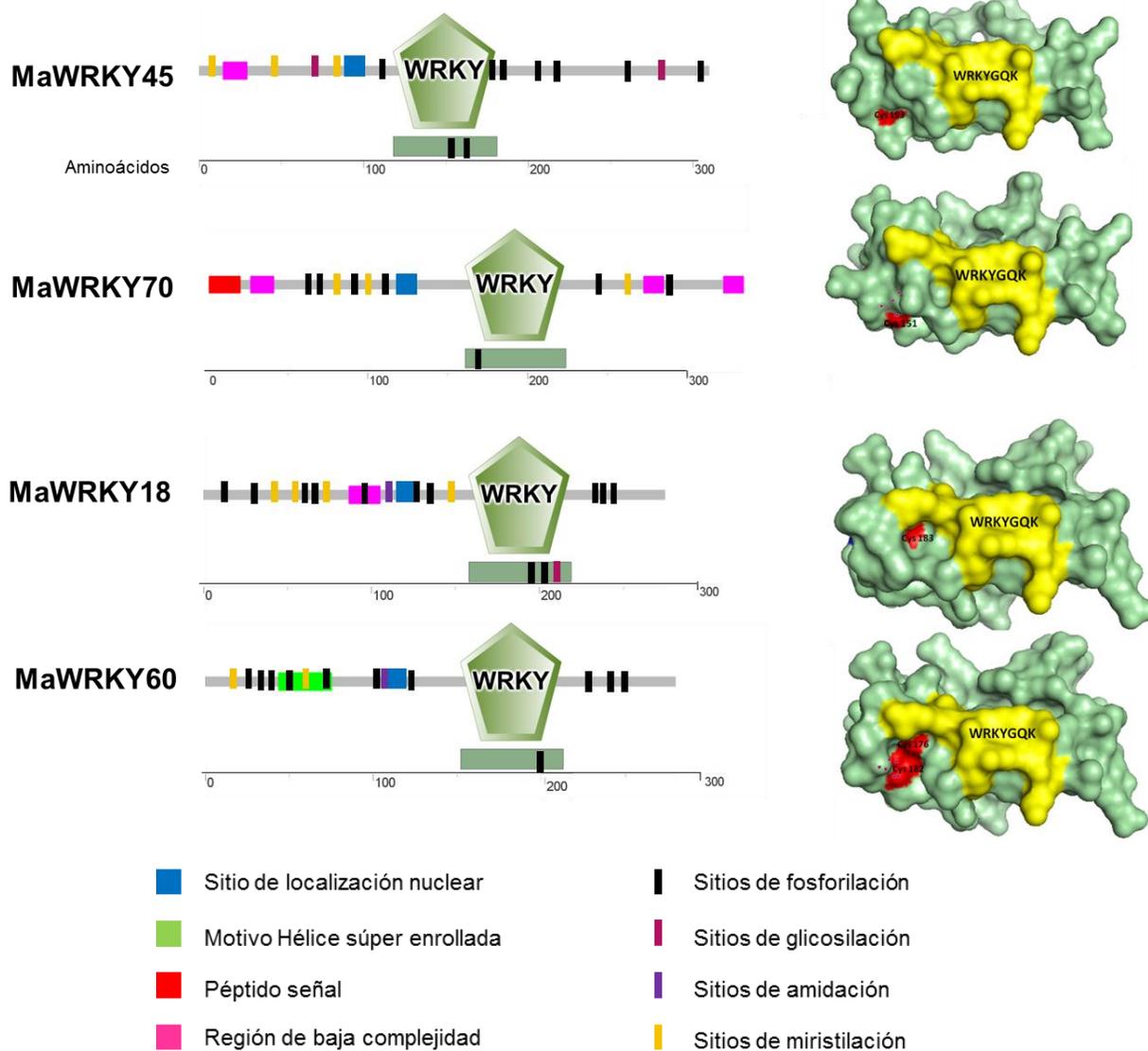


Figura 2.3 Dominios y motivos estructurales predichos para los factores de transcripción MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 y MaWRKY70.

2.3.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS

El árbol filogenético se realizó utilizando las secuencias proteicas de los factores de transcripción MaWRKY de estudio, todos los miembros de la familia WRKY de *A. thaliana* y miembros representativos de otras especies de plantas como se describió previamente en materiales y métodos.

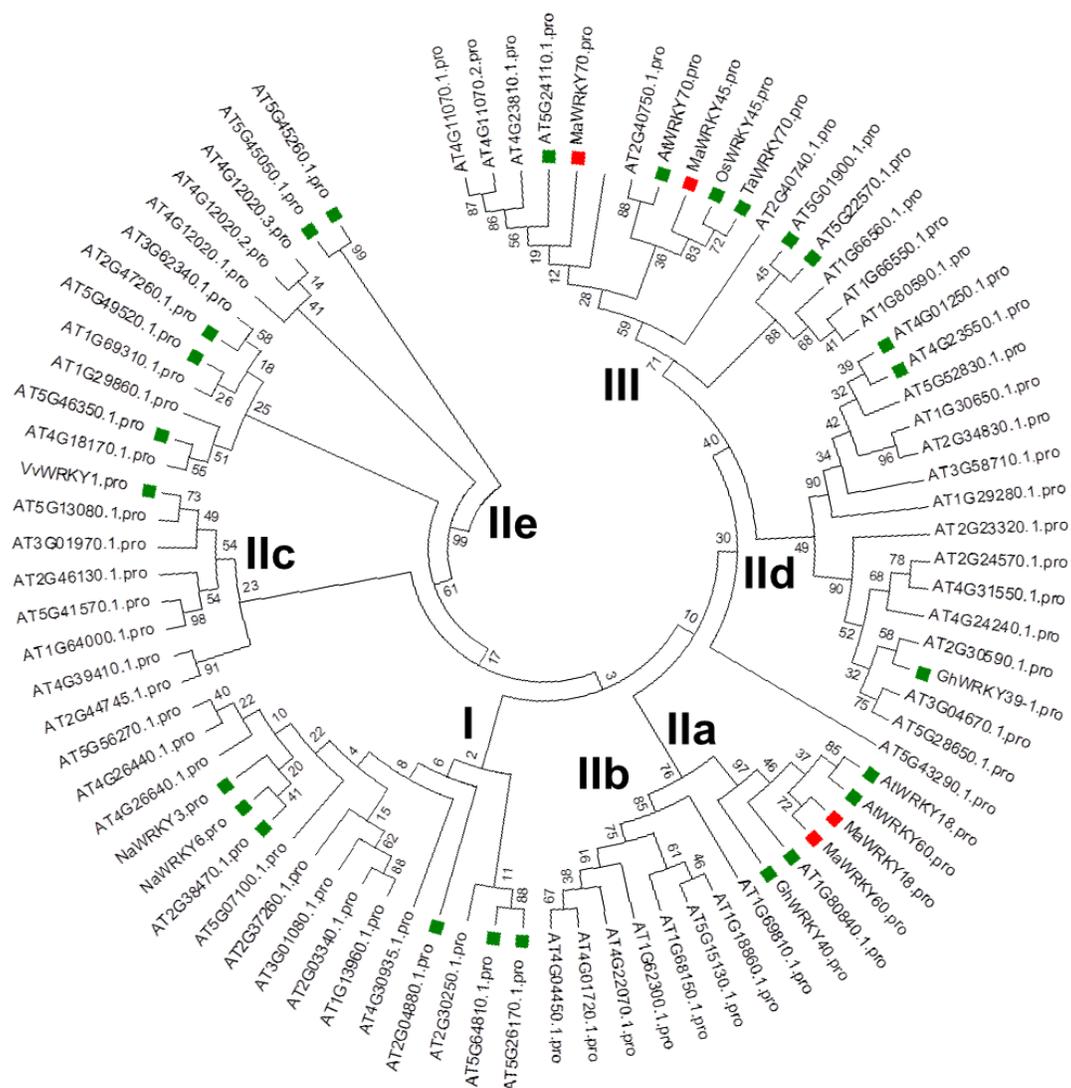


Figura 2.4 Filogenia de los factores de transcripción MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 y MaWRKY70. En cuadros verdes los factores de transcripción que han sido evaluados funcionalmente por sobreexpresión o mutación. En rojo los factores de transcripción MaWRKY de estudio.

El análisis filogenético (Figura 2.4) muestra claramente la distribución de los clados que corresponden a los diferentes grupos y subgrupos en los que se divide la familia WRKY (grupo I; grupo IIa, b, c, d, e; grupo III). Las proteínas de estudio MaWRKY45 y MaWRKY70 se sitúan en el grupo III juntamente con sus ortólogos OsWRKY45 y AtWRKY70, aunque este último se encuentra a una distancia evolutiva más alejada de su posible ortólogo en plátano. Así mismo, en este mismo grupo 4 de los 11 miembros de *A. thaliana*, TaWRKY70 (de trigo) y OsWRKY45 están involucrados en el mecanismo de defensa de las plantas al estrés biótico. No obstante, MaWRKY18 y MaWRKY60 pertenecen al grupo II subgrupo IIa que es uno de los clados más pequeños con apenas 3 miembros en *A. thaliana* de los cuales todos participan en la vía de señalización del sistema de defensa de las plantas contra microorganismos patógenos.

La mayoría de los factores de transcripción de la familia WRKY de *A. thaliana* que participan en el sistema de defensa al estrés biótico según datos experimentales se concentran en los grupos I, IIa, IIe y III.

2.3.6 REDICCIÓN DE LOS ELEMENTOS REGULATORIOS EN CIS DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN

En el análisis de los elementos en *cis* de la región promotora putativa de la transcripción de cada uno de los cuatro genes *MaWRKYs* de estudio se encontraron elementos regulatorios responsivos a fitohormonas, a estrés biótico, estrés abiótico y otros elementos en *cis* que son reconocidos por diferentes familias de factores de transcripción de plantas.

En la Figura 2.5 se detalla la distribución de todos los elementos en *cis*, sin embargo, es relevante mencionar que se identificaron elementos W-box en los cuatro promotores cuya secuencia es reconocida por la familia WRKY, elementos responsivos a ácido salicílico en MaWRKY18 y MaWRKY70, y responsivos a metil jasmonato en MaWRKY45 y MaWRKY60. También se encontraron elementos responsivos a otras fitohormonas como giberelina, auxina y ácido abscísico. Por otra parte, se encontraron elementos responsivos al estrés por calor y bajas temperaturas; así como elementos de unión de diversas familias de factores de transcripción MYB, bZIP, NAC, bHLH, DOF y ERF.

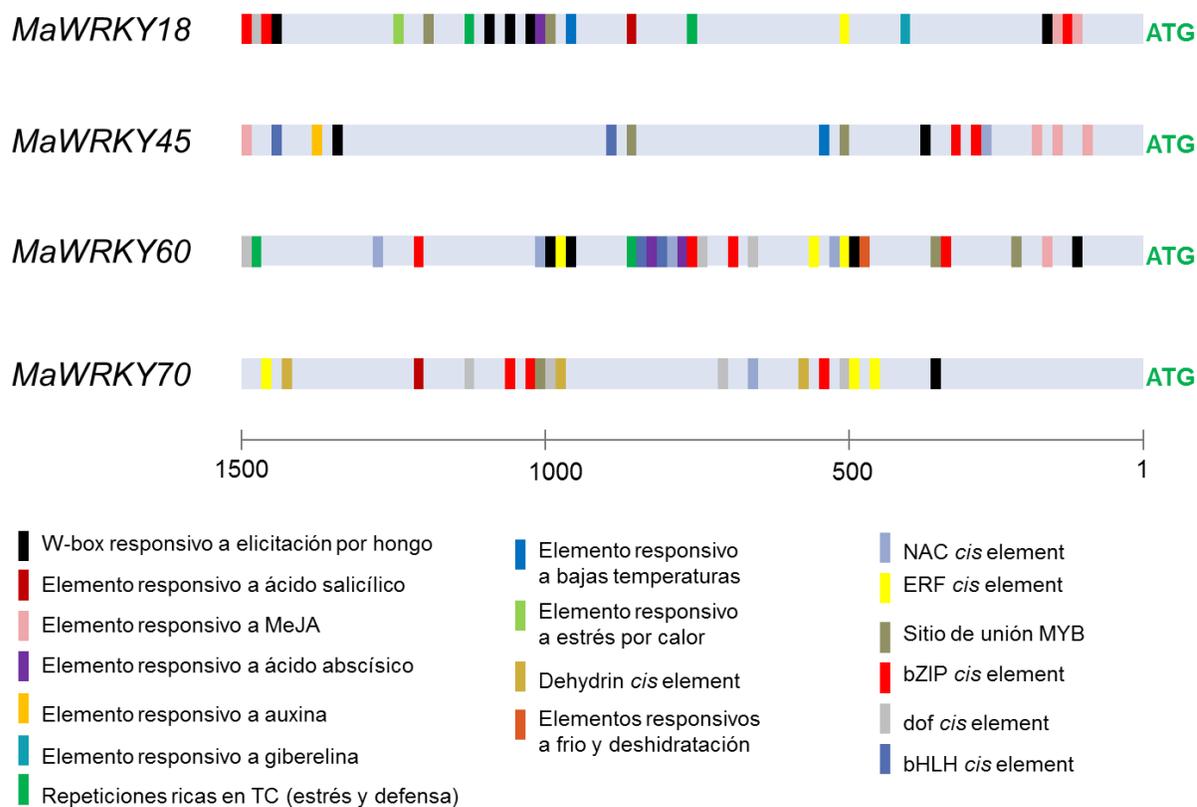


Figura 2.5 Elementos regulatorios en cis de las regiones promotoras de la transcripción de los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70*.

2.3.7 MODELAJE POR HOMOLOGÍA DE LA ESTRUCTURA EN 3D DEL DOMINIO WRKY DE *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70*

El alineamiento por identidad de secuencia en el programa en línea de Swiss model tomó como modelo el dominio WRKY de *AtWRKY1* que fue elucidado por difracción de rayos X (Duan *et al.*, 2007).

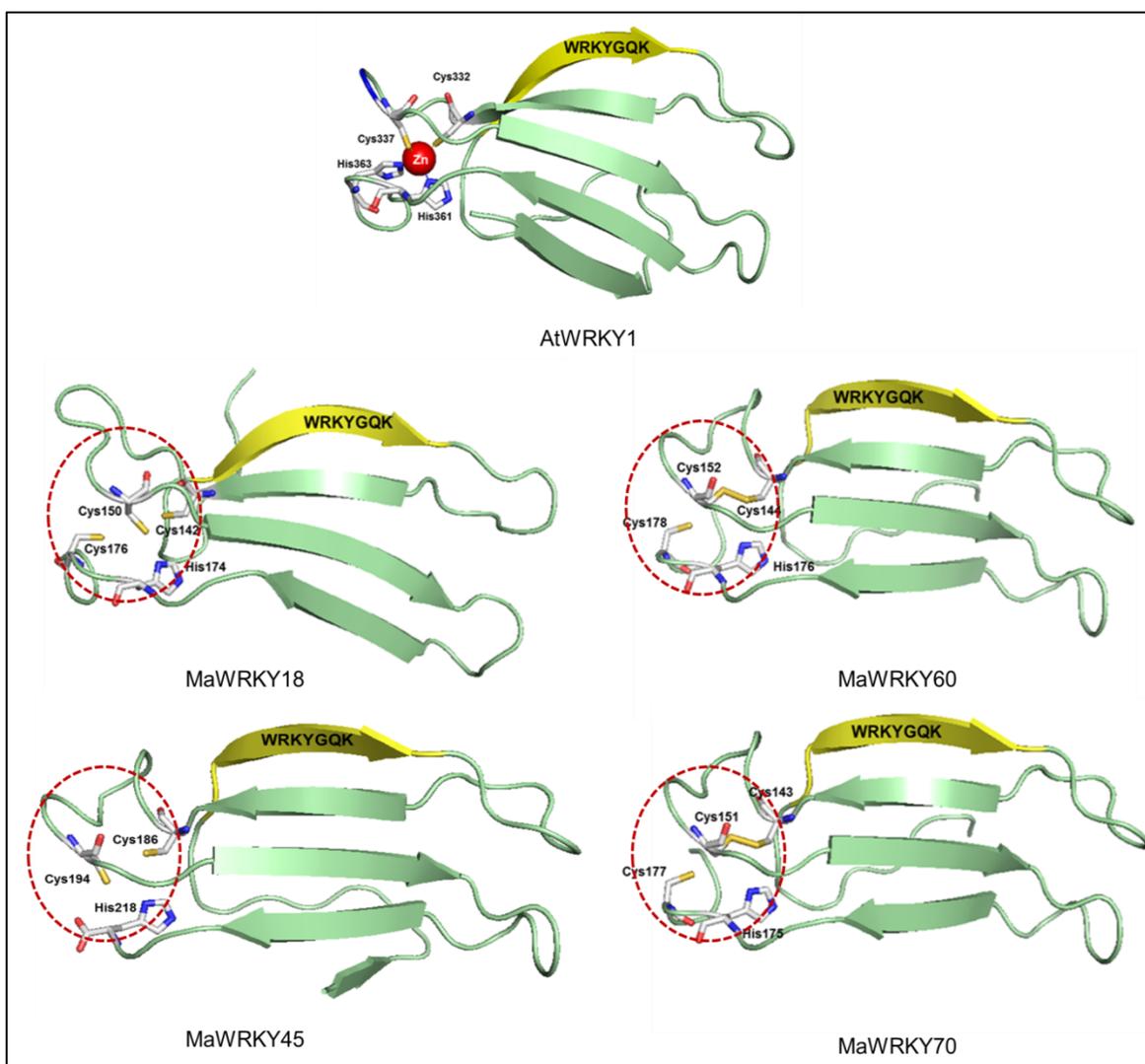


Figura 2.6 Estructura tridimensional modo cartoon de los dominios WRKY. Comparación de la estructura en 3D del dominio WRKY AtWRKY1 con los dominios WRKY de los factores de transcripción MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 y MaWRKY70. En amarillo la lámina beta plegada WRKYGQK y en círculo rojo los residuos de aminoácidos que conforman el motivo dedos de zinc.

En la Figura 2.6 se muestra la estructura tridimensional de los dominios WRKY de cada proteína de estudio en contraste con el dominio WRKY elucidado de AtWRKY1. La estructura secundaria tridimensional del dominio WRKY está constituido por al menos cuatro laminas beta plegadas en dirección antiparalela (listones verdes con punta de flecha en color verde y amarillo) unidas por cordones. En amarillo se resalta la lámina

beta plegada del motivo WRKYGQK la cual interactúa directamente con el surco mayor del ADN. En el círculo rojo se señalan los residuos de aminoácidos que constituyen el motivo dedos de zinc cuya función es la de quelar un átomo de zinc como se muestra en el modelo en 3D del dominio WRKY de AtWRKY1.

2.3.8 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL

La extracción de ARN total se realizó a partir de la hoja adyacente a la hoja cigarro.

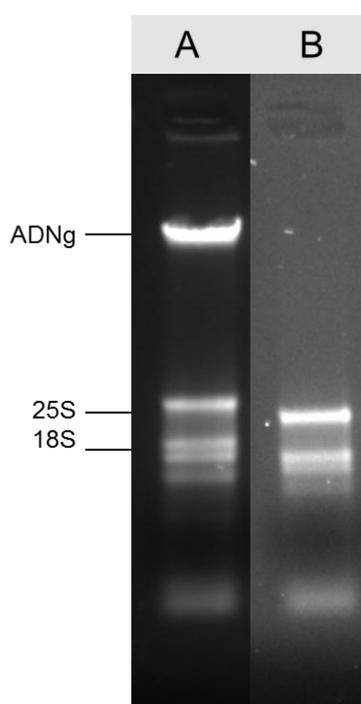


Figura 2.7 Extracción de ARN total a partir de hojas jóvenes de plátano (*M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang kra'). A) Extracción de ácidos nucleicos (ADNg y ARN total). B) ARN total después del tratamiento con ADNasa.

En la Figura 2.7 se muestran primero en el inciso A la integridad de la extracción de ácidos nucleicos ADN/ARN y en el inciso B, el ARN total integro después del tratamiento con DNasa el extracto ADN/ARN. Se observan bandas definidas e integras de los ARN ribosomales 25S y 18S lo que sugieren que los ARN mensajeros (ARNm) no están

degradados. La concentración del ARN total obtenido fue de $98.4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ en un volumen de $40 \mu\text{L}$ y con una razón de absorbancia de 1.9 a 260/280 nm lo que indica que el ARN se encuentra en un alto grado de pureza con respecto a la contaminación por proteínas considerando el rango aceptable de 1.8 a 2. La integridad y la pureza del ARN se encuentran dentro de los parámetros aceptables para la obtención de una biblioteca de ADNc, si el ARN no cumple con los requisitos antes mencionados, los contaminantes pueden interferir inhibiendo la acción de la TR y en consecuencia la síntesis de ADNc se verá comprometida.

2.3.9 MAPEO DE LOS EXTREMOS 3' UTRs DE *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* Y *MaWRKY70*

La amplificación de los extremos 3' UTRs de los ADNc de los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* Y *MaWRKY70* se realizaron mediante la técnica de RACE. En la Figura 2.8 se observan los productos de las amplificaciones de la segunda ronda de PCR.

Se obtuvieron amplicones definidos e íntegros como se observa en los carriles 2, 4, 6 y 8. Los tamaños aproximados obtenidos de los amplicones son de $\sim 290 \text{ pb}$ para *MaWRKY18*, de $\sim 650 \text{ pb}$ para *MaWRKY45*, $\sim 500 \text{ pb}$ para *MaWRKY60* y de $\sim 400 \text{ pb}$ para *MaWRKY70*. Se amplificó el extremo 3'UTR de un gen de actina de plátano el cual amplifica un producto de $\sim 700 \text{ pb}$. Los productos amplificados fueron fraccionados por electroforesis al 1% a 90 volts y teñidos con $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Los fragmentos fueron escindidos y purificados para su posterior clonación.

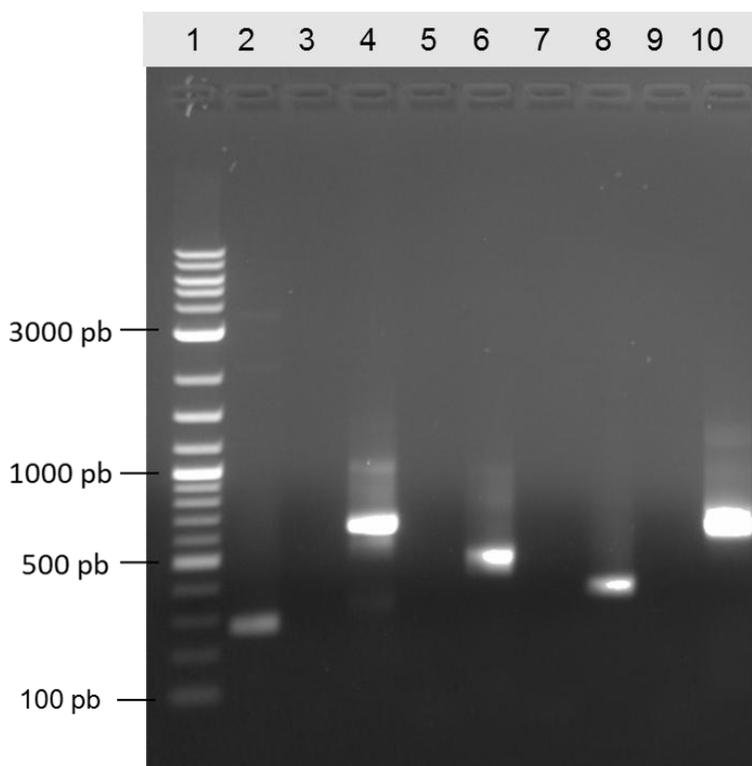


Figura 2.8 Amplificación de los extremos 3' UTRs de los ADNc de MaWRKY18, 45, 60 y 70. Carril 2, amplificación del extremo 3' UTR de MaWRKY18. Carril 4, extremo 3' UTR de MaWRKY45. Carril 6, extremo 3' UTR de MaWRKY60. Carril 8, extremo 3' UTR de MaWRKY70. Carril 1, escalera de 10 KB. Carriles 3, 5, 7 y 9, controles negativos. Carril 10, control de actina.

2.3.10 CLONACIÓN DE LOS EXTREMOS 3' UTR *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* Y *MaWRKY70*

Los fragmentos purificados fueron ligados al vector de clonación pGEM-T Easy linearizado y células competentes de *E. coli* DH10B fueron transformadas por choque térmico. Se obtuvieron colonias blancas y azules en las placas de medio LB agar sólido y se realizó la verificación de la clonación de nuestros insertos mediante la técnica de PCR a partir de colonias blancas (Figura 2.9).

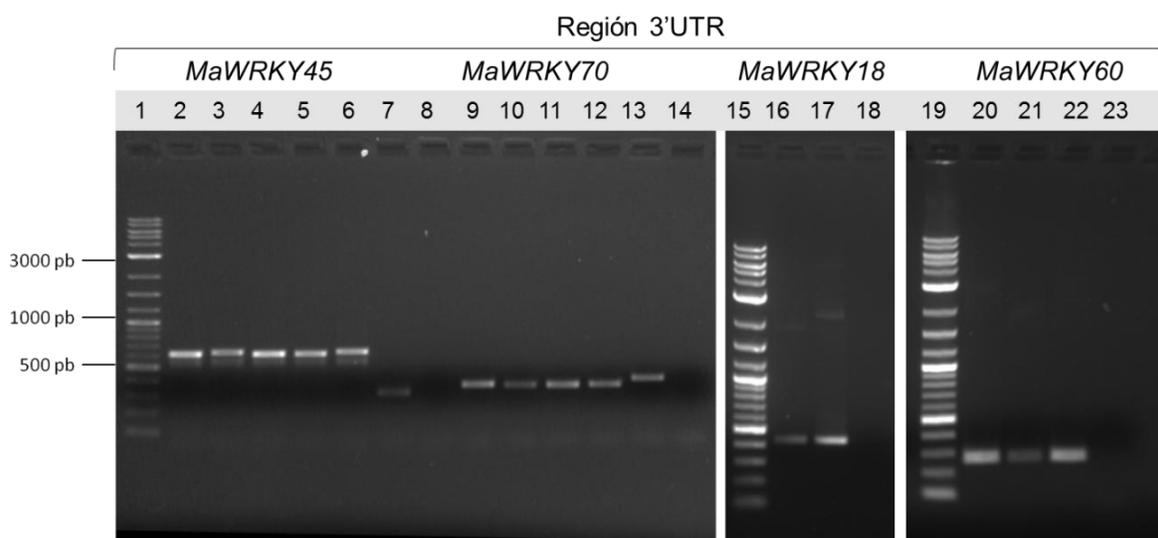


Figura 2.9 Amplificación por PCR de los extremos 3'UTR de *MaWRKY18*, *45*, *60* y *70* clonados en pGEM-T Easy. Carriles 1, 15 y 19: escalera de 10 kb. Carriles 2-7: colonias de *E. coli* transformadas con el vector pGEM T Easy::3'UTR*MaWRKY45*. Carriles 9-13: pGEM T Easy::3'UTR*MaWRKY70*. Carriles 16 y 17: pGEM T Easy::3'UTR*MaWRKY18*. Carriles 20-22: pGEM T Easy::3'UTR*MaWRKY60*. Carriles 8, 14, 18 y 23 controles negativos.

Se obtuvieron amplicones bien definidos de diferentes tamaños. Para *MaWRKY45* se obtuvo un amplicon de ~630 pb, *MaWRKY70* de ~300 pb, *MaWRKY18* de ~420 y *MaWRKY60* de ~290 pb. Las amplificaciones contemplan la región putativa 3'UTR mas un fragmento de la ORF de donde se diseñaron los oligonucleótidos para la técnica de RACE.

2.3.11 MAPEO DE LOS EXTREMOS 3'UTRs DE *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* Y *MaWRKY70*

En este trabajo se lograron aislar las cuatro regiones 3'UTR de cada uno de los genes WRKY de estudio.

Se aisló una región 3'UTR de 89 pb para *MaWRKY18* (Figura 2.10). El codón de terminación de su ORF es TAA y los nucleótidos de reconocimiento para el sitio de corte son CA. Muy cerca del sitio de corte (~10 nucleótidos) se identificó una región enriquecida con adenilatos. Según Loke *et al.* (2005), esta región es distintiva en la mayoría de los

extremos 3'UTR de plantas y constituyen la señal de poliadenilación. La región 3'UTR predicha para este gen en el algoritmo de phytozome es casi 100% idéntica a la obtenida *in vivo*. Excepto por un posible polimorfismo localizado a 7 pb corriente arriba del sitio de corte, donde un adenilato es sustituido por un timidilato en la clona 8.



Figura 2.10 Alineamiento de la región 3'UTR predicha de *MaWRKY18* con la región 3'UTR de la clona 18 aislada de *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang kra'. Sombreado en negro los nucleótidos idénticos. Sombreado de rojo se resalta el codón de terminación de la ORF y en verde el sitio de corte de la transcripción y de inicio de la poliadenilación (cola de poli A). De color gris sobresale una región rica en adenilatos que es muy probablemente la señal de poliadenilación.

En el caso del gen *MaWRKY45* se aisló una región 3'UTR de 432 pb de nucleótidos (Figura 2.11). En el alineamiento entre la región 3'UTR predicha en phytozome con la secuencia obtenida de las clona 2 se puede observar que existe un alto porcentaje de identidad que es de 97.6%. Solo 8 nucleótidos no son idénticos y los nucleótidos 309 y 310 de la región 3'UTR de la clona 2 no existen en la secuencia 3'UTR predicha en la base de datos Phytozome. La secuencia 3' UTR obtenida de las clonas es 57 pb menor que la secuencia 3' UTR predicha del ADNc de *MaWRKY45*. El codón de terminación de la ORF es TGA y el dinucleótido TA conforman el sitio de corte de la transcripción. La región rica en adenilatos es de aproximadamente 19 nucleótidos.

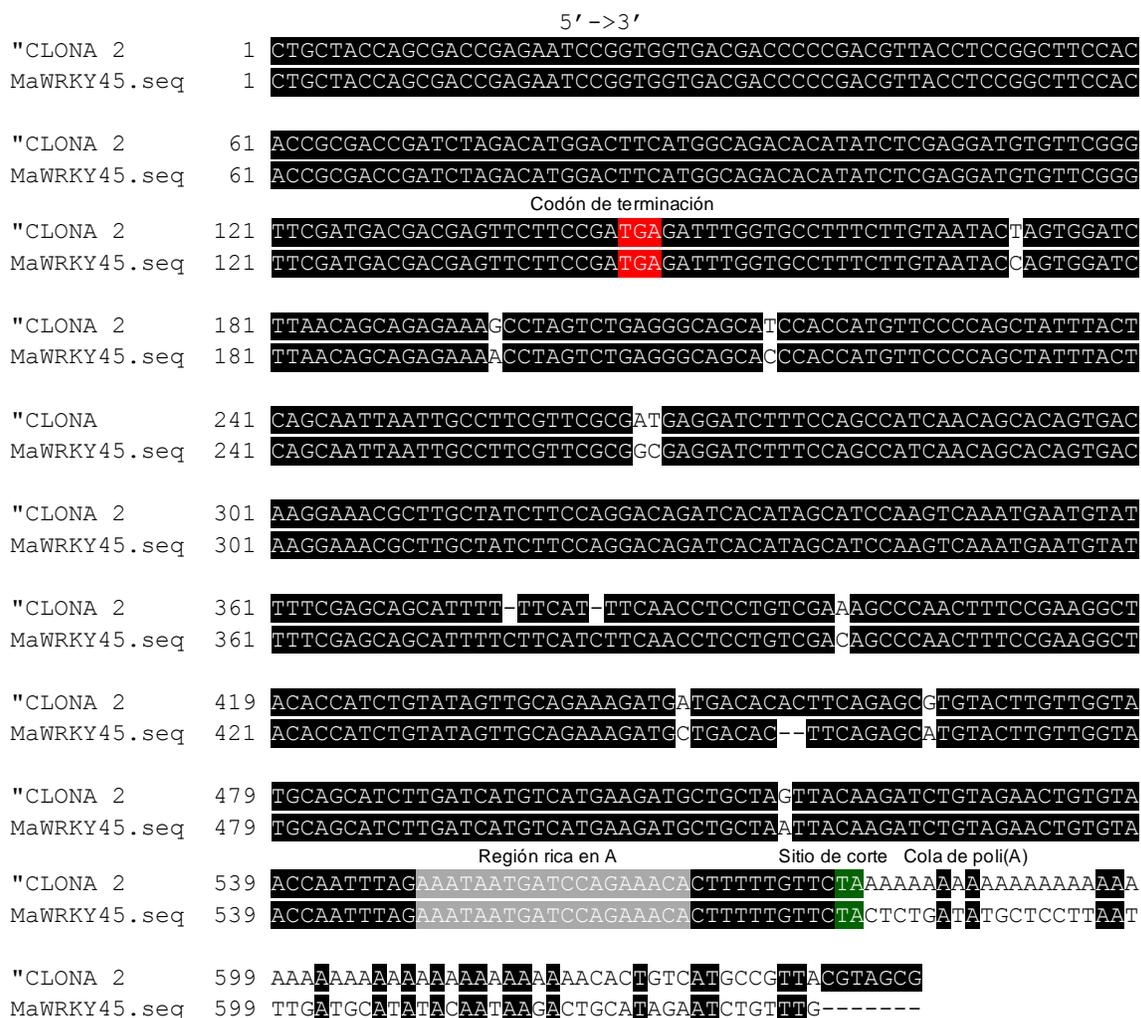


Figura 2.11 Alineamiento de la región 3'UTR predicha de *MaWRKY45* con la región 3'UTR de la clona 2 aislada de *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang kra'. Sombreado en negro los nucleótidos idénticos. Sombreado de rojo se resalta el codón de terminación de la ORF y en verde el sitio de corte de la transcripción y donde se inicia la poliadenilación. De color gris sobresale una región rica en adenilatos que es muy probablemente la señal de poliadenilación.

Se aisló la región 3'UTR de *MaWRKY60* cuya longitud es de 314 pb de nucleótidos. El alineamiento de la región 3'UTR aislada *in vitro* con la región aislada *in silico* mantiene una identidad de 98% con solo 6 posibles polimorfismos (Figura 2.12). El codón de

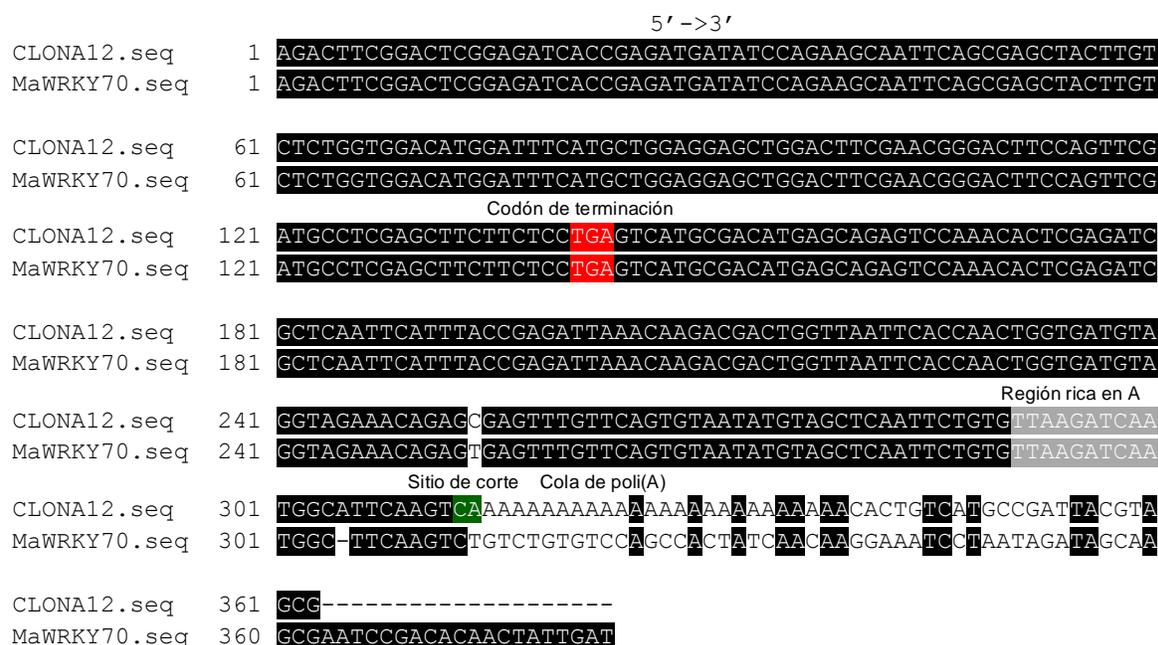


Figura 2.13 Alineamiento de la región 3'UTR predicha de *MaWRKY70* con la región 3'UTR de la clona 2 aislada de *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang kra'. Sombreado en negro los nucleótidos idénticos. Sombreado de rojo se resalta el codón de terminación de la ORF y en verde el sitio de corte de la transcripción e inicio de la poliadenilación. De color gris sobresale una región rica en adenilatos que es muy probablemente la señal de poliadenilación.

Se lograron aislar las regiones 3'UTR de cada uno de los cuatro genes WRKY de estudio y se localizaron las regiones consenso reportadas por Loke *et al.* (2005) para los extremos 3' no codificantes de plantas. Se puede observar diferentes codones de terminación para cada gen. En el sitio de corte y poliadenilación mantiene un patrón entre los nucleótidos TA y CA. Así mismo, es evidente un patrón de localización de la región rica en adenilatos que se encuentra a ~10 nucleótidos corriente arriba del sitio de corte. Los alineamientos de las regiones aisladas por técnicas de PCR con las regiones aisladas *in silico* de la base de datos del genoma son muy similares con pocos polimorfismos tomando en cuenta que son de diferentes variedades.

2.3.12 AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES DE LOS GENES *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* Y *MaWRKY70*

Las regiones codificantes o CDSs de los genes fueron obtenidas mediante dos rondas de PCR (Figura 2.14). Todos los fragmentos obtenidos corresponden al tamaño predicho *in silico* excepto el CDS de *MaWRKY45* que tiene ~100 pb por encima de lo esperado (1008).

Para *MaWRKY18* se espera un amplicón de 880 pb, de los cuales 828 pb pertenecen al CDS y 52 pb a sitios de restricción incluidos en el diseño de los oligonucleótidos. El tamaño corresponde a lo que se observa a simple vista en la imagen obtenida de la electroforesis en gel de agarosa en el carril dos de la Figura 2.14. En el carril se observa un amplicón de ~100 pb, sin embargo el CDS predicho para este gen en phytozome es de 1008 pb. Por lo tanto, se revisará esta discrepancia una vez se tengan los resultados de la secuenciación.

El CDS de *MaWRKY60* es de 843 pb, sumando 52 pb de los sitios de restricción adicionados a los oligonucleótidos resulta en un fragmento de 895 pb, lo cual es consistente con el amplicón obtenido en el carril 6. Por último, el CDS de *MaWRKY70* predicho *in silico* es de 933 pb, adicionando los nucleótidos de los sitios de restricción se espera un amplicón de 986 pb el cual corresponde al amplicón obtenido *in vitro*.

Los fragmentos amplificados fueron escindidos del gel de agarosa y purificados para clonarlos posteriormente. En la Figura 2.15 se muestran los fragmentos purificados y su tamaño correspondiente.

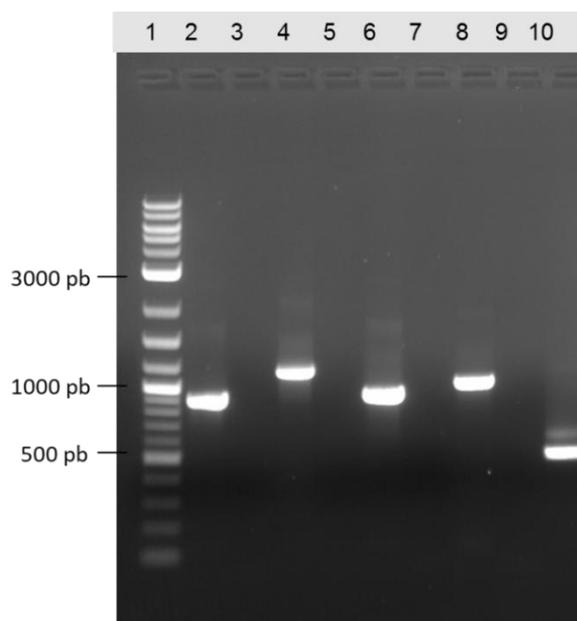


Figura 2.14 Amplificación por PCR de las regiones codificantes de los genes *MaWRKY18*, *45*, *60* y *70*. Carril 1, escalera de 10 kb. Carril 2, CDS de *MaWRKY18*. Carril 4, CDS de *MaWRKY45*. Carril 6, CDS de *MaWRKY60*. Carril 8, CDS de *MaWRKY70*. Carriles 3, 5, 7 y 9 controles negativos. Carril 10 control positivo de actina.

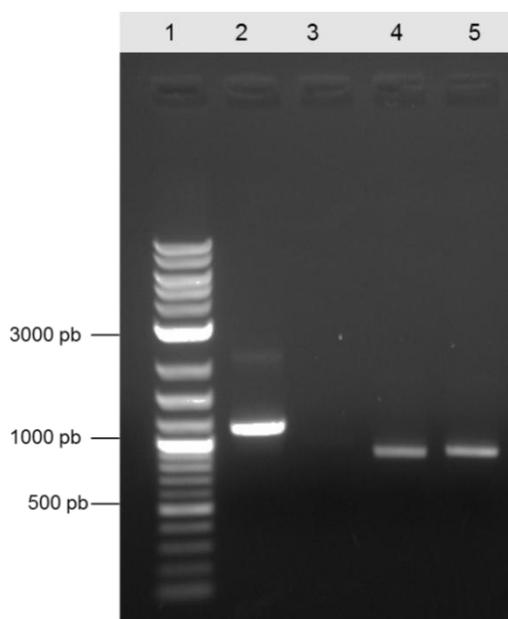


Figura 2.15 Purificación de los productos de PCR de las regiones codificantes de los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70*. Carril 1, escalera de 10 kb. Carril 2, CDS de *MaWRKY45*. Carril 3, CDS de *MaWRKY70*. Carril 4, CDS de *MaWRKY18*. Carril 5, CDS de *MaWRKY60*.

2.3.13 CLONACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES DE *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* Y *MaWRKY70*

Los productos purificados se ligaron al vector de clonación pGEM T Easy y fueron clonados en *E. coli*. Las colonias blancas (posibles colonias positivas) obtenidas fueron evaluadas mediante amplificación por PCR de los correspondientes CDSs.

Nótese en la Figura 2.16 que se obtuvieron bandas bien definidas que corresponden a los mismos tamaños de las amplificaciones de los CDSs realizados mediante PCR a partir de ADNc (Figura 2.14). Excepto por una de las clonas de *MaWRKY60* (carril 17) que amplifica un producto de tamaño ligeramente por encima de la media. No obstante, se obtuvieron clonas positivas de cada uno de los genes de estudio.

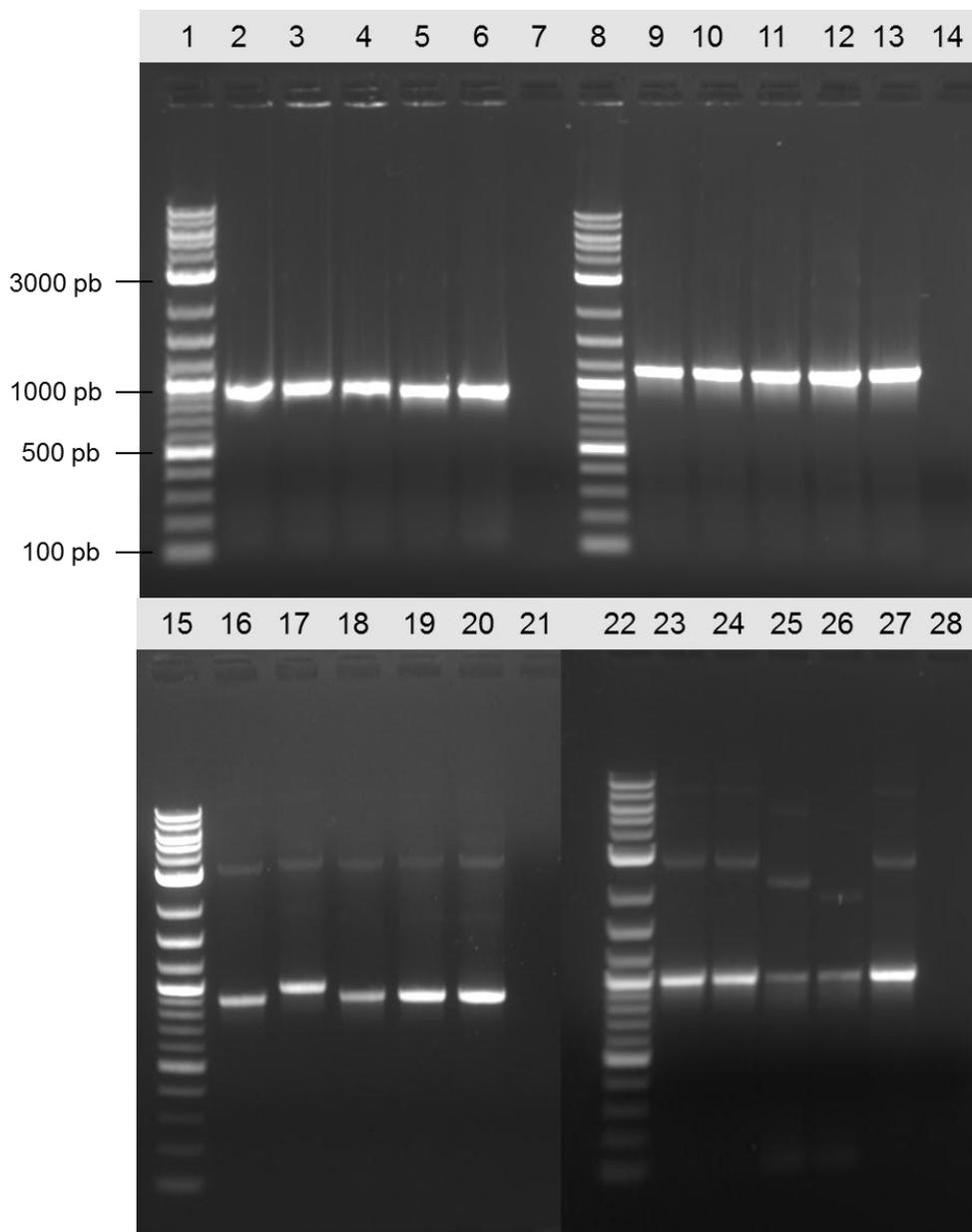


Figura 2.16 Verificación de clonación mediante amplificación por PCR de las regiones codificantes de los genes *MaWRKY18*, *45*, *60* y *70*. Carril 1, 8, 15 y 22; escalera de 10 kb. Carriles 2-6, CDS de *MaWRKY18*. Carriles 9-13, CDS de *MaWRKY45*. Carriles 16-20, CDS de *MaWRKY60*. Carriles 23-27, CDS de *MaWRKY70*. Carriles 7, 14, 21 y 28 con controles negativos.

2.3.14 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS REGIONES CODIFICANTES DE *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* Y *MaWRKY70*

Las secuencias obtenidas de las clonas fueron analizadas mediante alineamientos de las secuencias predichas con las secuencias obtenidas.

Las secuencias obtenidas del CDS de *MaWRKY18* muestran la presencia de dos variantes de este gen, esto se puede observar en el patrón de polimorfismos en el alineamiento. Una de las clonas es 100% idéntica a la secuencia predicha *in silico* mientras que otras dos comparte un 99.3% de identidad con apenas seis posibles polimorfismos (Figura 2.17). También se puede observar algunas sustituciones aisladas que no siguen un patrón en la posición de cambio como ocurre con los polimorfismos.

En este trabajo se decidió tomar la clona 13 (*MaWRKY18*) para estudios posteriores de caracterización y evaluación por ser la única clona sin errores aparentes de inserción por la Taq polimerasa. La longitud de la secuencia proteica correspondiente a la clona 13 es de 275 residuos de aminoácidos. En la Figura 2.18 se muestra la secuencia de nucleótidos de la clona 13 traducida a aminoácidos y su extremo 3'UTR previamente caracterizado.

En el caso de *MaWRKY45* se mandaron a secuenciar cuatro clonas. El análisis revela un alto porcentaje de similitud, sin embargo, en el alineamiento de la secuencia predicha del CDS con las secuencias de las clonas aisladas *in vitro* se puede observar una inconsistencia en el alineamiento en el extremo 5'. En la Figura 2.19 se resalta con guiones color rojo el espacio de un intrón predicho *in silico* para *MaWRKY45*. No obstante, las secuencias aisladas por PCR a partir de ADNc demuestran que se trata de un exón y no de un intrón. Este resultado es respaldado por la naturaleza de nuestro experimento, por los controles que descartan contaminación de ADN genómico y porque solo uno de los cuatro intrones predichos *in silico* es inconsistente con los resultados de las secuencias aisladas. Tomando en consideración la nueva secuencia obtenida *in vitro*, se procedió a realizar un análisis para verificar la secuencia correcta del CDS. Derivado del análisis en la Figura 2.20 se muestra la secuencia correcta del factor de transcripción *MaWRKY45*. La secuencia es 40 aminoácidos más corta de lo predicho. El codón de la metionina de inicio correcta (flecha negra, Figura 2.19) se localizó cerca de 200 pb

corriente debajo del codón de la metionina predicha. Por lo tanto, la predicción *in silico* del CDS de *MaWRKY45* fue errónea y el tamaño correcto del CDS es de 885 pares de bases (sin contar el codón de terminación) y la proteína tiene una longitud de 295 residuos de aminoácidos como se observa en la Figura 2.21.

Por otro lado, el alineamiento del CDS predicho para *MaWRKY60* con la secuencia aislada *in vitro* obtuvo un 99.5% de identidad con solo 4 posibles polimorfismos (Figura 2.22). La secuencia del CDS tiene una longitud de 840 pb (sin el codón de terminación) y codifica para una proteína de 280 residuos de aminoácidos (Figura 2.23).

Por último, la secuencia del CDS de *MaWRKY70* aislada *in vitro* tiene un porcentaje de identidad del 100% con la secuencia del CDS predicha *in silico* como se muestra en el alineamiento (Figura 2.24). La región codificante tiene una longitud de 930 pb (sin contar el codón de terminación) y codifica para una proteína de 310 residuos de aminoácidos (Figura 2.25). Este es el factor de transcripción con una longitud ligeramente más grande que los otros tres factores de transcripción previamente descritos. Es interesante el hecho de que no existe ningún polimorfismo aparente entre las secuencias aislada *in silico* que pertenece al genoma de *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'DH-Pahang' y la secuencia aislada *in vitro* que pertenece a *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pisang kra'.

MaWRKY18.seq 1 -----ATCGGATCGGCTTGGTTGGATCTCGA
 CLONA17.seq 1 TATTCAGGATCCAGGCCAACTAGTGGTACCAACAATGGGATCGGCTTGGTTGGATCTCGA
 CLONA13.seq 1 TATTCAGGATCCAGGCCTACTAGTGGTACCAACAATGGGATCGGCTTGGTTGGATCTCGA
 CLONA14.seq 1 TATTCAGGATCCAGGCCTACTAGTGGTACCAACAATGGGATCGGCTTGGTTGGATCTCGA

MaWRKY18.seq 27 CCTCAACGTTGGCTCGCTCCGATTCCCTGTCTGATGCTCCGCAAGTGTTCCTCCGTTGGAATA
 CLONA17.seq 61 CCTCAACGTTGGCTCGCTCCGATTCCCTGTCTGATGCTCCGCAAGTGTTCCTCCGTTGGAATA
 CLONA13.seq 61 CCTCAACGTTGGCTCGCTCCGATTCCCTGTCTGATGCTCCGCAAGTGTTCCTCCGTTGGAATC
 CLONA14.seq 61 CCTCAACGTTGGCTCGCTCCGATTCCCTGTCTGATGCTCCGCAAGTGTTCCTCCGTTGGAATC

MaWRKY18.seq 87 CAAGCGTGTTCGAGGATAAGATCTCGATGAGAGGAGGCGAAAGAAGTGTGATGCTCAAGTTGA
 CLONA17.seq 121 CAAGCGTGTTCGAGGATAAGATCTCGATGAGAGGAGGCGAAAGAAGTGTGATGCTCAAGTTGA
 CLONA13.seq 121 CAAGCGTGTTCGAGGATAAGATCTCGATGAGAGGAGGCGAAAGAAGTGTGATGCTCAAGTTGA
 CLONA14.seq 121 CAAGCGTGTTCGAGGATAAGATCTCGATGAGAGGAGGCGAAAGAAGTGTGATGCTCAAGTTGA

MaWRKY18.seq 147 AGGTCTCGCGCGGAGCTGATTCGGGTGACGGAGGAGAACAAGAACTCGATGAAACGCT
 CLONA17.seq 181 AGGTCTCGCGCGGAGCTGATTCGGGTGACGGAGGAGAACAAGAACTCGATGAAACGCT
 CLONA13.seq 181 AGGTCTCGCGCGGAGCTGATTCGGGTGACGGAGGAGAACAAGAACTCGATGAAACGCT
 CLONA14.seq 181 AGGTCTCGCGCGGAGCTGATTCGGGTGACGGAGGAGAACAAGAACTCGATGAAACGCT

MaWRKY18.seq 207 GCGAATCATCACGGCGAAGTACACCTCGCTTTGGAACCAGCTGAATGATCTGACGACCAC
 CLONA17.seq 241 GCGAATCATCACGGCGAAGTACACCTCGCTTTGGAACCAGCTGAATGATCTGACGACCAC
 CLONA13.seq 241 GCGAATCATCACGGCGAAGTACACCTCGCTTTGGAACCAGCTGAATGATCTGACGACCAC
 CLONA14.seq 241 GCGAATCATCACGGCGAAGTACACCTCGCTTTGGAACCAGCTGAATGATCTGACGACCAC

MaWRKY18.seq 267 CACCTCCTCTTCCGAGGGGGCGTCTCCCTCTCCCTCACCTGCCTGGGAAGAGGAAGATCGA
 CLONA17.seq 301 CACCTCCTCTTCCGAGGGGGCGTCTCCCTCTCCCTCACCTGCCTGGGAAGAGGAAGATCGA
 CLONA13.seq 301 CACCTCCTCTTCCGAGGGGGCGTCTCCCTCTCCCTCACCTGCCTGGGAAGAGGAAGATCGA
 CLONA14.seq 301 CACCTCCTCTTCCGAGGGGGCGTCTCCCTCTCCCTCACCTGCCTGGGAAGAGGAAGATCGA

MaWRKY18.seq 327 GAGCTCCGCGGCCACACCGAGCCGGCTAACTGCAACGCGGAGTGCACGTGCGCCGAGGA
 CLONA17.seq 361 GAGCTCCGCGGCCACACCGAGCCGGCTAACTGCAACGCGGAGTGCACGTGCGCCGAGGA
 CLONA13.seq 361 GAGCTCCGCGGCCACACCGAGCCGGCTAACTGCAACGCGGAGTGCACGTGCGCCGAGGA
 CLONA14.seq 361 GAGCTCCGCGGCCACACCGAGCCGGCTAACTGCAACGCGGAGTGCACGTGCGCCGAGGA

MaWRKY18.seq 387 GTCCTGCAAGCGAGTCAAGACAGGATTGCAAACCCCGGCTGGAAGCTTACGTTTCGCAC
 CLONA17.seq 421 GTCCTGCAAGCGAGTCAAGACAGGATTGCAAACCCCGGCTGGAAGCTTACGTTTCGCAC
 CLONA13.seq 421 GTCCTGCAAGCGAGTCAAGACAGGATTGCAAACCCCGGCTGGAAGCTTACGTTTCGCAC
 CLONA14.seq 421 GTCCTGCAAGCGAGTCAAGACAGGATTGCAAACCCCGGCTGGAAGCTTACGTTTCGCAC

MaWRKY18.seq 447 CAATCCATCCGATTTCGAGTCTGGTTCGTGAAAGATGGGTATCAATGGAGGAAGTATGGTCA
 CLONA17.seq 481 CAATCCATCCGATTTCGAGTCTGGTTCGTGAAAGATGGGTATCAATGGAGGAAGTATGGTCA
 CLONA13.seq 481 CAATCCATCCGATTTCGAGTCTGGTTCGTGAAAGATGGGTATCAATGGAGGAAGTATGGTCA
 CLONA14.seq 481 CAATCCATCCGATTTCGAGTCTGGTTCGTGAAAGATGGGTATCAATGGAGGAAGTATGGTCA

MaWRKY18.seq 507 GAAGGTGACAAGAGACAACCCCTCTCCAAGAGCTTACTTCCGGTGTCTCTTCGCGCTGC
 CLONA17.seq 541 GAAGGTGACAAGAGACAACCCCTCTCCAAGAGCTTACTTCCGGTGTCTCTTCGCGCTGC
 CLONA13.seq 541 GAAGGTGACAAGAGACAACCCCTCTCCAAGAGCTTACTTCCGGTGTCTCTTCGCGCTGC
 CLONA14.seq 541 GAAGGTGACAAGAGACAACCCCTCTCCAAGAGCTTACTTCCGGTGTCTCTTCGCGCTGC

MaWRKY18.seq 567 CTGCCCCGTGAAGAAGAAGGTGCAAAGAAGCGCGGAGGATCAATCCATCTTGGTGGCGAC
 CLONA17.seq 601 CTGCCCCGTGAAGAAGAAGGTGCAAAGAAGCGCGGAGGATCAATCCATCTTGGTGGCGAC
 CLONA13.seq 601 CTGCCCCGTGAAGAAGAAGGTGCAAAGAAGCGCGGAGGATCAATCCATCTTGGTGGCGAC
 CLONA14.seq 601 CTGCCCCGTGAAGAAGAAGGTGCAAAGAAGCGCGGAGGATCAATCCATCTTGGTGGCGAC

MaWRKY18.seq 627 GTACGAAGCGAGCACAATCACAGCCAGCCTTCTCAGGTTCGGAGATCGCAGTGCATGGA
 CLONA17.seq 661 GTACGAAGCGAGCACAATCACAGCCAGCCTTCTCAGGTTCGGAGATCGCAGTGCATGGA
 CLONA13.seq 661 GTACGAAGCGAGCACAATCACAGCCAGCCTTCTCAGGTTCGGAGATCGCAGTGCATGGA
 CLONA14.seq 661 GTACGAAGCGAGCACAATCACAGCCAGCCTTCTCAGGTTCGGAGATCGCAGTGCATGGA

MaWRKY18.seq 687 TTTCCGCGAGTCTTCGCATCCCAAGTATCAGTGTCCGAGGAACCTCCATCCAACCTTTGGT
 CLONA17.seq 721 TTTCCGCGAGTCTTCGCATCCCAAGTATCAGTGTCCGAGGAACCTCCATCCAACCTTTGGT
 CLONA13.seq 721 TTTCCGCGAGTCTTCGCATCCCAAGTATCAGTGTCCGAGGAACCTCCATCCAACCTTTGGT
 CLONA14.seq 721 TTTCCGCGAGTCTTCGCATCCCAAGTATCAGTGTCCGAGGAACCTCCATCCAACCTTTGGT

```

MaWRKY18.seq 747 GGAGCAGATGGCTCGGTTGTTGACCAAAAATCCAGCCTTCACAGCTGCTGTAGCTACTGC
CLONA17.seq 781 GGAGCAGATGGCTCGGTTGTTGACCAAAAATCCAGCCTTCACAGCTGCTGTAGCTACTGC
CLONA13.seq 781 GGAGCAGATGGCTCGGTTGTTGACCAAAAATCCAGCCTTCACAGCTGCTGTAGCTACTGC
CLONA14.seq 781 GGAGCAGATGGCTCGGTTGTTGACCAAAAATCCAGCCTTCACAGCTGCTGTAGCTACTGC

MaWRKY18.seq 807 CATTCCGGGATGATGCTTAA-----
CLONA17.seq 841 CATTCCGGGATGATGCTTAAACCGCGG-TCGACTGAATA
CLONA13.seq 841 CATTCCGGGATGATGCTTAAACCGCGGTCGACTGAATA
CLONA14.seq 841 CATTCCGGGATGATGCTTAAACCGCGGTCGACTGAATA
  
```

Figura 2.17 Alineamiento de la secuencia de ADN predicha de MaWRKY18 con las secuencias aisladas *in vitro*. MaWRKY18.seq refiere a la secuencia predicha en phytozome, las clonas 13, 14 y 17 son las secuencias obtenidas mediante PCR. En color negro se sombrea los nucleótidos idénticos y en blanco los no idénticos. En color verde se resalta el codón de inicio de la traducción y en color rojo el codón de terminación TAA. Los nucleótidos debajo de las líneas punteadas corresponden a sitios de restricción.

1	ATG	GGA TCG GCT TGG TTG GAT CTC GAC CTC AAC GTT GGC TCG CTC	45
1	M	G S A W L D L D L N V G S L	15
46	CGA TTC CCT GTC GAT GCT CCG CAA GTG TTC CCC GTG GAA TCC AAG	90	
16	R	F P V D A P Q V F P V E S K	30
91	CTT GTC GAG GAT AAG ATC TCG ATG AGA GGA GGC GAA AGA AGT GAT	135	
31	L	V E D K I S M R G G E R S D	45
136	GCT CAA GTT GAA GGT CTC GAG GCG GAG CTG ATT CGG GTG ACG GAG	180	
46	A	Q V E G L E A E L I R V T E	60
181	GAG AAC AAG AAA CTC GAT GAA ACG CTG CGA ATC ATC ACG GCG AAG	225	
61	E	N K K L D E T L R I I T A K	75
226	TAC ACC TCG CTT TGG AAC CAG CTG AAT GAT CTG ACG ACC ACC ACC	270	
76	Y	T S L W N Q L N D L T T T T	90
271	TCC TCT TCC GAG GGG GCG TCT CCC TCT CCC ACA CCT GCA GGG AAG	315	
91	S	S S E G A S P S P T P A G K	105
316	AGG AAG ATC GAG AGC TCC GCA GGC CAC ACC GAG CCG GCT AAC TGC	360	
106	R	K I E S S A G H T E P A N C	120
361	AAC GCG GAG TGC ACG TCG GCC GAG GAG TCC TGC AAG CGA GTC AGA	405	
121	N	A E C T S A E E S C K R V R	135
406	CAG GAT TGC AAA CCC CCG GTC TGG AAG CTT CAC GTT CGC ACC AAT	450	
136	Q	D C K P P V W K L H V R T N	150
451	CCA TCC GAT TCG AGT CTG GTC GTG AAA GAT GGG TAT CAA TGG AGG	495	
151	P	S D S S L V V K D G Y Q	165
496	AAG TAT GGT CAG AAG GTG ACA AGA GAC AAC CCC TCT CCA AGA GCT	540	
166	K Y C Q K	V T R D N P S P R A	180
541	TAC TTC CCG TGC TCC TTC GCG CCT GCC TGC CCG GTG AAG AAG AAG	585	
181	Y	F R S F A P A P V K K K	195
586	GTG CAA AGA AGC GCG GAG GAT CAA TCC ATC TTG GTG GCG ACG TAC	630	
196	V	Q R S A E D Q S I L V A T Y	210
631	GAA GGC GAG CAC AAT CAC AGC CAG CCT TCT CAG GTC GGA GAT CGC	675	
211	E	G E N S Q P S Q V G D R	225
676	AGT GAC ATG GAT TTC GGC AGG TCT TCG CAT CCC AAG TCA TCA GTG	720	
226	S	D M D F G R S S H P K S S V	240
721	TCG GAG GAA CTC CAT CCA ACT TTG GTG GAG CAG ATG GCT CGG TTG	765	
241	S	E E L H P T L V E Q M A R L	255
766	TTG ACC AAA AAT CCA GCC TTC ACA GCT GTA GCT ACT GCC ATT	810	
256	L	T K N P A F T A A V A T A I	270
811	TCC GGG ATG ATG CTT TAA	CCA AAA ATC CAG CCT TCA CAG CTG CTG	855
271	S	G M M L *	
856	TAG CTA CTG CCA TTT CCG GGA TGA TGC TTT AAC CAA AAT CCA CCC	900	
901	CCA AAA GAT GCC ATG AAT TCA AGG CTT CTT CTC TGT GAC GCT TTC	945	
946	TTA TAG GTA AAG GAT AAA TGA TTT GAG CTC AAA AAA AAA AAA AAA	990	
991	AAA AAA	996	

Figura 2.18 Región codificante y extremo 3'UTR de la secuencia obtenida de *MaWRKY18* de *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pinsag kra'. En color violeta se resalta el codón de inicio de la traducción y en color rojo el codón de terminación TAA. Se subraya el dominio WRKY con líneas negras y se resaltan en color verde los motivos WRKY y dedos de zinc. Los nucleótidos encerrados en cajas negras pertenecen al extremo 3'UTR.

```

CLONA4.seq      1  TATTCAAGGCCTACTAGTGGTACCAACAATGACAACACGCCCTCTTCTCCTCCATGACGT
CLONA5.seq      1  TATTCAAGGCCTACTAGTGGTACCAACAATGACAACACGCCCTCTTCTCCTCCATGACGT
CLONA3.seq      1  ----T AAGGCCTACTAGTGGTACCAACAATGACAACACGCCCTCTTCTCCTCCATGACGT
CLONA2.seq      1  TATTCAAGGCCTACTAGTGGTACCAACAATGACAACACGCCCTCTTCTCCTCCATGACGT
MaWRKY45.seq    1  -----ATGACAACACGCCCTCTTCTCCTCCATGACGT

CLONA4.seq      61  CGCGCTGCTTTCCTTGAAACTTCTCTCCCAATTATGCTCTCTGTGCAATTTCCCATACT
CLONA5.seq      61  CGCGCTGCTTTCCTTGAAACTTCTCTCCCAATTATGCTCTCTGTGCAATTTCCCATACT
CLONA3.seq      57  CGCGCTGCTTTCCTTGAAACTTCTCTCCCAATTATGCTCTCTGTGCAATTTCCCATACT
CLONA2.seq      61  CGCGCTGCTTTCCTTGAAACTTCTCTCCCAATTATGCTCTCTGTGCAATTTCCCATACT
MaWRKY45.seq    33  CGCGCTGCTTTCCTTGAAACTTCTCTCCCAATTATGCTCTCT-----

CLONA4.seq      121 GCCCCGATCCCCCTCGGCAGCTGTATAAAACACAGAGCACACCCAGTCGAGTTAGGGA
CLONA5.seq      121 GCCCCGATCCCCCTCGGCAGCTGTATAAAACACAGAGCACACCCAGTCGAGTTAGGGA
CLONA3.seq      117 GCCCCGATCCCCCTCGGCAGCTGTATAAAACACAGAGCACACCCAGTCGAGTTAGGGA
CLONA2.seq      121 GCCCCGATCCCCCTCGGCAGCTGTATAAAACACAGAGCACACCCAGTCGAGTTAGGGA
MaWRKY45.seq    76  -----TTAGGGA
                                     ↓

CLONA4.seq      181 AGGCGGGAGCATTCGGAGGAGGAAGAGGAGAAGGAGAAATGGAACACACGCCTGTGTGG
CLONA5.seq      181 AGGCGGGAGCATTCGGAGGAGGAAGAGGAGAAGGAGAAATGGAACACACGCCTGTGTGG
CLONA3.seq      177 AGGCGGGAGCATTCGGAGGAGGAAGAGGAGAAGGAGAAATGGAACACACGCCTGTGTGG
CLONA2.seq      181 AGGCGGGAGCATTCGGAGGAGGAAGAGGAGAAGGAGAAATGGAACACACGCCTGTGTGG
MaWRKY45.seq    83  AGGCGGGAGCATTCGGAGGAGGAAGAGGAGAAGGAGAAATGGAACACACGCCTGTGTGG

CLONA4.seq      241 CTTGTGGGAAGCCGAGGAGTCCCTGGTCGGCGGCACGGTGGTGGGGAGATGGCGAAGA
CLONA5.seq      241 CTTGTGGGAAGCCGAGGAGTCCCTGGTCGGCGGCACGGTGGTGGGGAGATGGCGAAGA
CLONA3.seq      237 CTTGTGGGAAGCCGAGGAGTCCCTGGTCGGCGGCACGGTGGTGGGGAGATGGCGAAGA
CLONA2.seq      241 CTTGTGGGAAGCCGAGGAGTCCCTGGTCGGCGGCACGGTGGTGGGGAGATGGCGAAGA
MaWRKY45.seq    143 CTTGTGGGAAGCCGAGGAGTCCCTGGTCGGCGGCACGGTGGTGGGGAGATGGCGAAGA

CLONA4.seq      301 TCCGGGCATCGACCTCCCGGCTCGGAGTGTGCTCCGGGAGGCGTTGGAGGGGAATTCCA
CLONA5.seq      301 TCCGGGCATCGACCTCCCGGCTCGGAGTGTGCTCCGGGAGGCGTTGGAGGGGAATTCCA
CLONA3.seq      297 TCCGGGCATCGACCTCCCGGCTCGGAGTGTGCTCCGGGAGGCGTTGGAGGGGAATTCCA
CLONA2.seq      301 TCCGGGCATCGACCTCCCGGCTCGGAGTGTGCTCCGGGAGGCGTTGGAGGGGAATTCCA
MaWRKY45.seq    203 TCCGGGCATCGACCTCCCGGCTCGGAGTGTGCTCCGGGAGGCGTTGGAGGGGAATTCCA

CLONA4.seq      361 CGGTGGGAGCCGCTTTTGAGGAGCTCGAAGGCTCGATCTCGCGAGCCTTCTCTCTGCTGG
CLONA5.seq      361 CGGTGGGAGCCGCTTTTGAGGAGCTCGAAGGCTCGATCTCGCGAGCCTTCTCTTTGCTGG
CLONA3.seq      357 CGGTGGGAGCCGCTTTTGAGGAGCTCGAAGGCTCGATCTCGCGAGCCTTCTCTTTGCTGG
CLONA2.seq      361 CGGTGGGAGCCGCTTTTGAGGAGCTCGAAGGCTCGATCTCGCGAGCCTTCTCTTTGCTGG
MaWRKY45.seq    263 CGGTGGGAGCCGCTTTTGAGGAGCTCGAAGGCTCGATCTCGCGAGCCTTCTCTTTGCTGG

CLONA4.seq      421 ACCGCAAGCAGCAGGGCGGAGATGGCCCCCTTCTTCTGAGCACCGAAGTAGCGAGATCC
CLONA5.seq      421 ACCGCAAGCAGCAGGGCGGAGATGGCCCCCTTCTTCTGAGCACCGAAGTAGCGAGATCC
CLONA3.seq      417 ACCGCAAGCAGCAGGGCGGAGATGGCCCCCTTCTTCTGAGCACCGAAGTAGCGAGATCC
CLONA2.seq      421 ACCGCAAGCAGCAGGGCGGAGATGGCCCCCTTCTTCTGAGCACCGAAGTAGCGAGATCC
MaWRKY45.seq    323 ACCGCAAGCAGCAGGGCGGAGATGCCCCCTTCTTCTGAGCACCGAAGTAGCGAGATCC

CLONA4.seq      481 CGACCAAGAAACGGAAGTGAATCCGGCGTGTGATCGGCGTGGAGGTTGCCGGAGAAGAA
CLONA5.seq      481 CGACCAAGAAACGGAAGTGAATCCGGCGTGTGATCGGCGTGGAGGTTGCCGGAGAAGAA
CLONA3.seq      477 CGACCAAGAAACGGAAGTGAATCCGGCGTGTGATCGGCGTGGAGGTTGCCGGAGAAGAA
CLONA2.seq      481 CGACCAAGAAACGGAAGTGAATCCGGCGTGTGATCGGCGTGGAGGTTGCCGGAGAAGAA
MaWRKY45.seq    383 CGACCAAGAAACGGAAGTGAATCCGGCGTGTGATCGGCGTGGAGGTTGCCGGAGAAGAA

CLONA4.seq      541 TACAATCTTCTTCCCTGCGGATCGTCAAATCCAAGACACTGGACGATGGCCAGACCTGGA
CLONA5.seq      541 TACAATCTTCTTCCCTGCGGATCGTCAAATCCAAGACACTGGACGATGGCCAGACCTGGA
CLONA3.seq      537 TACAATCTTCTTCCCTGCGGATCGTCAAATCCAAGACACTGGACGATGGCCAGACCTGGA
CLONA2.seq      541 TACAATCTTCTTCCCTGCGGATCGTCAAATCCAAGACACTGGACGATGGCCAGACCTGGA
MaWRKY45.seq    443 TACAATCTTCTTCCCTGCGGATCGTCAAATCCAAGACACTGGACGATGGCCAGACCTGGA

CLONA4.seq      601 GAAAATACGGACAGAAAGAGATCCAAAGTGCTAAGCATCCGAGGAGCTACTTCAGGTGTA
CLONA5.seq      601 GAAAATACGGACAGAAAGAGATCCAAAGTGCTAAGCATCCGAGGAGCTACTTCAGGTGTA
CLONA3.seq      597 GAAAATACGGACAGAAAGAGATCCAAAGTGCTAAGCATCCGAGGAGCTACTTCAGGTGTA
CLONA2.seq      601 GAAAATACGGACAGAAAGAGATCCAAAGTGCTAAGCATCCGAGGAGCTACTTCAGGTGTA
MaWRKY45.seq    503 GAAAATACGGACAGAAAGAGATCCAAAGTGCTAAGCATCCGAGGAGCTACTTCAGGTGTA

```

CLONA4 .seq	661	CCCACAAGTACGATCAAGGTTGCATGGCGCACAGACAGGCGCAGTTATCAGAGGACGATC
CLONA5 .seq	661	CCCACAGTACGATCAAGGTTGCATGGCGCACAGACAGGCGCAGTTATCAGAGGACGATC
CLONA3 .seq	657	CCCACAAGTACGATCAAGGTTGCATGGCGCACAGACAGGCGCAGTTATCAGAGGACGATC
CLONA2 .seq	661	CCCACAAGTACGATCAAGGTTGCATGGCGCACAGACAGGCGCAGTTATCAGAGGACGATC
MaWRKY45 .seq	563	CCCACAAGTACGATCAAGGTTGCATGGCGCACAGACAGGCGCAGTTATCAGAGGACGATC
CLONA4 .seq	721	CCACTGATTTTCGTGATCACATACATCGGGGAGCACACCTGCAGGGATCCAACCGTGGTGC
CLONA5 .seq	721	CCACTGATTTTCGTGATCACATACATCGGGGAGCACACCTGCAGGGATCCAACCGTGGTGC
CLONA3 .seq	717	CCACTGATTTTCGTGATCACATACATCGGGGAGCACACCTGCAGGGATCCAACCGTGGTGC
CLONA2 .seq	721	CCACTGATTTTCGTGATCACATACATCGGGGAGCACACCTGCAGGGATCCAACCGTGGTGC
MaWRKY45 .seq	623	CCACTGATTTTCGTGATCACATACATCGGGGAGCACACCTGCAGGGATCCAACCGTGGTGC
CLONA4 .seq	781	CTCCTCAGATGGTCTCTGCTTCCATTTTTTCAGGACACCTGCCTAATTAGCTTTGGAGCAG
CLONA5 .seq	781	CTCCTCAGATGGTCTCTGCTTCCATTTTTTCAGGACACCTGCCTAATTAGCTTTGGAGCAG
CLONA3 .seq	777	CTCCTCAGATGGTCTCTGCTTCCATTTTTTCAGGACACCTGCCTAATTAGCTTTGGAGCAG
CLONA2 .seq	781	CTCCTCAGATGGTCTCTGCTTCCATTTTTTCAGGACACCTGCCTAATTAGCTTTGGAGCAG
MaWRKY45 .seq	683	CTCCTCAGATGGTCTCTGCTTCCATTTTTTCAGGACACCTGCCTAATTAGCTTTGGAGCAG
CLONA4 .seq	841	GCGGTCATGGCGTTAGGCAAGAAGCTTCGGTGCCTGCTTCCCTTTGCCTCTCAGAAACAAG
CLONA5 .seq	841	GCGGTCATGGCGTTAGGCAAGAAGCTTCGGTGCCTGCTTCCCTTTGCCTCTCAGAAACAAG
CLONA3 .seq	837	GCGGTCATGGCGTTAGGCAAGAAGCTTCGGTGCCTGCTTCCCTTTGCCTCTCAGAAACAAG
CLONA2 .seq	841	GCGGTCATGGCGTTAGGCAAGAAGCTTCGGTGCCTGCTTCCCTTTGCCTCTCAGAAACAAG
MaWRKY45 .seq	743	GCGGTCATGGCGTTAGGCAAGAAGCTTCGGTGCCTGCTTCCCTTTGCCTCTCAGAAACAAG
CLONA4 .seq	901	AGAGTGATGAAGATGCAGCGAGCAATCTGACCACTGCCAGTTCGTCGTCGGGCTATTTC
CLONA5 .seq	901	AGAGTGATGAAGATGCAGCGAGCAATCTGACCACTGCCAGTTCGTCGTCGGGCTATTTC
CLONA3 .seq	897	AGAGTGATGAAGATGCAGCGAGCAATCTGACCACTGCCAGTTCGTCGTCGGGCTATTTC
CLONA2 .seq	901	AGAGTGATGAAGATGCAGCGAGCAATCTGACCACTGCCAGTTCGTCGTCGGGCTATTTC
MaWRKY45 .seq	803	AGAGTGATGAAGATGCAGCGAGCAATCTGACCACTGCCAGTTCGTCGTCGGGCTATTTC
CLONA4 .seq	961	TGCTACCAGCGACCGAGAATCCGGTGGTACGACCCCCGACGTTACCTCCGGCTTCCACA
CLONA5 .seq	961	TGCTACCAGCGACCGAGAATCCGGTGGTACGACCCCCGACGTTACCTCCGGCTTCCACA
CLONA3 .seq	957	TGCTACCAGCGACCGAGAATCCGGTGGTACGACCCCCGACGTTACCTCCGGCTTCCACA
CLONA2 .seq	961	TGCTACCAGCGACCGAGAATCCGGTGGTACGACCCCCGACGTTACCTCCGGCTTCCACA
MaWRKY45 .seq	863	TGCTACCAGCGACCGAGAATCCGGTGGTACGACCCCCGACGTTACCTCCGGCTTCCACA
CLONA4 .seq	1021	CCGCGACCGATCTAGACATGGACTTCATGGCAGACACATATCTCGAGGATGTGTTCCGGT
CLONA5 .seq	1021	CCGCGACCGATCTAGACATGGACTTCATGGCAGACACATATCTCGAGGATGTGTTCCGGT
CLONA3 .seq	1017	CCGCGACCGATCTAGACATGGACTTCATGGCAGACACATATCTCGAGGATGTGTTCCGGT
CLONA2 .seq	1021	CCGCGACCGATCTAGACATGGACTTCATGGCAGACACATATCTCGAGGATGTGTTCCGGT
MaWRKY45 .seq	923	CCGCGACCGATCTAGACATGGACTTCATGGCAGACACATATCTCGAGGATGTGTTCCGGT
CLONA4 .seq	1081	TCGATGACGACGAGTTCTTCCGATGACCGGGGTCGACTGAATA
CLONA5 .seq	1081	TCGATGACGACGAGTTCTTCCGATGACCGGGGTCGACTGAATA
CLONA3 .seq	1077	TCGATGACGACGAGTTCTTCCGATGACCGGGGTCGACTGAATA
CLONA2 .seq	1081	TCGATGACGACGAGTTCTTCCGATGACCGGGGTCGACTGAATA
MaWRKY45 .seq	983	TCGATGACGACGAGTTCTTCCGATGACCGGGGTCGACTGAATA

Figura 2.19 Alineamiento de la secuencia de ADN predicha de *MaWRKY45* con las secuencias aisladas *in vitro*. *MaWRKY45.seq* refiere a la secuencia predicha en phytozome, las clonas 2-5 son las secuencias que se obtuvieron por PCR. En color negro se somborean los nucleótidos idénticos. En color verde se resaltan el codón de inicio de la traducción predicho y el correcto (flecha negra) y en color rojo el codón de terminación TGA. Los nucleótidos arriba de la línea punteada negra corresponden a sitios de restricción. La línea punteada color rojo corresponde a un intrón predicho en phytozome.

CLONA2.pro	1	-----EHTPVVACGEAEESLVGGT
CLONA3.pro	1	-----EHTPVVACGEAEESLVGGT
CLONA4.pro	1	-----EHTPVVACGEAEESLVGGT
CLONA5.pro	1	-----EHTPVVACGEAEESLVGGT
MaWRKY45.pro	1	VTRPPLLHDVALLSLKLPLPIMLSLKGAGAFGGGRGEGEVETPAVACGEAEESLVGGT
CLONA2.pro	21	VVREMAKIRASTSRLGVLLREALEGNSTVGAVFEELEGSISRAFSLLDRKQQGGDGPSS
CLONA3.pro	21	VVREMAKIRASTSRLGVLLREALEGNSTVGAVFEELEGSISRAFSLLDRKQQGGDGPSS
CLONA4.pro	21	VVREMAKIRASTSRLGVLLREALEGNSTVGAVFEELEGSISRAFSLLDRKQQGGDGPSS
CLONA5.pro	21	VVREMAKIRASTSRLGVLLREALEGNSTVGAVFEELEGSISRAFSLLDRKQQGGDGPSS
MaWRKY45.pro	61	VVREMAKIRASTSRLGVLLREALEGNSTVGAVFEELEGSISRAFSLLDRKQQGDA PPS
CLONA2.pro	81	EHRSEIPTKKRKNPACDRRGCCRRIQSSSLRIVKSKTLDGQTWRKYGQKEIQSAKH
CLONA3.pro	81	EHRSEIPTKKRKNPACDRRGCCRRIQSSSLRIVKSKTLDGQTWRKYGQKEIQSAKH
CLONA4.pro	81	EHRSEIPTKKRKNPACDRRGCCRRIQSSSLRIVKSKTLDGQTWRKYGQKEIQSAKH
CLONA5.pro	81	EHRSEIPTKKRKNPACDRRGCCRRIQSSSLRIVKSKTLDGQTWRKYGQKEIQSAKH
MaWRKY45.pro	121	GHQSEIPTKKRKNPACDRRGCCRRIQSSSLRIVKSKTLDGQTWRKYGQKEIQSAKH
CLONA2.pro	141	PRSYFRCTHKYDQGCMAHRQAQLSEDDPTDFVITYIGEHTCRDPTVVPPQMVSASIFQDT
CLONA3.pro	141	PRSYFRCTHKYDQGCMAHRQAQLSEDDPTDFVITYIGEHTCRDPTVVPPQMVSASIFQDT
CLONA4.pro	141	PRSYFRCTHKYDQGCMAHRQAQLSEDDPTDFVITYIGEHTCRDPTVVPPQMVSASIFQDT
CLONA5.pro	141	PRSYFRCTHKYDQGCMAHRQAQLSEDDPTDFVITYIGEHTCRDPTVVPPQMVSASIFQDT
MaWRKY45.pro	181	PRSYFRCTHKYDQGCMAHRQAQLSEDDPTDFVITYIGEHTCRDPTVVPPQMVSASIFQDT
CLONA2.pro	201	CLISFGAGGHGVRQEASVPASFASQKQESDEDAASNLTASSSSGYFLLPATENPVVTTT
CLONA3.pro	201	CLISFGAGGHGVRQEASVPASFASQKQESDEDAASNLTASSSSGYFLLPATENPVVTTT
CLONA4.pro	201	CLISFGAGGHGVRQEASVPASFASQKQESDEDAASNLTASSSSGYFLLPATENPVVTTT
CLONA5.pro	201	CLISFGAGGHGVRQEASVPASFASQKQESDEDAASNLTASSSSGYFLLPATENPVVTTT
MaWRKY45.pro	241	CLISFGAGGHGVRQEASVPASFASQKQESDEDAASNLTASSSSGYFLLPATENPVVTTT
CLONA2.pro	261	DVTSGFHTATDLDMDFMADTYLEDVFGFDDDEFFR
CLONA3.pro	261	DVTSGFHTATDLDMDFMADTYLEDVFGFDDDEFFR
CLONA4.pro	261	DVTSGFHTATDLDMDFMADTYLEDVFGFDDDEFFR
CLONA5.pro	261	DVTSGFHTATDLDMDFMADTYLEDVFGFDDDEFFR
MaWRKY45.pro	301	DVTSGFHTATDLDMDFMADTYLEDVFGFDDDEFFR

Figura 2.20 Análisis de la región codificante de MaWRKY45. MaWRKY45.pro refiere a la secuencia predicha en phytozome, las clonas 2-5 son las secuencias obtenidas mediante PCR. En color negro se somborean los aminoácidos idénticos. En color rojo se resaltan el codón de inicio de la traducción predicho y el correcto. En color verde se resaltan los motivos del dominio WRKY.

1	ATG	GAA	CAC	ACG	CCT	GTT	GTG	GCT	TGT	GGG	GAA	GCC	GAG	GAG	TCC	45
1	M	E	H	T	P	V	V	A	C	G	E	A	E	E	S	15
46	CTG	GTC	GGC	GGC	ACG	GTG	GTG	CGG	GAG	ATG	GCG	AAG	ATC	CGG	GCA	90
16	L	V	G	G	T	V	V	R	E	M	A	K	I	R	A	30
91	TCG	ACC	TCC	CGG	CTC	GGA	GTG	TTG	CTC	CGG	GAG	GCG	TTG	GAG	GGG	135
31	S	T	S	R	L	G	V	L	L	R	E	A	L	E	G	45
136	AAT	TCC	ACG	GTG	GGA	GCC	GTC	TTT	GAG	GAG	CTC	GAA	GGC	TCG	ATC	180
46	N	S	T	V	G	A	V	F	E	E	L	E	G	S	I	60
181	TCG	CGA	GCC	TTC	TCT	CTG	CTG	GAC	CGC	AAG	CAG	CAG	GGC	GGA	GAT	225
61	S	R	A	F	S	L	L	D	R	K	Q	Q	G	G	D	75
226	GGC	CCC	CCT	TCT	TCT	GAG	CAC	CGA	AGT	AGC	GAG	ATC	CCG	ACC	AAG	270
76	G	P	P	S	S	E	H	R	S	S	E	I	P	T	K	90
271	AAA	CGG	AAG	GTG	AAT	CCG	GCG	TGT	GAT	CGG	CGT	GGA	GGT	TGC	CGG	315
91	K	R	K	V	N	P	A	C	D	R	R	G	G	C	R	105
316	AGA	AGA	ATA	CAA	TCT	TCT	TCC	CTG	CGG	ATC	GTC	AAA	TCC	AAG	ACA	360
106	R	R	I	Q	S	S	S	L	R	I	V	K	S	K	T	120
361	CTG	GAC	GAT	GGC	CAG	ACC	TGG	AGA	AAA	TAC	GGA	CAG	AAA	GAG	ATC	405
121	L	D	D	G	Q	T	N	R	K	Y	G	Q	K	E	I	135
406	CAA	AGT	GCT	AAG	CAT	CCG	AGG	AGC	TAC	TTC	AGG	TGT	ACC	CAC	AAG	450
136	Q	S	A	K	H	P	R	S	Y	F	R	T	H	K		150
451	TAC	GAT	CAA	GGT	TGC	ATG	GCG	CAC	AGA	CAG	GCG	CAG	TTA	TCA	GAG	495
151	Y	D	Q	G	M	A	H	R	Q	A	Q	L	S	E		165
496	GAC	GAT	CCC	ACT	GAT	TTC	GTG	ATC	ACA	TAC	ATC	GGG	GAG	CAC	ACC	540
166	D	D	P	T	D	F	V	I	T	Y	I	G	E	T		180
541	TGC	AGG	GAT	CCA	ACC	GTG	GTG	CCT	CAG	ATG	GTC	TCT	GCT	TCC		585
181	R	D	P	T	V	V	P	P	Q	M	V	S	A	S		195
586	ATT	TTT	CAG	GAC	ACC	TGC	CTA	ATT	AGC	TTT	GGA	GCA	GGC	GGT	CAT	630
196	I	F	Q	D	T	C	L	I	S	F	G	A	G	G	H	210
631	GGC	GTT	AGG	CAA	GAA	GCT	TCG	GTG	CCT	GCT	TCC	TTT	GCC	TCT	CAG	675
211	G	V	R	Q	E	A	S	V	P	A	S	F	A	S	Q	225
676	AAA	CAA	GAG	AGT	GAT	GAA	GAT	GCA	GCG	AGC	AAAT	CTG	ACC	ACT	GCC	720
226	K	Q	E	S	D	E	D	A	A	S	N	L	T	T	A	240
721	AGT	TCG	TCG	TCG	GGC	TAT	TTC	CTG	CTA	CCA	GCG	ACC	GAG	AAT	CCG	765
241	S	S	S	S	G	Y	F	L	L	P	A	T	E	N	P	255
766	GTG	GTG	ACG	ACC	CCC	GAC	GTT	ACC	TCC	GGC	TTC	CAC	ACC	GCG	ACC	810
256	V	V	T	T	P	D	V	T	S	G	F	H	T	A	T	270
811	GAT	CTA	GAC	ATG	GAC	TTC	ATG	GCA	GAC	ACA	TAT	CTC	GAG	GAT	GTG	855
271	D	L	D	M	D	F	M	A	D	T	Y	L	E	D	V	285
856	TTC	GGG	TTC	GAT	GAC	GAC	GAG	TTC	TTC	CGA	TGA	GAT	TTG	GTG	CCT	900
286	F	G	F	D	D	D	E	F	F	R	*					
901	TTC	TTG	TAA	TAC	TAG	TGG	ATC	TTA	ACA	GCA	GAG	AAA	GCC	TAG	TCT	945
946	GAG	GGC	AGC	ATC	CAC	CAT	GTT	CCC	CAG	CTA	TTT	ACT	CAG	CAA	TTA	990
991	ATT	GCC	TTC	GTT	CGC	GAT	GAG	GAT	CTT	TCC	AGC	CAT	CAA	CAG	CAC	1035
1036	AGT	GAC	AAG	GAA	ACG	CTT	GCT	ATC	TTC	CAG	GAC	AGA	TCA	CAT	AGC	1080
1081	ATC	CAA	GTC	AAA	TGA	ATG	TAT	TTT	CGA	GCA	GCA	TTT	TCT	TCA	TCT	1125
1126	TCA	ACC	TCC	TGT	CGA	AAG	CCC	AAC	TTT	CCG	AAG	GCT	ACA	CCA	TCT	1170
1171	GTA	TAG	TTG	CAG	AAA	GAT	GAT	GAC	ACA	CTT	CAG	AGC	GTG	TAC	TTG	1215
1216	TTG	GTA	TGC	AGC	ATC	TTG	ATC	ATG	TCA	TGA	AGA	TGC	TGC	TAG	TTA	1260
1261	CAA	GAT	CTG	TAG	AAC	TGT	GTA	ACC	AAT	TTA	GAA	ATA	ATG	ATC	CAG	1305
1306	AAA	CAC	TTT	TTG	TTC	TAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	1350
1351	AAA	AAA	AAA	AAA												1362

Figura 2.21 Región codificante y extremo 3'UTR de la secuencia obtenida de *MaWRKY45* de *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pinsag kra'. En color violeta se resalta el codón de inicio de la traducción y en color rojo el codón de terminación TGA. Se subraya el dominio WRKY con líneas negras y se resaltan en color verde los motivos WRKY y dedos de zinc. Los nucleótidos encerrados en cajas negras pertenecen al extremo 3'UTR.

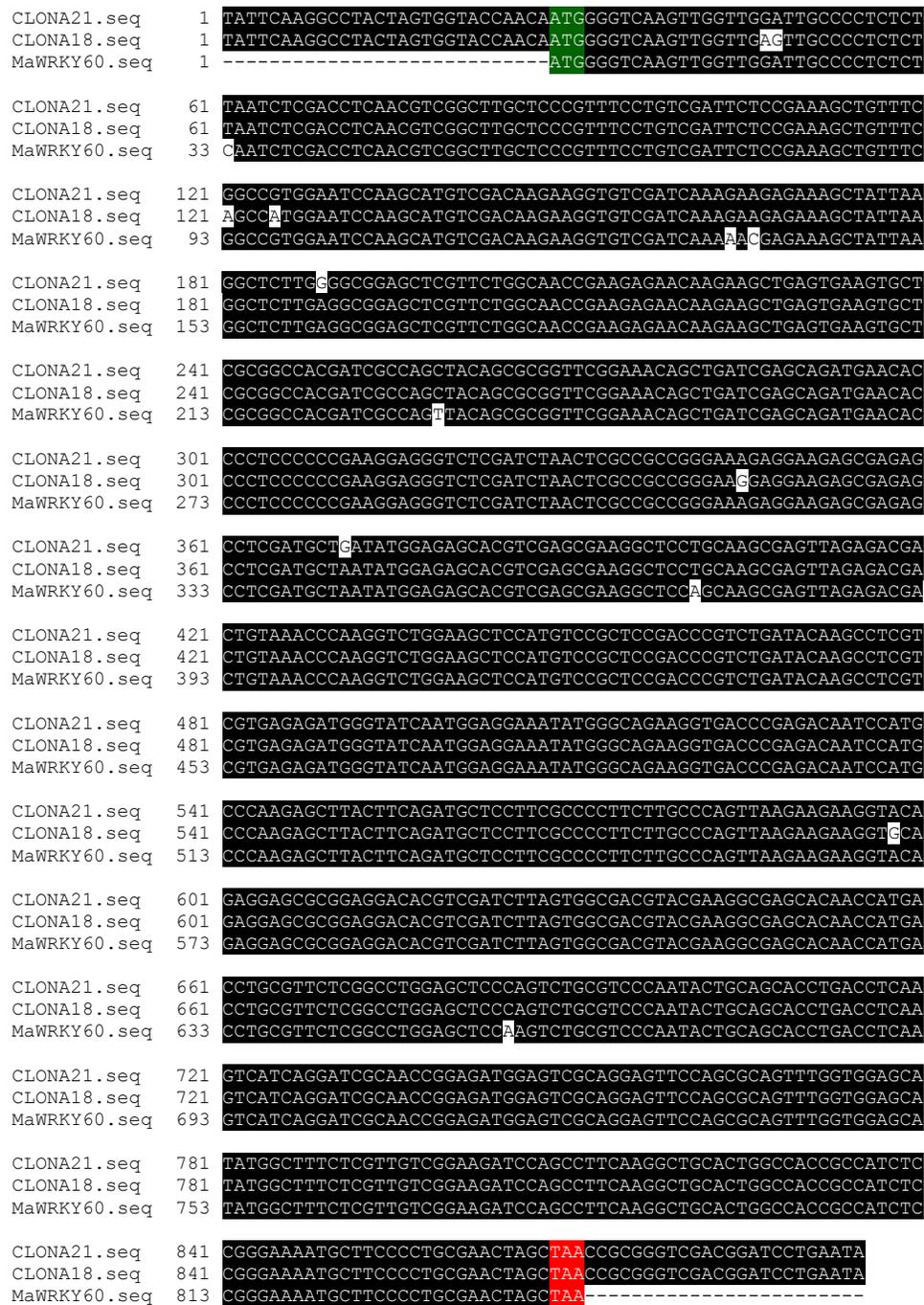


Figura 2.22 Alineamiento de la secuencia de ADN predicha de *MaWRKY60* con las secuencias aisladas *in vitro*. *MaWRKY60.seq* refiere a la secuencia predicha en phytozome, las clonas 18 y 21 son las secuencias obtenidas mediante PCR. En color negro se somborean los nucleótidos idénticos. En color verde se resaltan el codón de inicio de la traducción y en color rojo el codón de terminación TAA. Los nucleótidos arriba de la línea punteada negra corresponden a sitios de restricción.

1	ATG	GGG	TCA	AGT	TGG	TTG	GAT	TGC	CCC	TCT	CTT	AAT	CTC	GAC	CTC	45
1	M	G	S	S	W	L	D	C	P	S	L	N	L	D	L	15
46	AAC	GTC	GGC	TTG	CTC	CCG	TTT	CCT	GTC	GAT	TCT	CCG	AAA	GCT	GTT	90
16	N	V	G	L	L	P	F	P	V	D	S	P	K	A	V	30
91	TCG	GCC	GTG	GAA	TCC	AAG	CAT	GTC	GAC	AAG	AAG	GTG	TCG	ATC	AAA	135
31	S	A	V	E	S	K	H	V	D	K	K	V	S	I	K	45
136	GAA	GAG	AAA	GCT	ATT	AAG	GCT	CTT	GGG	GCG	GAG	CTC	GTT	CTG	GCA	180
46	E	E	K	A	I	K	A	L	G	A	E	L	V	L	A	60
181	ACC	GAA	GAG	AAC	AAG	AAG	CTG	AGT	GAA	GTG	CTC	GCG	GCC	ACG	ATC	225
61	T	E	E	N	K	K	L	S	E	V	L	A	A	T	I	75
226	GCC	AGC	TAC	AGC	GCG	GTT	CGG	AAA	CAG	CTG	ATC	GAG	CAG	ATG	AAC	270
76	A	S	Y	S	A	V	R	K	Q	L	I	E	Q	M	N	90
271	ACC	CCT	CCC	CCC	GAA	GGA	GGG	TCT	CGA	TCT	AAC	TCG	CCG	CCG	GGA	315
91	T	P	P	P	E	G	G	S	R	S	N	S	P	P	G	105
316	AAG	AGG	AAG	AGC	GAG	AGC	CTC	GAT	GCT	GAT	ATG	GAG	AGC	ACG	TCG	360
106	K	R	K	S	E	S	L	D	A	D	M	E	S	T	S	120
361	AGC	GAA	GGC	TCC	TGC	AAG	CGA	GTT	AGA	GAC	GAC	TGT	AAA	CCC	AAG	405
121	S	E	G	S	C	K	R	V	R	D	D	C	K	P	K	135
406	GTC	TGG	AAG	CTC	CAT	GTC	CGC	TCC	GAC	CCG	TCT	GAT	ACA	AGC	CTC	450
136	V	W	K	L	H	V	R	S	D	P	S	D	T	S	L	150
451	GTC	GTG	AGA	GAT	GGG	TAT	CAA	TGG	AGG	AAA	TAT	GGG	CAG	AAG	GTG	495
151	V	V	R	D	G	Y	Q	WRKY	GGC						V	165
496	ACC	CGA	GAC	AAT	CCA	TGC	CCA	AGA	GCT	TAC	TTC	AGA	TGC	TCC	TTC	540
166	T	R	D	N	P	WR	PA	Y	F	R	WR	S	F			180
541	GCC	CCT	TCT	TGC	CCA	GTT	AAG	AAG	AAG	GTA	CAG	AGG	AGC	GCG	GAG	585
181	A	P	S	C	P	V	K	K	K	V	Q	R	S	A	E	195
586	GAC	ACG	TCG	ATC	TTA	GTG	GCG	ACG	TAC	GAA	GGC	GAG	CAC	AAC	CAT	630
196	D	T	S	I	L	V	A	T	Y	E	G	E	WR	N	WR	210
631	GAC	CTG	CGT	TCT	CGG	CCT	GGA	GCT	CCC	AGT	CTG	CGT	CCC	AAT	ACT	675
211	D	L	R	S	R	P	G	A	P	S	L	R	P	N	T	225
676	GCA	GCA	CCT	GAC	CTC	AAG	TCA	TCA	GGA	TCG	CAA	CCG	GAG	ATG	GAG	720
226	A	A	P	D	L	K	S	S	G	S	Q	P	E	M	E	240
721	TCG	CAG	GAG	TTC	CAG	CGC	AGT	TTG	GTG	GAG	CAT	ATG	GCT	TTC	TCG	765
241	S	Q	E	F	Q	R	S	L	V	E	H	M	A	F	S	255
766	TTG	TCG	GAA	GAT	CCA	GCC	TTC	AAG	GCT	GCA	CTG	GCC	ACC	GCC	ATC	810
256	L	S	E	D	P	A	F	K	A	A	L	A	T	A	I	270
811	TCC	GGG	AAA	ATG	CTT	CCC	CTG	CGA	ACT	AGC	TAA	TCG	TTG	TCG	GAA	855
271	S	G	K	M	L	P	L	R	T	S	*					
856	GAT	CCA	GCC	TTC	AAG	GCT	GCA	CTG	GCC	ACC	GCC	ATC	TCC	GGG	AAA	900
901	ATG	CTT	CCC	CTG	CGA	ACT	AGC	TAA	CTC	TCT	GCT	CCT	CGA	GAT	GAC	945
946	TGA	GGT	GAT	GCC	GAA	AGT	TTG	GTT	TCT	GTT	CTT	ATC	AGT	TGA	AGT	990
991	AGA	CGA	TCC	ACC	AAT	CCA	CAG	ACT	GAG	TTT	GAT	TCG	GAA	GAA	GAA	1035
1036	GTT	CCG	AGT	TGG	ACA	CAC	CGA	TCG	ATC	GAT	CCC	GAA	CGA	AAC	TTC	1080
1081	CTC	TCG	GAA	CGA	AGG	TCA	AAA	ACA	CGT	GCT	GTT	GAC	TTC	TCG	GTC	1125
1126	AAT	GAT	GCC	AGC	CAA	GGA	AGT	TTC	GCA	GTT	GCT	TAT	CAA	GGC	GAT	1170
1171	GTC	GTT	GTA	AAT	GCT	TTA	AAA	GTT	GTG	TCG	GTA	TGA	TAA	TGG	ACA	1215
1216	TCC	AGC	CAT	TGA	TTT	GTG	TAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	1257

Figura 2.23 Región codificante y extremo 3'UTR de la secuencia obtenida de *MaWRKY60* de *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pinsag kra'. En color violeta se resalta el codón de inicio de la traducción y en color rojo el codón de terminación TAA. Se subraya el dominio WRKY con líneas negras y se resaltan en color verde los motivos WRKY y dedos de zinc. Los nucleótidos encerrados en cajas negras pertenecen al extremo 3'UTR.



Figura 2.24 Alineamiento de la secuencia de ADN predicha de *MaWRKY70* con la secuencia aisladas *in vitro*. MaWRKY70.seq refiere a la secuencia predicha en phytozome, la clona 10 es la secuencia obtenida mediante PCR. En color negro se somborean los nucleótidos idénticos. En color verde se resaltan el codón de inicio de la traducción y en color rojo el codón de terminación TAA. Los nucleótidos debajo de la línea punteada negra corresponden a sitios de restricción.

1	ATG	GGG	AGC	AGC	ACA	GGA	AGT	GAG	CTC	GAA	AGC	CCT	CTC	GTG	GCC	45
1	M	G	S	S	T	G	S	E	L	E	S	P	L	V	A	15
46	GAG	CTA	GCT	CGA	GCT	CTC	GAG	TTG	GCC	AGG	CAG	CTG	GAA	TCC	CAT	90
16	E	L	A	R	A	L	E	L	A	R	Q	L	E	S	H	30
91	CTC	AGC	AAC	CCT	GCC	CCA	ATT	GAC	TTG	TGC	AAG	TCC	GTG	GCG	CCC	135
31	L	S	N	P	A	P	I	D	L	C	K	S	V	A	P	45
136	GAG	ATA	TTG	TCA	TCC	ATT	CAG	AGG	TCC	ATC	CTC	ATG	GCG	AAA	TCG	180
46	E	I	L	S	S	I	Q	R	S	I	L	M	A	K	S	60
181	AGC	GAT	CCC	GAC	GGC	GAG	CAG	CAG	GCG	GCT	GGC	GAC	AGC	CCC	CGC	225
61	S	D	P	D	G	E	Q	Q	A	A	G	D	S	P	R	75
226	AGC	GAG	AGT	TCC	AGC	CCG	GCG	TTC	AAG	GAT	CAC	GAC	CGC	AAG	GAG	270
76	S	E	S	S	S	P	A	F	K	D	H	D	R	K	E	90
271	CTG	ATC	AAG	AAA	AGG	AAG	ACG	CTG	CAC	AAA	TGG	ACG	AAT	CAA	GTG	315
91	L	I	K	K	R	K	T	L	H	K	W	T	N	Q	V	105
316	AGG	CTC	ACC	CCG	GGC	ACC	GGA	GGA	GTC	GAA	GGG	TCT	GTG	GAT	GAC	360
106	R	L	T	P	G	T	G	G	V	E	G	S	V	D	D	120
361	GGC	TAC	AGC	TGG	AGA	AAG	TAC	GGG	CAG	AAG	GAC	ATC	CTG	GGA	GCC	405
121	G	Y	S	WRKY	GGQ	R	D	I	L	G	A					135
406	AAA	CAT	CCG	AGA	GCC	TAC	TAC	AGG	TGC	ACG	CAC	CGC	CAC	ACC	CAG	450
136	K	H	P	R	A	Y	Y	R	T	H	R	H	T	Q		150
451	GGC	TGC	TCT	GCG	ACG	AAG	CAA	GTG	CAG	AGA	TCG	GAC	GAG	GAC	CCT	495
151	G	S	A	T	K	Q	V	Q	R	S	D	E	D	P		165
496	CTG	ACG	TTC	GAC	ATC	ACC	TAC	GTC	GGG	GCT	CAT	ACC	TGC	CTC	CAG	540
166	L	T	F	D	I	T	Y	V	G	A	T	L	Q			180
541	AAG	CCA	CAG	CGA	GCC	TGC	GCA	TCC	GCA	TGC	CAG	GTG	CCG	CAG	CGG	585
181	K	P	Q	R	A	S	A	S	A	C	Q	V	P	Q	R	195
586	CGG	GAA	CAC	CAG	AAG	GAG	GAC	CTG	CTG	CTG	AGC	TTT	CGA	GCA	GGC	630
196	R	E	H	Q	K	E	D	L	L	L	S	F	R	A	G	210
631	TTG	AAG	GTC	AAG	ACC	GAA	GTC	GCG	GAA	TTG	GAG	GAA	GCG	CAG	CGG	675
211	L	K	V	K	T	E	V	A	E	L	E	E	A	Q	R	225
676	CAG	ACT	TGT	CGA	CAA	GGA	AAT	GAA	TTC	CAC	GTC	TTC	TCC	GCG	CCG	720
226	Q	T	C	R	Q	G	N	E	F	H	V	F	S	A	P	240
721	GCC	TTA	AAC	CTG	TCG	CCG	GTG	GCG	TCG	GAG	TCG	ATC	TAC	TTC	AGC	765
241	A	L	N	L	S	P	V	A	S	E	S	I	Y	F	S	255
766	AGC	TTT	GAT	GAT	GGC	ATC	AAC	CTA	CAG	ACT	TCG	GAC	TCG	GAG	ATC	810
256	S	F	D	D	G	I	N	L	Q	T	S	D	S	E	I	270
811	ACC	GAG	ATG	ATA	TCC	AGA	AGC	AAT	TCA	GCG	AGC	TAC	TTG	TCT	CTG	855
271	T	E	M	I	S	R	S	N	S	A	S	Y	L	S	L	285
856	GTG	GAC	ATG	GAT	TTC	ATG	CTG	GAG	GAG	CTG	GAC	TTC	GAA	CGG	GAC	900
286	V	D	M	D	F	M	L	E	E	L	D	F	E	R	D	300
901	TTC	CAG	TTC	GAT	GCC	TCG	AGC	TTC	TTC	TCC	TGA	GTC	ATG	GGA	CAT	945
301	F	Q	F	D	A	S	S	F	F	S	*					
946	GAG	CAG	AGT	CCA	AAC	ACT	CGA	GAT	CGC	TCA	ATT	CAT	TTT	CCG	AGA	990
991	TTA	AAC	AAG	ACG	ACT	GGT	AAA	TTC	CCC	AAC	CGG	AAA	TGT	AGG	TAG	1035
1036	AAA	CAG	AAA	GAG	TTT	GTT	CCA	TGT	AAT	GCG	TAG	CTC	AAT	TTT	GTG	1080
1081	TTA	AAA	TCA	ATG	GAT	CAA	GTC	AAA	1125							

Figura 2.25 Región codificante y extremo 3'UTR de la secuencia obtenida de *MaWRKY70* de *M. acuminata* subsp. *malaccensis* 'Pinsag kra'. En color violeta se resalta el codón de inicio de la traducción y en color rojo el codón de terminación TGA. Se subraya el dominio WRKY con líneas negras y se resaltan en color verde los motivos WRKY y dedos de zinc. Los nucleótidos encerrados en cajas negras pertenecen al extremo 3'UTR.

2.3.15 GENERACIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

Se lograron subclonar dos de los cuatro CDSs que se aislaron. Los CDSs de *MaWRKY18* y *MaWRKY70* fueron subclonados a un vector de expresión derivado de pCAMBIA2200. En la Figura 2.26 se muestra el T-DNA final de cada una de las dos construcciones que se generaron.

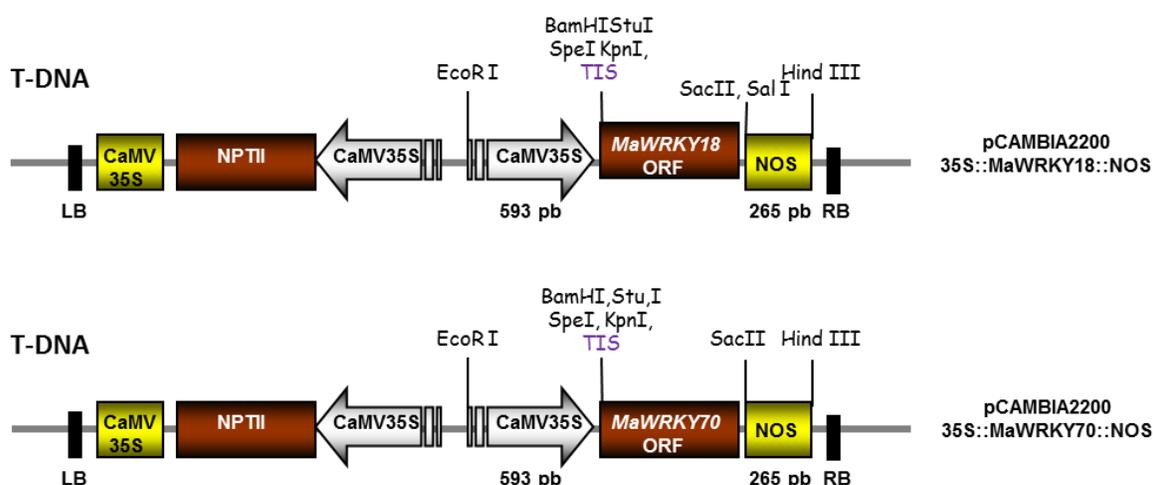


Figura 2.26 Construcciones de expresión generadas para sobreexpresar el CDS de *MaWRKY18* y *MaWRKY60* en *Nicotiana benthamiana*.

La verificación de la subclonación se realizó mediante digestiones con enzimas de restricción. El tamaño de los fragmentos esperados es de 828 pb para *MaWRKY18* y 933 pb para *MaWRKY70*. En la Figura 2.27 se muestra el producto de las digestiones que confirman la subclonación de los CDSs. El tamaño de los vectores de expresión es de 10,581 pb para la construcción 35S::*MaWRKY18*::NOS y 10,686 pb para la construcción 35S::*MaWRKY70*::NOS.

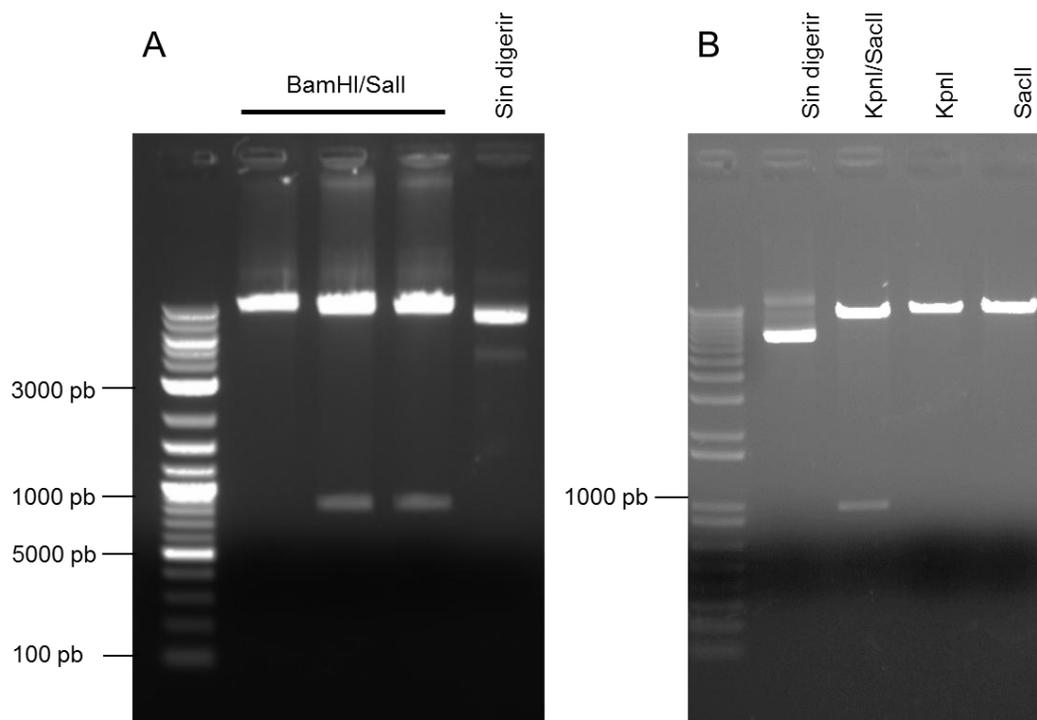


Figura 2.27 Digestión enzimática de los vectores de expresión. A) Digestión de la construcción 35S::MaWRKY18::NOS con BamHI y Sall. B) Digestión de la construcción 35S::MaWRKY70::NOS con KpnI y SacII.

Los genes *MaWRKY45* y *MaWRKY60* no pudieron ser clonados en el vector de expresión en el transcurso del tiempo que duro este proyecto.

2.4 DISCUSIÓN

Han transcurrido cinco años desde que D'Hont *et al.* (2012) publicaron la secuenciación del genoma de una variedad silvestre de plátano (*Musa acuminata* ssp *malaccensis*) resistente a la Sigatoka negra. El genoma completo de esta variedad diploide es de aproximadamente 523 mega bases (MB) y se lograron ensamblar 472.2 MB que constituye el 90% y se identificaron 36,542 genes potenciales que codifican para proteínas. Desde entonces, la disponibilidad del genoma al público en general ha sido crucial para la comunidad científica que trabaja en el mejoramiento genético de este cultivo. Como consecuencia de este avance científico, la identificación y caracterización de genes de interés agronómico es menos laboriosa, más precisa, y eficiente. En este trabajo utilizamos herramientas bioinformáticas para identificar, caracterizar *in silico* y clonar a cuatro factores de transcripción de la familia WRKY de plátano en un esfuerzo por encontrar genes involucrados en los mecanismos de defensa del plátano.

2.4.1 POSIBLE FUNCIÓN DE MAWRKY45 Y MAWRKY70 EN EL MECANISMO DE DEFENSA DEL PLÁTANO HACIA EL ESTRÉS BIÓTICO.

La participación de los factores de transcripción de la familia WRKY en las vías de señalización de estrés biótico ha sido reportada en muchas especies de plantas, principalmente en las plantas modelo de *A. thaliana* y *O. sativa*. En el año 2007 Shimono *et al.* obtuvieron evidencias de una vía alterna a la vía de señalización del AS no dependiente de NPR1 como sucede en la especie dicotiledónea *A. thaliana*, si no dependiente del factor de transcripción OsWRKY45 inducible a AS cuya sobreexpresión incrementa notablemente la tolerancia de plantas de *O. sativa* contra el añublo del arroz causado por el hongo *Magnaporthe grisea* cavara, raza 007.0. Estudios posteriores en *Nicotiana tabacum* demostraron su inducibilidad en la regulación al estrés por deshidratación, estrés salino, temperaturas bajas y altas (0 y 42 °C) y los microorganismos patógenos *Pyricularia oryzae* Cav. y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Qiu y Yu, 2009). De este modo, las evidencias señalan su participación en diferentes procesos como lo son el estrés biótico y abiótico. Por otra parte, AtWRKY70 es un factor de transcripción indispensable en el SAR y que regula la comunicación cruzada entre las vías del AS y el jasmonato, su sobreexpresión incremental notablemente la tolerancia de

A. thaliana contra microorganismos virulentos como *P. syringae* y el Oomiceto *Hyaloperonospora parasitica* (Knoth *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004).

El factor de transcripción de plátano más parecido a OsWRKY45 lo nombramos en este trabajo como MaWRKY45. La proteína obtuvo un porcentaje de identidad de 38% y un porcentaje de similitud de 55% con OsWRKY45. En tanto que el posible ortólogo para AtWRKY70 en plátano presentó un 33% de identidad y 52% de similitud. Estos porcentajes son aparentemente bajos, sin embargo, es razonable si consideramos el número extenso y la diversidad de funciones de esta familia de factores de transcripción, dado que cada especie de planta tiene requerimientos particulares para interactuar con su entorno. El alineamiento de MaWRKY45 y MaWRKY70 con sus respectivos ortólogos y otros miembros representativos de la familia WRKY muestran una conservación única del dominio WRKY que es la firma distintiva de esta familia. Es este dominio el responsable de la interacción con el ADN en la región promotora de la transcripción de los genes que contienen el elemento en *cis* TTGACC(T) (Goel *et al.*, 2016; Rushton *et al.*, 2010). El análisis de la secuencia de aminoácidos confirma la presencia del dominio WRKY y de otros dominios y motivos estructurales canónicos de esta familia. Los SLN son esenciales para que los factores de transcripción puedan ser transportados del citoplasma donde son sintetizados en los ribosomas, al núcleo celular donde actúan regulando la transcripción de genes (Marfori *et al.*, 2011; Hicks, 2005). Se identificó un SLN bipartita KRKVNPA GDRRG GCRRI del residuo 91 al 108 en la secuencia de MaWRKY45 y un SLN monopartita RKELIKKRKTLHKW del residuo 88 a 102 en MaWRKY70. Se localizaron sitios putativos de miristoilación en el extremo N-terminal de ambas secuencias, estas modificaciones postraduccionales son frecuentes entre las proteínas que participan en las cascadas de señalización como cinasas y factores de transcripción, son útiles en las interacciones proteína-proteína y en las proteínas que tienen que interactuar con los lípidos de membrana (Hayashi y Titani, 2010; Maurer stroh *et al.*, 2002); en este caso, los factores de transcripción putativos MaWRKY45 y MaWRKY70 tienen que ser transportados al núcleo, por lo tanto, muy probablemente estos sitios de miristoilación podrían facilitar su asociación a la membrana nuclear previo a su importación. Por otro lado, existe un enriquecimiento de sitios susceptibles a fosforilación. La fosforilación es una de las MPs más comunes que suceden en una célula,

sobre todo en las vías de señalización donde proteínas como las MAPKs (Mitogen-activated protein kinase) fosforilan a factores de transcripción específicos para activar su función activadora o represora de la transcripción de genes; en el caso particular de los WRKY se sabe que estos son fosforilados frecuentemente por las MAPKs. AtWRKY25, AtWRKY33 (Phukan *et al.*, 2016) y NtWRKY1 (Ogata *et al.*, 2015) son fosforilados por las MAPKs en las serinas de los grupos SP (Serina/prolina), por consiguiente, es muy probable que las proteínas WRKY que contienen grupos SP en su secuencia proteica sean sustratos de las MAPKs (Ishihama *et al.*, 2014). Análisis bioinformáticos en *Oryza nivara* indican que la mayoría de los 94 FsT WRKY podrían estar siendo regulados por fosforilación (Xu *et al.*, 2016). MaWRKY45 y MaWRKY70 tienen grupos SP, este hecho sugiere que estos son activados por fosforilación en la ruta de señalización. MaWRKY70 contiene además dos sitios de glicosilación, lo que puede implicar una posible regulación de su función mediante la estabilidad y el plegamiento correcto que pueda derivar de las glicosilaciones.

Las fitohormonas AS, MeJa, y etileno controlan a la mayoría de las vías de señalización involucradas en la respuesta contra microorganismos patógenos (Verma *et al.*, 2016). Los factores de transcripción WRKY responden a más de una vía hormonal. *OsWRKY45* por ejemplo es inducido por las hormonas MeJa, ABA y AS (Huangfu *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2011; Shimono *et al.*, 2007;) cada vía hormonal determina la función de *OsWRKY45*. En la vía de ABA, *OsWRKY45* confiere tolerancia hacia el estrés hídrico, demostrando así su habilidad de actuar en diferentes tipos de estrés en respuesta a una vía hormonal en específico (Tao *et al.*, 2011). *AtWRKY70* es inducido por AS y regula la comunicación entre la vía del jasmonato y la vía del AS mediante la represión de los genes relacionados con la síntesis del jasmonato y la activación transcripcional de los genes de defensa del SAR. Por otro lado, *VvWRKY1* es inducido por la vía del jasmonato e induce la expresión de genes que confieren una alta tolerancia a mildiu veloso (Marchive *et al.*, 2013). Nuestro análisis de los elementos *in cis* del promotor proximal de la transcripción (1500 pb) de *OsWRKY45* muestra elementos responsivos a MeJa, ABA y AS como se ha descrito experimentalmente. En el promotor de *MaWRKY45* se encontraron cuatro elementos responsivos a MeJa y un elemento responsivo a auxina, esto supone una función de *MaWRKY45* en la respuesta al estrés biótico dependiente de la vía del

jasmonato y una función relacionada con el desarrollo del plátano inducida por auxina. Esto es consistente con lo que se ha descrito acerca de la multiplicidad de funciones que generalmente se ha visto en esta familia. No es de sorprenderse que proteínas clave de las vías de defensa sean reguladas por más de una vía hormonal, las plantas priorizan la sobrevivencia sobre el desarrollo y el crecimiento (Huot *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2012). Por lo tanto, sugerimos que MaWRKY45 podría estar induciendo directa o indirectamente la transcripción de genes de defensa dependientes de la vía del jasmonato y reprimiendo genes relacionados con el crecimiento y desarrollo del plátano. Ahora bien, cuando la infección haya sido contrarrestada, la expresión de MaWRKY45 podría estar siendo reprimida por alguna proteína inducida por la vía de las auxinas como sucede con los Factores Responsivos a Auxina (ARF7 y ARF19) los cuales controlan el crecimiento y desarrollo de las raíces mediante la modulación de la expresión de AtWRKY23 (Phukan *et al.*, 2016). Este tipo de comunicación entre diferentes vías hormonales es prescindible para la eficiencia y el buen uso de los recursos energéticos. Interesantemente, MaWRKY70 solo contiene un elemento en *cis* responsivo a AS, lo que sugiere la especialización de este factor de transcripción en esta vía hormonal; de igual manera su ortólogo AtWRKY70 es inducido por la vía del AS dependiente de NPR1, basados en esta premisa, sugerimos que MaWRKY70 tiene un papel similar a su ortólogo en *Arabidopsis* en la vía de señalización del AS que induce el mecanismo del SAR. Las secuencias promotoras contienen además de la W-box un amplio repertorio de elementos en *cis* de unión a otras familias de factores de transcripción como: MYB, Dof, BHLH, NAC, ERF y bZIP, esto es consistente con lo que conocemos hoy sobre la existencia de una regulación cruzada entre los factores de transcripción para adaptar las vías metabólicas y poder responder eficientemente a un proceso celular o estrés. Particularmente, la familia WRKY se caracteriza por la regulación transcripcional entre miembros de la misma familia o incluso por una autoregulación como en el caso de PcWRKY1 (*Petroselinum crispum*) que se une al elemento W-box de su región promotora y a PcWRKY3 (Turck *et al.*, 2004).

MaWRKY45 y MaWRKY70 se agrupan en el clado clasificado como grupo III con un motivo de dedos de zinc tipo Cx7Cx23HxC. Este clado parece estar más especializado en el estrés biótico y abiótico. De los 12 factores de transcripción de *A. thaliana* que conforman este grupo, siete están involucrados en el mecanismo de defensa contra el

estrés biótico (At4G11070-1, At4G11070-2, At4GG23810, At5G01900, At5G22570, At5G24110 y At3G56400). AtWRKY70 (At3G56400), AtWRKY38 (At5G22570) y AtWRKY62 (At5G01900) son inducidos por la vía del AS y por *Pseudomonas syringae* (Kim *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2004). No obstante, la sobreexpresión de AtWRKY41 (At4G11070) incrementa notablemente la tolerancia hacia la infección por *P. syringae* pero disminuye la tolerancia hacia el patógeno *Erwinia carotovora* (Pandey y Somssich 2009; Higashi *et al.*, 2008). En este sentido, con las evidencias proporcionadas por los análisis *in silico* proponemos que los FsT MaWRKY45 y MaWRKY70 están involucrados en la vía de señalización del plátano en respuesta al estrés biótico.

2.4.2 POSIBLE FUNCIÓN DE MAWRKY18 Y MAWRKY60 EN EL MECANISMO DE DEFENSA DEL PLÁTANO HACIA EL ESTRÉS BIÓTICO.

Actualmente se sabe que la mayoría de las proteínas con propiedades regulatorias raramente actúan solas. Muy a menudo, ellas interactúan físicamente de manera transitoria o permanente para controlar las funciones biológicas en los sistemas vivos (Chi, *et al.*, 2013). Los factores de transcripción WRKY tienen la habilidad de formar homo o heterocomplejos para regular diversas funciones. El complejo AtWRKY38/48/62 regula negativamente la defensa al estrés biótico (Xing *et al.*, 2008), AtWRKY22/29 incrementa la tolerancia a la infección por *P. syringae* (Asai *et al.*, 2002). En arroz, el grupo OsWRKY45-1/2 regula la defensa basal contra *Xanthomonas oryzae*. Uno de los clusters más estudiados en *A. thaliana* es el cluster AtWRKY18/40/60 que regula el mecanismo molecular de defensa en respuesta a diversos microorganismos patógenos. Interesantemente, este mismo grupo parece estar siendo activado durante la interacción *M. fijiensis*-*M. acuminata* como lo demuestran las evidencias del transcriptoma realizado por D'Hont *et al.* (2012). En este trabajo se caracterizaron solo dos de los tres miembros del grupo. MaWRKY18 y MaWRKY60 homólogos de AtWRKY18 y AtWRKY60 respectivamente. La razón, las evidencias señalan a AtWRKY18 como el autor principal de la regulación positiva del sistema de defensa, pero que sin embargo necesita interactuar con AtWRKY60 para aumentar su especificidad de unión al ADN y AtWRKY40 parece disminuir su habilidad de unión al ADN (Phukan *et al.*, 2016; Chi *et al.*, 2013). En nuestro análisis filogenético observamos que en *Arabidopsis* únicamente este

grupo conforma el clado que pertenece al subgrupo Ila de la familia WRKY, del mismo modo que en plátano solo que con más variantes de secuencia, igualmente este hecho se ha reportado para las especies *Gossypium hirsutum*, *Populus trichocarpa* y *Cucumis sativus* (Gu *et al.*, 2018). La localización de MaWRKY18/40/60 en el mismo clado sugiere una relación entre la estructura y la función, además de una posible especialización evolutiva de este clado en la regulación del sistema defensa contra microorganismos patógenos. Tomando en cuenta los antecedentes y nuestro análisis proponemos que los miembros del subgrupo Ila en plátano (MaWRKY18/40/60) regulan la respuesta al estrés biótico. Pruebas experimentales futuras permitirán probar esta hipótesis.

En las secuencias del extremo N-terminal de las proteínas MaWRKY18 y MaWRKY60 se observan motivos potenciales de zipper de leucina como los que poseen las proteínas del cluster AtWRKY18/40/60 y que son esenciales para la interacción de cada miembro en el heterocomplejo (Xu *et al.*, 2016). Además, se encontró un dominio hélice superenrollada para MaWRKY18, las funciones de este dominio siguen siendo debatidas, sin embargo, se sabe que actúan como andamiajes en la formación de complejos moleculares (Truebestein y Leonard, 2016). En este sentido, sugerimos que este dominio es necesario para la formación del grupo MaWRKY18/40/60 en plátano.

2.4.3. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES CODIFICANTES Y LOS EXTREMOS 3'UTR

La clonación de las regiones codificantes de cada uno de los genes de estudio, permitió corroborar o descartar los resultados obtenidos *in silico*. La longitud de la mayoría de los genes WRKY oscilan entre los 250 y 350 residuos de aminoácidos (Rushton *et al.*, 2010). El CDS de *MaWRKY18* es de 828 pb y codifica para una proteína de 275 aminoácidos. *MaWRKY45* tiene un CDS de 885 pb que codifican para 295 pares de bases. *MaWRKY60* tiene un CDS de 840 pb que codifican una proteína de 280 aminoácidos y, por último, el CDS de *MaWRKY70* es de 930 pb que codifican para una proteína de 310 aminoácidos. A excepción de *MaWRKY45*, las secuencias de los genes aislados *in vitro* comparten un porcentaje de identidad del más del 99.5%, incluso en el caso de *MaWRKY70* este tiene un 100% de identidad con el CDS predicho. Tomando en consideración que las

secuencias predichas provienen de la información del genoma de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* 'DH-Pahang' (D'Hont *et al.*, 2012) y que los CDSs de los genes de interés fueron aislados de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* 'Pisang kra', es interesante la conservación que se mantiene de la secuencia de los genes WRKY. Esto sugiere que estos factores de transcripción WRKY de plátano mantienen una estructura casi idéntica entre diferentes variedades porque posiblemente realizan funciones de vital importancia para el desarrollo o sobrevivencia del plátano mediante la reprogramación del transcriptoma. Es bien sabido que muchos de estos factores de transcripción tienen alelos con diferentes funciones. OsWRKY45-1 por ejemplo, tiene un alelo OsWRKY45-2 (Tao *et al.*, 2012). Este alelo con apenas cinco aminoácidos diferentes tiene funciones antagonistas sobre OsWRKY45-1. El alineamiento de las clonas obtenidas para MaWRKY18 (Figura 2.17) muestran claramente la presencia de dos alelos para este gen. Es muy probable que estos alelos participen de manera conjunta para regular una función.

El ADNc de un gen está conformado por la región codificante y por exones no codificantes que se encuentran en los extremos y son nombrados región 3'UTR y 5'UTR. Se sabe que el extremo 3'UTR participa en la terminación del proceso de transcripción, en el proceso de poliadenilación y en la regulación postranscripcional de los ARNm como la estabilidad, transporte, eficiencia de traducción y degradación por pequeños ARNs (Mignone *et al.*, 2002). En este trabajo se caracterizaron los extremos 3'UTR de los cuatro genes de estudio con el fin de delimitar la región codificante y conocer la secuencia que podría darnos evidencias sobre la regulación de los genes WRKY. Se identificaron los elementos distintivos que conforman estas regiones no codificantes en plantas. Según un estudio realizado por Loke *et al.* (2005) en los ARNm de *A. thaliana*, observo que el sitio de corte y poliadenilación siempre ocurre en los nucleótidos TA y CA. Hecho que pudimos corroborar en las secuencias clonadas *in vitro* (Figuras 2.10-2.13). Se identificaron regiones ricas en adenilatos y uridilatos (AU) aproximadamente a 10 pb del sitio de corte. Estas regiones han sido descritas como parte de la señal de poliadenilación en plantas. Interesantemente, encontramos estas regiones ricas en AU en los extremos 3' de todos los genes WRKY de estudio. Lo que nos lleva a sustentar el trabajo de loke *et al.* (2005). Esta secuencia consenso parece ser conservada en el reino vegetal. El tamaño de las regiones 3' UTR varía ampliamente en los ARNm de las plantas, En *A. thaliana* el

promedio de estas regiones es de 155 pb a 242 pb y en arroz de 259 pb a 469 pb (Srivastava *et al.*, 2017). Parece ser que existe una correlación entre la complejidad del organismo y la longitud de las regiones 3'UTR. El rango de longitud de los extremos 3'UTR de los genes WRKY va de 89 pb a 432 pb para *MaWRKY18* y *MaWRKY45* respectivamente. Un extremo 3' UTR demasiado largo o corto es inestable (Wachter *et al.*, 2007). Esto es un mecanismo de regulación de la expresión genética de la que se valen las células para adaptar su proteoma a sus requerimientos. *MaWRKY18* tiene la región 3'UTR más pequeña, esto podría ser causado por una poliadenilación alternativa que produce extremos 3'UTR más cortos con el fin de reducir la estabilidad y eficiencia de la traducción. En algún momento cuando la célula necesite de este factor de transcripción, por algún mecanismo que desconocemos se generaran isoformas de ARNm con el tamaño óptimo para mejorar la eficiencia de traducción de *MaWRKY18*. Si lo que proponemos es cierto, el gen *MaWRKY18* debe de ser un gen inducible y con funciones críticas en el metabolismo celular. Sería interesante evaluar la expresión de un gen reportero bajo la regulación de las regiones 3'UTR aisladas en este trabajo y ampliar nuestro conocimiento en torno a la regulación postranscripcional de los genes *MaWRKY*.

2.5 CONCLUSIONES

1. Se aislaron *in silico* las regiones codificantes de cuatro genes de la familia WRKY de plátano nombrados en este trabajo como MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 y MaWRKY70 y se determinó su identidad mediante el análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos utilizando herramientas bioinformáticas. Se encontraron los motivos y dominios distintivos de esta familia que son: el dominio WRKY (motivo WRKY y motivo dedos de zinc), el sitio de localización nuclear (SLN) y sitios putativos de fosforilación.
2. Se demostró mediante el análisis filogenético que MaWRKY45/70 pertenecen al grupo III y MaWRKY18/60 al subgrupo IIa de la familia WRKY. Nuestras observaciones de los miembros del subgrupo IIa y su mecanismo de acción descrito en la literatura nos llevan a proponer la hipótesis de la especialización evolutiva de este clado en el proceso de defensa de las plantas contra microorganismos patógenos.
3. Se encontraron elementos en *cis* responsivos a fitohormonas como jasmonato y AS en el análisis de la región promotora de la transcripción de los genes. Esto sugiere una posible función de los factores de transcripción MaWRKY18/45/60/70 en las vías de señalización del mecanismo de defensa del plátano.
4. Se aislaron y clonaron los ADNc de las regiones codificantes de los cuatro genes WRKY de estudio y se corroboró la fidelidad de las predicciones *in silico* realizadas en la plataforma de phytozome utilizando el algoritmo de FGENESH. MaWRKY18, MaWRKY60 y MaWRKY70 tienen un porcentaje de identidad del 99 al 100% con escasos polimorfismos. No obstante, MaWRKY45 tuvo un error en la predicción, se encontró que la proteína es más pequeña de lo predicho y que el intrón localizado en el extremo 5' predicho es muy probablemente parte del extremo 5'UTR.
5. Se aislaron y caracterizaron las regiones 3'UTR de cada uno de los cuatro genes. Todas las predicciones *in silico* de los extremos 3'UTR fueron erróneas. Se localizaron los sitios de corte, regiones ricas en adenilatos adyacentes al sitio de corte que podrían estar involucrados en el mecanismo de terminación de la transcripción y se estableció el límite de las regiones codificante.

6. Se realizaron dos construcciones de expresión para sobreexpresar en un futuro la región codificante de MaWRKY18 y MaWRKY70 por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* y validar su función en el mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos.

2.6 PERSPECTIVAS

En este trabajo se ofrece evidencia *in silico* y evidencia molecular que identifican nuestros genes como pertenecientes a la familia WRKY y como genes que probablemente se encuentren involucrados en algún nivel de las cascadas de señalización activadas por microorganismos patógenos. En este sentido, es necesario realizar ensayos funcionales mediante la sobreexpresión individual de las regiones codificantes en una planta modelo como *N. benthamiana* que nos permita identificar de manera rápida y eficiente el o los genes candidatos para iniciar un programa de mejoramiento en el cultivar *M. acuminata* (grupo AAA) subgrupo Cavendish 'Enano gigante' que es la variedad más importante económicamente en nuestro país y en todo el mundo, el cual es también blanco de microorganismos patógenos que amenazan su producción (Menon, 2016).

Los genes que se confirmen estén involucrados en las vías de defensa, serán caracterizados para corroborar experimentalmente lo que sugerimos en este trabajo. Para ello, será necesario realizar ensayos de un híbrido para corroborar su afinidad a la caja W, un ensayo para confirmar la localización subcelular mediante el uso de proteínas reporteras como GUS (β -glucuronidase) o GFP (Green Fluorescent Protein). Así mismo, ensayos de transactivación brindarán información sobre su autoregulación dado que este mecanismo es muy común en esta familia de factores de transcripción (Turck *et al.*, 2004). Por la importancia que tienen las fitohormonas en la regulación de los mecanismos de defensa, es pertinente medir los niveles de transcritos inducidos por AS y jasmonato mediante la técnica de qRT-PCR. Este ensayo ampliará nuestra visión sobre la regulación de los genes de interés WRKY.

Finalmente, el objetivo final es, la aplicación biotecnológica que pueda derivar del conocimiento que se ha generado. La etapa final es la generación de nuevas líneas transgénicas o cisgénicas de plátano que sean resistentes o altamente tolerantes a los microorganismos patógenos, sobre todo del tipo fúngico como *M. fijiensis* y FOC raza 4. Así, el proyecto a largo plazo tiene como objetivo contribuir a la resolución de un problema específico que enfrentan los agricultores no solo de nuestro país México, sino un problema que preocupa a la industria mundial del plátano.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. 635 p.
- Akankwasa, K., G.F. Ortmann, E. Wale y W.K. Tushemereirwe (2013). Farmers' choice among recently developed hybrid banana varieties in Uganda: a multinomial logit analysis. *Agrekon*, 52, 25-51.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers y D.J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Antoni, R., L. Rodriguez, M. Gonzalez-Guzman, G.A. Pizzio, y P.L. Rodriguez (2011). News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Current Opinion Plant Biology*, 14, 547-553.
- Asai, T., G. Tena, J. Plotnikova, M.R. Willmann, W.L. Chiu, L. Gomez-Gomez y J. Sheen (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415, 977-983.
- Barberis, A. y M. Petrascheck (2003). Transcription activation in eukaryotic cells. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7.
- Boman, H.G. (1991). Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 65, 205-207.
- Bordoli, L., F. Kiefer, K. Arnold, P. Benkert, J. Battey y T. Schwede (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, 6, 1-13.
- Cammue, B.P.A., M.F.C. De Bolle, F.R.G. Terras y W.F. Broekaert (1993). Fungal disease control in *Musa*: application of new antifungal proteins, en: Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests, Ganry, J. (ed). Montpellier. France: CIDAR/INIBAP, pp. 221-225.

-
- Carr, M.K.V. (2009). The water relations and irrigation requirements of banana (*Musa spp.*). *Experimental Agriculture*, 45, 333-371.
- Castillo, L.E., C. Ruepert y E. Solis (2000). Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the north Atlantic zone of Costa Rica. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 1942-1950.
- Chen, L., Y. Song, S. Li, L. Zhang, C. Zou y D. Yu (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819, 120-128.
- Chi, Y., Y. Yang, Y. Zhou, J. Zhou, B. Fan, J.-Q. Yu y Z. Chen (2013). Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. *Molecular Plant*, 6, 287-300.
- Churchill, A.C.L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12, 307-328.
- Cramer, P., K.-J. Armache, S. Baumli, S. Benkert, F. Brueckner, C. Buchen, G.E. Damsma, S. Dengl, S.R. Geiger, A.J. Jasiak, A. Jawhari, S. Jennebach, T. Kamenski, H. Kettenberger, C.-D. Kuhn, E. Lehmann, K. Leike, J.F. Sydow y A. Vannini (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annual Review of Biophysics*, 37, 337-352.
- Cui, H., K. Tsuda y J.E. Parker (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 487-511.
- D'Hont, A., F. Denoeud, J.-M. Aury, F.-C. Baurens, F. Carreel, O. Garsmeur, B. Noel, S. Bocs, G. Droc, M. Rouard, C. Da Silva, K. Jabbari, C. Cardi, J. Poulain, M. Souquet, K. Labadie, C. Jourda, J. Lengelle, M. Rodier-Goud, A. Alberti, M. Bernard, M. Correa, S. Ayyampalayam, M.R. Mckain, J. Leebens-Mack, D. Burgess, M. Freeling, D. Mbégué-A-Mbégué, M. Chabannes, T. Wicker, O.

- Panaud, J. Barbosa, E. Hribova, P. Heslop-Harrison, R. Habas, R. Rivallan, P. Francois, C. Poiron, A. Kilian, D. Burthia, C. Jenny, F. Bakry, S. Brown, V. Guignon, G. Kema, M. Dita, C. Waalwijk, S. Joseph, A. Dievert, O. Jaillon, J. Leclercq, X. Argout, E. Lyons, A. Almeida, M. Jeridi, J. Dolezel, N. Roux, A.-M. Risterucci, J. Weissenbach, M. Ruiz, J.-C. Glaszmann, F. Quétier, N. Yahiaoui y P. Wincker (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 488, 213-219.
- Dai, X., Y. Wang y W.-H. Zhang (2016). *OsWRKY74*, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *Journal of Experimental Botany*, 67, 947-960.
- Dale, J., A. James, J.Y. Paul, H. Khanna, M. Smith, S. Peraza-Echeverria y R. Harding (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications*, 8, 1-8.
- Duan, M.-R., J. Nan, Y.-H. Liang, P. Mao, L. Lu, L. Li, C. Wei, L. Lai, Y. Li y X.-D. Su (2007). DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY1 protein. *Nucleic Acids Research*, 35, 1145-1154.
- Eulgem, T. y I.E. Somssich (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 366-371.
- Eulgem, T., P.J. Rushton, S. Robatzek y I.E. Somssich (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5, 199-206.
- FAO, 2017. Banana Market Review 2015-16. Rome, Italy. (Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i7410e.pdf>).
- Feng, B., S. Yang, H. Du, X. Hou, J. Zhang, H. Liu y Y. Huang (2012). Molecular characterization and functional analysis of plant WRKY genes. *African Journal of Biotechnology*, 11, 13606-13613.
- Fouré, E. y M. Grisoni (1984). Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Sélection de molécules fongicides nouvelles. Activités comparées de différentes

molécules fongicides sur *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agent de la maladie des raies noires des bananiers et plantains du Gabon (suite III). *Fruits*, 39, 427-440.

Franco-Zorrilla, J.M., I. López-Vidriero, J.L. Carrasco, M. Godoy, P. Vera y R. Solano (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 2367-2372.

Fu, Z.Q. y X. Dong (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 839-863.

Gao, Q.-M., S. Zhu, P. Kachroo y A. Kachroo (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-12.

Ghag, S.B., U.K.S. Shekhawat y T.R. Ganapathi (2012). *Petunia* floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of *Fusarium* wilt resistance in transgenic banana plants. *PLoS ONE*, 7, e39557.

Ghag, S.B., U.K.S. Shekhawat y T.R. Ganapathi (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 541-553.

Giacomelli, J.I., K.F. Ribichich, C.A. Dezar y R.L. Chan (2010). Expression analyses indicate the involvement of sunflower WRKY transcription factors in stress responses, and phylogenetic reconstructions reveal the existence of a novel clade in the *Asteraceae*. *Plant Science*, 178, 398-410.

Goel, R., A. Pandey, P.K. Trivedi, y M.H. Asif (2016). Genome-wide analysis of the *Musa* WRKY gene family: evolution and differential expression during development and stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-13.

Göhre, V., T. Spallek, H. Häweker, S. Mersmann, T. Mentzel, T. Boller, M. de Torres, J.W. Mansfield y S. Robatzek (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is

- directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Current Biology*, 18, 1824-1832.
- Gong, X., J. Zhang, J. Hu, W. Wang, H. Wu, Q. Zhang y J.-H. Liu (2015). FcWRKY70, a WRKY protein of *Fortunella crassifolia*, functions in drought tolerance and modulates putrescine synthesis by regulating arginine decarboxylase gene. *Plant, Cell and Environment*, 38, 2248-2262.
- Gu, L., L. Li, H. Wei, H. Wang, J. Su, Y. Guo y S. Yu (2018). Identification of the group IIa WRKY subfamily and the functional analysis of *GhWRKY17* in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *PloS One*, 13, e0191681.
- Guo, D., J. Zhang, X. Wang, X. Han, B. Wei, J. Wang, y L.J. Qu (2015). The WRKY transcription factor WRKY71/EXB1 controls shoot branching by transcriptionally regulating RAX genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27, 3112-3127.
- Hancock, R.E.W. y R. Lehrer (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16, 82-88.
- Hayashi, N. y K. Titani (2010). N-myristoylated proteins, key components in intracellular signal transduction systems enabling rapid and flexible cell responses. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86, 494-508.
- Heslop-Harrison, J.S. y T. Schwarzacher (2007). Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*, 100, 1073-1084.
- Hicks, G.R. (2005). Nuclear import of plant proteins, en: Nuclear import and export in plants and Animals, Tzfira, T. y V. Citovsky (eds). Springer. Boston. pp. 61-82.
- Higashi, K., Y. Ishiga, Y. Inagaki, K. Toyoda, T. Shiraishi, y Y. Ichinose (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 279, 303-312.
- Hu, C.-H., Y.-R. Wei, Y.-H. Huang y G.-J. Yi (2013). An efficient protocol for the production of *chit42* transgenic Furenzhi banana (*Musa* spp. AA group) resistant to *Fusarium*

- oxysporum*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 49, 584-592.
- Huangfu, J., J. Li, R. Li, M. Ye, P. Kuai, T. Zhang, y Y. Lou (2016). The transcription factor OsWRKY45 negatively modulates the resistance of rice to the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. International Journal of Molecular Sciences, 17, 1-14.
- Huot, B., J. Yao, B.L. Montgomery y S.Y. He (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. Molecular Plant, 7, 1267-1287.
- Hwang, S.-C. y W.-H. Ko (2004). Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. Plant Disease, 88, 580-588.
- IITA Annual Report, 2000. International Institute of Tropical Agriculture Annual Report 2000. Improving plantain-and banana-based system. Project 2. Disponible en: https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/Pnacl770.pdf. [Acceso 2 de Enero 2018]
- Ishiguro, S. y K. Nakamura (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato. Molecular and General Genetics MGG, 244, 563-571.
- Ishihama, N., H. Adachi, M. Yoshioka y H. Yoshioka (2014). In vivo phosphorylation of WRKY transcription factor by MAPK, en: Plant MAP Kinases, Komis, G. y J. Samaj (eds). Humana Press, New York. pp. 171-181.
- Jing, S., X. Zhou, Y. Song y D. Yu (2009). Heterologous expression of OsWRKY23 gene enhances pathogen defense and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. Plant Growth Regulation, 58, 181-190.
- Johnson, R. (2000). Classical plant breeding for durable resistance to diseases. Journal of Plant Pathology, 82, 3-7.
- Jones, D. R. (1994). The improvement and testing of Musa: a global partnership. INIBAP, Montpellier, France. 303pp.
- Jones, D.R. (1999). Diseases of banana, abaca and enset. Wallingford, United Kingdom

(UK): CABI (Centre for Agricultural Bioscience International). 139 p.

- Jones, J.D.J. y J.L. Dangl (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Kaliyappan, R., S. Viswanathan, B. Suthanthiram, U. Subbaraya, S.M. Somasundram y M. Muthu (2016). Evolutionary Expansion of WRKY Gene Family in Banana and Its Expression Profile during the Infection of Root Lesion Nematode, *Pratylenchus coffeae*. *PloS one*, 11, e0162013.
- Kim, K.-C., Z. Lai, B. Fan, y Z. Chen (2008). *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *The Plant Cell*, 20, 2357-2371.
- Knoth, C., J. Ringler, J.L. Dangl y T. Eulgem (2007). *Arabidopsis* WRKY70 is required for full *RPP4*-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 120-128.
- Kosky, R.G., B. Chong-Pérez, J. López-Torres, M. Reyes, I. Bermúdez-Caraballosa, N.M. Martín, J.M. Machado-Rodríguez, O. Portal, B. Ocaña, Y. Alvarado-Capó, M. Leiva-Mora, M. Acosta-Suárez, M Cruz-Martin, B. Roque y L. Hernández (2010). Plantain (*Musa* spp. cv. 'Navolean' AAB) transgenic plants from *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions. *Biotecnología Vegetal*, 10, 209-218.
- Kosugi, S., M. Hasebe, M. Tomita y H. Yanagawa (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 10171-10176.
- Kovács, G., L. Sági, G. Jacon, G. Arinaitwe, J.-P. Busogoro, E. Thiry, H. Strosse, R. Sweennen y S. Remy (2013). Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. *Transgenic Research*, 22, 117-130.
- Kuai, X., B.J. MacLeod y C. Després (2015). Integrating data on the *Arabidopsis*

NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-5.

Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson y D.G. Higgins (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.

Li, J., G. Brader y E.T. Palva (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell*, 16, 319-331.

Licausi, F., M. Ohme-Takiagi y P. Perata (2013). APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, 199, 639-649.

Loke, J.C., E.A. Stahlberg, D.G. Strenski, B.J. Haas, P.C. Wood y Q.Q. Li (2005). Compilation of mRNA polyadenylation signals in *Arabidopsis* revealed a new signal element and potential secondary structures. *Plant Physiology*, 138, 1457-1468.

Mahdavi, F., M. Sariah y M. Maziah (2012). Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to *Fusarium* wilt. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1008-1019.

Marchive, C., C. Léon, C. Kappel, P. Coutos-Thévenot, M.-F. Corio-Costet, S. Delrot y V. Lauvergeat (2013). Over-expression of VvWRKY1 in grapevines induces expression of jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew. *PLoS One*, 8, e54185.

Marfori, M., A. Mynott, J.J. Ellis, A.M. Mehdi, N.F.W. Saunders, P.M. Curmi, J.K. Forwood, M. Bodén y B. Kobe (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813, 1562-1577.

- Marin, D.H., R.A. Romero, M. Guzman y T.B. Sutton (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87, 208-222.
- Maurer-Stroh, S., B. Eisenhaber, y F. Eisenhaber (2002). N-terminal *N*-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *Journal of Molecular Biology*, 317, 523-540.
- Maziah, M., M. Sariah y S. Sreeramanan (2007). Transgenic banana Rastali (AAB) with β -1, 3-glucanase gene for tolerance to *Fusarium* wilt race 1 disease via *Agrobacterium*-mediated transformation system. *Plant Pathology Journal*, 6, 271-282.
- Menon, R. (2016). Banana Breeding, en: *Banana: genomics and transgenic approaches for genetic improvement*, S. Mohandas y K.V. Ravishankar (eds). Springer. Singapore. pp. 13-34.
- Mignone, F., C. Gissi, S. Liuni y G. Pesole (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*, 3, 0004.1-0004.10.
- Mur, L.A.J., P. Kenton, A.J. Lloyd, H. Ougham y E. Prats (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of Experimental Botany*, 59, 501-520.
- Muthamilarasan, M. y M. Prasad (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 38, 433-449.
- Muthamilarasan, M., y Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 38(2), 433-449.
- Narusaka, M., K. Shirasu, Y. Noutoshi, Y. Kubo, T. Shiraishi, M. Iwabuchi y Y. Narusaka (2009). *RRS1* and *RPS4* provide a dual *Resistance*-gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant Journal*, 60, 218-226.
- Nayeri, F.D. (2014). Identification of transcription factors linked to cell cycle regulation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, 9, e972864.

- Nelson, D.L., A.L. Lehninger y M.M. Cox (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. W.H. Freeman y Company, New York, Macmillan. 1023 p.
- Nwauzoma, A.B., A. Tenkouano, J.H. Crouch, M. Pillay, D. Vuylsteke y L.A.D. Kalio (2002). Yield and disease resistance of plantain (*Musa* spp., AAB group) somaclones in Nigeria. *Euphytica*, 123, 323-331.
- Ogata, T., H. Okada, H. Kawaide, H. Takahashi, S. Seo, I. Mitsuhashi y Y. Matsushita (2015). Involvement of NtERF3 in the cell death signalling pathway mediated by SIPK/WIPK and WRKY1 in tobacco plants. *Plant Biology*, 17, 962-972.
- Ortiz, R. y D. Vuylsteke (1995). Inheritance of dwarfism in plantain (*Musa* spp., AAB group). *Plant Breeding*, 114, 466-468.
- Ortiz, R. y D. Vuylsteke (1996). Improving plantain and banana-based system. *Plantain and Banana Production and Research in West and Central Africa*, Ortiz, R. and MO Akoroda (Eds.). International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, 2-7.
- Pandey, S.P. y I.E. Somssich (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology*, 150, 1648-1655.
- Park, C.Y., J.H. Lee, J.H. Yoo, B.C. Moon, M.S. Choi, Y.H. Kang, S.M. Lee, H.S. Kim, K.Y. Kang, W.S. Chung, C.O. Lim y M.J. Cho (2005). WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Letters*, 579, 1545-1550.
- Passos, M.A.N., V.O. de Cruz, F.L. Emediato, C.C. de Teixeira, V.C.R., Azevedo, A.C.M. Brasileiro, E.P. Amorim, C.F. Ferreira, N.F. Martins, R.C. Togawa, G.J.P. Júnior, O.B. da Silva Jr. y R.N.G. Miller (2013). Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. *BMC Genomics*, 14, 1-17.
- Pei, X.-W., S.-K. Chen, R.-M. Wen, S. Ye, J.-Q. Huang, Y.-Q. Zhang, B.-S. Wang, Z.-X. Wang y S.-R. Jia (2005). Creation of transgenic bananas expressing human lysozyme gene for Panama wilt resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*,

47, 971-977.

- Peña, J.E., J.L. Sharp y M. Wysoki (2002). Tropical fruit pests and pollinators: Biology, Economic importance, natural enemies and control. Oxon, United Kingdom (UK): CABI (Centre for Agricultural Bioscience International)
- Pérez-Vicente, L., M.A. Dita y E. Martínez-de la Parte (2014). Technical manual: prevention and diagnostic of *Fusarium* wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium Oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4). Food and agriculture organization of the united nations (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-br126e.pdf> [Acceso 7 de febrero 2018]
- Perrier, X., E. De Langhe, M. Donohue, C. Lentfer, L. Vrydaghs, F. Bakry, F. Carreel, I. Hippolyte, J.-P. Horry, C. Jenny, V. Lebot, A.-M. Risterucci, K. Tomekpe, H. Doutrelepont, T. Ball, J. Manwaring, P. de Maret y T. Denham (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 11311-11318.
- Phukan, U.J., G.S. Jeena y R.K. Shukla (2016). WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-14.
- Ploetz, R.C. (2015). Management of *Fusarium* wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*, 73, 7-15.
- Ploetz, R.C., G.H.J. Kema y L.-J. Ma (2015). Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 269-288.
- Qiu, Y. y D. Yu (2009). Over-expression of the stress-induced *OsWRKY45* enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 35-47.
- Richard, P. y J.L. Manley (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes and Development*, 23, 1247-1269.
- Robatzek, S. y I.E. Somssich (2001). A new member of the *Arabidopsis* WRKY

transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence-and defence-related processes. *The Plant Journal*, 28, 123-133.

Robinson, J.C., y V.G. Saúco (2010). Bananas and plantains. Wallingford, United Kingdom (UK): CABI (Centre for Agricultural Bioscience International).

Rochon, A., P. Boyle, T. Wignes, P.R. Fobert y C. Després (2006). The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *The Plant Cell*, 18, 3670-3685.

Ross, C.A., Y. Liu, y Q.J. Shen (2007). The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 827-842.

Rushton, P.J., I.E. Somssich, P. Ringler y Q.J. Shen (2010). *WRKY* transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15, 247-258.

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

Schmutz, J., S.B. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, D.L. Hyten, Q. Song, J.J. Thelen, J. Cheng, D. Xu, U. Hellsten, G.D. May, Y. Yu, T. Sakurai, T. Umezawa, M.K. Bhattacharyya, D. Sandhu, B. Valliyodan, E. Lindquist, M. Peto, D. Grant, S. Shu, D. Goodstein, K. Barry, M. Futrell-Griggs, B. Abernathy, J. Du, Z. Tian, L. Zhu, N. Gill, T. Joshi, M. Libault, A. Sethuraman, X.-C. Zhang, K. Shinozaki, H.T. Nguyen, R.A. Wing, P. Cregan, J. Specht, J. Grimwood, D. Rokhsar, G. Stacey, R.C Shoemaker y S.A. Jackson (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463, 178-183.

Shimono, M., S. Sugano, A. Nakayama, C.-J. Jiang, K. Ono, S. Toki y H. Takatsuji (2007). Rice *WRKY45* plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *The Plant Cell*, 19, 2064-2076.

SIAP, 2017. Atlas agroalimentario 2017. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. En línea: <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>. Fecha de Consulta: Abril de 2017.

- Simmonds, N.W. (1962). The evolution of the bananas. Evolución del banano. Tropical Sciences Series. Longmans, Cornell University. p.
- Singh, K.B., R.C. Foley y L. Oñate-Sánchez (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 430-436.
- Sowmya, H.D., T.R. Usharani, C. Sunisha y S. Mohandas (2016). Engineering Resistance to Sigatoka, en *Banana: genomics and transgenic approaches for genetic improvement*, Mohandas, S. y K.V. Ravishankar (eds). Springer. Singapore. pp. 227-236.
- Spitz, F. y E.E.M. Furlong (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature Reviews Genetics*, 13, 613-626.
- Srivastava, A.K., Y. Lu, G. Zinta, Z. Lang y J.K. Zhu (2017). UTR-dependent control of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 23, 248-259.
- Ssebuliba, R., D. Makumbi y M. Pillay (2009). Patterns of seed set in East African highland banana (*Musa* spp.) hybrids. *Journal of New Seeds*, 10, 160-170.
- Ssebuliba, R., D. Talengera, D. Makumbi, P. Namanya, A. Tenkouano, W. Tushemereirwe, y M. Pillay (2006). Reproductive efficiency and breeding potential of East African highland (*Musa* AAA-EA) bananas. *Field Crops Research*, 95, 250-255.
- Stover, R.H. (1962). Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other *Musa* species. Commonwealth Mycological. Institute, Kew, Surrey, England. 117 p.
- Swennen, R., G. Arinaitwe, B.P.A. Cammue, I. Francois, B. Panis, S. Remy, L. Sági, E. Santos, H. Strosse y I. Van Den Houwe (2003). Transgenic approaches for resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases in *Musa* spp., en: *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook, Jacome, L., P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero y J.V. Escalant (eds). The International Network for the Improvement of Banana Plantain. Dan José, Costa Rica, INIFAP, Montpellier, France. pp. 209-238.

- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Tao, Z., Y. Kou, H. Liu, X. Li, J. Xiao y S. Wang (2011). *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4863-4874.
- The guardian, 2016. The banana as we know it is in imminent danger. Disponible en: <https://www.theguardian.com/commentisfree/2016/oct/25/banana-farming-danger-cavendish-crop-genetics>.
- Truebestein, L. y T.A. Leonard (2016). Coiled-coils: the long and short of it. *Bioessays*, 38, 903-916.
- Turck, F., A. Zhou y I. E. Somssich (2004). Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene *PcPR1-1* in parsley. *The Plant Cell*, 16, 2573-2585.
- Ülker, B., M.S. Mukhtar y I.E Somssich (2007). The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta*, 226, 125-137.
- Usharani, T.R., H.D. Sowmya, C. Sunisha y S. Mohandas (2016). Engineering Resistance to *Fusarium* wilt, en: *Banana: genomics and transgenic approaches for genetic improvement*, Mohandas, S. y K.V. Ravishankar (eds). Springer. Singapore. pp 211-226.
- van Asten, P.J.A., A.M. Fermont y G. Taulya (2011). Drought is a major yield loss factor for rainfed East African highland banana. *Agricultural Water Management*, 98, 541-552.
- Verma, V., P. Ravindran y P.P. Kumar (2016). Plant hormone-mediated regulation of

stress responses. *BMC Plant Biology*, 16, 86.

Vishnevetsky, J., T.L. White Jr, A.J. Palmateer, M. Flaishman, Y. Cohen, Y. Elad, M. Velcheva, U. Hanania, N. Sahar, O. Dgani y A. Perl (2011). Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. *Transgenic Research*, 20, 61-72.

Wachter, A., M. Tunc-Ozdemir, B.C. Grove, P.J. Green, D.K. Shintani y R.R. Breaker (2007). Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *The Plant Cell*, 19, 3437-3450.

Wairegi, L. y P.J.A. van Asten (2011). Norms for multivariate diagnosis of nutrient imbalance in the East African highland bananas (*Musa* spp. AAA). *Journal of Plant Nutrition*, 34, 1453-1472.

Wendehenne, D., Q.-M. Gao, A. Kachroo y P. Kachroo (2014). Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 127-134

Wesseling, C., M. Corriols y V. Bravo (2005). Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, S697-S705.

Xing, D. H., Lai, Z. B., Zheng, Z. Y., Vinod, K. M., Fan, B. F. y Chen, Z. X. (2008). Stress- and pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Molecular plant*, 1(3), 459-470.

Xu, H., K.A. Watanabe, L. Zhang y Q.J. Shen (2016). WRKY transcription factor genes in wild rice *Oryza nivara*. *DNA Research*, 23, 311-323.

Yang, B., Y. Jiang, M.H. Rahman, M.K. Deyholos y N.N. Kav (2009). Identification and expression analysis of *WRKY* transcription factor genes in canola (*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments. *BMC Plant Biology*, 9, 1-19.

Yang, D.-L., J. Yao, C.-S. Mei, X.-H. Tong, L.-J. Zeng, Q. Li, L.-T. Xiao, T.-p. Sun, J. Li, X.-

- W. Deng, C.M. Lee, M.F. Thomashow, Y. Yang, Z. He y S.Y. He (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E1192-E1200.
- Yilmaz, A. y E. Grotewold (2010). Components and mechanisms of regulation of gene expression, en: *Computational biology of transcription factor binding*, Ladunga, I. (ed). Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 23-32.
- Zhang, C.-Q., Y. Xu, Y. Lu, H.-X. Yu, M.-H. Gu, y Q.Q. Liu (2011). The WRKY transcription factor OsWRKY78 regulates stem elongation and seed development in rice. *Planta*, 234, 541-554.
- Zurbriggen, M.D., N. Carrillo y M.-R. Hajirezaei (2010). ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for?. *Plant signaling and Behavior*, 5, 393-396.