



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

**Caracterización funcional de factores de transcripción
MaWRKY de plátano y análisis del transcriptoma de
hojas de *Nicotiana benthamiana* que sobreexpresan al
gen *MaWRK45***

Tesis que presenta

SERGIO GARCÍA LAYNES

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2023

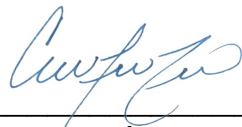
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Sergio García Laynes** titulado “**Caracterización funcional de factores de transcripción WRKY de plátano y análisis del transcriptoma de hojas de *Nicotiana benthamiana* que sobrepresan al gen *MaWRK45***”, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación de Agrobiotecnología, en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Santy Peraza Echeverría** y la codirección de la **Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 08 de junio de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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.



M. en C. Sergio García Laynes

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Caracterización funcional de factores de transcripción de plátano con potencial para generar resistencia contra la enfermedad de la Sigatoka negra”, clave de proyecto 252964, en el que participé bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca otorgada: número 692581.

Este trabajo se realizó dentro del marco del proyecto titulado: “Caracterización funcional de factores de transcripción de plátano con potencial para generar resistencia contra la enfermedad de la Sigatoka negra” (clave de proyecto 252964).

A mis asesores: El Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia por su paciencia, dedicación y guía en mi formación.

Al Dr. Carlos L. Calderón Vázquez profesor investigador del Instituto Politécnico Nacional de Guasave, Sinaloa, por su asesoría en la tecnología de RNASeq.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Santy Peraza Echeverría, la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa y el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por sus invaluable consejos y observaciones que enriquecieron el trabajo.

Al comité predoctoral conformado por la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, la Dra. Elsa Góngora Castillo, el Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado y el Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell por su profesionalidad y paciencia en mi evaluación predoctoral.

Al comité de revisión del presente documento de tesis conformado por el Dr. Santy Peraza Echeverría, la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, la Dra. Elsa Beatriz Góngora Castillo, la Dra. Ileana de la Caridad Echeverría Machado, el Dr. Carlos Alberto Puch Hau y el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

A los técnicos de nuestro laboratorio, la QBA. Ileana Borges Argáez y la Bióloga Verónica Limones Briones que facilitaron que el trabajo fluya organizadamente en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de microalgas y cultivos tropicales de la Unidad de Biotecnología, por su amistad y su disposición de servir cuando se requirió de ellos ayuda.

A mi familia: mis padres Federico García Romero y Martha Laynes Valenzuela, mi hermano Federico García Laynes y mi esposa Natali Gómez Falcón quienes dan siempre su apoyo y amor incondicional.

A mis mejores amigos Gilberto Andrés Muñoz Perez y José Ignacio Laines Hidalgo por su sincera amistad.

DEDICATORIA

A Dios, a quien debo todo lo que soy.

A mis padres Federico García Romero y Martha Laynes Valenzuela, que me dieron todo su amor y apoyo incondicional.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Artículo como primer autor

1. **Garcia-Laynes, S.**, Herrera-Valencia, V. A., Tamayo-Torres, L. G., Limones-Briones, V., Barredo-Pool, F. A., Baas-Espinola, F. M., Alpuche-Solís, A. G., Puch-Hau, C., & Peraza-Echeverria, S. (2022). The banana MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 genes encode functional transcription factors and display differential expression in response to defense phytohormones. *Genes*, 13(10), 1891. <https://doi.org/10.3390/genes13101891>. MDPI. Factor de impacto: 4.1.

Artículos en colaboración

2. Álvarez-López, D., Herrera-Valencia, V. A., Góngora-Castillo, E., **García-Laynes, S.**, Puch-Hau, C., López-Ochoa, L. A., Lizama-Uc, G., & Peraza-Echeverria, S. (2022). Genome-wide analysis of the LRR-RLP gene family in a wild banana (*Musa acuminata* ssp. *malaccensis*) uncovers multiple Fusarium Wilt resistance gene candidates. *Genes*, 13(4), 638. <https://doi.org/10.3390/genes13040638>. MDPI. Factor de impacto: 4.1.
3. Mayorga-López, Á. G., Baas-Espinola, F. M., Limones-Briones, V., Martin-Cocom, M. A., Vallejo-Reyna, M. Á., de Jesús Canul-Euán, T., Barredo-Pool, F. A., **García-Laynes, S.**, Herrera-Valencia, V. A., & Peraza-Echeverria, S. (2018). Genomic organization, phylogeny, and functional analysis of the banana MaRAR1 gene that encodes a cochaperone of HSP90. *Plant Gene*, 16, 19-31. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2018.08.003>. Elsevier. CiteScore: 3.2.

Congresos, modalidad de cartel

1. Garcia-Laynes, S., Herrera-Valencia, V. A., Tamayo-Torres, L. G., Limones-Briones, V., Baas-Espinola, F. M., Alpuche-Solís, A.G., & Peraza-Echeverria, S. Cloning of WRKY genes encoding transcription factors in banana and evaluation of their role in plant immunity. XVIII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y XI Simposio México/USA y 1st ASPB México, 28-31 de octubre de 2019, Mérida, Yucatán, México.

2. Garcia-Laynes, S., Herrera-Valencia, V. A., Tamayo-Torres, L. G., Limones-Briones, V., Barredo-Pool, F. A., Baas-Espinola, F. M., Alpuche-Solís, A.G., & Peraza-Echeverria, S. Molecular cloning and functional characterization of banana MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 transcription factors. XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica, 16-21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán, México.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 GENERALIDADES DEL PLÁTANO	3
1.1.1 Historia y taxonomía	3
1.1.2 Importancia económica.....	4
1.1.3 Comercialización	5
1.1.4. Contenido nutricional.....	6
1.2 PLAGAS Y ENFERMEDADES	8
1.2.1 Factores abióticos	8
1.2.2 Factores bióticos	8
1.2.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense	9
1.2.2.2 <i>Pseudosercospora fijiensis</i>	10
1.3 MANEJO Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES FÚNGICAS DE PLÁTANO	12
1.3.1 Generación de híbridos	12
1.3.2 Control químico	14
1.3.3 Mejoramiento del plátano mediante ingeniería genética	15
1.4 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS	17
1.4.1 Inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)	18
1.4.2 Inmunidad activada por efectores (ETI)	19
1.4.3 Resistencia sistémica adquirida (SAR)	20
1.5 REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN GENÉTICA EN PLANTAS	23
1.6 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	24
1.7 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY	25
1.7.1 Estructura y clasificación	25
1.7.2 Papel de los genes WRKY en las plantas.....	27
1.7.3 Función en la respuesta al estrés biótico	29
1.8 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY EN PLÁTANO	32
JUSTIFICACIÓN	33
HIPÓTESIS.....	34

OBJETIVOS	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
 CAPITULO II	 37
THE BANANA <i>MAWRKY18</i> , <i>MAWRKY45</i> , <i>MAWRKY60</i> AND <i>MAWRKY70</i> GENES ENCODE FUNCTIONAL TRANSCRIPTION FACTORS AND DISPLAY DIFFERENTIAL EXPRESSION IN RESPONSE TO DEFENSE PHYTOHORMONES	37
2.1 INTRODUCTION.....	37
2.2.1 Plant material and phytohormone treatments	40
2.2.2 BLAST searches.....	40
2.2.3 RT-qPCR and cloning of <i>MAWRKY</i> cDNAs	41
2.2.4 Gene structure, identification of conserved protein motifs, protein modeling and phylogenetic tree construction	42
2.2.5 Subcellular localization assay	43
2.2.6 Yeast one-hybrid assay	43
2.2.7 RT-qPCR	44
2.3 RESULTS	45
2.3.1 Structural and phylogenetic analysis of the <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i> genes.....	45
2.3.2 Subcellular localization of <i>MaWRK18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i>	59
2.3.3 Transactivation activity of <i>MaWRK18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i> transcription factors	60
2.3.4 Expression profiles of the <i>MaWRK18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i> genes in response to phytohormone treatments	61
2.4 DISCUSSION.....	65
 CAPITULO III	 69
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE HOJAS DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> SOBREEXPRESANDO EL GEN <i>MAWRKY45</i> USANDO LA METODOLOGÍA INFILTRACIÓN-RNASEQ REVELA LA ACTIVACIÓN DE MÚLTIPLES GENES DE DEFENSA.....	69
3.1 INTRODUCCIÓN	69
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
3.2.1 Material biológico.....	71
3.2.2 Agroinfiltración.....	71
3.2.3 Extracción de RNA total y preparación del cDNA para secuenciación	71
3.2.4 Ensamblado <i>de novo</i> del transcriptoma y anotación funcional.....	72

3.2.5 Análisis de genes expresados diferencialmente (DEGs).....	73
3.2.6 Validación por PCR cuantitativa en tiempo real	73
3.3 RESULTADOS	74
3.3.1 Análisis transcriptómico de hojas de <i>N. benthamiana</i> sobreexpresando al gen <i>MaWRKY45</i> de plátano	74
3.3.2 Identificación y anotación funcional de DEGs relacionados al estrés biótico.....	79
3.3.3 Análisis de DEGs que codifican para factores de transcripción	85
3.3.4 Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA)	78
3.4 DISCUSIÓN	88
 CAPITULO IV	 93
 DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	 93
4.1 DISCUSIÓN	93
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	95
4.3 PERSPECTIVAS	96
 BIBLIOGRAFÍA.....	 98
 ANEXO	 ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación de la familia <i>musaceae</i>	4
Figura 1.2. Principales países exportadores de plátano	5
Figura 1.3. Contenido nutricional en una porción de 100 gramos de la especie <i>M. acuminata</i>	7
Figura 1.4. Distribución mundial del “Mal de Panamá”	10
Figura 1.5. Etapas de desarrollo de la enfermedad de la raya de la hoja negra o Sigatoka negra.....	11
Figura 1.5. Aspersión de fungicida sobre una plantación de plátano en el sureste del archipiélago filipino en la Isla de Mindanao.	14
Figura 1.6. Resistencia de plantas sobreexpresando los genes <i>RGA2</i> y <i>Ced9</i>	17
Figura 1.6. Mecanismos moleculares que desencadenan la inmunidad disparada por PAMPs.	19
Figura 1.7. Mecanismos moleculares que desencadenan la inmunidad disparada por efectores.	20
Figura 1.8. Transducción de señales del SAR.....	22
Figura 1.9. Transcripción del DNA.	24
Figura 1.10. Esquema de la estructura del dominio WRKY y representación hipotética de su evolución	26
Figura 1.11. Estructura en 3D del dominio WRKY de AtWRKY1 en unión con la W-box.	27
Figura 1.12. Regulación de los FTs WRKY en múltiples vías en arroz (a) y <i>Arabidopsis</i> (b).	28
Figura 1.13. Plantas transgénicas sobre-expresando a <i>MaWRKY45</i> manifiestan alta tolerancia al tizón del arroz.	30
Figura 1.14. Interacciones proteicas entre miembros de la familia WRKY.....	31
Figura 1.15. Estrategia experimental implementada en el presente estudio para la caracterización de los genes <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> y <i>MaWRKY70</i> de plátano.	36

Figure 2.1. Schematic representation of <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i> cDNAs and their protein sequence structures.....	47
Figure 2.2. Multiple sequence alignment of the proteins <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> , <i>MaWRKY70</i> and their homologs from rice and <i>Arabidopsis</i>	48
Figure 2.3. 3D ribbon cartoon view of the WRKY domain of <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i>	49
Figure 2.4. Neighbor-joining phylogenetic tree of <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i> TFs, including the complete set of <i>Arabidopsis</i> WRKY TFs and other plant WRKY FTs with known functions.	50
Figure 2.5. Predicted <i>cis</i> -acting regulatory elements in the promoter regions of <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i>	51
Figure 2.6. Partial cDNA sequence of <i>MaWRKY18</i> translated to amino acid sequence.....	60
Figure 2.7. Partial cDNA sequence of <i>MaWRKY45</i> translated to amino acid sequence.....	61
Figure 2.8. Partial cDNA sequence of <i>MaWRKY60</i> translated to amino acid sequence.....	64
Figura 2.9. Partial cDNA sequence of <i>MaWRKY70</i> translated to amino acid sequence.....	75
Figura 2.10. Subcellular localization of <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i> proteins in onion epidermal cells.....	77
Figura 2.11. Transactivation activity analysis of <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i> in Y2HGold yeast	80
Figura 2.12. Transcription profiles of <i>MaWRKY18</i> , <i>MaWRKY45</i> , <i>MaWRKY60</i> and <i>MaWRKY70</i> genes in response to SA and MeJA phytohormones	81
Figura 3.1. Amplificación por PCR del CDS de <i>MaWRKY45</i> en hojas de <i>N. benthamiana</i> agroinfiltradas	75
Figura 3.2. Análisis de la integridad y pureza del RNA total.....	75
Figura 3.3. Análisis de expression después de 3 días de agroinfiltrar muestras con el vector vacío y sobreexpresando al CDS de <i>MaWRKY45</i>	76
Figura 3.4. Identificación de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en las hojas de <i>N. benthamiana</i> que sobreexpresan al gen <i>MaWRKY45</i>	79

Figura 3.5. Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes. Se realizó un GSEA en la plataforma ShinyGO utilizando los ortólogos de los DEGs de <i>Nicotiana tabacum</i>	80
Figura 3.6. Genes diferencialmente expresados relacionados con la respuesta al estrés biótico	81
Figura 3.7. Genes diferencialmente expresados que responden a las fitohormonas AS (a) y JA (b)	85
Figura 3.9. Análisis de dispersión de los 127 FTs diferencialmente expresados	86
Figura 3.10. Distribución por familia de 127 FTs expresados diferencialmente en hojas de <i>N. benthamiana</i> que sobreexpresan a <i>MaWRKY45</i> de plátano.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales enfermedades y plagas del plátano.....	9
Tabla 1.2. Características de híbridos desarrollados por FHIA.....	13
Tabla 1.3. Cultivares transgénicos tolerantes a FOC y <i>P. fijiensis</i>	15
Table 2.1. Best BlastP hits of banana WRKY TF related sequences.	45
Table 2.2. List of primers.	41
Table 2.3. Relevant features of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 cDNAs and their deduced proteins.....	46
Table 2.4. Amino acid sequence similarity (%) between banana MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60, MaWRKY70 and their respective putative homologous in <i>Arabidopsis</i> and rice.....	42
Tabla 3.1. Estadística de datos curados del RNAseq.	78
Tabla 3.2. Estadísticas de la predicción de ORF.....	78
Tabla 3.3. Genes diferencialmente expresados con los valores más altos de fold change	82

LISTADO DE ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

cDNA: DNA complementario

CDS: secuencia codificante

FT/FTs: factor de transcripción/factores de transcripción

FOC: *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

PTI: inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos

ETI: inmunidad activada por efectores

SAR: resistencia sistémica adquirida

ISR: resistencia sistémica inducida

AS: ácido salicílico

MeJA: metil jasmonato

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

PDB: base de datos de proteínas

ORF: marco abierto de lectura

DEGs: genes expresados diferencialmente

FC: Fold Change

GSEA: análisis de enriquecimiento de conjunto de genes

FAO: organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura

RESUMEN

En este trabajo se caracterizaron cuatro genes que codifican para factores de transcripción (FTs) de la familia WRKY de plátano, *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70*, cuyos homólogos en *Arabidopsis* y arroz están involucrados en regular la defensa contra microorganismos patógenos de tipo fúngico y bacteriano. Los análisis bioinformáticos establecieron que *MaWRKY18* y *MaWRKY60* comparten similitudes en la estructura del gen y de la proteína, ambas proteínas pertenecen al subgrupo IIa de la familia WRKY, un pequeño clado con miembros especializados en la respuesta contra el estrés biótico. De la misma manera, *MaWRKY45* y *MaWRKY70* son filogenéticamente cercanas, perteneciendo al grupo III. Todas las proteínas contienen el dominio WRKY, cuya estructura en 3D es similar a las reportadas en la base de datos PDB (Protein Data Base). Mediante la fusión de las regiones codificantes (CDSs, por sus siglas en inglés) de los cuatro genes *MaWRKY* a *GFP* se confirmó que las cuatro proteínas *MaWRKY* de plátano se localizaron en el núcleo de células epiteliales de cebolla. Además, las cuatro proteínas presentaron actividad de transactivación por medio del ensayo de un híbrido en levadura. Se determinó mediante RT-qPCR que los cuatro genes de estudio modificaron su expresión en respuesta a la aplicación exógena de las fitohormonas ácido salicílico (AS) y metil jasmonato (MeJA) en tejido de foliar. Los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45* y *MaWRKY60* incrementaron su expresión con la adición de AS (5 mM), mientras que con la adición de MeJA (100 μ M), la expresión relativa de los genes *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* aumentaron significativamente su expresión en comparación con las muestras tratadas con AS. Con el fin de tener un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares que un FT WRKY de plátano desencadena corriente abajo, se sobre expresó transitoriamente el CDS del gen *MaWRKY45* por agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana* y se colectó el RNA total después de tres días postagroinfiltración para un ensayo de RNASeq. El total de genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés) fue de 2473, con 1092 regulados positivamente y 1381 regulados negativamente. El análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA, por sus siglas en inglés) reveló a los procesos biológicos de fosforilación, traducción de señales, respuesta a estímulos y hormonas, y regulación de la transcripción como los procesos más representados. Se identificaron genes responsivos al estrés biótico como quitinasas, genes reguladores de la biosíntesis de metabolitos antimicrobiales y que participan en la síntesis de cutícula y lignina. También se encontraron 127 FTs DEGs, siendo las familias AP2/ERF, WRKY y MYB las más representativas. Los resultados de este trabajo sientan una base sólida para que estos cuatro genes *MaWRKY* de estudio puedan ser tomados en cuenta en

programas de fitomejoramiento de plátano que pretenden conferir resistencia de amplio espectro contra microorganismos patógenos en plátano y otros cultivos.

ABSTRACT

We functionally characterized four banana genes encoding transcription factors (TFs) of the WRKY family from a wild banana species that were named as *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70*. Their orthologous genes in *Arabidopsis* and rice play a central role in bacteria and fungi defense responses. Bioinformatic analyses established that *MaWRKY18* and *MaWRKY60* share similarities in protein and gene structures. Both proteins belong to the IIa subgroup of the WRKY TF family, a small clade with members specialized in plant pathogen responses. While, *MaWRKY45* and *MaWRKY70* showed to be phylogenetically closely related and they were classified into the same group III of the WRKY family. All four *MaWRKY* proteins contains a WRKY domain next to the N-terminal, which was 3D modelled and found to be similar to the *Arabidopsis* WRKY domains reported at the Protein Database (PDB). Nuclear localization of the four proteins was confirmed using GFP as reporter protein in onion epidermal cells transformed by particle bombardment. To evaluate the transactivation activity, we performed a one-hybrid assay in yeast, the four banana *MaWRKY* proteins presented transactivation activity since they were capable to activate the yeast RNA Polymerase II to transcribe selection reporter genes. In order to find whether these four banana *MaWRKY* genes respond to the defense phytohormones salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA), we performed a RT-qPCR to measure their relative expression in leaf tissue treated with this phytohormones. *MaWRKY18*, *MaWRKY45* and *MaWRKY70* increased their expression with SA (5 mM), while with the MeJA (100 μ M) treatment, the relative expression of *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* increased significantly compared to SA treatment. To have a better understanding on the mechanisms down-stream of a banana WRKY TF activation, we transformed *Nicotiana benthamiana* leaves transiently by agroinfiltration to overexpress *MaWRKY45* CDS. The transcriptomic profiles showed that 2473 DEGs were identified, from which 1092 were up regulated and 1381 were down regulated. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showed phosphorylation, signal transduction, stimulus and hormone response, and transcription regulation as the most overrepresented biological processes. In addition, we identified biotic responsive genes as chitinases, antimicrobial peptides, transcriptional regulators of antimicrobial metabolites and genes involved in the biosynthesis of cuticle and lignin. In addition, 127 DEGs from TFs were found, where the AP2/ERF, WRKY and MYB were the TFs families most represented. These results pave the way to utilize these banana TFs as potential biotechnological

tools to improve the banana resistance against microorganism pathogens *via* a genetic engineering approach.

INTRODUCCIÓN

El plátano es un cultivo importante para la seguridad alimentaria de países en vías de desarrollo en el trópico del continente africano y asiático (Ploetz et al., 2015). Además, representa una vital fuente de ingresos para países productores de Latinoamérica, como en el caso de nuestro país, México, que ocupa el doceavo lugar en la producción mundial (SIAP, 2017). No obstante, enfermedades de tipo fúngico como la Sigatoka negra y el mal de Panamá causados por *Pseudocercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (FOC) raza 4, respectivamente, amenazan con destruir por completo la industria platanera, como ocurrió en la década de los 60s con la completa erradicación del cultivar Gros Michel por FOC raza 1 (Ploetz et al., 2015). El uso intensivo de pesticidas para controlar a la Sigatoka negra no es sustentable y ocasiona efectos colaterales hacia el medio ambiente y la salud humana, sobre todo para los trabajadores de las grandes plantaciones y sus familias que viven en los alrededores. Tan solo para el control de la Sigatoka negra se gastaron más de 500 millones de USD\$ anualmente, lo que supone el 30 % de la inversión total de producción de plátano (The guardian, 2016; Churchill, 2011). Otras estrategias como el control biológico (Becker et al., 2021), producción *in vitro* de plántulas libres de enfermedades (Justin et al., 2022) y las buenas prácticas agrícolas (Ebimieowei y Wabiye, 2011) son importantes, pero no son asequibles o versátiles para ser utilizadas por todos los productores.

En este respecto, la ingeniería genética se ofrece como una alternativa amigable, rápida y eficaz, para generar cultivares resistentes y que mantengan las características organolépticas del fruto. Un caso de éxito es el programa de mejoramiento genético ejecutado por Dale et al., (2017) en el que se generaron plantas transgénicas resistentes a FOC raza 4 sobre expresando los genes *RGA2* y *Cde9*, las plantas fueron evaluadas en campo con resultados satisfactorios. Existen muy pocos trabajos de ingeniería genética orientados a mejorar la resistencia o tolerancia del plátano contra microorganismos patógenos. Sin embargo, la situación es aún peor para nuestro país. En México no se ha generado ningún ejemplar de plátano resistente *in vitro* por ingeniería genética. En este escenario, el presente trabajo tiene como objetivo proveer información valiosa derivada de la caracterización de cuatro genes que codifican para factores de transcripción (FsT) de la familia WRKY de plátano, nombrados como *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70*. La familia WRKY de FsT es una familia muy numerosa y diversa entre las plantas angiospermas. En la última década diversos estudios en las plantas modelos de *Arabidopsis* y arroz y en muchas otras plantas de interés agronómico, han demostrado que muchos miembros de la familia WRKY juegan un papel central en la regulación de la respuesta de las plantas contra

microorganismos patógenos de origen bacteriano y fúngico mediante la activación de la transcripción de genes de defensa del SAR e ISR. Previamente, los cDNA de los cuatro genes *MaWRKY* de estudio fueron aislados y reportados en el trabajo de tesis de maestría de García-Laynes (2018). Sin embargo, un análisis molecular más detallado sobre la funcionalidad de estos genes es imprescindible. En este sentido, este trabajo provee información valiosa sobre la caracterización molecular de estos genes, lo que permitirá sentar las bases para que estos genes sean tomados en cuenta como genes candidatos en programas de mejoramiento genético dirigidos a mejorar la resistencia del plátano contra el estrés biótico, que es la principal limitante de su producción y que tiene en jaque a la industria platanera. El hecho de que las plantas puedan defenderse a sí mismas de microorganismos patógenos, disminuiría considerablemente los costos de producción para los pequeños y grandes productores. En nuestro país se necesita hacer esfuerzos en conjunto entre el gobierno, los investigadores de este cultivo y los productores para poder ofrecer soluciones concretas mediante el uso de la biotecnología.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES DEL PLÁTANO

1.1.1 Historia y taxonomía

Para evitar confusiones de nomenclatura, en este trabajo utilizaremos el término “plátano” para referirnos a todas las variedades existentes: sean comestibles, no comestibles, que se cocinan, o que se consumen como fruto fresco; y utilizaremos los nombres científicos para referirnos específicamente a lo particular.

La historia del plátano se remonta hasta 7000 años A.C. según evidencias arqueológicas de fitolitos procedentes de Papua Nueva Guinea. Es bien aceptado que el centro de origen se localiza en el sureste asiático, específicamente, en el cinturón tropical que se extiende desde la India hasta las Islas Salomón. En esta región se localizan la mayoría de las especies silvestres (Denham *et al.*, 2003). Muy probablemente en esta región se llevó a cabo la domesticación de los primeros cultivares; por ejemplo, en el archipiélago malayo se encuentran cuatro de cinco subespecies de *Musa acuminata*, cuya especie es una de las dos que dieron origen a los cultivares comestibles (Menon, 2016). Ahora bien, la domesticación fue un proceso complejo que aún se sigue estudiando, pero a grandes rasgos, en algún punto de la historia, la selección natural resultó en mutaciones y recombinaciones de diferentes genotipos silvestres que dieron origen a cultivares con frutos comestibles y de naturaleza estéril, estos nuevos cultivares fueron seleccionados por el hombre y propagados vegetativamente (Perrier *et al.*, 2011). Por otro lado, la migración del hombre llevó consigo la colonización del plátano a todas las regiones tropicales del mundo; en África, el plátano encontró un nicho ecológico para su diversificación; y en las cálidas tierras de Centro América, el Caribe y Australia, los cultivares de interés comercial erigieron la industria del plátano (Ploetz, 2015).

El plátano es una planta herbácea gigante monocotiledónea que pertenece al género *Musa*. Los cultivares comestibles derivan específicamente de las especies diploides silvestres; *M. acuminata* (genoma AA) y *Musa balbisiana* (genoma BB) (Ploetz, 2015). Al igual que la evolución y domesticación del plátano, su taxonomía ha sufrido diversas modificaciones a través del tiempo. Anteriormente fue clasificado 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 incluye dos géneros, *Musa* y

Ensete. El género *Musa* fue 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. Según las evidencias moleculares se estableció que los cultivares comestibles evolucionaron a partir de la sección *Eumusa* (Simmonds, 1962). Sin embargo, basado en los últimos estudios moleculares, en el 2013 Häkkinen sugieren una actualización en la clasificación de las secciones, reduciéndolas a solo dos: *Musa* (antes *Eumusa*) y *Callimusa* (Figura 1.1); no obstante, la anterior sección *rodoclamys* se integra en la sección *Musa* y; la sección *Australimusa* queda clasificada dentro de la sección *Callimusa*.

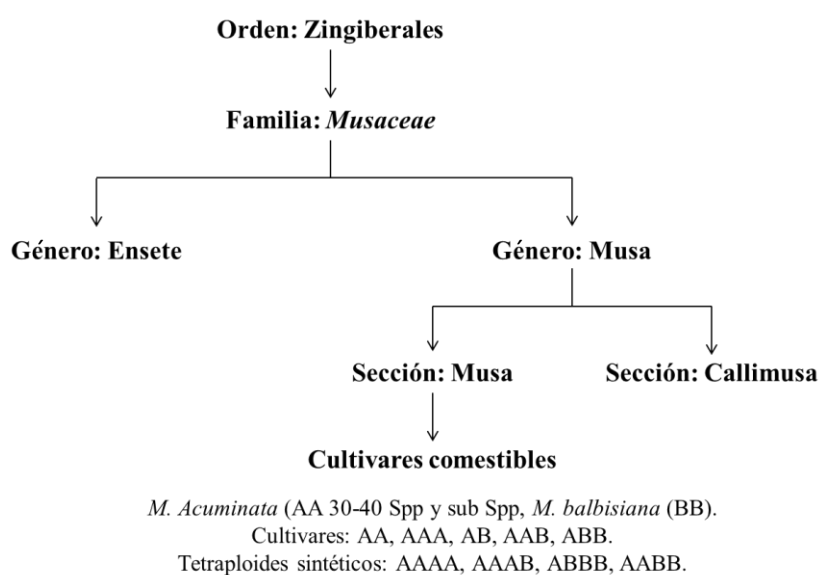


Figura 1.1. Clasificación de la familia *Musaceae* (Menon, 2016; Simmonds, 1962).

1.1.2 Importancia económica

En un reporte publicado por Daniel Stone en la revista de *National Geographic* bajo el título “El milagro del plátano en la actualidad” (The miracle of the modern banana) escribió lo siguiente: “Si las frutas fueran países, el plátano sería la super potencia; si las frutas fueran estrellas del pop, el plátano sería Beyoncé” (National Geographic, 2016). Acertadamente, el plátano es el fruto comercial más popular y consumido en el mundo, se cultiva en más de 120 países, 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). Los mayores importadores son: la Unión Europea (UE) y Estados Unidos de América (EUA) con 31 y 27 % respectivamente de la importación mundial. La India es el mayor productor, pero su producción se queda para el abastecimiento nacional; mientras que Ecuador, es el mayor exportador de plátano, vendiendo casi un cuarto del total de plátano exportado en el mundo (FAO, 2017a).

México es el onceavo productor mundial de plátano, con una producción de 2,150, 520 toneladas (2.2 % del volumen total mundial) y el decimocuarto exportador del mundo (Figura 1.2), 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). Este cultivo genera 100,000 empleos directos y 164,000 indirectos, por lo que representa una fuente de ingresos para más de 1.5 millones de personas en el país.

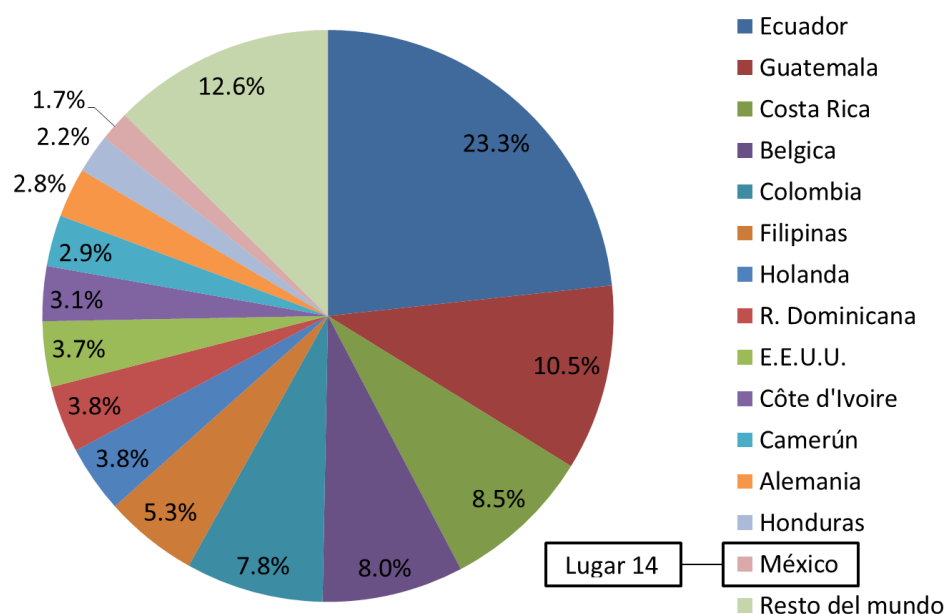


Figura 1.2. Principales países exportadores de plátano (modificado de FAO, 2017a).

1.1.3 Comercialización

Del total de la producción global de plátano el ~20 % constituye la industria de exportación. En 2016, la exportación de este fruto dejó una derrama económica de unos US\$ 8000 millones de dólares a nivel global. Cinco empresas comerciales multinacionales se disputan la producción,

compra, transporte y el mercado del plátano. Estas son: Chiquita, Fresh Del Monte, Dole, Fyffes y Noboa (FAO, 2017a). Paralelamente, las grandes cadenas de supermercado en los EUA y de la UE amplían su poder de negociación en el mercado global y comienzan a incrementar sus compras de plátano a pequeños intermediarios o directamente con los agricultores. El Reino Unido es un ejemplo del poderío de este tipo de mercado, con las cadenas de supermercado (Tesco, Sainsbury's y Asda) que venden más del 80 % del plátano disponible (Bananalink, 2014).

En el mercado internacional, el precio por kilogramo fluctúa dependiendo de diversos factores como el precio de los combustibles para el transporte. En general, en años recientes, en los grandes mercados como la UE y EUA los precios de importación son estables en el rango de 0.90 a 1 dólar por kilogramo. En México el precio del plátano varía significativamente en los diferentes estados de la república; por ejemplo, para el 'Plátano Chiapas' desde cuatro pesos mexicanos el kilogramo en Chiapas (mayor productor) a 12.7 pesos el kilogramo en Baja California Sur al día 04 de enero de 2019 (SNIIM, 2019).

1.1.4. Contenido nutrimental

En países del Sureste Asiático y África, el plátano es un alimento de la canasta básica. Aunque existe una diversidad de colores, sabores y aromas, su contenido nutrimental es poco variable. El alto contenido nutrimental del plátano ha ocasionado que sea muy popular en varios países tropicales del continente africano y asiático, al grado de convertirse en la principal fuente de carbohidratos en su alimentación (Ploetz *et al.*, 2015; Robinson y Saúco, 2010). Para ellos, el plátano representa lo que para nosotros los mexicanos es el maíz. El cultivar más popular es el Cavendish (Ploetz, 2015), por su textura y sabor ha conquistado los paladares de millones de personas de todas las edades, desde el niño hasta el anciano; además, es un fruto apetecible a la vista y con una prolongada vida de anaquel.

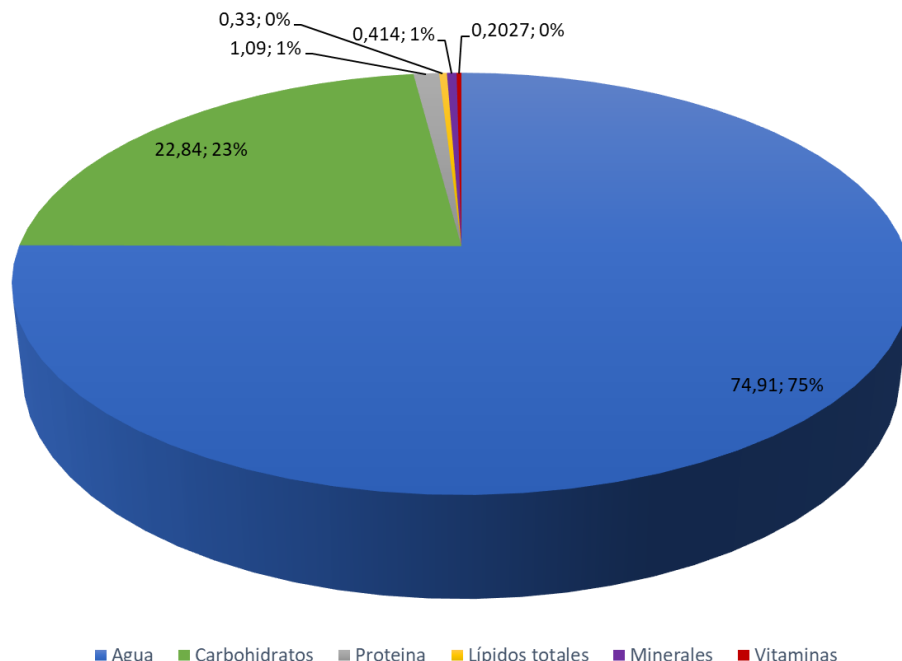


Figura 1.3. Contenido nutricional en una porción de 100 gramos de la especie *M. acuminata* (modificado de USDA, 2018). Los datos muestran la cantidad de gramos a la izquierda del “;” y el porcentaje a la derecha.

Las diferencias más notables entre el plátano que se consume en fresco y el plátano para cocinar, son: 1) la cantidad de carbohidratos. Mientras que el plátano en fresco contiene alrededor de 23 % de carbohidratos, el plátano de cocinar posee 32 % del total de nutrientes orgánicos; (2) el porcentaje de agua es mayor en el plátano que se consume en fresco. Por ello, el plátano que se cocina necesita más tiempo que su homólogo plátano postre para alcanzar la madurez mediante la hidrólisis de los carbohidratos en azúcares (USDA, 2018).

El agua y los carbohidratos son los elementos más abundantes (Figura 1.3), constituyen hasta el 97 % del total del contenido nutrimental. Es bajo en proteínas y grasas y contiene cantidades significativas de algunos minerales y vitaminas como: potasio (358 mg), magnesio (27 mg), fósforo (22 mg), vitamina C (8.7 mg) y otros en menor proporción como: calcio, hierro, sodio, zinc, cobre, niacina, riboflavina, tiamina, ácido pantoténico y vitamina B-6 (USDA, 2018). Por sus bondades nutrimentales es un alimento saludable y nutritivo; y se recomienda su ingesta para pacientes con problemas cardiovasculares, problemas digestivos y en dietas bajas en colesterol y ácidos grasos (Den *et al.*, 2013).

1.2 PLAGAS Y ENFERMEDADES

Existen diversos factores que afectan negativamente la producción de plátano y, por lo tanto, ponen en riesgo la seguridad alimentaria y la economía de millones de personas. Diversos factores abióticos y bióticos constituyen un problema serio para la producción de plátano (Dita *et al.*, 2018; Sánchez Timm *et al.*, 2016; Jones, 1999).

1.2.1 Factores abióticos

El estrés hídrico, inundaciones y la erosión del suelo son los ejemplos más comunes de factores abióticos que impactan negativamente en la producción de plátano. 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).

1.2.2 Factores bióticos

Al ser un organismo sésil, el plátano interacciona con diversos microorganismos, nematodos, e insectos. En la actualidad, existe un amplio repertorio de enfermedades que afectan a los cultivares de interés (Tabla 1.1). Aunque las variedades silvestres son resistentes a la mayoría de los microorganismos patógenos, no sucede así con los cultivares de interés comercial, cuya susceptibilidad es una amenaza a la seguridad alimentaria y la estabilidad económica de muchas personas que se dedican a su cultivo (Ploetz *et al.*, 2015). El problema se agrava debido a la naturaleza estéril del plátano, por lo que su propagación vegetativa implica una uniformidad en el genotipo. Esta falta de diversidad significa una ventaja comercial y una desventaja para la selección natural en la generación de resistencia contra microorganismos patógenos que se encuentran en constante evolución.

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

Enfermedades y plagas del plátano	
I. Enfermedades	
i. Enfermedades fúngicas	
Mal de Panamá	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.cubense
Sigatoka negra	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
Sigatoka amarilla	<i>Mycosphaerella musicola</i>
Mancha foliar Eumusae	<i>Mycosphaerella eumusae</i>
ii. Enfermedades bacterianas	
Pudrición del rizoma	<i>Erwinia</i> sp.
iii. Enfermedades virales	
Banana bunchy top virus	BBTV
Banana bract 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</i> , <i>Meloidogyne incognita</i>

1.2.2.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

En la lista de los microorganismos más agresivos, los hongos encabezan la lista. En el pasado, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 1 (FOC) asoló la pujante industria bananera. En la década de los 50', todas las plantaciones de 'Gros Michel', que era el cultivar de exportación por excelencia, fueron arrasadas por FOC, el agente causal de la enfermedad conocida como el Mal de Panamá. Este hongo, infecta las raíces de las plantas penetrando y obstruyendo el sistema vascular, lo que causa el marchitamiento y posterior muerte de las plantas por falta de agua y nutrientes (Ploetz *et al.*, 2015). En rescate de la industria bananera, se introduce una variedad resistente a FOC raza 1 conocida como 'Enano gigante' (Grand Nain) del subgrupo Cavendish. Este cultivar también triploide (AAA), con características organolépticas un poco inferior a 'Gros Michel' pero muy agradable a la vista por su color amarillo brillante y una vida de anaquel aceptable para la industria, sustituyó a los decadentes cultivares de 'Gros Michel'. Sin embargo, a principios de la década de los 70's, se comenzaron a observar síntomas de marchitamiento en las nuevas plantaciones de Cavendish; fue hasta la década de los 90's, que las plantaciones en Indonesia y Malasia fueron diezmadas y se detectó una nueva raza de FOC, y se identificó como FOC raza 4 (Buddenhagen, 2009; Su *et al.*, 1986).

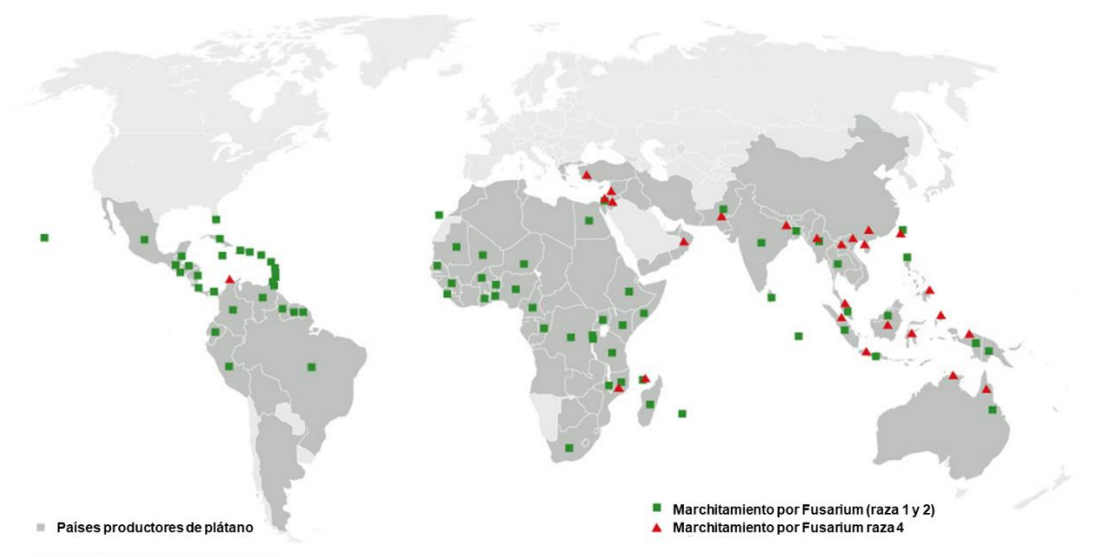


Figura 1.4. Distribución mundial del “Mal de Panamá” (Modificado de Promusa, 2020).

Actualmente, y a pesar de los esfuerzos de varios países para prevenir la diseminación de FOC raza 4, esta se ha distribuido por todo el Sureste Asiático (Figura 1.4) hasta alcanzar el noreste de Australia (Queensland) y el sureste de África (Mozambique) (Promusa, 2018). En la actualidad, este hongo ha llegado al continente americano. En Colombia, una plantación de aproximadamente 100 hectáreas perteneciente a la multinacional Chiquita Inc. ha dado positivo a la infección por FOC raza 4 mediante diversos ensayos (García-Bastidas *et al.*, 2020). No obstante, en un mundo tan globalizado, es cuestión de tiempo para que FOC raza 4 se propague en los países latinoamericanos, que son la base productiva de la industria platanera.

1.2.2.2 *Pseudosercospora fijiensis*

P. fijiensis, es un hongo ascomiceto filamentosos hemibiotrófico causante de una enfermedad foliar del plátano conocida como Sigatoka negra (Ploetz *et al.*, 2015). Anteriormente se nombraba este hongo como *Mycosphaerella fijiensis* que es en su forma sexual y *P. fijiensis* en su forma asexual; pero, a partir del 2011, en el XVIII congreso internacional botánico se adoptó el principio “un hongo, un nombre” para nombrar en términos generales a los hongos. Por consiguiente, en la actualidad se le conoce como *P. fijiensis* por unanimidad de los expertos (Hawksworth, 2011).

La Sigatoka negra o raya de la hoja es una enfermedad menos destructiva que el mal de Panamá, pero que se ha distribuido geográficamente en todos los territorios productores de plátano. Es la enfermedad más común y causante de las mayores pérdidas económicas en el mundo. Su ciclo de vida consta de cuatro pasos: la germinación de las esporas, la penetración de la célula hospedera, desarrollo de signos de la enfermedad y producción de esporas. En la Figura 1.5 se describe detalladamente el desarrollo de la enfermedad. En México la Sigatoka negra es el principal problema agronómico que enfrentan los pequeños y grandes productores de plátano (Menon, 2016).

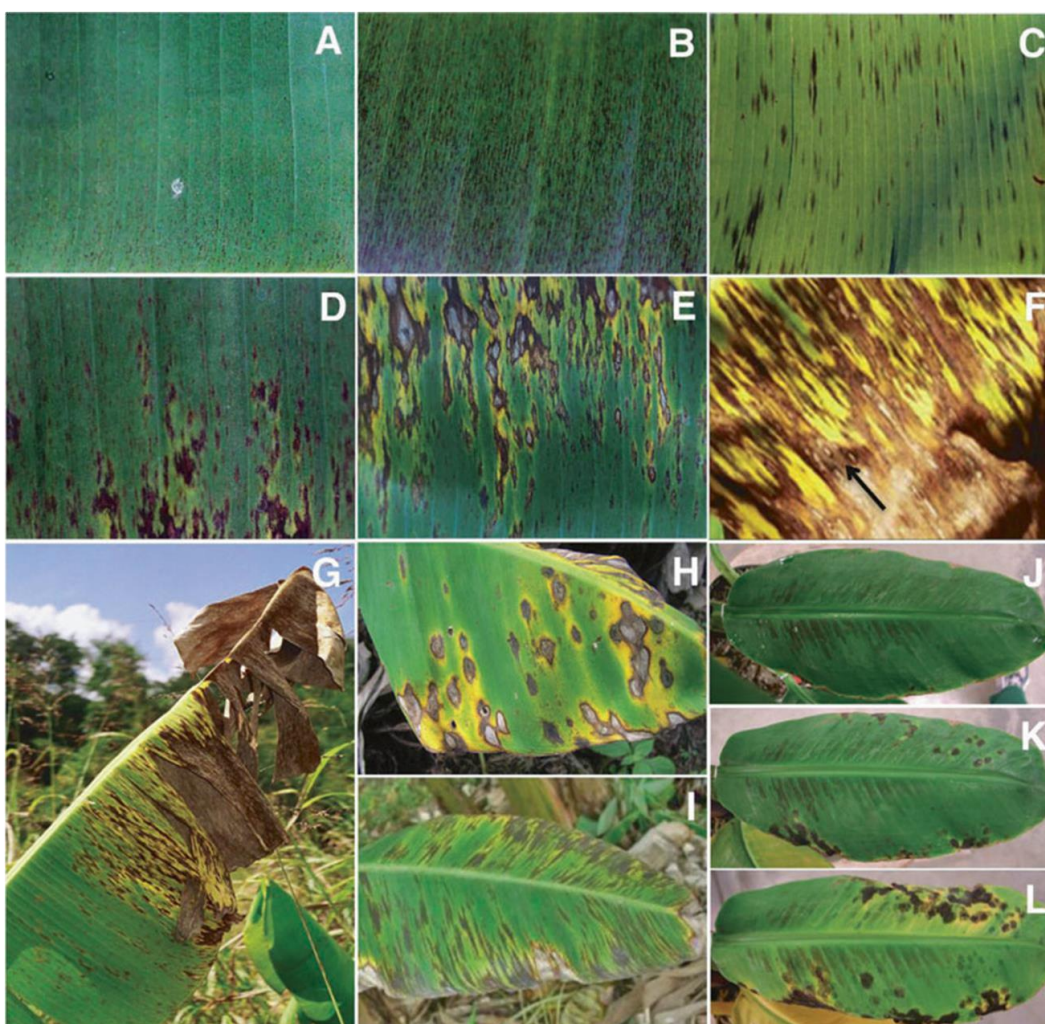


Figura 1.5. Etapas de desarrollo de la enfermedad de la raya de la hoja negra o Sigatoka negra. (A) Estadio 2, aparecen las primeras rayas. (B) Estadio 3, se considera como la segunda fase de las rayas. (C) Estadio 4, primera fase de la mancha. (D) Estadio 5, segunda fase de la mancha. (E) Estadios 5 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).

1.3 MANEJO Y CONTROL DE LAS ENFERMEDADES FÚNGICAS DE PLÁTANO

Los microorganismos fúngicos causantes de las enfermedades más importantes del plátano son: *P. fijiensis* y FOC raza 4. Para su control, se han desarrollado estrategias convencionales como: control químico, generación de híbridos resistentes y buenas prácticas agrícolas; por otro lado, la biotecnología moderna desarrolla programas de mejoramiento genético para generar cultivares resistentes a las enfermedades más importantes del plátano (Akankwasa *et al.*, 2013; Churchill, 2011).

1.3.1 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' (Johnson, 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 (FAO, 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 la resistencia o tolerancia a FOC y *P. fijiensis* (Tabla 1.2).

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

Híbrido	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 enano gigante. 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 'enano gigante'
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.

La generación de híbridos es una tarea ardua por la naturaleza estéril y poliploide de los cultivares. Obtener un híbrido puede tomar más de 15 años si se tiene éxito (Ssebuliba *et al.*, 2009 y 2006; Ortiz y Vuylsteke, 1995). FHIA ha obtenido algunos híbridos de baja altura y con buen rendimiento de frutos resistentes a FOC y a *P. fijiensis*. Pero estos no cumplen con todas las características que la industria demanda para su exportación. Por lo tanto, no son capaces de sustituir al cultivar Cavendish si se presentara alguna situación que amenace la industria platanera.

Con todo, la generación de híbridos con características agronómicas de interés es y seguirá siendo una herramienta imprescindible para el mejoramiento genético de los cultivares. Es claro

que esta tecnología es insuficiente por si sola para resolver los problemas que afectan el plátano, pero también es claro que no se debe dejar a un lado. En México no se está realizando ningún proyecto de esta envergadura, por lo que esto representa una oportunidad para muchos fitomejoradores que estén interesados en esta área.

1.3.2 Control químico

El uso intensivo de fungicidas para controlar los hongos es la estrategia más común. *P. fijiensis* es controlado mediante el uso de fungicidas tales como: benzimidazoles, morfolinas, triazoles, y estrobilurinas (Marin *et al.*, 2003; Fouré y Grisoni, 1984). Anualmente durante un ciclo de cultivo 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 grandes cantidades de fungicidas conlleva también efectos adversos para el medio ambiente y la salud de los trabajadores y demás personas que viven en los alrededores de las plantaciones. Por otra parte, esta tecnología es inaccesible para los pequeños productores que representan más del 80% de la producción total (The guardian, 2016). Aunado a esto, emergen nuevas cepas de *P. fijiensis* cada vez más resistente a los fungicidas debido a la alta tasa de mutación causada por la presión selectiva (Wesseling *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2000). En México, el control químico es la estrategia más frecuente para combatir a la Sigatoka negra.



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

1.3.3 Mejoramiento del plátano mediante ingeniería genética

El monocultivo, es una desventaja para las plantas, las cuales no pueden competir evolutivamente contra los microorganismos patógenos. 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 se presentan como una alternativa de corto plazo, sustentables y eficientes (Kovács *et al.*, 2013; Passos *et al.*, 2013; Swennen, 2003). Es importante mencionar que existen algunos trabajos en los que se han generado plantas transgénicas con diferentes niveles de tolerancia a FOC y *P. fijiensis* (Tabla 1.3), resultado de la generación y la aplicación del conocimiento científico (Menon, 2016).

Tabla 1.3. Cultivares transgénicos tolerantes a FOC y *P. 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 FOC raza 4, aún después de dos meses de postinoculación.	Hu <i>et al.</i> , 2013
Rasthali	β - 1 - 3 - <i>endoglucanase</i>	Tolerancia a FOC 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 FOC raza 1.	Ghag <i>et al.</i> , 2012
Taijiao	Gen de la lisozima humana	Tolerancia a FOC raza 1	Pei <i>et al.</i> , 2005
Rasthali	(HIGS). Secuencia parcial de los genes VeA, VelB y VosA y el factor de transcripción 1 de FOC (<i>factor de transcripciónf1</i>)	Tolerancia significativa a FOC raza 1.	Ghag <i>et al.</i> , 2014
Nangka	thaumatin-like protein (<i>tlp</i>)	Incremento en la tolerancia a FOC raza 4.	Mahdavi <i>et al.</i> , 2012
Resistencia a la sigatoka negra			
Enano gigante (Cavendish)	<i>TnEn-42</i> (endoquitinasa) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>StSy</i> (estilbeno sintasa)	Tolerancia a <i>P. 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>P. 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

Enano gigante (Cavendish)	RGA2 y <i>Ced9</i> (de <i>M. acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i> y de <i>Caenorhabditis elegans</i> respectivamente).	Alta tolerancia a FOC raza 4. La resistencia se evaluó en campo por 3 años.	Dale <i>et al.</i> , 2017
---------------------------	---	---	---------------------------

La mayoría de los genes sobreexpresados codifican para proteínas antimicrobiales y se ha realizado en diferentes cultivares de plátano. Solo dos trabajos se han realizado para el cultivar más importante del mundo (enano gigante); interesantemente son también los únicos que se han evaluado en campo. En el primero, Vishnevetsky *et al.* (2011), coexpresaron 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. Las líneas transgénicas mostraron un nivel reducido de síntomas contra *P. fijiensis* durante los cuatro años que se evaluaron en el campo, además, no mostraron cambios en la calidad y rendimiento del fruto. El segundo trabajo realizado en Australia por Dale *et al.* (2017) en el cual se sobreexpresaron los genes RGA2 aislado de una variedad de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* resistente a FOC raza 4 y Cde9 aislado del nematodo *C. elegans*. En este trabajo se generaron líneas transgénicas altamente tolerantes a FOC raza 4 (Figura 1.6) que fueron evaluadas durante tres años en campo. Estos trabajos demuestran la viabilidad de la biotecnología para la generación de cultivares resistentes en tiempos no tan prolongados como el mejoramiento convencional y con modificaciones genómicas puntuales que no afectan otros caracteres fenotípicos.

Por otra parte, en México son muy pocos los proyectos enfocados al mejoramiento del plátano por ingeniería genética, otros grupos de investigación se enfocan al entendimiento molecular de la interacción *P. fijiensis*-plátano. García Ruiz *et al* (2018), en una revisión que se publicó en *GM crops and food* menciona que México no es un productor de plantas transgénicas, su argumento se basa en datos que muestran que el 97.6 % de los permisos autorizados para evaluar plantas transgénicas en el campo provienen de multinacionales. Contrario a esto, México genera plantas transgénicas, pero, los proyectos quedan confinados en un laboratorio y no se termina su evaluación en campo por la falta de recursos y apoyo del gobierno. En el caso de plátano, no hay ninguna publicación de ningún grupo de fitomejoradores de México, que haya generado plantas transgénicas. Esto plantea un nicho de oportunidades para biotecnólogos que pretendan contribuir en la solución de problemas nacionales.

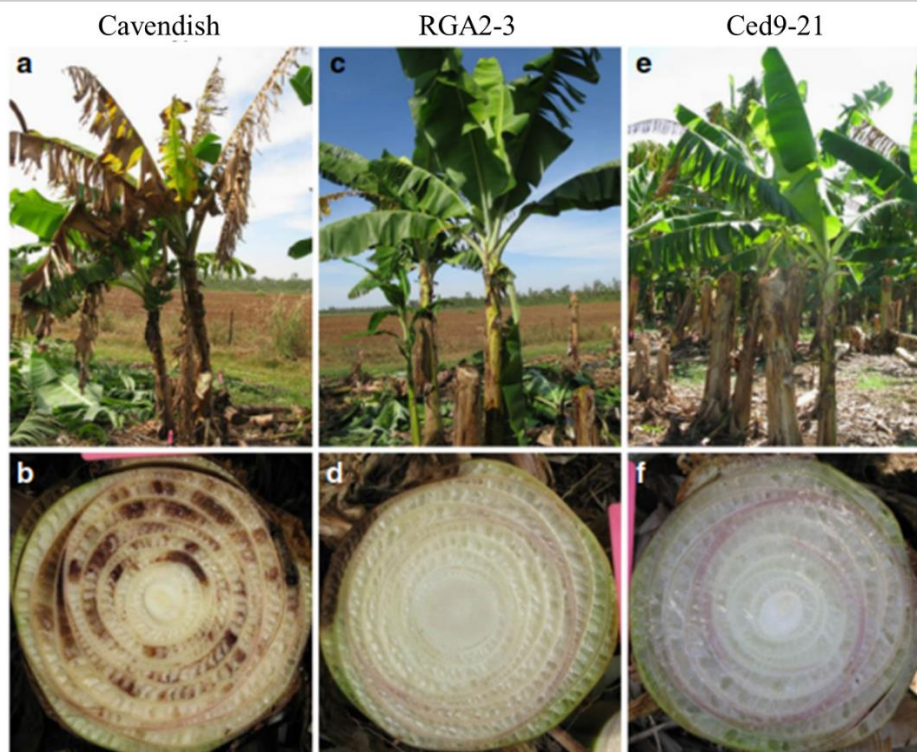


Figura 1.6. Resistencia de plantas sobreexpresando los genes RGA2 y Ced9. Síntomas externos y decoloración del sistema vascular causado por la infección de FOC raza 4 en plantas susceptibles (a y b) y líneas transgénicas resistentes RGA2-3 (c y d) y Ced9-21 (e y f). (Dale *et al.*, 2017).

1.4 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 siempre cambiante que les rodea. Por ejemplo, para combatir microorganismos patógenos, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa que les permiten contrarrestar la infección. Desde barreras físicas y químicas, hasta sofisticados mecanismos moleculares que dependen de receptores transmembranales o intracelulares que reconocen patrones moleculares y moléculas efectoras de los microorganismos respectivamente. 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).

1.4.1 Inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos (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).

A través del tiempo, algunos microorganismos logran superar la primera línea de defensa mediante la generación de nuevos mecanismos moleculares que le permiten acceso al apoplasto de los tejidos. En esta instancia, las plantas dependen del mecanismo de defensa conocido como PTI (Figura 1.6). 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 respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés). Este proceso es una 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. Posterior a la MCL se induce la resistencia sistémica adquirida (SAR).

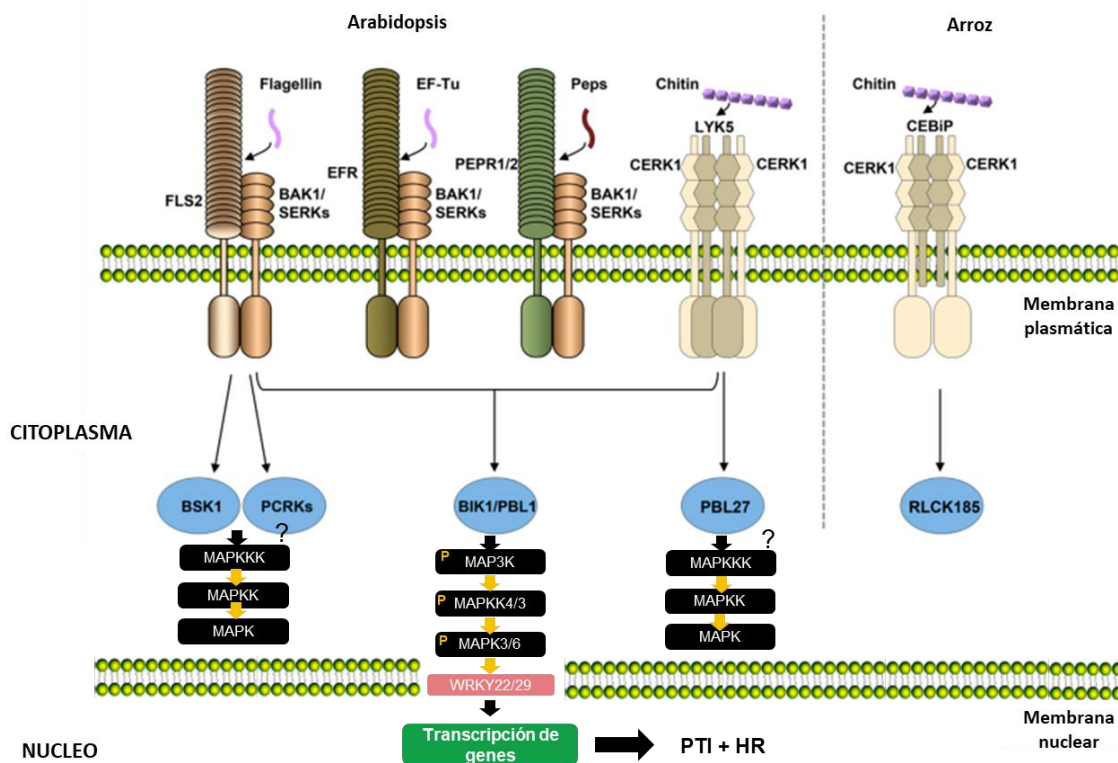


Figura 1.6. Mecanismos moleculares que desencadenan la inmunidad disparada por PAMPs. Los receptores transmembranales reconocen específicamente a una molécula (PAMP) proveniente de un microorganismo y eventualmente desencadena una cascada de señalización que converge en la transcripción de genes de resistencia (Tang *et al.*, 2017).

1.4.2 Inmunidad activada por efectores (ETI)

Los microorganismos patógenos han coevolucionado con las plantas a través del tiempo y han generado estrategias moleculares sofisticadas con el propósito de evadir a 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. El ETI (Figura 1.7) es la última barrera de defensa que tienen las plantas para neutralizar la infección por microorganismos patógenos. Su fundamento reside 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).

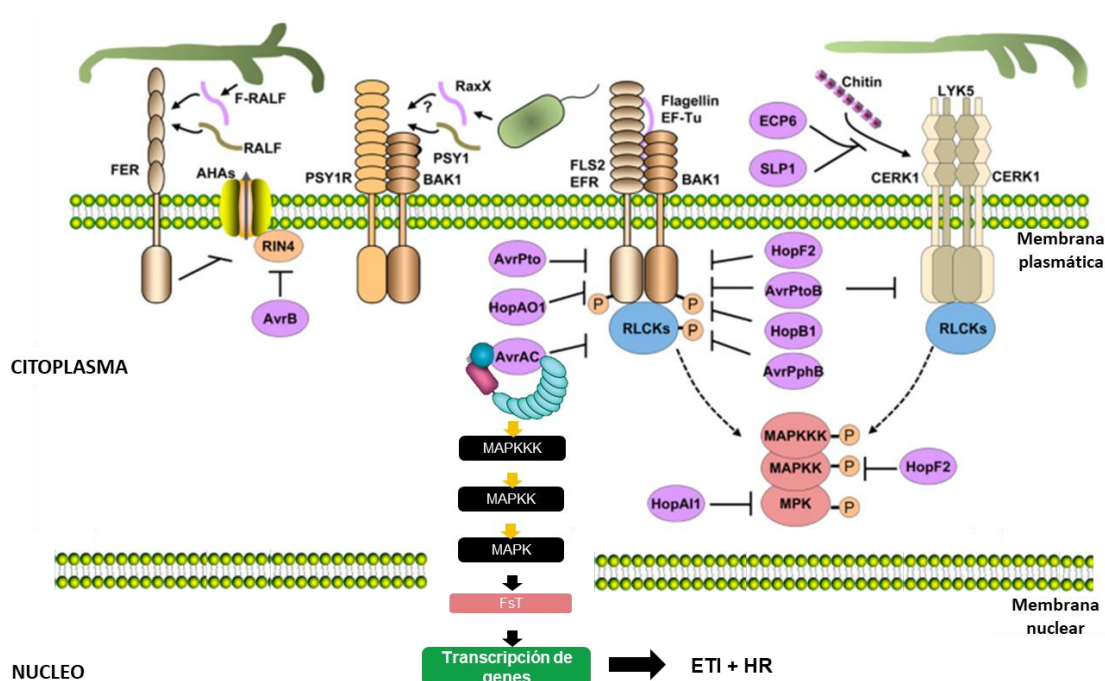


Figura 1.7. Mecanismos moleculares que desencadenan la inmunidad disparada por efectores. Receptores intracelulares reconocen específicamente a una molécula efectora proveniente de un microorganismo y se desencadena una cascada de señalización que converge en la transcripción de genes de resistencia (Tang *et al.*, 2017).

1.4.3 Resistencia sistémica adquirida (SAR)

El SAR, es un mecanismo molecular que se activa corriente abajo del PTI y ETI. A diferencia de HR, el SAR (Figura 1.8) es un proceso que amplifica y disemina la resistencia hacia todos los tejidos de la planta, más allá del sitio de infección, incluidos los tejidos no afectados (Gao *et al.*, 2015). El proceso inicia con 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 moleculares responsables del iniciar el proceso del 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).

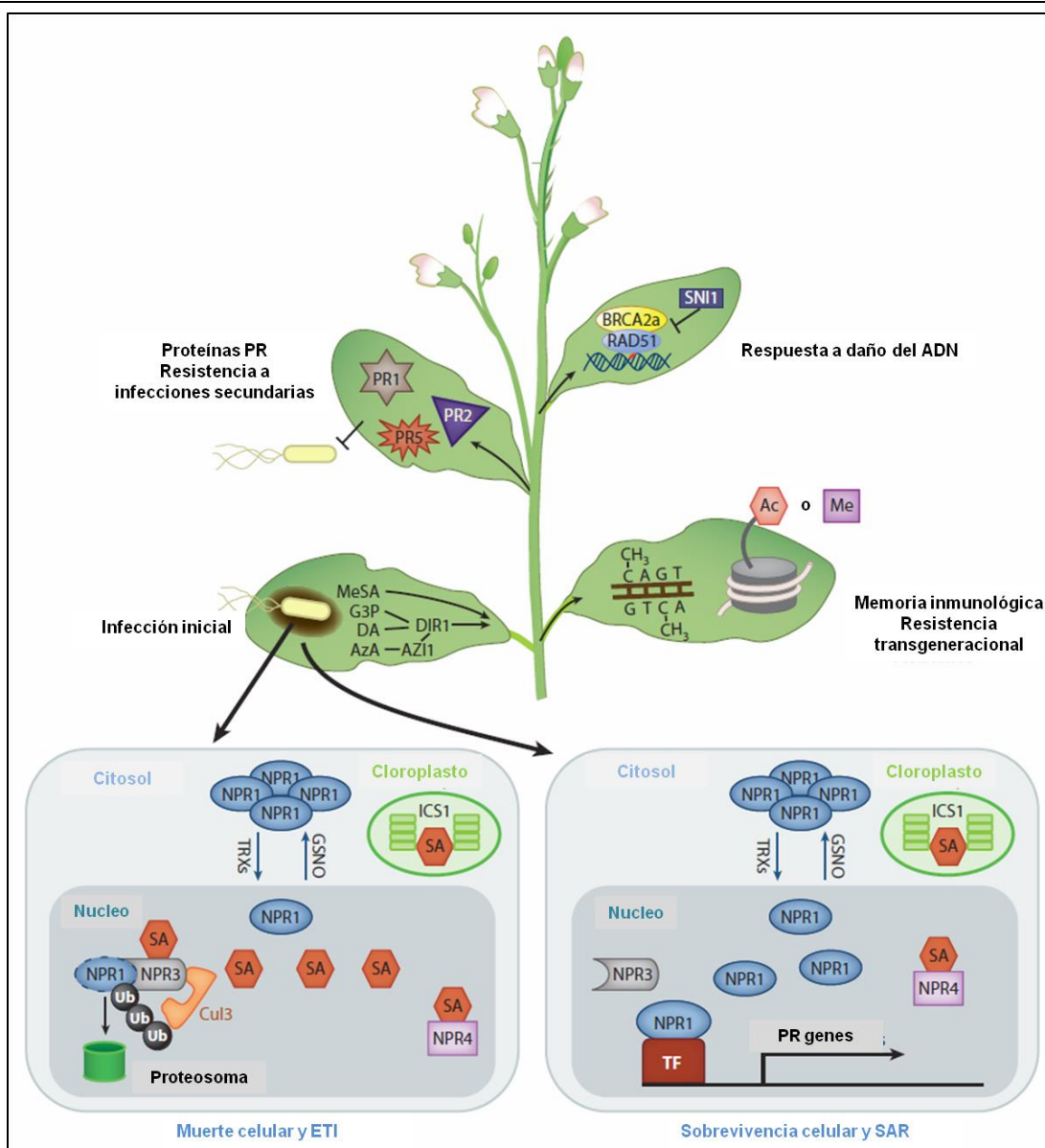


Figura 1.8. Transducción de señales del SAR. PTI o ETI activan la producción de la fitohormona AS en los cloroplastos por acción de la enzima isocorismato sintasa (ICS1). También se producen señales inmunes de desplazamiento, incluido el ácido azelaico (AzA), glicerol-3-fosfato (G3P), ácido metil salicílico (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-nitrosoglutatión (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. (Tomado de Fu y Dong, 2013).

1.5 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 RNA tiene como protagonistas a las RNA polimerasas y a proteínas regulatorias conocidas como factores de transcripción que son capaces de reconocer motivos específicos de DNA 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 RNA polimerasa II (RNAPII) es la responsable de la transcripción de los genes que codifican para proteínas y de muchos RNAs no codificantes, incluyendo pequeños RNA nucleares (snRNAs), precursores de microRNAs (miRNA), y RNAs crípticos inestables (CUTs). La RNA polimerasa I transcribe los RNAs ribosomales (rRNA), y la ARN polimerasa III transcribe RNAs no codificantes como los RNAs de transferencia (tRNAs), y el RNA ribosomal 5S. La transcripción del DNA a RNA consiste en tres etapas: iniciación, elongación, y terminación (Richard y Manley, 2009).

El proceso de transcripción (Figura 1.9) conlleva a la desnaturalización de la doble cadena de DNA y la síntesis química de RNA, usando una de las dos hebras de DNA genómico como templado (Yilmaz y Grotewold, 2010). En la etapa de iniciación, la RNAP II se ensambla con diferentes factores de transcripción para formar un complejo de pre-iniciación en la secuencia promotora de DNA. 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).

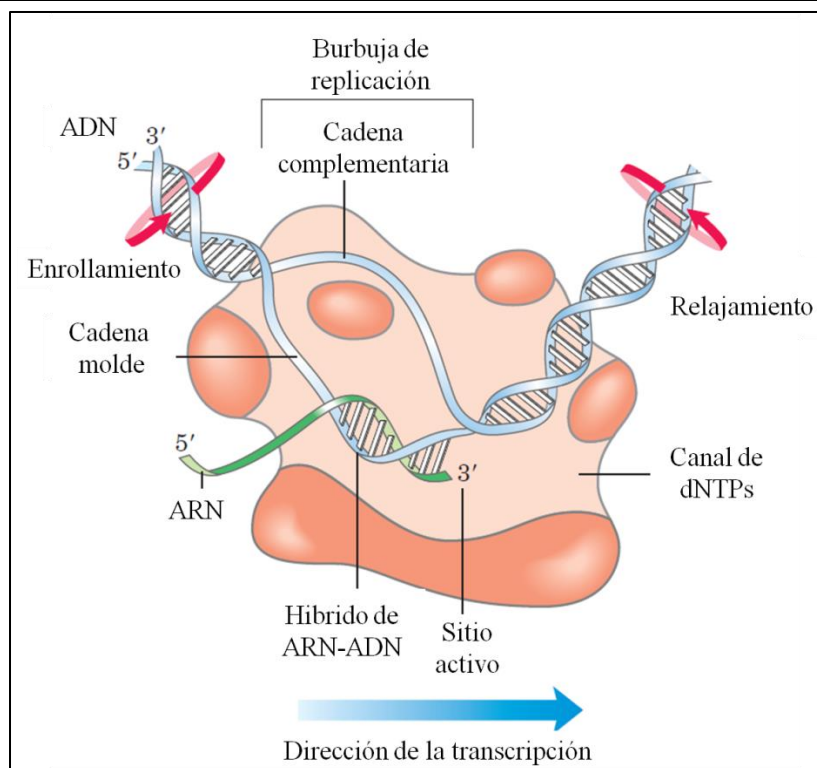


Figura 1.9. Transcripción del DNA. Primero la enzima RNA polimerasa se une al DNA molde en la secuencia promotora. Luego, durante el proceso de elongación, la doble hélice de DNA se desenrolla y la RNA polimerasa polimeriza desoxinucleótidos al extremo 3' del nascente transcrito de RNA. Finalmente, la RNA polimerasa reconoce la secuencia de terminación en la hebra molde de DNA y el transcrito de RNA y la RNA polimerasa se desensamblan del complejo terminando la transcripción (Tomado de Nelson *et al.*, 2008).

1.6 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción son proteínas clave que decodifican la información de los genomas para expresar un grupo único y preciso de genes y moléculas de RNA en cada tipo celular de los organismos. Estos se unen a una secuencia específica del DNA de 6 a 12 nucleótidos aproximadamente en la región del promotor que la precede para promover la transcripción de genes (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 las de los factores 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.

1.7 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY

1.7.1 Estructura y clasificación

Han transcurrido más de 20 años desde que Ishiguro y Nakamura (1994) aislaron 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 DNA, específicamente al elemento en *cis* nombrado W-box (TTGACC/T) mediante un dominio de aproximadamente 60 residuos de aminoácidos que tiene la firma conservada de aminoácidos WRKYGQK, la cual es una estructura de dedo de zinc hacia el extremo C terminal (Figura 1.10) (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 DNA en el promotor (Figura 1.11). Con el advenimiento de las tecnologías de

secuenciación masiva, se han secuenciado cerca de 1000 genomas de plantas que representan 788 especies diferentes (Sun *et al.*, 2021) y, de las cuales se han caracterizado *in silico* 166 familias completas de FTs WRKY según la base de datos de FTs de PLANT TRANSCRIPTION FACTORS DATABASE v5.0 (PlantTFDB, 2022) Lo que ha permitido generar hipótesis sobre su origen y evolución. La hipótesis más aceptada sugiere que un FT WRKY ancestro dio origen el grupo I y a el grupo IIc y IIb, los cuales dieron origen a los demás subgrupos de la extensa familia WRKY (Figura 1.10).

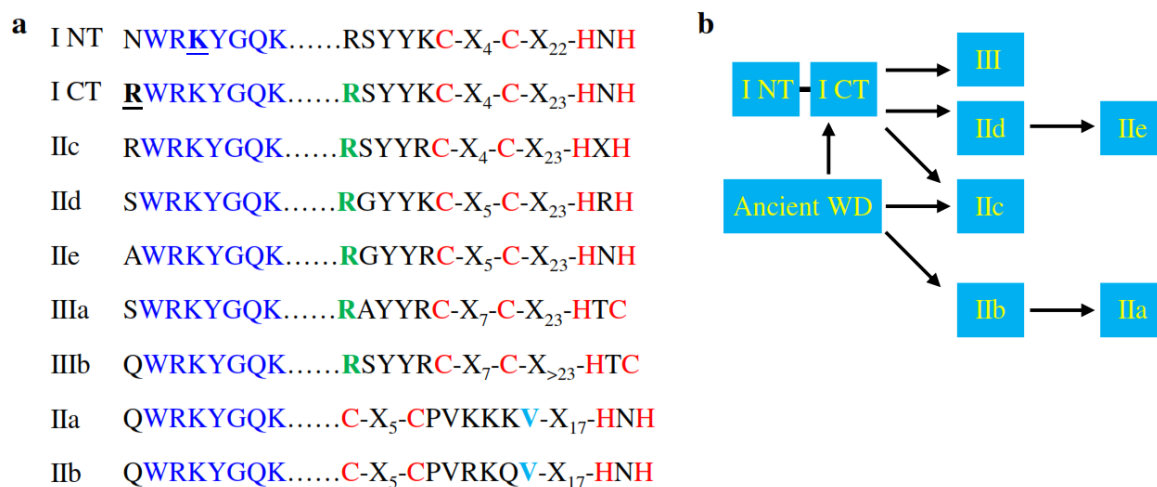


Figura 1.10. Esquema de la estructura del dominio WRKY y representación hipotética de su evolución. a) Esquema de la clasificación de los dominios WRKY de arroz. Se resalta en rojo el motivo conservado dedos de zinc; la R en verde representa el intrón R conservado, la V en azul representa el intrón V conservado de los subgrupos IIa y IIb. b) Evolución hipotética de los dominios WRKY (Tomado de Chen *et al.*, 2019).

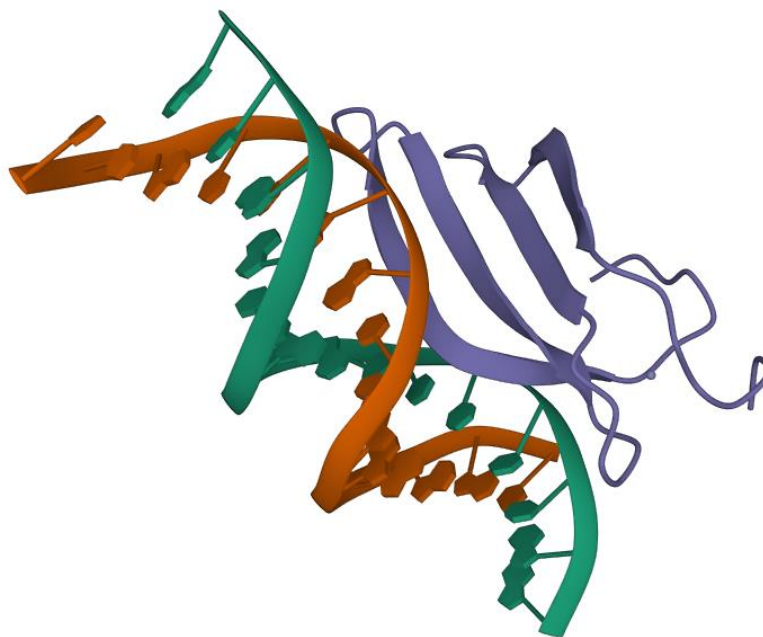


Figura 1.11. Estructura en 3D del dominio WRKY de AtWRKY1 en unión con la W-box. La estructura en 3D del dominio WRKY en unión con el DNA fue elucidada por difracción de rayos X. El dominio WRKY está constituido por cuatro láminas betas plegadas antiparalelas, la lámina beta plegada compuesta por los amino ácidos WRKYGQK interactúa con el surco mayor del DNA (Tomado de la base de datos PDB; código 6J4E) (Xu *et al.*, 2020).

1.7.2 Papel de los genes WRKY en las plantas

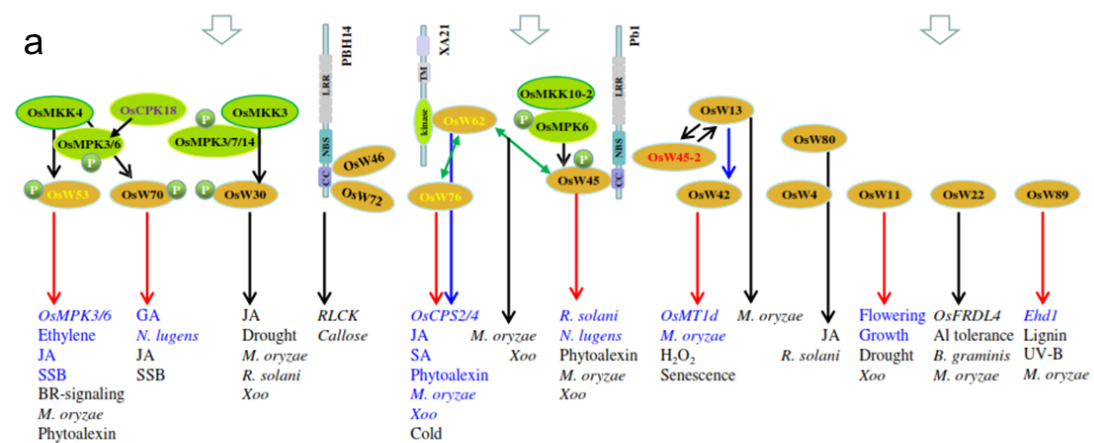
En la última década se ha generado la mayor cantidad de información concerniente a la funcionalidad de los factores de transcripción WRKY. *A. thaliana* y *O. sativa* son las especies de plantas de las que se tiene el mayor número de registros de estudios funcionales de los genes WRKY. En estos casos 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 1.11). 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 (Dehghan 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).

Señales celulares y ambientales, tales como patógenos bacterianos y fúngicos, herbívoros, PAMPs y fitohormonas



Señales celulares y ambientales, tales como patógenos bacterianos y fúngicos, nematodos, PAMPs y fitohormonas

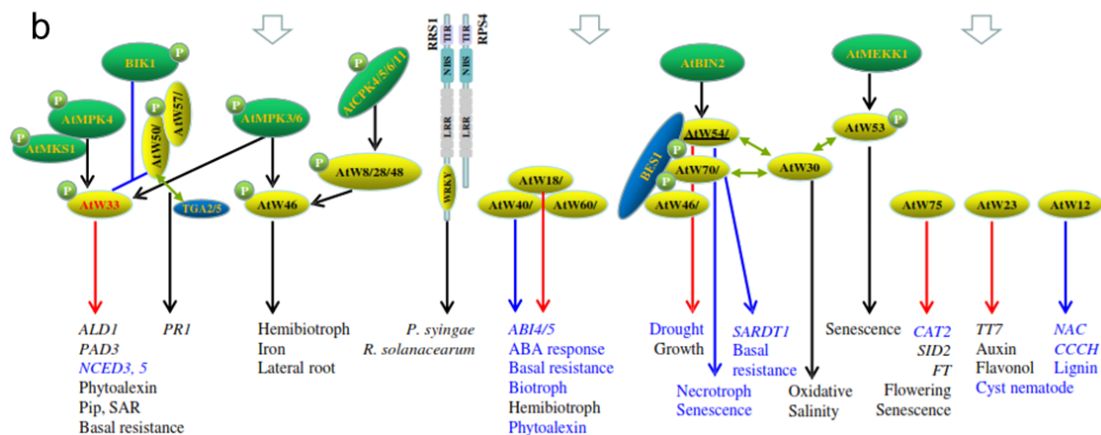


Figura 1.12. Regulación de los FTs WRKYen múltiples vías en arroz (a) y Arabidopsis

(b). (Rushton, 2010). Los FTs OsWRKYs y AtWRKYs participan en respuesta a varios estímulos ambientales y celulares. Los FTs WRKY pueden ser activados por quinasas y por la interacción de proteínas receptoras. Interacciones entre proteínas WRKY o con otros FTs, y la existencia de la cascada WRKY complica la red de regulación de estas proteínas. Las flechas indican el tipo de regulación, negro para regulación positiva, azul para regulación negativa, rojo para regulación positiva y negativa. Flechas dobles en verde indican interacciones. WRKY en rojo indican autoregulación positiva y en amarillo indican autoregulación negativa. Palabras en azul indican regulación negativa (Tomado de Chen *et al.*, 2019)

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 por 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 1.12 se muestran algunos ejemplos de la intrincada red regulatoria de FTs de la familia WRKY en *Arabidopsis* y arroz.

1.7.3 Función en la respuesta 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 y colaboradores 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 1.13). El heterodímero 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 ruta de señalización del jasmonato vía la supresión de los represores JAZ (Jazmonate-Zim Domain). AtWRKY60 interactúa con AtWRKY18 y AtWRKY40 formando un complejo 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).

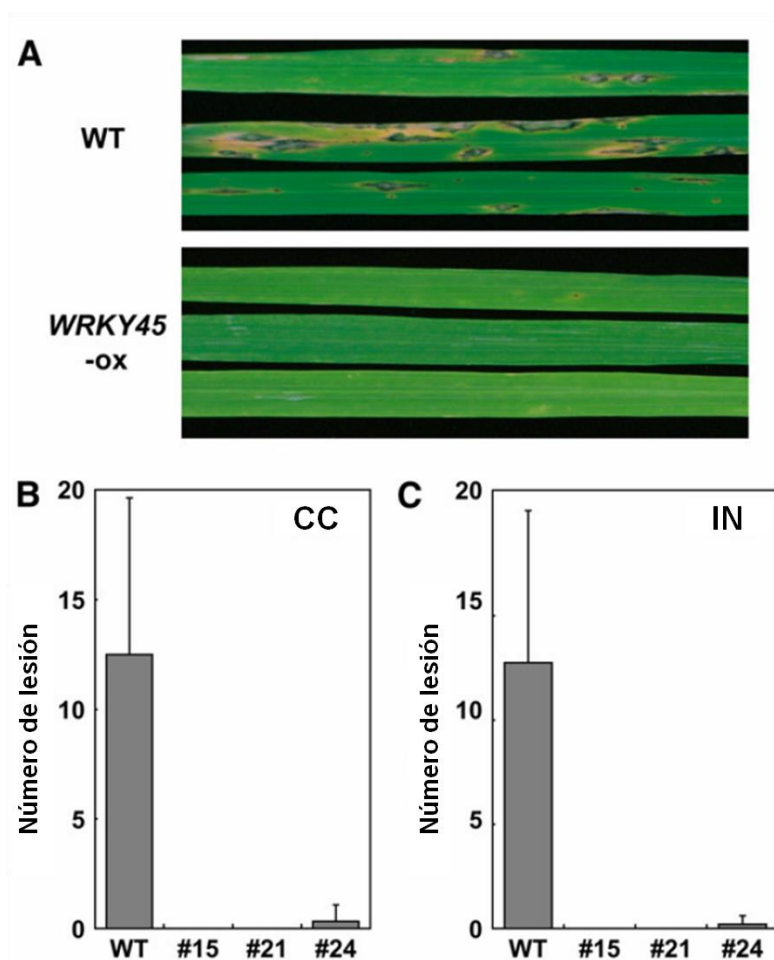


Figura 1.13. Plantas transgénicas sobre-expresando a *MaWRKY45* manifiestan alta tolerancia al tizón del arroz. Plantas transgénicas homocigotas T3 (tercera generación) y plantas silvestres control dispuestas en una cámara de crecimiento (A y B) o en un invernadero (C) fueron inoculadas con *M. grisea* (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. (Tomado de Shimono *et al.*, 2007).

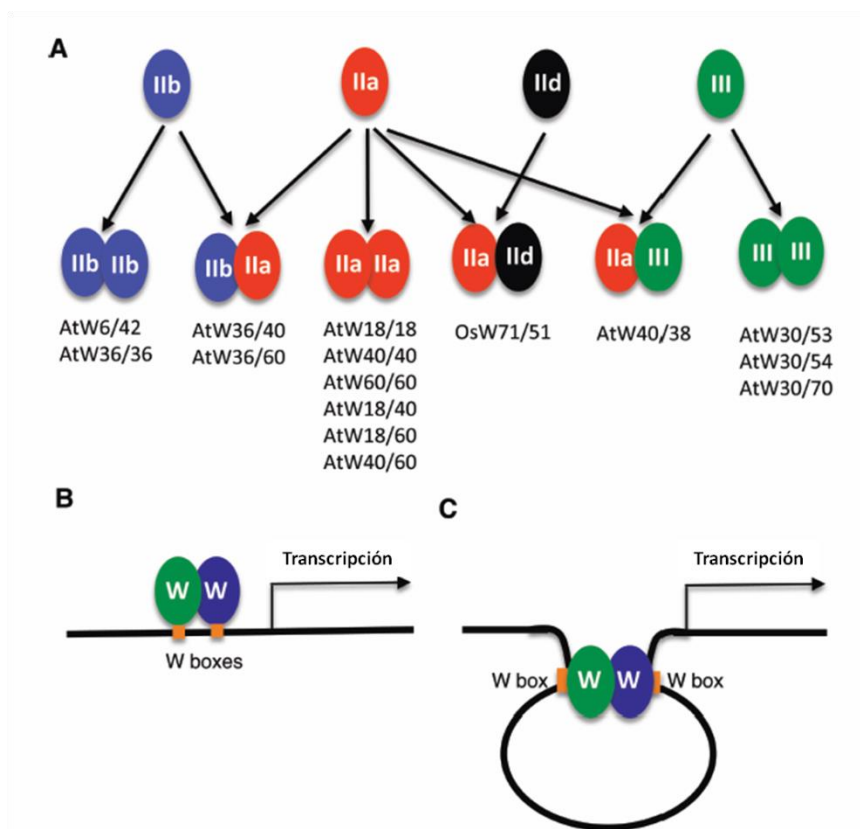


Figura 1.14. Interacciones proteicas entre miembros de la familia WRKY. (A) Proteínas WRKY pertenecientes a varias subclases (IIa, IIb, IIc y III) pueden interactuar con ellas mismas y con otras para formar homo- y hetero-complejos. Pares de proteínas WRKY cuya interacción ha sido demostrada experimentalmente 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 (Tomado de Chi *et al.*, 2013).

1.8 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY EN PLÁTANO

Existen solo dos estudios en plátano en los cuales se evidencia la relación de los factores de transcripción WRKY en la resistencia al estrés biótico. 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 *P. 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 *P. 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'. El segundo estudio analizó la expansión evolutiva de los genes de la familia WRKY y de su perfil de expresión durante la infección en lesiones radiculares por el nemátodo *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, y 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). La escasa investigación de esta familia de proteínas en plátano nos proporciona un nicho de oportunidades en la caracterización de genes WRKY de plátano, y así, tener un mejor entendimiento del intrincado mecanismo de defensa del plátano contra microorganismos patógenos como *P. fijiensis* y FOC raza 4 para poder generar estrategias biotecnológicas que nos permitan mejorar este cultivo por el bien de la seguridad alimentaria y el bolsillo de muchos agricultores.

JUSTIFICACIÓN

El plátano, es un alimento de la canasta básica para millones de personas del Sureste asiático y africano, y es económicamente importante para la industria de plátano en Latino América (Ploetz *et al.*, 2015). Sin embargo, la uniformidad genética de este cultivo, producto de la esterilidad y el monocultivo de las variedades comerciales, lo hace más susceptible a los microorganismos patógenos que afectan su producción y que son una amenaza para la industria y la seguridad alimentaria (Johnson, 2000). Entre estos patógenos destacan *P. fijiensis* y FOC raza 4, causantes de la Sigatoka negra y el Mal de Panamá respectivamente, como los hongos ascomicetos que causan las mayores pérdidas económicas. Cabe señalar que no existen cultivares resistentes para sustituir al cultivar ‘Enano gigante’, que es la base de la industria de plátano en Latino América (Menon, 2016). Aunado a esto, el uso intensivo de pesticidas como estrategia de control, puede producir efectos negativos en la salud de los trabajadores de las plantaciones y contaminar el ambiente. Además, en el caso de *P. fijiensis*, el uso indiscriminado de fungicidas ocasiona que surjan nuevas cepas resistentes.

Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo caracterizar funcionalmente a cuatro FTs de la familia WRKY de plátano previamente aislados y nombradas por Garcia-Laynes (2018) como: MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 y MaWRKY70 cuyos homólogos en *Arabidopsis* y arroz participan en la respuesta de defensa contra microorganismos patógenos. También se sobreexpresó el CDS del gen *MaWRKY45* por medio de la técnica de Infiltration-RNAseq en *N. benthamiana* y se realizó un análisis transcriptómico para tener un mejor entendimiento de la función de este FT en el proceso transcripcional de los genes que se activan corriente abajo. Los resultados obtenidos proporcionan evidencia sustancial que permitirá el uso de estos genes en el fitomejoramiento biotecnológico de plátano.

HIPÓTESIS

I.

Los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* de plátano codifican para factores de transcripción de la familia WRKY que modifican su perfil de expresión en respuesta a las fitohormonas AS y MeJA.

II.

La sobreexpresión de la región codificante del gen *MaWRKY45* en el sistema heterólogo de *Nicotiana benthamiana* provoca cambios en la expresión génica de genes relacionados al estrés biótico.

OBJETIVOS*Objetivo general:*

Caracterizar funcionalmente factores de transcripción WRKY de plátano y analizar el transcriptoma de hojas de *Nicotiana benthamiana* sobreexpresando el gen *MaWRKY45*.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la estructura y filogenia de los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60*, y *MaWRKY70* de plátano.
2. Determinar la localización nuclear de las proteínas codificadas por los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60*, y *MaWRKY70* de plátano.
3. Evaluar la actividad de transactivación de las proteínas codificadas por los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60*, y *MaWRKY70* de plátano.
4. Evaluar los niveles de transcritos de los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60*, y *MaWRKY70* en respuesta a las fitohormonas ácido salicílico y metil jasmonato.
5. Evaluar los cambios en el transcriptoma de hojas de *N. benthamiana* como resultado de la sobreexpresión transitoria de *MaWRKY45*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

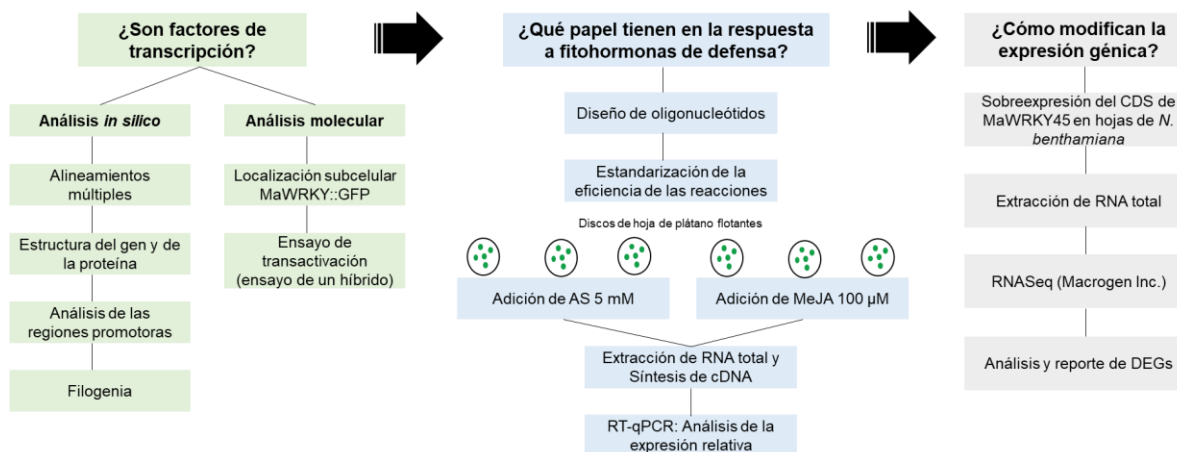


Figura 1.14. Estrategia experimental implementada en el presente estudio para la caracterización de los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* de plátano. Los experimentos y análisis se diseñaron para contestar tres preguntas biológicas relativas a los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* de plátano, ¿son factores de transcripción?, ¿cómo modifican su perfil de expresión por fitohormonas de defensa? y ¿cómo estos factores de transcripción modifican la expresión génica corriente abajo?

CAPITULO II**THE BANANA *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* AND *MaWRKY70* GENES ENCODE FUNCTIONAL TRANSCRIPTION FACTORS AND DISPLAY DIFFERENTIAL EXPRESSION IN RESPONSE TO DEFENSE PHYTOHORMONES****Artículo publicado**

Genes 2022, 13(10), 1891; <https://doi.org/10.3390/genes13101891>

Sergio García-Laynes¹, Virginia Aurora Herrera-Valencia¹, Lilia Guadalupe Tamayo-Torres¹, Verónica Limones-Briones¹, Felipe Alonso-Pool¹, Fray Martin Baas-Espinola¹, Ángel Gabriel Alpuche-Solís², Carlos puch-Hau³ and Santy Peraza-Echeverria¹. *

2.1 INTRODUCTION

Banana is a staple food for more than 400 million people in the tropics and a major source of foreign currency for the leading producers (Dale *et al.*, 2017). Banana ranks as the most prolifically produced fruit in the world, with 145 million tons per year, representing an estimated value of USD\$ 52 billion (FAO, 2017b). Similar to other monocultures, banana cultivars are affected by a broad range of pathogens, including viruses, bacteria, fungi, and nematodes, which can cause partial or total loss of fruit production (Drenth and Guest, 2015; Ploetz *et al.*, 2015). Fungal pathogens are the most destructive in the banana industry today, and the most notorious of them are the soil-borne *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense (Foc), the causal agent of Panama disease, and the air-borne *Pseudocercospora fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka disease. Foc tropical race 4 (TR4) threatens to destroy all banana plantations of susceptible cultivars in the tropics. Fungicides are largely ineffective against Foc. *P. fijiensis* is spread in almost all banana-growing regions of the world and requires an intensive regime of fungicide applications to control it, with up to 66 applications per year in some locations (Drenth and Guest, 2015; Ploetz *et al.*, 2015; Churchill, 2011). This conventional strategy to control *P. fijiensis* is one of the most expensive in agriculture, surpassing US\$500 million per year (Arango-Isaza *et al.*, 2016) and putting the health of plantation workers and the environment at risk. Taking into account all these biotic factors, there is an urgent need to develop disease-resistant genotypes that preserve the current agronomic quality features of banana fruits without using pesticides. A better understanding of the genes involved in disease resistance in banana should provide valuable tools for the genetic improvement of this crop.

Plants have developed two effective spatial immune responses to recognize and repel pathogens. The first comprises mainly receptor-like proteins (RLPs) or receptor-like kinases (RLKs) located at the plasma membrane. RLPs and RLKs perceive extracellular immunogenic patterns (ExIPs) derived from the pathogen or damaged host cell, activating extracellularly triggered immunity (ExTI) that halts pathogen spread (Kanyuka and Rudd, 2019; Van der Burgh and Joosten, 2019). ExTI is usually associated with programmed cell death at the infection site, known as the hypersensitive response (HR). The second immune response takes place inside the cell and occurs when an intracellular receptor, mainly a nucleotide-binding site and leucine-rich repeat (NBS-LRR) protein, perceives intracellular immunogenic patterns (InIPs) derived from the pathogen or damaged host cell, activating intracellularly triggered immunity (InTI), which can also result in an HR to stop pathogen spread (Kanyuka and Rudd, 2019; Van der Burgh and Joosten, 2019).

The HR generally activates a disease resistance mechanism known as systemic acquired resistance (SAR), which is dependent on the accumulation of the defense hormone salicylic acid (SA) and is effective against biotrophic or hemibiotrophic pathogens. The SAR response activates several types of pathogenesis-related (PR) proteins with antimicrobial activities, providing broad-spectrum resistance in the entire plant that can last several days (Ding and Ding, 2020; Gao *et al.*, 2015). The hormone jasmonic acid (JA) also plays a major role in regulating plant defense responses against necrotrophic pathogens (Wasternack, 2015). Moreover, beneficial microorganisms can activate induced systemic resistance (ISR) through JA and its conjugates, such as methyl-JA (MeJa), leading to broad-spectrum resistance (Yu *et al.*, 2022). Recent studies have shown that SA also plays a role in ISR (Samaras *et al.*, 2021; Ilham *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2019).

Several TF families have been implicated in the regulation network of SAR or ISR, such as AP2/ERF, bHLH, bZIP, MYB, NAC and WRKY (Timmermann *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2006). These TFs bind to promoter elements of defense genes, regulating their expression as either activators or repressors of transcription. WRKY TFs play a prominent role in the activation of immune responses. These TFs belong to a large plant gene family of transcriptional regulators, which are defined by the highly conserved WRKY domain (~60 amino acid residues in length) composed of a conserved WRKYGQK motif at the N-terminus and a zinc-finger motif at the C-terminus (Chen *et al.*, 2019). WRKY TFs recognize the W-box cis-acting element (TTGACY) in the promoters of their target genes. WRKY proteins are classified into three major groups based on the number of WRKY domains and the type of zinc finger motif (Eulgem *et al.*, 2000). Group I contains two WRKY domains in tandem and a C2H2 zinc finger type, whereas groups II and III

each possess only one WRKY domain with a C2H2 zinc finger type and a C2HC zinc finger type, respectively. Group II WRKY proteins are further classified into five subgroups (IIa to IIe) by phylogenetic analysis (Chen *et al.*, 2019). Furthermore, several WRKY proteins are responsive to defense-related hormones, such as SA or JA, leading to disease resistance. Moreover, overexpression of *WRKY* genes can enhance disease resistance against a broad range of pathogens (Chen *et al.*, 2019; Phukan *et al.*, 2016); for example, the overexpression of rice *OsWRKY45* increased resistance against biotrophic and hemibiotrophic pathogens such as the bacterium *Xanthomonas oryzae* and the fungus *Magnaporthe grisea*, respectively, in transgenic rice (Shimono *et al.*, 2012). Additionally, *Arabidopsis AtWRKY70*, which is phylogenetically closely related to *OsWRKY45*, enhanced resistance to the bacterial pathogens *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas syringae* and to the fungal pathogen *Erysiphe cichoracearum* in transgenic *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2004). Both genes belong to group III. Another example is *Arabidopsis AtWRKY18*, whose overexpression increased resistance to *P. syringae* (Chen and Chen, 2002). Moreover, *Arabidopsis AtWRKY60* enhanced the DNA-binding activity of *AtWRKY18* (Xu *et al.*, 2006). The *AtWRKY18* and *AtWRKY60* genes are phylogenetically closely related and belong to subgroup IIa of the WRKY family (Xu *et al.*, 2006). Interestingly, homologs of *AtWRKY18* and *AtWRKY60* genes in banana were upregulated in response to the fungus *P. fijiensis* (D'Hont *et al.*, 2012). These reports and others make *WRKY* genes interesting candidates for the genetic improvement of crops.

In banana, genome-wide analyses have identified 164 members of the WRKY family, and transcriptomic analyses have revealed a possible involvement of members of groups II and III in disease resistance (Jia *et al.*, 2022; Goel *et al.*, 2016; Kaliyappan *et al.*, 2016; D'Hont *et al.*, 2012). Although substantial advances have been made in the annotation of *WRKY* genes in banana and their expression analysis in response to biotic and abiotic stress, our understanding of their function as TFs and their regulation by defense hormones is still very limited. To expand the current knowledge of banana *WRKY* genes, in the present study, we isolated the cDNAs of four banana *WRKY* homologs, which we named *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* due to their close phylogenetic relationships with their counterparts in *Arabidopsis* and rice. A comprehensive structural analysis of these banana *WRKY* genes was carried out, and their protein subcellular locations were determined. Furthermore, their function as TFs was determined, along with their expression profiles in response to the defense hormones SA and MeJA. The novel insights provided in this study represent a foundation for further functional analyses of these banana *WRKY* genes, which may lead to engineering disease resistance in this crop.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Plant material and phytohormone treatments

Leaves of *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* (ITC code: 1345) plants growing outdoors at the Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. were used for RNA extraction and cloning of banana WRKY cDNAs. A floating leaf disc assay (González-Torralva *et al.*, 2017) was used for hormone treatments. Briefly, fully expanded young leaves next to the furled leaf of *M. acuminata* ssp. *malaccensis* plants (~2 m tall) were used to collect leaf fragments in the morning (9 am/26 °C), which were disinfected as described by Rodríguez-García *et al.* (Rodríguez-García *et al.*, 2016). Leaf fragments were then cut into 10 circular pieces of 1.5 cm diameter and floated (adaxial surface facing up) on 30 ml of 5 mM SA (Tzean *et al.*, 2021) or 100 µM MeJA [33] in 10 cm diameter Petri dishes; both solutions contained 0.025% Silwet-L77 and 0.5% ethanol. For the control, the leaf discs were floated on 30 ml of 0.025% Silwet-L77 and 0.5% ethanol solution. All Petri dishes had 10 leaf discs, each excised from an independent plant. Three biological replicates were used for each hormone treatment, and three biological replicates were used for the control. Samples were incubated at 26 ± 1 °C in a growth room with a 16-h photoperiod (light intensity of $100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) for 6 hours, collected and stored at -80 °C until use for total RNA extraction.

2.2.2 BLAST searches

The amino acid sequences of OsWRKY45 (GenBank accession number AK066255) [34] and AtWRKY70 (GenBank accession number AF421157) [22] from rice and *Arabidopsis*, respectively, were used as queries to search (E-value cutoff of -1) the proteome of the wild species *M. acuminata* ssp. *malaccensis* (D'Hont *et al.*, 2012) using the BLASTP algorithm at the Phytozome v12.1 database (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>, accessed on 20 January 2021). We also included as queries in BLASTP searches the banana WRKY sequences GSMUA_Achr3T13440 and GSMUA_Achr7T05200, as they have been shown to be upregulated by the pathogen *P. fijiensis* and have been reported to be closely related to AtWRKY18 and AtWRKY60 (D'Hont *et al.*, 2012). In this case, the BLASTP searches were carried out at the Phytozome v12.1 database (accessed on 20 January 2021) using the *Arabidopsis* proteome (TAIR10) (Lamesch *et al.*, 2011). The four banana WRKY genes were named based on their *Arabidopsis* or rice WRKY gene counterparts, with the prefix 'Ma' indicating *M. acuminata* (Table 2.1).

Table 2.1. Best BlastP hits of Banana WRKY TF related sequences. Banana, *Arabidopsis* and rice WRKY TFs were taken as reference amino acid sequences to

Reference gene	Genbank accession no. of reference gene	BlastP best Hits in arabidopsis and banana	Genbank accesión no. of BlastP best Hits	Length of the BlastP alingment (aa)	Identity %	positives	Bitscore	Expected (E) value
OsWRKY45	AK066255	MaWRKY45	OP186310	177	44	97	123.25	1.78e-032
AtWRKY70	AF421157	MaWRKY70	OP186312	73	55	54	102.449	2.98e-25
MaWRKY18	OP186309	AtWRKY18	NM_119329	306	41	159	183.726	1.81e-56
MaWRKY60	OP186311	AtWRKY60	NM_001335969	263	49	159	187.963	1.76e-58

retrieve the best BlastP hits in *M. acuminata* subsp. *malaccensis* and *Arabidopsis*.

2.2.3 RT–qPCR and cloning of MAWRKY cDNAs

The Illustra Nucleon Phytopure™ kit (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, USA) was used to extract total RNA from leaf tissue of the wild banana *M. acuminata* ssp. *malaccensis* following the manufacturer's instructions. The nucleic acid extract was treated with TURBO™ DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and then first-strand cDNA synthesis was performed using 5 µg of total RNA employing SuperScript™ III (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Specific primers for the predicted coding sequences (CDSs) of the *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* genes were designed (Table 2.2) and used for RT–PCR amplification using the Expand™ Long Template PCR System (Merck, Darmstadt, Germany). The cycling conditions were 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 10 s, 59 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. The PCR products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced on both strands by MacroGen, Inc. (<https://dna.macrogen.com>). In addition, specific primers (Table 2.2) upstream of the stop codon of each CDS were designed for mapping the 3' cDNA ends using the SMARTer® RACE Kit (Takara Bio USA, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The PCR products were cloned and sequenced as described above. The sequences were edited using the BioEdit v7.2. software package (Hall, 1999). The cDNA sequences of *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* were deposited in GenBank with the accession numbers OP186309, OP186310, OP186311 and OP186312, respectively.

Table 2.2. List of primers.

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Reference
CDS isolation			
MaWRKY18	ATGGGATCGGCTTGTTG	TTAAAGCATCATCCCGGAAATG	This study
MaWRKY45	ATGGAACACACGCCTGTTG	TCATCGGAAGAACTCGTCG	This study
MaWRKY60	ATGGGGTCAAGTTGGTTGG	TTAGCTAGTTCGCAGGGGAAG	This study
MaWRKY70	ATGGGGAGCAGCACAGG	TCAGGAGAAGAAGCTCGAGG	This study
3'UTR isolation			
MaWRKY18	ACAGCCAGCCTTCTCAGGTC	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG*	This study
MaWRKY45	AAGATGCAGCGAGCAATCTGACC	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG*	This study
MaWRKY60	ACCGGAGATGGAGTCG	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG*	This study
MaWRKY70	TGGCGTCGGAGTCGATCTACTTC	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG*	This study
qPCR			
MaWRKY18	AGGTCTTCGCATCCCAAGTC	AAAGCGTCACAGAGAAGAAGCC	This study
MaWRKY45	TTCATGGCAGACACATATCTCG	TGCTGAGTAAATAGCTGGGGAAC	This study
MaWRKY60	TCGTTGTCGGAAGATCCAGC	TCCGAATCAAACCTCAGTCTGTG	This study
MaWRKY70	ATGGATTTCATGCTGGAGGAG	TGTTTCTACCTACATCACCAGTTGG	This study
MaDLO1	GAGAGCTTGGGACTTGAGAAG	CTGTGGGCATGGTG GATAG	Tzean <i>et al.</i> , 2021
MaLOX1	CCCAACAGCGTGTCCATCTA	CTTTGCGTCCAAGCCACCAC	Zhao <i>et al.</i> , 2013
Ma25S	ACATTGTCAGGTGGGGAGTT	CCTTTTGTTCACACGAGATT	Van den Berg <i>et al.</i> 2007

*GeneRacer™ 3' Nested Primer.

2.2.4 Gene structure, identification of conserved protein motifs, protein modeling and phylogenetic tree construction

The 3' UTR (Untranslated Region), exon and intron regions of banana *WRKY* genes were illustrated using the Exon–Intron Graphic Maker v4.0 platform (<http://wormweb.org/exonintron>, accessed on 8 June 2021). The *WRKY* CDS was translated with the Translate function of the BioEdit software package v7.2. The identification of conserved motifs was performed using the ScanProsite Tool from the Expasy Bioinformatics Resource Portal (De Castro *et al.*, 2006) (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>, accessed on 13 February 2021) with the default settings. The amino acid identity between sequences was determined with the Clustal Omega program (Sievers *et al.*, 2011) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> accessed on 18 February 2021). The presence of cis-acting DNA regulatory elements in the putative promoter region (1,500 bp upstream of the start codon) of each banana *WRKY* gene was detected using the databases PlantCARE (Rombauts *et al.*, 1999) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>,

accessed on 3 April 2021) and PlantPAN v3.0 (Chow *et al.*, 2019) (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/>, accessed on 5 April 2021) with the default settings. Homology modeling of protein structures was carried out using the SWISS-MODEL suite (Schwede *et al.*, 2003) (<https://swissmodel.expasy.org/>, accessed on 9 April 2021), and 3D models were edited with the PyMol program v2 (<https://pymol.org/2/>). Multiple sequence alignments were performed using the Clustal Omega program with the default parameter settings. Identical and similar amino acids were indicated with black and gray shading, respectively, using the Boxshade program (<http://www.ch.embnet.org>, accessed on 12 April 2021). A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method with 1000 bootstrap replications, employing the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v11.0.10 package (Tamura *et al.*, 2021) (<http://www.megasoftware.net/>). The phylogenetic tree was edited with the FigTree v1.4.4 program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). The banana MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 protein sequences plus 72 members of the *Arabidopsis* WRKY family were used for phylogenetic tree construction.

2.2.5 Subcellular localization assay

The CDSs of the *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* cDNAs were fused in frame to the 3' end of the GFP reporter gene present in the pAVA121 vector (Von Arnim *et al.*, 1998). Onion epidermal cells were transiently transformed with the particle bombardment method (Von Arnim *et al.*, 1998) using a PDS-1000/HeTM system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Green fluorescence was observed with an AxioScope A1 epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), and image editing was performed with ZEN Edition Blue imaging software (Carl Zeiss).

2.2.6 Yeast one-hybrid assay

The transcriptional activity of *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* was determined by yeast one-hybrid assay using the pGBKT7 vector and the Y2HGold yeast strain (Takara Bio USA, San Jose, CA, USA). The pGBKT7 plasmid contains the GAL4 DNA-binding domain (BD) under the control of the ADH1 promoter and the TRP1 nutritional marker for selection in yeast, whereas the yeast Y2HGold strain contains the reporter genes AUR1-C, ADE2, and HIS3. The CDSs of *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* cDNAs were PCR

amplified using primers designed for In-Fusion® cloning (Table S1) and cloned into the pGBKT7 vector by recombination using the In-Fusion® HD Cloning Plus kit (Takara Bio USA) following the manufacturer's instructions. The generated constructs were sequenced as described above and then used to transform the Y2HGold yeast strain as described in the manufacturer's instructions (Takara Bio USA). To test the transactivation activity, yeast strains harboring the recombinant and empty plasmids were streaked on synthetic dropout (SD) medium (-Trp, -His, -Ade) or YPDA medium supplemented with 200 ng/mL aureobasidin A. We used the papaya ERF transcription factor CpERF7 as a positive control (Vallejo-Reyna *et al.*, 2015).

2.2.7 RT-qPCR

Total RNA extraction and cDNA synthesis from floating leaf discs treated with SA or MeJA hormones were performed as previously described. RT-qPCR was performed using Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix (Thermo Fisher Scientific) and specific primers for the *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* genes (Table S1). The cycling conditions were 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 57 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. Banana Ma25S gene expression was used as an internal standard (Van den Berg *et al.*, 2007) to normalize the expression of the banana WRKY genes, and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [43] was used to calculate the relative gene expression. In addition, specific primers for the banana MaDLO1 (Tzean *et al.*, 2021) and MaLOX1 (Zhao *et al.*, 2013) genes were used in the RT-qPCR assays as controls (Table S1). Three biological replicates (each one with three technical replicates) and two experimental repetitions were performed for statistical analysis. RT-qPCR was carried out using the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

2.3 RESULTS

2.3.1 Structural and phylogenetic analysis of the *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* genes

BLASTP searches revealed that the best banana sequence hits to OsWRKY45 and AtWRKY70 were GSMUA_Achr5P07490 (E value = 1.78e-032) and GSMUA_Achr1P27980 (E value = 2.98e-25), respectively, whereas the best BLASTP hits for banana GSMUA_Achr3P13440 and GSMUA_Achr7P05200 in the *Arabidopsis* proteome were AtWRKY18 (E value = 1.81e-56) and AtWRKY60 (E value = 1.76e-58), respectively (Table 2.1). The CDSs of the four banana WRKY cDNAs ranged from 828 (*MaWRKY18*) to 933 bp (*MaWRKY70*) in length (Table 2.3) (Figures 2.6-2.9).

Table 2.3. Relevant features of *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* cDNAs and their deduced proteins.

Gene name	Genbank accession number of cDNAs	CDS length (bp)	3'UTR length (bp)	Number of Exon/Intron	Chromosome location No.	Protein length (aa)	Domains	kDa	pI	Subcellular location
<i>MaWRKY18</i>	OP186309	828	148	4/3	3	275	WRKY	30.31	6.61	Nucleus
<i>MaWRKY45</i>	OP186310	888	434	3/2	5	295	WRKY	32.36	5.34	Nucleus
<i>MaWRKY60</i>	OP186311	843	392	4/3	7	280	WRKY	30.66	8.80	Nucleus
<i>MaWRKY70</i>	OP186312	933	169	3/2	1	310	WRKY	34.52	5.54	Nucleus

MaWRKY18 and *MaWRKY60* contained the highest numbers of exons and introns, with 4 and 3, respectively, while *MaWRKY45* and *MaWRKY70* contained the lowest numbers of exons and introns, with 3 and 2, respectively (Figure 1a). The 3' UTR lengths varied from 148 (*MaWRKY18*) to 434 (*MaWRKY45*) bp. The amino acid sequence lengths ranged from 275 (*MaWRKY18*) to 310 (*MaWRKY70*) (Table 2.3), while the protein sequence similarities among them ranged from 16% (*MaWRKY60* vs. *MaWRKY70*) to 67.9% (*MaWRKY18* vs. *MaWRKY60*) (Table 2.4). The deduced amino acid sequences of the four *MaWRKY* cDNAs revealed the presence of the conserved WRKY domain of ~60 amino acids (Figures 2.1b and 2.2), which comprises the canonical WRKYGQK and zinc-finger motifs. Based on the number of WRKY repeats and the structure of the zinc-finger motif (Chen *et al.*, 2019), *MaWRKY18* and *MaWRKY60* were determined to belong to group II, while *MaWRKY45* and *MaWRKY70* were classified as members of group III. Moreover, the four banana WRKY proteins had a potential nuclear localization signal

(NLS) at the N-terminus near the WRKY domain (Figure 1b). We also found potential phosphorylation sites in the four protein sequences (Figure 2.1b). All proteins except MaWRKY45 had posttranslational sites (PTSs) for myristoylation (Figure 2.1b). Glycosylation sites were also found for MaWRKY18 and MaWRKY45 proteins (Figure 2.1b).

Table 2.4. Amino acid sequence similarity (%) between banana MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60, MaWRKY70 and their respective putative homologous in Arabidopsis and rice.

WRKY Proteins	MaWRKY1 8	MaWRKY4 5	MaWRKY6 0	MaWRKY7 0	AtWRKY1 8	OsWRKY4 5	AtWRKY6 0	AtWRKY7 0
MaWRKY1 8		27.5	67.9	23.0	50.6*	15.2	29.8	15.7
MaWRKY4 5	...		19.5	21.0	17.5	25.5*	18.2	20.3
MaWRKY6 0	...	...		16.0	35.3	14.7	28.8*	14.0
MaWRKY7 0	...	...	...		16.0	24.8	14.2	22.3*
AtWRKY18	...	...	...	...		14.5	46.8	16.0
OsWRKY45	...	...	...	...	...		13.5	22.8
AtWRKY60	...	...	...	...	...	...		14.7
AtWRKY70	...	...	...	...	...	...	...	

*Stands for % similarity between banana TF and their respective equivalents in Arabidopsis and rice.

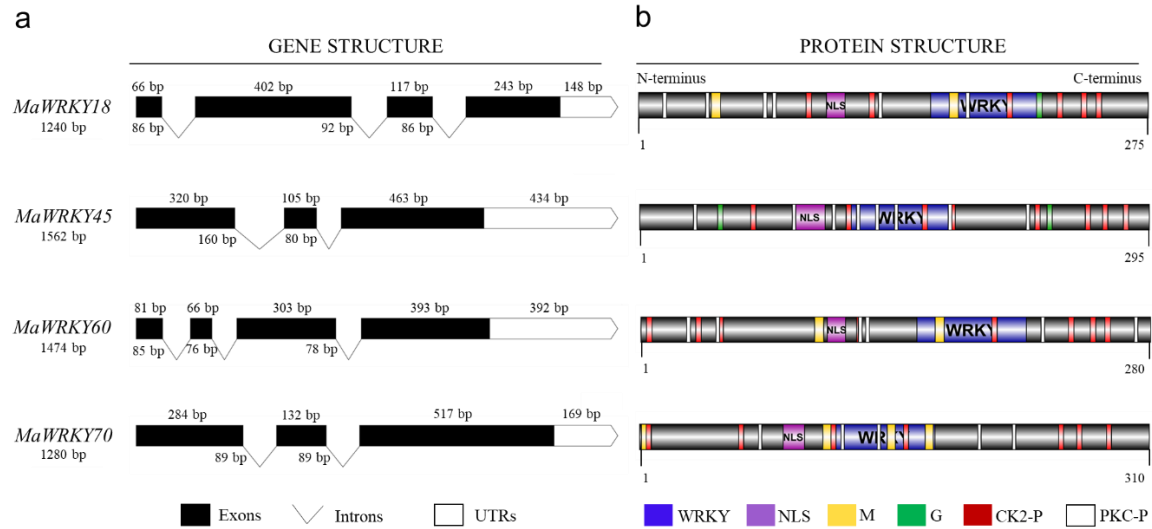


Figure 2.1. Schematic representation of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 cDNAs and their protein sequence structures. **(a)** Exon/intron and 3' UTR composition. **(b)** Protein domains and posttranslational modification predictions. UTRs, untranslated regions; NLS, nuclear localization signal; WRKY, WRKY domain; M, myristoylation; G, glycosylation; CK2-P, CK2-phosphosites; PKC-P, PKC-phosphosite.

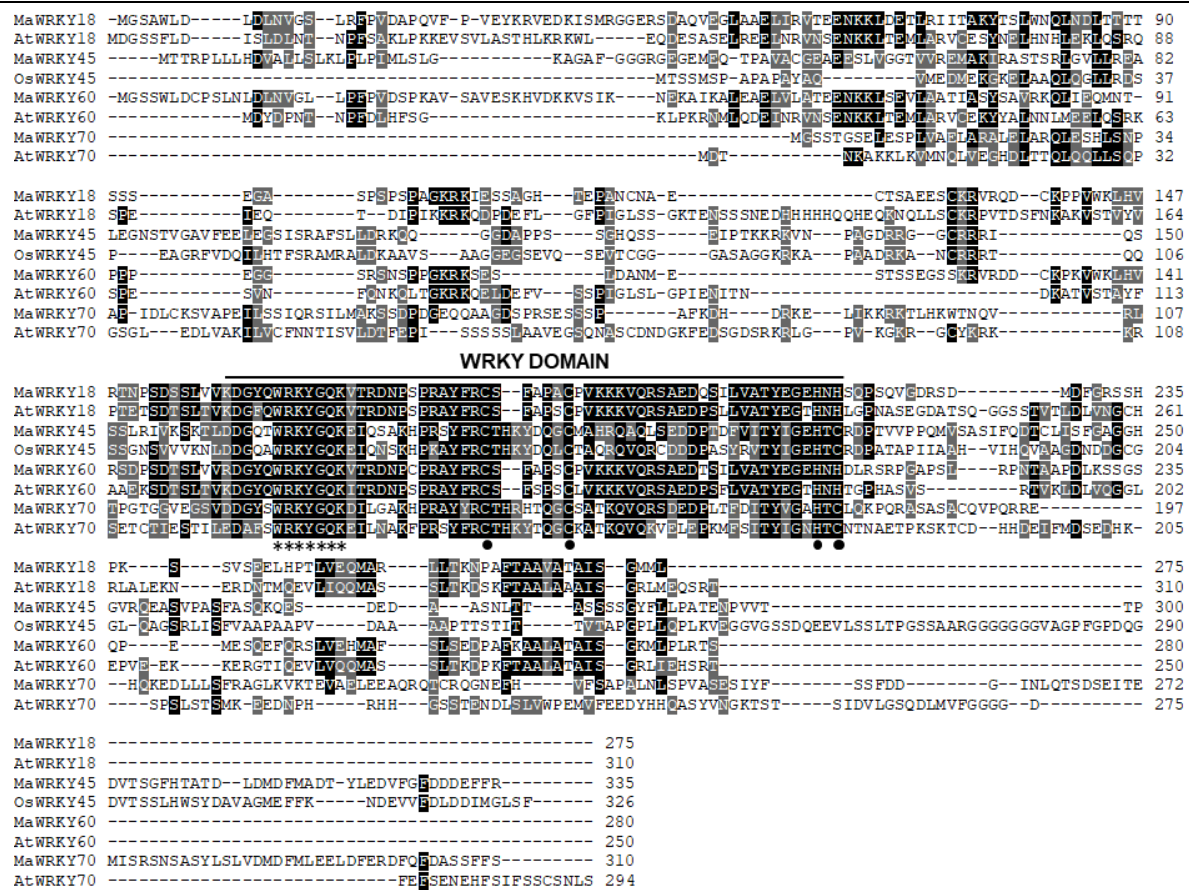


Figure 2.2. Multiple sequence alignment of the proteins MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60, MaWRKY70 and their homologs from rice and Arabidopsis. Identical and similar amino acids are shaded in black and gray, respectively. The amino acids of the WRKY domain are highlighted with asterisks and black circles, respectively.

The 3D models of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 (Figure 2.3) showed four antiparallel β -sheets comprising the WRKY DNA-binding domain similar to the WRKY domain of the *Arabidopsis* AtWRKY1 protein (Duan *et al.*, 2007). The phylogenetic tree (Figure 2.4) revealed that MaWRKY18 and MaWRKY60 clustered in clade IIa along with AtWRKY18 and AtWRKY60, while MaWRKY45 and MaWRKY70 clustered in clade III, with their homologs OsWRKY45 and AtWRKY70.

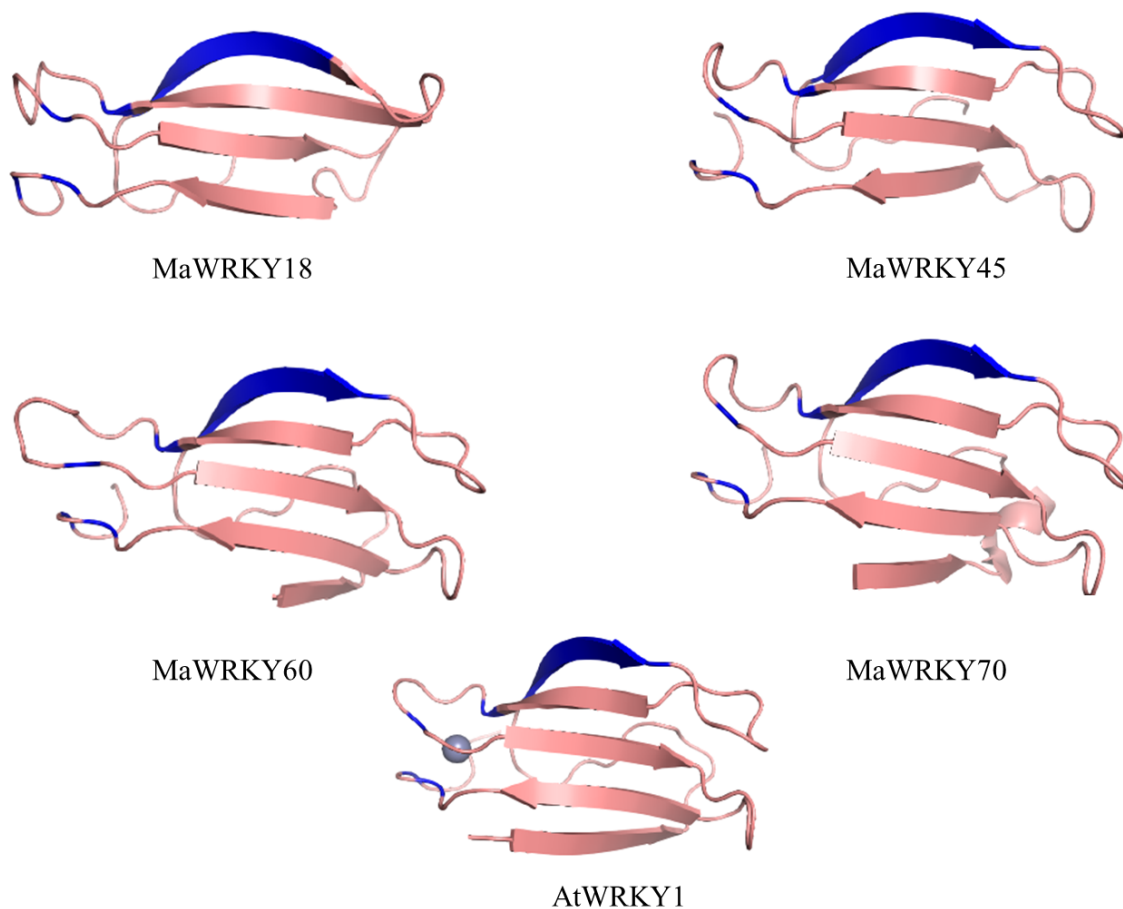


Figure 2.3. 3D ribbon cartoon view of the WRKY domain of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70. The WRKYGQK beta-sheets and the zinc-finger motifs are shown in blue. The zinc ion is presented for the *Arabidopsis* AtWRKY1 3D model (PDB accession code 2AYD).

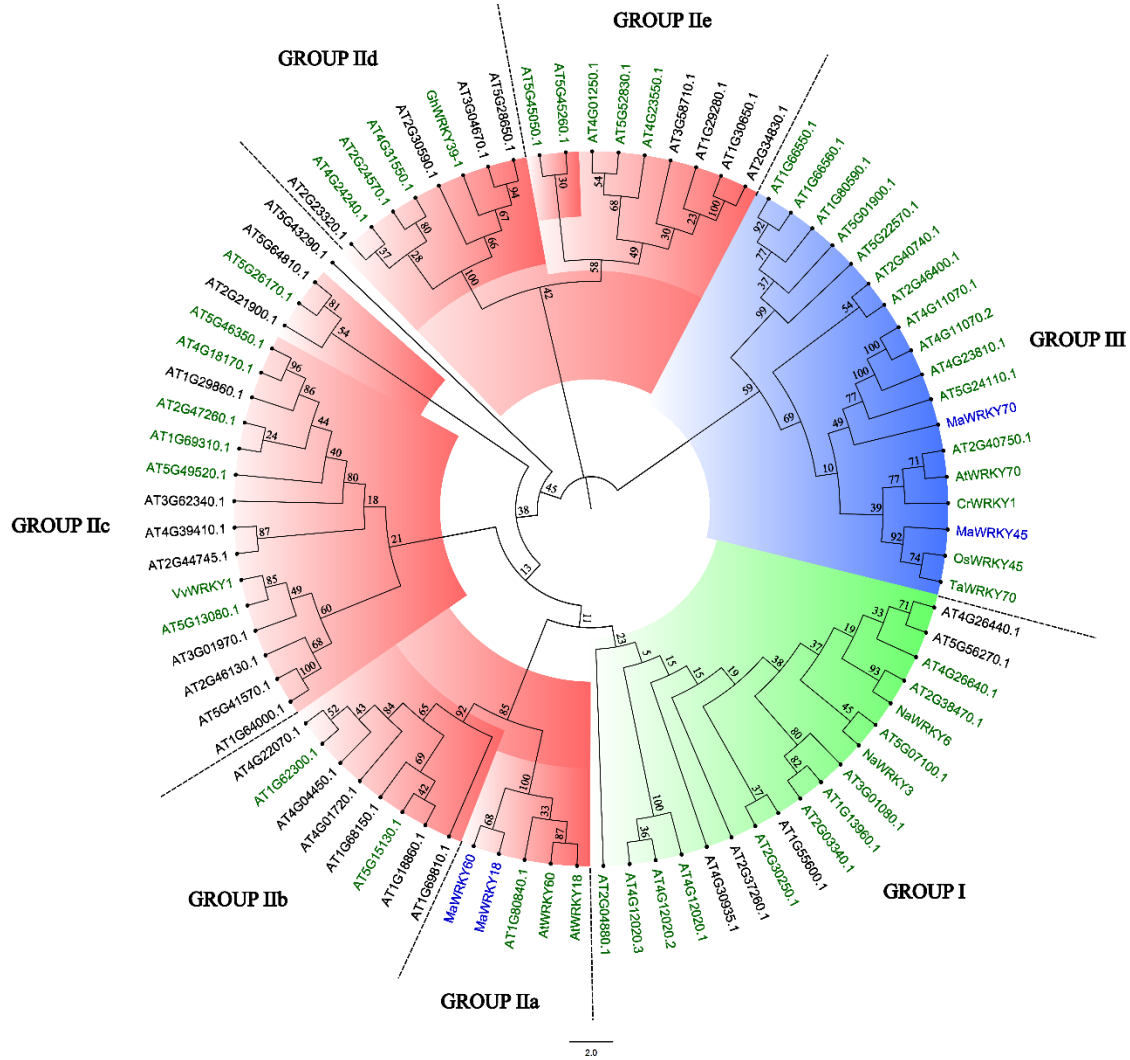


Figure 2.4. Neighbor-joining phylogenetic tree of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 TFs, including the complete set of Arabidopsis WRKY TFs and other plant WRKY TFs with known functions. Groups I, II and III of the WRKY TF family are highlighted in green, red and blue, respectively. WRKY TFs with green names are involved in biotic stress responses. MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 are highlighted in blue. Numbers above branches are bootstrap values supporting the nodes based on 1000 bootstrap replications.

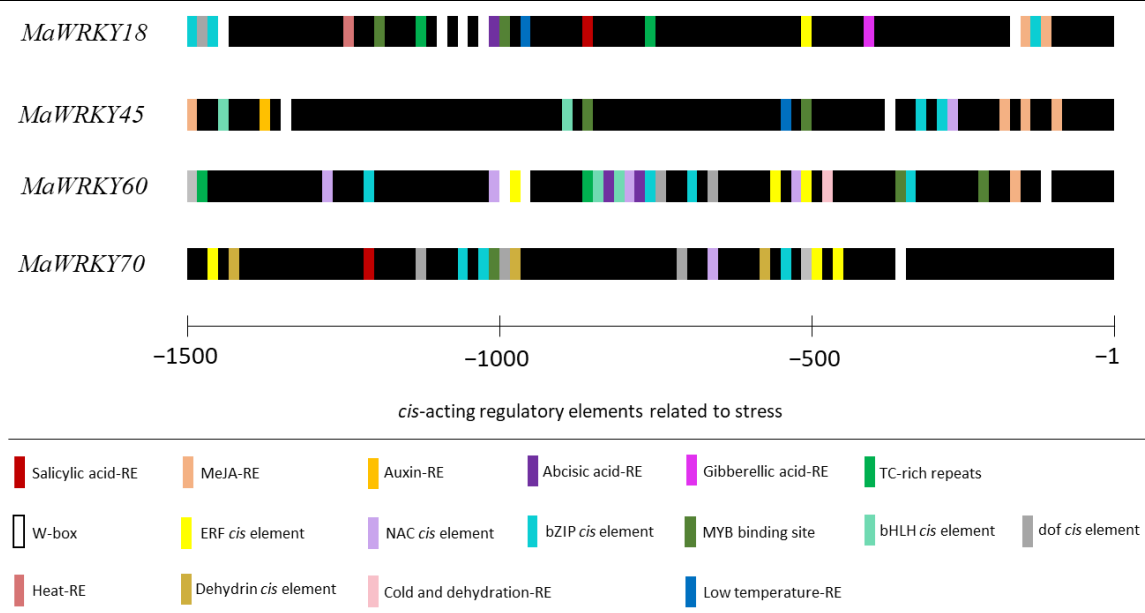


Figure 2.5. Predicted *cis*-acting regulatory elements in the promoter regions of *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70*. A region of 1,500 bp upstream of the ATG start codon of each gene was used for the prediction of *cis*-acting regulatory elements. Bars with different colors represent the predicted *cis*-acting regulatory elements.

The promoter regions (1,500 bp upstream of the start codon) of *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* contained potential *cis*-acting regulatory elements (Figure 2.5). The four promoters contained potential hormone-responsive elements, such as SA, MeJA, auxin, abscisic acid, and gibberellic acid. The MeJA-responsive element was found in the promoter regions of *MaWRKY18*, *MaWRKY45* and *MaWRKY60*. *MaWRKY45* had the highest number of MeJA-responsive elements, with four. Single SA-responsive elements were found in the promoter regions of *MaWRKY18* and *MaWRKY70*. All four gene promoters also had W-boxes, which are the sequences recognized by WRKY TFs. *MaWRKY18* and *MaWRKY60* had the highest numbers of W-boxes, with five and three, respectively, while *MaWRKY45* had two and *MaWRKY70* had only one. Other TF-responsive elements, such as NAC, ERF, MYB, bZIP, dof and bHLH, were also present in the four promoters (Figure 2.5). Moreover, *cis*-acting regulatory elements involved in heat, cold or dehydration responses were found in the promoter regions of the four banana WRKY genes, suggesting their roles in the cross-talk between abiotic and biotic stress responses.

MaWRKY18

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	W	R	165
496	AAG	TAT	GGT	CAG	AAG	GTG	ACA	AGA	GAC	AAC	CCC	TCT	CCA	AGA	GCT	540
166	K	Y	G	Q	K	V	T	R	D	N	P	S	P	R	A	180
541	TAC	TTC	CGG	TGC	TCC	TTC	GCG	CCT	GCC	TGC	CCG	GTG	AAG	AAG	AAG	585
181	Y	F	R	C	S	F	A	P	A	C	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	H	N	H	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	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	*										276
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 A

976

Figure 2.6. Partial cDNA sequence of *MaWRKY18* translated to amino acid sequence. The CDS of 828 bp was translated to one-letter code amino acid. The 148 bp of the 3' UTR was included. WRKY domain was highlighted with grey colour, WRKYGQK motif was blue coloured and the main amino acids of the zinc-finger motif were red coloured. Putative NLS residues were orange colored.

MaWRKY45

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	W	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	C	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	C	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	H	T	180
541	TGC	AGG	GAT	CCA	ACC	GTG	GTG	CCT	CCT	CAG	ATG	GTC	TCT	GCT	TCC	585
181	C	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	AAT	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	*					296
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	TA										1319

Figure 2.7. Partial cDNA sequence of *MaWRKY45* translated to amino acid sequence. The CDS of 888 bp was translated to one-letter code amino acid. The 434 bp of the 3' UTR was included. WRKY domain was highlighted with grey colour, WRKYGQK motif was blue coloured and the main amino acids of the zinc-finger motif were red coloured. Putative NLS residues were orange colored.

MaWRKY60

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	W	R	K	Y	G	Q	K	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	C	P	R	A	Y	F	R	C	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	H	N	H	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	*					281
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 TA	1235

Figure 2.8. Partial cDNA sequence of *MaWRKY60* translated to amino acid sequence. The CDS of 843 bp was translated to one-letter code amino acid. The 392 bp of the 3' UTR was included. WRKY domain was highlighted with grey colour, WRKYGQK motif was blue coloured and the main amino acids of the zinc-finger motif were red coloured. Putative NLS residues were orange colored.

MaWRKY70

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	W	R	K	Y	G	Q	K	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	C	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	C	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	H	T	C	L	Q	180
541	AAG	CCA	CAG	CGA	GCC	TCG	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	*					311
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	A								1102

Figure 2.9. Partial cDNA sequence of *MaWRKY70* translated to amino acid sequence. The CDS of 933 bp was translated to one-letter code amino acid. The 169 bp of the 3' UTR was included. WRKY domain was highlighted with grey colour, WRKYGQK motif was blue coloured and the main amino acids of the zinc-finger motif were red coloured. Putative NLS residues were orange colored.

2.3.2 Subcellular localization of MaWRK18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70

As previously described, the four banana WRKY proteins were predicted to be located within the nucleus. To confirm whether these proteins were indeed localized in the nucleus of the cell, their coding sequences were fused in-frame to the GFP gene and transiently expressed in onion epidermal cells. We confirmed that these four MaWRKY proteins were localized inside the nucleus (Figure 2.10), indicating that these four MaWRKY proteins have roles in this cellular compartment.

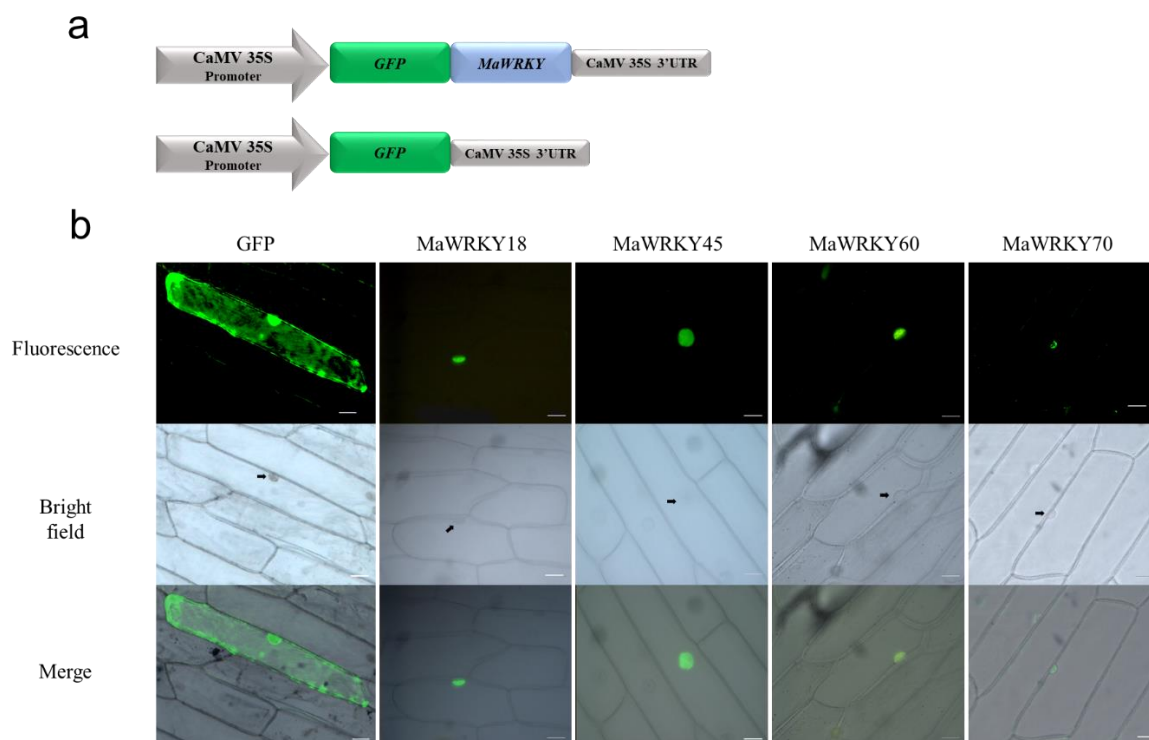


Figure 2.10. Subcellular localization of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 proteins in onion epidermal cells. (a) Schematic representation of the expression cassettes used for the transient expression analyses. Gene expression is regulated by the CaMV 35S promoter and terminator present in the pAVA121 vector (Von Arnim *et al.*, 1998). (b) The fluorescence of GFP fused with the MaWRKY proteins is localized in the nucleus, whereas the fluorescence of GFP alone used as a control is present in both the cytoplasm and nucleus. Scale bars: 5 μ m.

2.3.3 Transactivation activity of MaWRK18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 transcription factors

We carried out a yeast one-hybrid assay to test the *in vivo* transactivation activity of the MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 proteins. The cDNA coding sequences of these four *MaWRKYs* were fused in-frame to the GAL4 DNA-binding domain (Figure 2.11a), resulting in fusion proteins capable of activating the transcription of three independent reporter genes (*AUR1-C*, *ADE2*, and *HIS3*) and promoting the growth of the Y2HGold yeast strain in either SD minimal medium (-Trp, -His, -Ade) or YPDA medium supplemented with the highly toxic drug aureobasidin A (Figure 2.11c). The two negative controls used in the yeast one-hybrid assay did not grow on YPDA medium supplemented with aureobasidin A or SD (-Trp, -His, -Ade) minimal medium, whereas the positive control CpERF7 did grow (Figure 2.11c). These results indicated

that these MaWRKY proteins were functional TFs capable of positively regulating the transcription process in yeast.

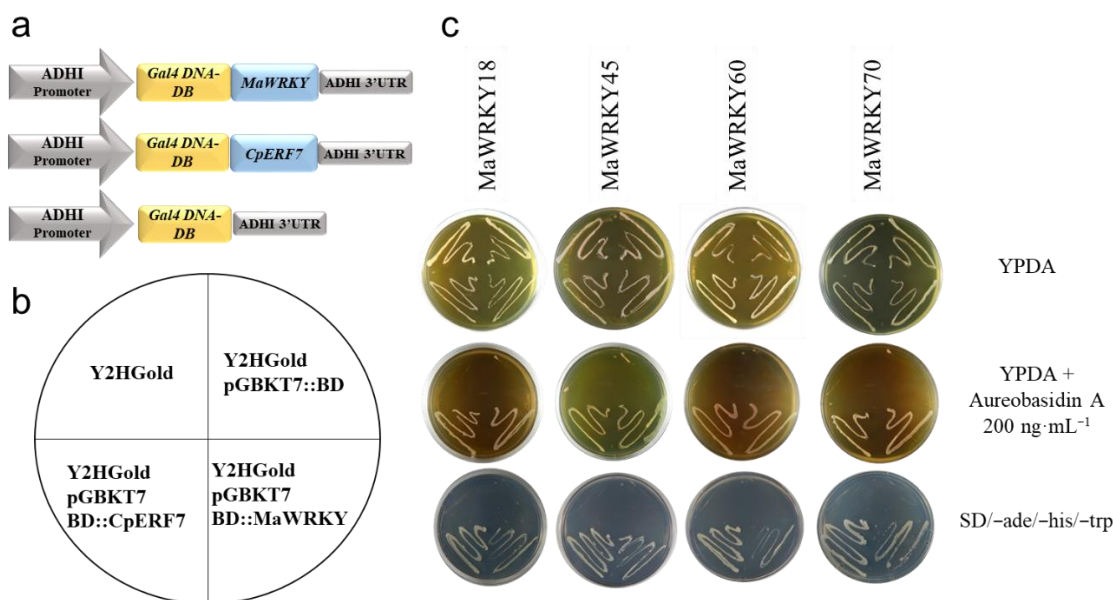


Figure 2.11. Transactivation activity analysis of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 in Y2HGold yeast. (a) Schematic representation of the expression cassettes used for the transient expression analyses. Gene expression is regulated by the *ADH1* promoter and terminator present in the pGBKT7 vector. (b) The diagram shows the order in which the yeast strains were plated. (c) Yeast strains transformed with MaWRKYs fused with Gal4 DNA-BD were grown in YPDA or YPDA supplemented with aureobasidin A or SD minimal medium (-Trp, -His, -Ade). The Gal4 DNA BD::CpERF7 construct (Vallejo-Reyna *et al.*, 2015) was used as a positive control in this assay.

2.3.4 Expression profiles of the MaWRK18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 genes in response to phytohormone treatments

To determine whether the *MaWRK18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* genes were responsive to phytohormones involved in plant defense signaling pathways, we performed an RT-qPCR analysis to measure their transcript levels when exposed to exogenous SA or MeJA after 6 h. The four genes were responsive to SA (Figure 2.12). The expression levels of *MaWRKY45* and *MaWRKY60* increased above 2-fold, while *MaWRKY18* expression increased 1.7-fold. In the case of *MaWRKY70*, its expression decreased by 5-fold. The expression of the SAR marker *MaDLO1* increased significantly by 655-fold. The transcript levels in MeJA-treated samples exhibited higher expression levels than in samples treated with SA. The transcription

levels of *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* increased significantly, with *MaWRKY60* being the most responsive gene to MeJA treatment, with a 52-fold increase, whereas the *MaWRKY18* gene was not responsive to MeJA. As an ISR marker, the *MaLOX1* gene was analyzed and showed a marked increase of 210-fold. These results suggest that the *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* genes may play roles in SA or MeJA defense signaling pathways.

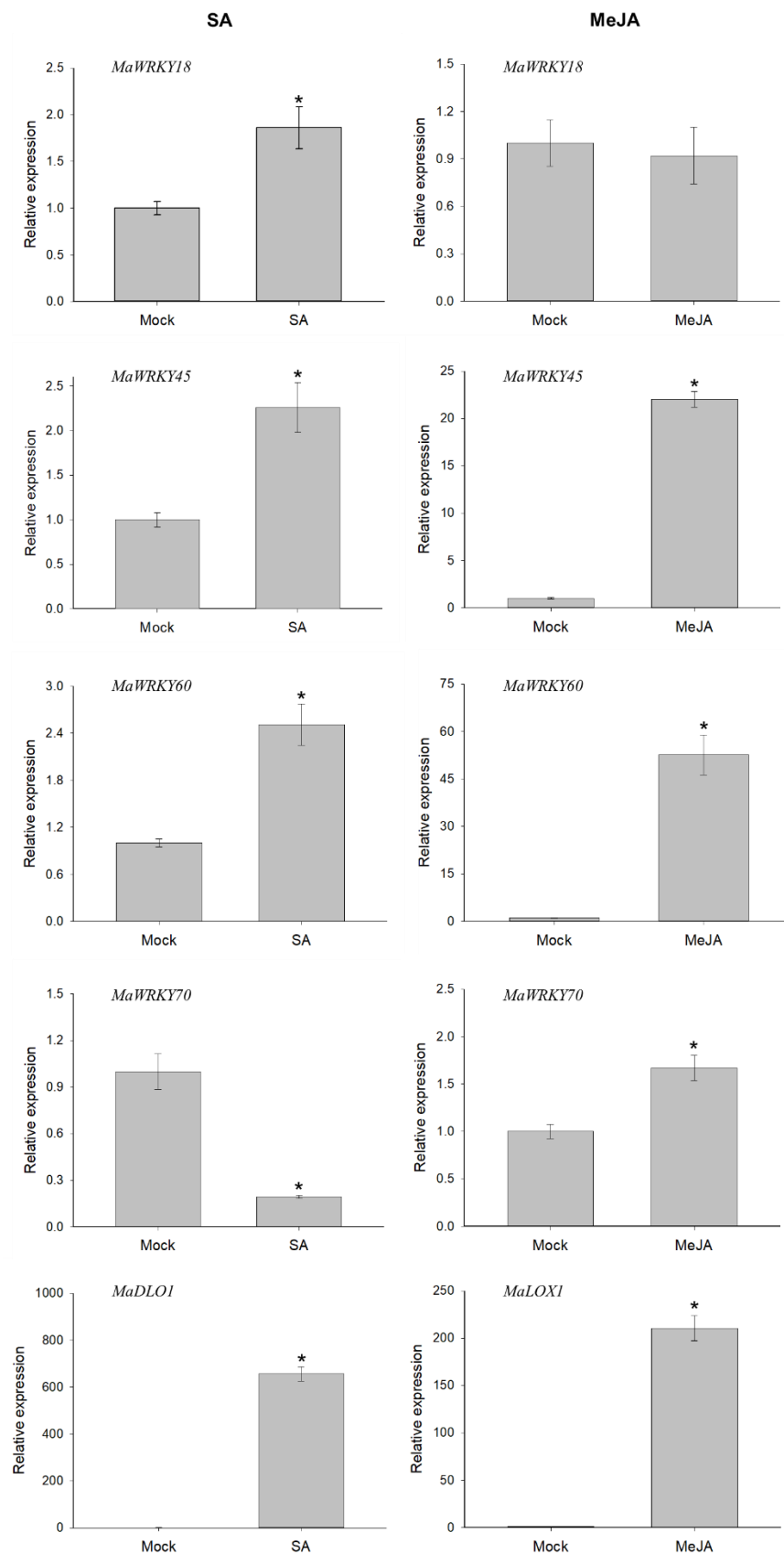


Figure 2.12. Transcription profiles of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70 genes in response to SA and MeJA phytohormones. A floating disc assay was performed in either SA (5 mM) or MeJA (100 μ M) phytohormones. The leaf discs were incubated for 6 h and collected for total RNA extraction. Gene expression was evaluated by quantitative real-time PCR. The banana 25S gene was used as a reference gene for RT-qPCR analysis. The *MaDLO1* and *MaLOX1* genes were used as SAR and ISR markers, respectively. The relative expression value was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Schmittgen and Livak, 2008). The mean $\pm$ S.D. of three biological replicates is presented. Asterisks indicate $p \leq 0.05$ (t test).

2.4 DISCUSSION

The *WRKY* genes are widespread in plant genomes, where they play a fundamental role in the transcriptional regulation of genes involved in growth, development and stress responses (Jiang *et al.*, 2017; He *et al.*, 2016). Annotation of *WRKY* genes in angiosperm plants has shown that they belong to a large gene family ranging from 38 to 287 members in *Genlisea aurea* and *Glycine max*, respectively (Tian *et al.*, 2020). Despite these advances in *WRKY* gene annotations, only a small percentage of them have been functionally characterized, mainly in the model plants *Arabidopsis* and rice. In the case of economically important fruit crops, such as banana, with 164 *WRKY* genes annotated (Jia *et al.*, 2022), only a few *WRKY* genes have been validated as TFs (Liu *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016). Cloning and elucidating the functional aspects of banana *WRKY* genes will expand our understanding of the multiple roles of these transcription factors and provide novel tools for genetic improvement.

OsWRKY45, AtWRKY18, AtWRKY60 and AtWRKY70 play pivotal roles in the resistance to fungal and bacterial pathogens (Shimono *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2004). Given the importance of these TFs in plant defense responses, in this study, we searched the banana genome for potential orthologs of these genes. The MaWRKY45 and MaWRKY70 proteins resulted in the best BLASTP hits using their counterparts from rice and *Arabidopsis* as queries, respectively. It has previously been shown that OsWRKY45 and AtWRKY70 are phylogenetically closely related (Nakayama *et al.*, 2013); interestingly, MaWRKY45 and MaWRKY70 also clustered in the same phylogenetic clade as OsWRKY45 and AtWRKY70, suggesting an evolutionary relationship and function in stress responses. In the case of MaWRKY18 and MaWRKY60, their best BLASTP hits were with AtWRKY18 and AtWRKY60 from *Arabidopsis*, respectively. They shared the features of the group IIa *WRKY* TFs and clustered with AtWRKY18 and AtWRKY60, which are phylogenetically closely related (Xu *et al.*, 2006), implying a possible orthology for MaWRKY18 and MaWRKY60.

We identified multiple potential phosphorylation sites in the protein sequences of MaWRKY18, MaWRKY45, MaWRKY60 and MaWRKY70, even at the core of *WRKY* domains, which indicates that the activity of these banana *WRKY*s might be modulated *via* phosphorylation. Numerous *WRKY* TFs have been shown to be phosphorylated by mitogen-activated protein kinases, leading to enhanced binding to W-box elements and transcriptional activity (Chen *et al.*, 2019). We also identified N-myristoylation sites for these banana *WRKY* proteins. The number of characterized myristoylated proteins in plants is still limited (Majeran *et al.*, 2018), and to our knowledge, no myristoylated *WRKY* TF has been experimentally validated. Analysis of the myristoylome in

Arabidopsis revealed that numerous membrane proteins involved in stress responses are myristoylated, suggesting that the myristoylome might function as a dynamic proteome in response to abiotic and biotic stresses (Majeran *et al.*, 2018). Moreover, myristoylation of the BASP1 protein is required for its function as a transcriptional repressor by binding to the Wilms' tumor 1 (WT1) transcription factor and other corepressor proteins (Toska *et al.*, 2012). By analogy, some myristoylated MaWRKY TFs could work in a similar manner. We also found NLS sites in all four banana WRKY proteins considered in this study and confirmed that these proteins were indeed localized in the nuclei of onion epidermal cells. These results are consistent with the nuclear localization of other plant WRKY TFs, including the banana WRKYs reported thus far (Liu *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016; Shekhawat *et al.*, 2011). Furthermore, we demonstrated that these four banana WRKYs were functional transcription factors in yeast since all of them were capable of activating RNA polymerase II for the transcription of three marker genes. Less than 5% of the WRKY genes found in the banana genome have been experimentally validated as TFs, and most of them are from the cultivar Cavendish (Liu *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016); this is the first report that assessed the transactivation activity of WRKY proteins from a wild banana (*M. acuminata* ssp. *malaccensis*), which is resistant to the most destructive diseases of this crop and is a progenitor of most banana cultivars (D'Hont *et al.*, 2012).

Numerous putative cis-acting regulatory elements related to defense phytohormones were found in the promoter regions of all four banana *WRKY* genes, including SA and MeJA, which are two key phytohormones involved in SAR and ISR, respectively (Vlot *et al.*, 2021). *MaWRKY18*, *MaWRKY45* and *MaWRKY60* were upregulated in response to SA. This is in agreement with the expression profiles of *AtWRKY18*, *OsWRKY45* and *AtWRKY60*, which were also upregulated by SA (Huangfu *et al.*, 2017; Shimono *et al.*, 2007; Chen and Chen, 2002). However, *MaWRKY70* was downregulated by SA, in contrast to *AtWRKY70*, which has been shown to be upregulated by this phytohormone (Li *et al.*, 2004). Regarding MeJA, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* were upregulated in response to this phytohormone, unlike *MaWRKY18*, which was not responsive to MeJA. Interestingly, both *MaWRKY18* and *MaWRKY60* were upregulated by the fungal pathogen *P. fijiensis* in susceptible banana accessions (D'Hont *et al.*, 2012). Taking into consideration that *MaWRKY18* was upregulated by SA and *MaWRKY60* by both SA and MeJA, it is plausible that both phytohormones play roles in the banana–*P. fijiensis* pathosystem. In the case of *Arabidopsis AtWRKY18* and *AtWRKY60*, it remains to be seen whether these TFs respond to MeJA. Previous reports have shown that *OsWRKY45* and *AtWRKY70* were

upregulated by MeJa (Huangfu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2004). These two TFs function as a convergent point of jasmonate- and salicylate-mediated signals in plant defense (Ye *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2004). Moreover, AtWRKY70 is regulated downstream of the master regulator of SAR, the cotranscription factor AtNPR1, while OsWRKY45 works independently of OsNPR1 (Ye *et al.*, 2016), indicating that although these two TFs are phylogenetically closely related and function downstream of SA, they respond differently to NPR1. Thus, a similar scenario may occur in MaWRKY45 and MaWRKY70. Moreover, the promoter regions of *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* contained W-boxes, suggesting that the expression of these banana WRKY genes could be either autoregulated or cross-regulated by other MaWRKYs, as previously reported (Chi *et al.*, 2013). W-boxes are ubiquitous in the promoter regions of stress-inducible genes (Dhatterwal *et al.*, 2019; Maleck *et al.*, 2000).

The fact that these four *MaWRKY* genes were responsive to phytohormones involved in SAR and ISR makes them interesting candidates for engineering broad-spectrum resistance in banana. Since constitutive overexpression of *WRKYs* can lead to adverse effects on agronomic traits (Shimono *et al.*, 2012; Shimono *et al.*, 2007; Chen and Chen, 2002), it is necessary to fine-tune their expression through a moderate constitutive or pathogen-inducible promoter to harness the full potential of *WRKY* genes for boosting the plant immune system without detrimental effects on growth and development. Promising advances in this direction have been made in rice with a moderate constitutive and pathogen-inducible promoter driving the expression of *OsWRKY45* [Goto *et al.*, 2016; Goto *et al.*, 2015]]. Therefore, the use of these types of promoters in banana for driving the expression of *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* and *MaWRKY70* may lead to triggering SAR or ISR, providing broad-spectrum resistance without affecting agronomic traits.

CAPITULO III

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE HOJAS DE *NICOTIANA BENTHAMIANA* QUE SOBREEXPRESAN AL GEN *MaWRKY45* DE PLÁTANO REVELA UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE MÚLTIPLES GENES DE DEFENSA

3.1 INTRODUCCIÓN

La decodificación del DNA es un proceso vital para el crecimiento, desarrollo e interacción de las plantas con su entorno. En este proceso los factores de transcripción (FTs) son proteínas que regulan la expresión espaciotemporal de los genes mediante el proceso de transcripción, razón por la que son imprescindibles en la expresión génica. Alrededor del 6-10 % de los genes codifican para FTs y más de 50 familias han sido reportadas en plantas (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014). Dentro de esta lista encontramos a las familias WRKY, AP2/ERF, bHLH, MADS, MYB, NAC, bZIP, MYB, NAC, HB y Dof que se caracterizan por tener miembros que participan en una multiplicidad de procesos biológicos incluyendo la respuesta al estrés biótico y abiótico (Hrmova y Hussain, 2021; Baillo *et al.*, 2019).

En la última década, se ha encontrado en plantas modelo (*Arabidopsis* y arroz) y de interés agronómico muchos FTs de la familia WRKY involucrados en la respuesta al estrés biótico, solo en *Arabidopsis* 44 de 74 genes WRKY (60 %) están involucrados en la respuesta al estrés biótico (García-laynes *et al.*, 2023). En arroz, OsWRKY45 es considerado como un regulador maestro de la defensa contra microorganismos biótrofos en la vía del ácido salicílico (AS) pero en una vía alterna a NPR1 homolog 1 (NHI) de arroz, su sobreexpresión confiere resistencia de amplio espectro contra *Magnoprote griseae* y *Xanthomonas oryzae* (Shimono *et al.*, 2012; Shimono *et al.*, 2007). Su homólogo en *Arabidopsis*, AtWRKY70, es dependiente de NPR1 y regula la comunicación cruzada entre la vía del AS y jasmonato (JA), su sobreexpresión aumenta notablemente la resistencia contra *Pseudomonas syringae* patovar tomato DC3000 (Li *et al.*, 2004). Sin embargo, existe un limitado conocimiento concerniente a los genes diana que se regulan corriente abajo de la activación de un FT.

El plátano es un producto de la canasta básica para más de 400 millones de personas en las regiones tropicales de África y Asia y una fuente de ingresos para miles de agricultores que sostienen la industria de plátano en Latinoamérica. Sin embargo, enfermedades de origen fúngico como la Sigatoka negra y el mal de Panamá, causados por *Pseudocercospora fijiensis* y

Fusarium oxysporum spp. cubence raza 4 respectivamente, son la principal amenaza de la seguridad alimentaria y la industria del plátano. No obstante, a pesar de que hay 164 genes anotados de la familia WRKY en plátano (Jia *et al.*, 2022), se han realizado pocos estudios de la caracterización funcional de estos factores de transcripción. D'Hont y colaboradores (2012) realizaron un análisis transcriptómico de interacción entre variedades susceptibles y resistentes contra *P. fijiensis*. Se identificaron a los genes **MaWRKY18**, **MaWRKY40** y **MaWRKY60** regulados positivamente en las variedades susceptibles. Sus homólogos en *Arabidopsis* y en cebada regulan positivamente la defensa contra microorganismos necrótrofos y negativamente regulan la respuesta contra microorganismos biótros (Chang *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2006). Por otro lado, Kaliyappan y colaboradores (2013) realizaron un estudio transcriptómico comparativo de una variedad susceptible y una variedad resistente de plátano contra el nemátodo *Pratylenchus coffeae* en el que identificaron a los genes *MaWRKY52*, *MaWRKY69* y *MaWRKY92* inducidos específicamente por este nematodo, lo cuales muy probablemente están involucrados en el mecanismo de defensa de plátano. Tomado en consideración la relevancia que tiene el gen *WRKY45* en el sistema inmune de plantas monocotiledóneas y al hecho que este gen resultó responsivo a las fitohormonas de defensa SA y JA (García-Laynes *et al.* 2022), en el presente estudio decidimos ampliar el conocimiento entorno a este gen de plátano para lo cual establecimos el objetivo de caracterizar la dinámica transcripcional corriente abajo de la sobreexpresión del gen *MaWRKY45* en hojas de la planta modelo *Nicotiana benthamiana*. Para cumplir con este objetivo se utilizó la tecnología de Infiltración-RNAseq (Infiltration RNASeq) publicada recientemente (Bond *et al.*, 2016) para evaluar el cambio en el perfil transcriptómico generado por la sobreexpresión de un FT. Por consiguiente, se transformó transitoriamente hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración para sobreexpresar la región codificante del gen *MaWRKY45* y se realizó un ensayo de RNAseq. Nuestros resultados sugieren que el gen *MaWRKY45* directa y/o indirectamente es capaz de dirigir la expresión de múltiples genes de defensa contra el estrés biótico y que modula la expresión de una variedad de FTs de diferentes familias, hechos que podrían explicar porque los FTs tienen un papel clave en la respuesta de las plantas contra el estrés biótico. Estos resultados tienen múltiples implicaciones para utilizar al gen *MaWRKY45* en programas de mejoramiento genético de plátano utilizando promotores inducibles o de expresión moderada.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material biológico

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* de cinco semanas de edad crecidas en turba de esfagno estéril en condiciones de fotoperiodo (10 h luz/ 14 h oscuridad) con una intensidad lumínica de 80–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura de 24 ° C. Para el proceso de agroinfiltración se usó la cepa *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Se usó la cepa DH10B de *Escherichia coli* para la generación del vector de expresión.

3.2.2 Agroinfiltración

El CDS del gen *MaWRKY45* fue amplificado por PCR con la Taq polimerasa de Expand Long Template PCR System (Roche, Basel, Switzerland) y subclonado en el vector de expresión pCAMBIA2200 bajo la regulación del promotor 35S y el terminador NOS. La clonación fue verificada por digestión enzimática y por secuenciación con el método de Sanger (Macrogen Inc. Seoul, República de Corea). Células de *A. tumefaciens* LBA4404 fueron transformadas por choque térmico con la construcción pCAMBIA2200::*MaWRKY45* y con el vector vacío pCAMBIA2200 por separado. Para preparar las células de *A. tumefaciens* para la infiltración se siguieron las instrucciones de Norkunas *et al.*, 2018 ajustando la OD₆₀₀ a 1. Se infiltraron dos hojas intermedias (hojas tercera y cuarta con respecto a la hoja más joven) de plantas de *N. benthamiana* de cinco semanas de edad con las construcciones pCAMBIA2200::*MaWRKY45* y con el vector vacío pCAMBIA2200. Se realizaron tres réplicas biológicas independientes. Después de tres días las hojas agroinfiltradas fueron colectadas y guardadas a -80 ° C.

3.2.3 Extracción de RNA total y preparación del cDNA para secuenciación

El RNA total de hojas agroinfiltradas fue aislado a partir de 100 mg de tejido empleando el estuche comercial RNeasy Plant Minikit y siguiendo las instrucciones del proveedor (QIAGEN, Aarhus, Denmark). El RNA fue fraccionado en un gel de agarosa al 1.5 % y teñido con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 3.1). La pureza y la concentración del RNA fueron analizadas en un espectrofotómetro (NanoDrop™ Lite Thermo Scientific™) (Tabla 3.1). Las muestras se mandaron a Macrogen Inc. (Seoul, República de Corea) para su secuenciación. La integridad del RNA se analizó mediante la tecnología de Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer. Se construyeron tres

bibliotecas de cDNA por muestra (vector vacío y sobreexpresión de *MaWRKY45*) para un total de seis bibliotecas las cuales se prepararon usando el estuche comercial TruSeq Stranded mRNA Library Prep y siguiendo las recomendaciones del fabricante (IlluminaR, USA). Las seis bibliotecas de cDNA se secuenciaron con la plataforma Illumina NovaSeq6000 generando lecturas de 100 pb de longitud modo de lectura desde ambos extremos (pair-end read). La calidad de las lecturas/ficheros crudos se verificó mediante un análisis FASTQC (Simons, 2010).

3.2.4 Ensamblado *de novo* del transcriptoma y anotación funcional

Se utilizó el programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) para remover la secuencia de los adaptadores de Illumina y lecturas menores de 36 pb. Las lecturas por encima del valor de Phred Quality Score mayor que 20 ($Q > 20$) fueron consideradas de buena calidad para el ensamblado. Las lecturas curadas de cada muestra fueron fusionadas en un mismo archivo para generar una referencia combinada. El ensamblado *de novo* a partir de los datos combinados se generó mediante el programa Trinity (Grabherr *et al.*, 2011) con los parámetros preestablecidos. Para el ensamblado de genes, el contig de mayor longitud de los contigs ensamblados son filtrados y clasificados como transcritos no redundantes utilizando el programa CD-HIT-EST (Li y Godzik, 2006). Estos transcritos fueron definidos como “Unigenes” los cuales se utilizaron para la predicción de ORFs (Open Reading frames) mediante el programa TransDecoder (v3.0.1) (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>). Las lecturas curadas fueron alineadas al ensamblado de referencia con el programa Bowtie2 (v2.2.6) (Langmead y Salzberg, 2012).

Para la anotación funcional de todos los unigenes, las secuencias se alinearon mediante BLAST contra las bases de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) v20220103 (Kanehisa *et al.*, 2016) (<http://www.genome.jp/kegg/ko.html>), NCBI Nucleotide (NT) v20180116 (O’leary *et al.*, 2016) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), Pfam v20160316 (Mistry *et al.*, 2021) (<https://pfam.xfam.org/>), Gene ontology (GO) v20180319 (Ashburner *et al.*, 2000) (<http://www.geneontology.org/>), NCBI non-redundant Protein (NR) v20180503 (Pruitt *et al.*, 2007) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), UniProt v20180116 (UniProt, 2023) (<http://www.uniprot.org/>) y EggNOG veggno4 (Hernández-Plaza *et al.*, 2023) (<http://eggnogdb.embl.de/>) usando BLASTN del National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST y BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) del programa DIAMOND (Buchfink *et al.*, 2015) con un valor de corte E-value de $1.0E-5$.

3.2.5 Análisis de genes expresados diferencialmente (DEGs)

La abundancia de unigenes en cada una de las muestras fue estimada como número de lecturas (read count) como una medida de la expresión por el algoritmo RSEM (Li y Dewey, 2011). El análisis de DEGs se realizó a partir de un total de seis muestras comparando los datos de tres muestras control y tres muestras tratamiento (pCAMBIA2200 vs pCAMBIA2200::MaWRKY45). Para las seis muestras, si hubo más de un conteo de lectura con valor de cero este fue excluido de los análisis estadísticos. Se utilizó el paquete DESeq2 (Love *et al.*, 2012) R para la identificación de DEGs. Los DEGs fueron identificados cuando cumplieran con los valores de fold change (FC) ≥ 2 para genes regulados positivamente y regulados negativamente con un FDR (False Discovery Rate) de $p < 0.05$. Los valores fueron ajustados con el método de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995). Un análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA) se realizó a partir de los DEGs con el software en línea ShinyGO v0.77 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) utilizando como referencia el genoma de *Nicotiana tabacum* (Edwards *et al.*, 2017) y con un punto de corte de FDR 0.05. Los gráficos de mapas de calor se generaron utilizando la herramienta de TBtools (<https://bio.tools/tbtools>). La búsqueda de DEGs responsivos a diferentes tipos de estrés biótico (bacterias, hongos, virus, fitohormonas) se realizó mediante minería de datos usando palabras claves en la base de datos de Gene Ontology previamente generada para la anotación funcional de los genes.

3.2.6 Validación de los DEGs por PCR cuantitativa en tiempo real

Para la extracción de RNA total se utilizó el mismo material foliar de *N. benthamiana* empleado para el ensayo de RNAseq. Se realizó la síntesis de cDNA a partir de 1 μ g de RNA total con la transcriptasa reversa III SuperScriptTM (Thermofisher). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar 10 DEGs candidatos y el gen de referencia tubulina. La RT-qPCR se realizó en la termocicladora StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). El programa utilizado fue 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 10 s, 57 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. La expresión relativa se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen y Livak, 2008). Tres réplicas biológicas (con tres réplicas técnicas cada una) se realizaron para los análisis estadísticos. El experimento se repitió con resultados similares. Para evaluar las diferencias significativas entre los genes candidatos se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análisis transcriptómico de hojas de *N. benthamiana* que sobreexpresan al gen *MaWRKY45* de plátano

Para explorar los mecanismos moleculares que se desencadenan corriente abajo de la activación de un FT, en este trabajo el CDS del gen *MaWRKY45* de plátano (Figura 3.1) (García-Laynes *et al.*, 2022) fue sobreexpresado transitoriamente (3 días), en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración, para posteriormente secuenciar por RNAseq. Esta técnica es conocida como infiltration-RNAseq (Bond *et al.*, 2016) y es efectiva para evaluar la funcionalidad de FTs en un tiempo corto. El RNA total cumplió con los estándares de calidad requeridos para el ensayo por RNAseq (Figura 3.2). Los análisis estadísticos de correlación entre las muestras demuestran que hay uniformidad y consistencia en las réplicas biológicas (Figura 3.3). Después de filtrar los datos transcriptómicos cada muestra generó un promedio de 50 Gb de datos. El valor Q30 de los datos curados fue mayor de 95.52 % y de Q20 mayor que 98.74 % (Tabla 3.1). El porcentaje del índice de mapeo de las lecturas curadas fue de ~60 %. Se predijeron 22,137 unigenes en todas las muestras (Tabla 3.2). Se identificaron un total de 2473 genes diferencialmente expresados (DEGs), de los cuales 1092 DEGs presentaron una regulación positiva mientras que la mayoría presentaron una regulación negativa de su expresión con 1381 genes. Basados en el agrupamiento por jerarquías, se determinó que las seis muestras se clasificaron en dos grupos distinguibles (Figura 3.4).

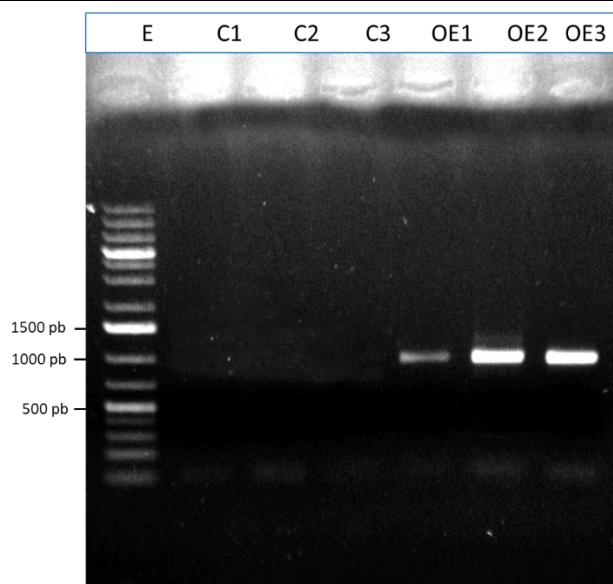


Figura 3.1. Amplificación por PCR del CDS de *MaWRKY45* en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. Se aisló el RNA total de todas las replicas biológicas de *N. benthamiana*, se sintetizó cDNA y se realizaron reacciones de PCR con oligos específicos para detectar el CDS del gen de plátano *MaWRKY45* (888 pb de longitud). Carriles C1-C3 pertenecen a las tres réplicas control (mock), carriles OE1- OE3 pertenecen a las tres réplicas biológicas que sobreexpresan el gen *MaWRKY45*.

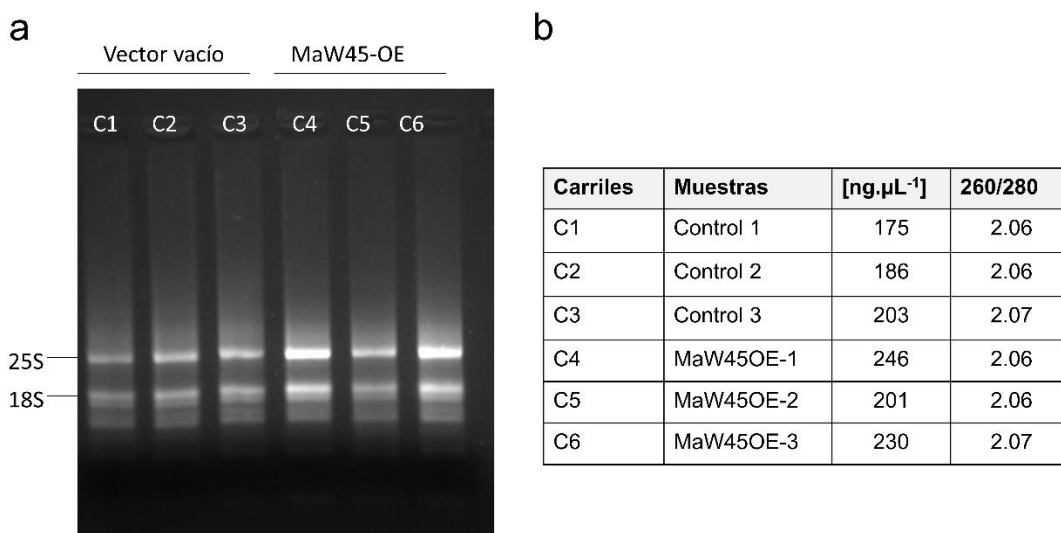


Figura 3.2. Análisis de la integridad y pureza del RNA total. **a)** 500 ng de RNA total de tres réplicas biológicas control (C1-C3) y tres réplicas biológicas con la construcción de expresión de *MaWRKY45* (C4-C6) fueron fraccionadas en un gel de agarosa al 1.5 % y teñidas con bromuro de etidio. **b)** La concentración y la pureza fueron cuantificadas en un espectrofotómetro.

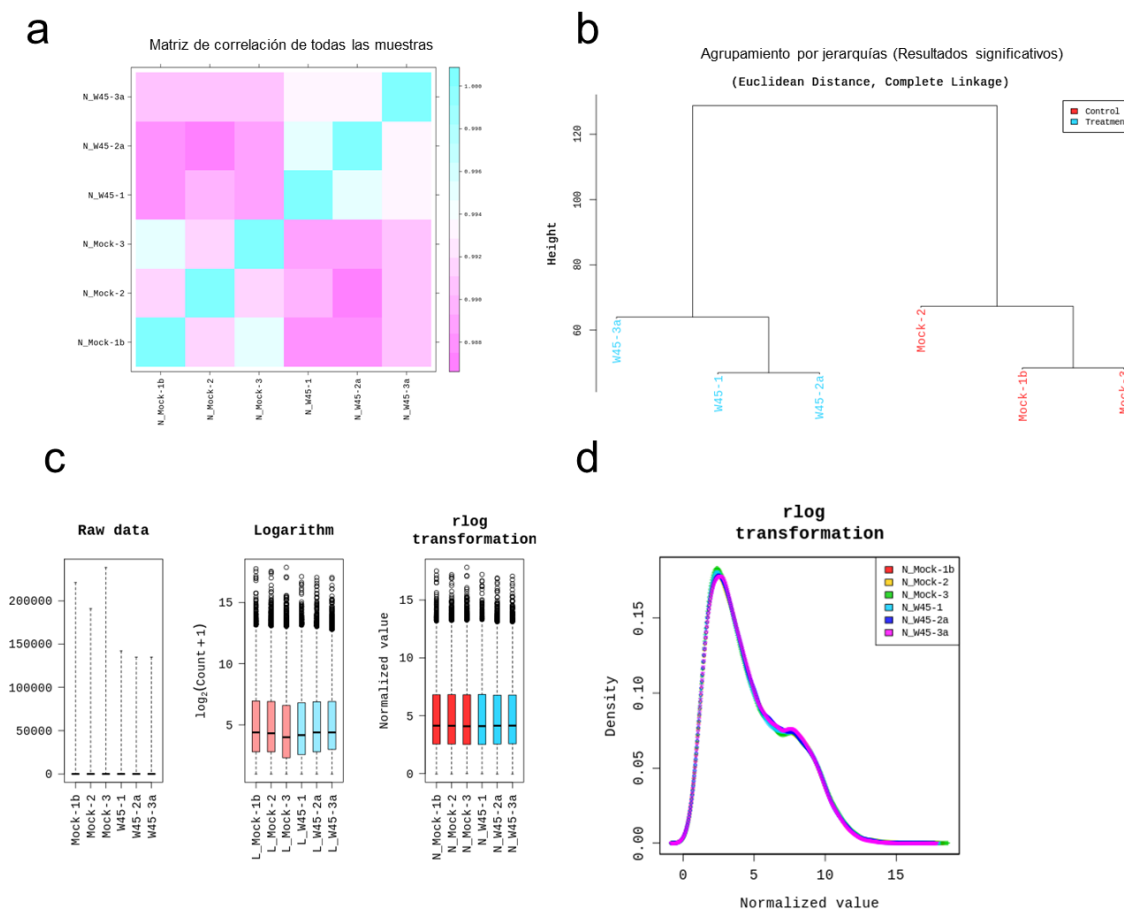


Figura 3.3. Análisis de expresión después de 3 días de agroinfiltrar muestras con el vector vacío y sobreexpresando al CDS de MaWRKY45. a) Análisis de correlación entre muestras. Donde, el eje de la X y Y representan cada muestra. El color representa el coeficiente de correlación (el color más oscuro indica una mayor correlación). b) Agrupamiento por jerarquías entre muestras. Las muestras más cercanas indican niveles de expresión similares. c) Gráfico de caja (Boxplot) de la expresión génica. El eje de las X representa el nombre de la muestra. El eje de las Y representa el valor log10FPKM. d) Mapa de densidad de la expresión génica. El eje de las X representa el valor log10FPKM. El eje de las Y representa la densidad de genes.

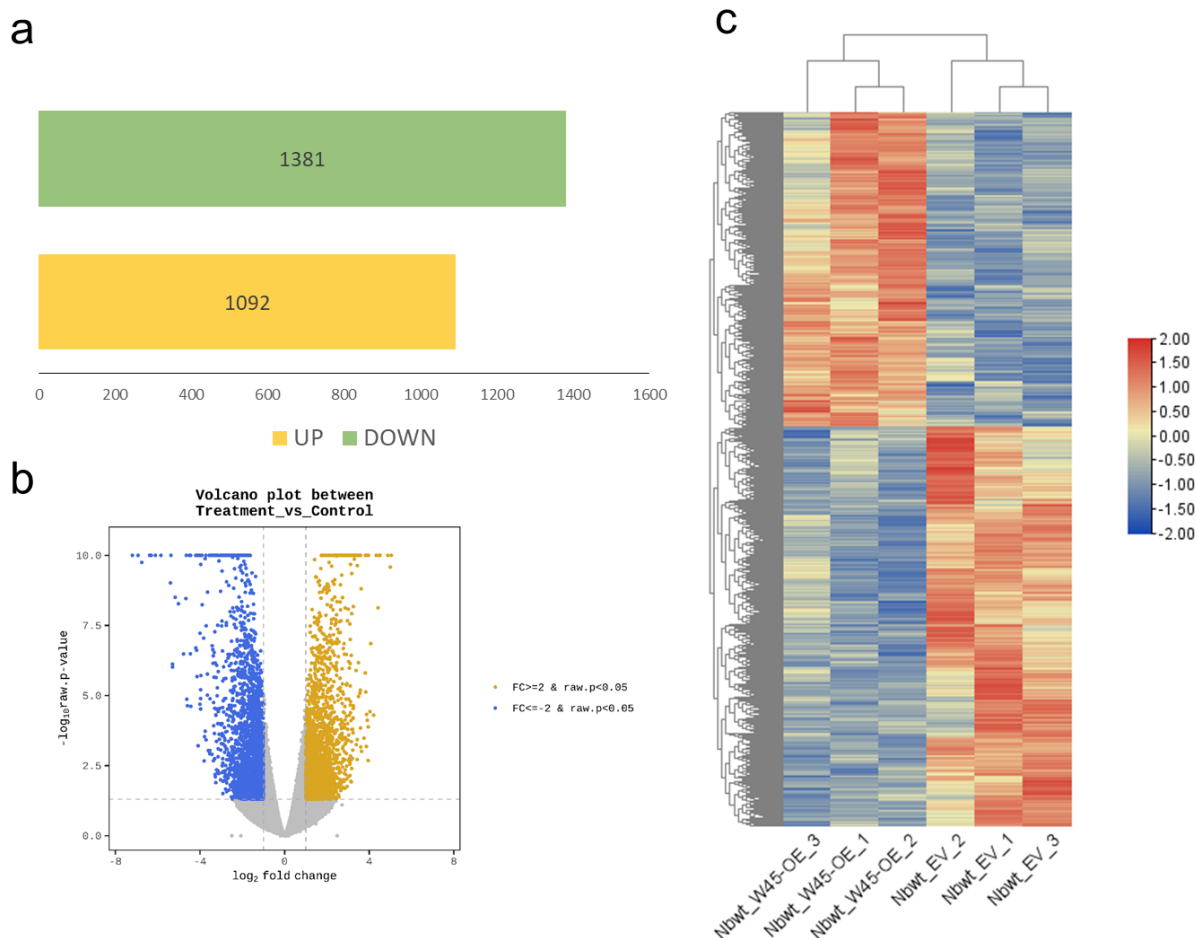


Figura 3.4. Identificación de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en las hojas de *N. benthamiana* que sobreexpresan al gen *MaWRKY45*. a) 2473 DEGs fueron identificados, 1092 regulados positivamente y 1381 regulados negativamente. b) Diagrama de dispersión de $-\log_{10}(p)$ (en el eje vertical) en función de $\log_2$ fold change (eje horizontal). c) Agrupamiento jerárquico de una vía (one-way) de los DEGs usando z-score como valor de normalización. Los 2473 DEGs surgen de la comparación de las tres réplicas del control (EV 1-3) contra las tres réplicas biológicas de la muestra (W45-OE-1-3), los colores rojo y azul del heatmap representan expresión a la alza y a la baja respectivamente.

Tabla 3.1. Estadística de datos curados del RNAseq.

Muestra	# lecturas	GC %	Q20(%)	Q30(%)	# lecturas mapeadas
Control 1	55,172,720	42.42	98.86	95.92	33,096,048 (59.99%)
Control 2	55,770,394	43.13	98.84	95.79	32,833,156 (58.87%)
Control 3	45,366,776	42.50	98.74	95.52	27,811,088 (61.3%)
MaWRKY45 OE-1	48,964,020	42.63	98.81	95.76	29,466,854 (60.18%)
MaWRKY45 OE-2	52,367,310	42.48	98.74	95.57	31,507,486 (60.17%)
MaWRKY45 OE-3	49,668,180	42.23	98.76	95.59	29,540,364 (59.48%)

Tabla 3.2. Estadísticas de la predicción de ORF.

Ensamblado	Unigenes totales	ORF predichos en unigenes	Unicos ORF predichos en unigenes	Múltiples predicciones de ORF en unigenes
De novo (merge)	167,935	24,853 (14.8%)	22,137 (89.07%)	2,716 (10.93%)

3.3.4 Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA)

Para tener una mejor comprensión de los procesos biológicos y las funciones moleculares más activas en *N. benthamiana* como consecuencia de la sobreexpresión del gen *MaWRKY45*, se realizó un análisis de enriquecimiento de conjunto de genes en (Figura 3.5) la plataforma en línea ShinyGO. De un total de 2473 DEGs identificados, el 24 % tuvieron identificadores GO, a partir de este porcentaje de genes se realizó el análisis de enriquecimiento. Los procesos biológicos enriquecidos fueron, regulación negativa de los procesos de organismos multicelulares (básicamente esta categoría contiene “GO terms” relacionados al rompimiento de la dormancia de las semillas) y ubiquitinación de proteínas. También se encontraron procesos biológicos involucrados en la respuesta al estrés como fosforilación de proteínas, respuesta a estímulo hormonal, respuesta a estímulos endógenos, respuesta a lípidos, respuesta a compuestos que contienen oxígeno y regulación del proceso de transcripción del DNA a RNA entre otros. Por otro lado, las funciones moleculares más enriquecidas fueron de unión a isoprenoides, alta actividad

de la RNA polimerasa II y de FTs de unión al DNA. También se encontraron funciones moleculares enriquecidas como actividad de receptor de señalización, actividad de transducción de señales, actividad de fosfotransferasa, actividad catalítica y de unión a ATP.

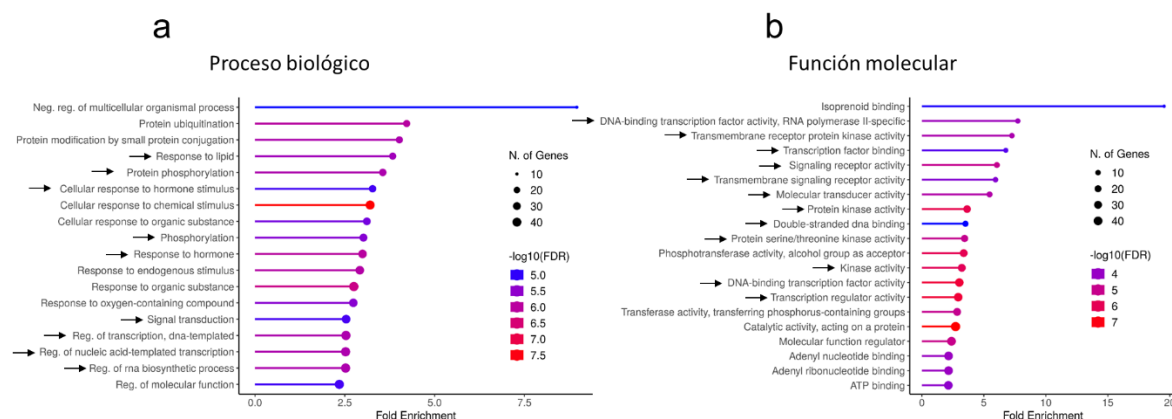


Figura 3.5. Análisis de enriquecimiento de conjunto de genes. Se realizó un GSEA en la plataforma ShinyGO utilizando los ortólogos de los DEGs de *Nicotiana tabacum*. Los procesos biológicos (a) y las funciones moleculares (b) enriquecidas se muestran en este gráfico. Las longitudes de las líneas representan el fold enrichment, los tamaños de los círculos en los extremos de las líneas representan el número de genes y los colores resaltan el valor de FDR.

3.3.2 Identificación y anotación funcional de DEGs relacionados al estrés biótico

Se determinaron como DEGs los genes que cumplieron con un FC ≥ 2 y un valor $p < 0.05$ en los datos del control (vector vacío pCambia2200) contra los datos del tratamiento (sobreexpresión del cDNA *MaWRKY45*) (Figura 3.3). Se encontraron 2473 DEGs (1092 regulados positivamente y 1381 regulados negativamente). La anotación funcional se realizó como se describió previamente en la sección 3.2.4 de materiales y métodos. Los DEGs con los FC más altos fueron una hidrolasa putativa (Nudix hidrolase 2-like) con un FC de 33 (regulado positivamente) y una peroxidasa putativa (peroxidase 70-like) con un FC de -146 (regulado negativamente) (Tabla 3.3). A partir de la información obtenida de la minería de datos (búsqueda con palabras clave). Se identificaron 40 DEGs responsivos a bacterias de los cuales 13 fueron regulados positivamente y 27 regulados negativamente. En el caso de genes responsivos a hongos se detectaron 31 DEGs con 13 regulados positivamente y 18 regulados negativamente. Solo 10 genes responsivos a virus fueron detectados con 4 regulados positivamente y 6 regulados negativamente. En esta sección de DEGs responsivos a microorganismos patógenos se

detectaron FTs, receptores de tipo Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs) y Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase (LRR-RLK), genes con actividad antimicrobiana, genes que participan en la biosíntesis de metabolitos con actividad antimicrobiana y genes involucrados en la biosíntesis de cutícula y lignina (Figura 3.6), polímeros estructurales que son la primera línea de defensa de las plantas.

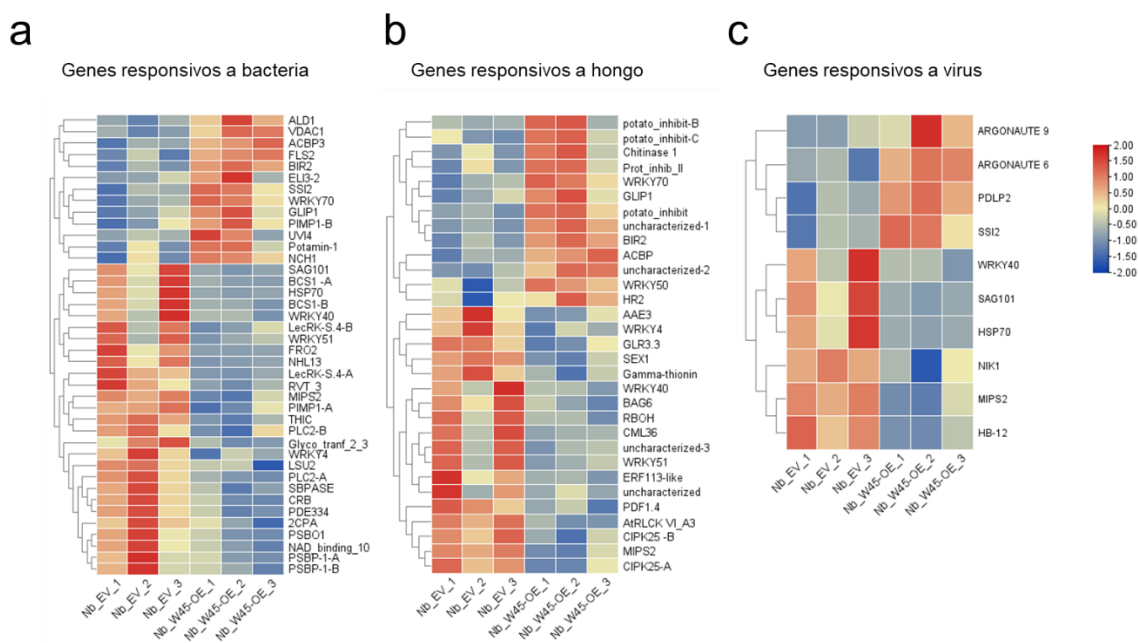


Figura 3.6. Genes diferencialmente expresados relacionados con la respuesta al estrés biótico. Escrutinio de DEGs anotados (GO terms) como responsivos a bacterias (a), hongos (b) y virus (c). Los datos fueron agrupados por jerarquías siguiendo el método de Euclidean (complete linkage) el cual organiza los datos por la similitud de los contigs y de las muestras por los datos normalizados de los niveles de expresión. Los colores en el mapa de calor representan incremento en la expresión (en rojo) y decremento de la expresión (en azul).

No obstante, también se realizó la búsqueda de DEGs responsivos a las fitohormonas de defensa ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (JA) (Figura 3.7). Se encontraron 23 DEGs responsivos a AS (12 regulados positivamente y 11 regulados negativamente) y 31 DEGs responsivos a JA (18 regulados positivamente y 13 regulados negativamente). Dentro de esta categoría se detectaron varios FTs de la familia MYB y WRKY, lo que sugiere un papel relevante de estos FTs en las vías de señalización gobernadas por las fitohormonas de defensa AS y JA. Además, se identificaron más genes responsivos a JA (18 genes) regulados positivamente en comparación con los DEGs responsivos a AS regulados positivamente. Es importante mencionar que no todas las réplicas

biológicas se comportan igual pero siguen una tendencia similar que permite clasificar la expresión a la alza y a la baja.

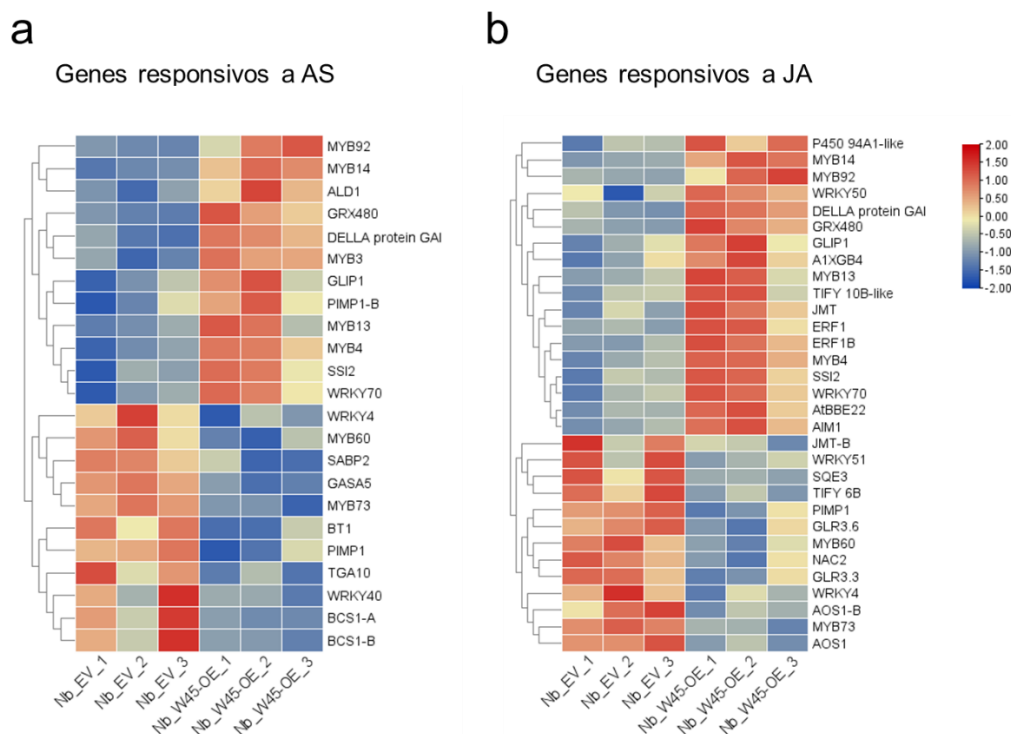


Figura 3.7. Genes diferencialmente expresados que responden a las fitohormonas AS (a) y JA (b). Los datos fueron agrupados por jerarquías siguiendo el método de Euclidean (complete linkage) el cual organiza los datos por la similitud de los contigs y de las muestras por los datos normalizados de los niveles de expresión. Los colores en el mapa de calor representan incremento en la expresión (en rojo) y decremento de la expresión (en azul).

Tabla 3.3. Genes diferencialmente expresados con los valores más altos de fold change. 60 genes con los valores más altos de fold change (30 regulados positivamente y 30 regulados negativamente) fueron representados.

No	Seq_ID	Gene	Protein activity	Subcellular Localization	Biological process	Fold_change
UP REGULATED GENES						
1	c86039_g1_i1	Nudix hydrolase 2-like	hydrolase activity	Cytoplasm	Response to oxidative stress	33.004058
2	c54821_g1_i1	Trypsin inhibitor 1-like	Peptidase activity	Extracellular	Defense response to fungus/response to wounding	31.889631
3	c98684_g2_i1	NRT1/ PTR FAMILY 7.3-like	transporter activity	Membrane	Response to nitrate	29.415224
4	c74390_g1_i1	Keratin, type I cytoskeletal 9-like	-	-	-	22.870795
5	c95394_g4_i4	Transcription repressor MYB5-like	Transcription factor activity	Nucleus	Seed germination/trichome differentiation	22.573151
6	c6266_g1_i1	MYB14	Transcription factor activity	Nucleus	cell differentiation/response to salt/response to freezing	22.053513
7	c82241_g2_i1	subtilisin-like protease SBT1.7	serine-type endopeptidase activity	Cell wall	-	21.327421
8	c121351_g1_i1	indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1	Ligase activity	Cytoplasm	Response to auxin	20.119373
9	c67623_g1_i2	Uncharacterized	-	-	-	18.476865
10	c88334_g2_i1	Cationic peroxidase 1-like	Peroxidase activity	Extracellular region	Response to oxidative stress	16.826092
11	c50214_g1_i1	Uncharacterized	-	-	-	16.374693
12	c98553_g2_i4	Microtubule-associated protein 70-5-like	Microtubule binding	Cytoplasm	Cell wall organization	15.663553
13	c76634_g2_i3	bHLH162-like	Transcription factor activity	Nucleus	-	15.615904
14	c99197_g1_i1	Beta-D-xylosidase 1-like	Xylan 1,4-beta-xylosidase activity	Cell wall	Xylan catabolic process	15.464113
15	c75853_g2_i1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase 2	Catalytic activity	Cytoplasm	Amino acid biogenesis	15.382905
16	c95261_g7_i4	Uncharacterized peptidase	Peptidase activity	-	-	15.288214
17	c84310_g1_i1	CONSTANS-LIKE 2-like	Transcription factor activity	Nucleus	Regulation of flower development	15.148669
18	c70942_g3_i1	Chaperone protein dnaJ 20	Folding	Chloroplast	-	15.036430
19	c93307_g26_i1	Probable disease resistance protein	-	-	-	14.722448
20	c89138_g2_i4	Probable serine/threonine-protein kinase WNK4	Protein serine/threonine kinase activity	Cytoplasm	Intracellular signal transduction	14.555279

21	c95764_g2_i1	Protein IQM3	Calmodulin binding	Cytoplasm/ Nucleus/Chloroplast	-	14.291853
22	c93342_g8_i1	Inositol 2-dehydrogenase-like	Oxidoreductase activity	-	Oxidation-reduction process	14.083394
23	c54440_g1_i1	Cation/H(+) antiporter 18-like	Proton antiporter activity	-	Regulation of pH	14.070267
24	c66466_g1_i1	histone H2B-like	-	-	-	12.445786
25	c89071_g1_i2	Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 20-like	Metal ion transport	Cytoplasm	Cellular transition metal ion homeostasis	12.078625
26	c2624_g2_i1	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 16	Hydrolase activity	Cell wall	Cell wall biogenesis	11.791959
27	c63510_g1_i1	Aluminum-activated malate transporter 2	Malate transmembrane transporter activity	Vacuole membrane		11.324505
28	c44491_g1_i1	F-box/kelch-repeat protein	Ubiquitin-protein transferase activity	-	Proteasomal catabolic process	11.232088
29	c50869_g1_i1	Uncharacterized	Integral component of mitochondria membrane	Mitochondria	Defense response to fungus	11.060097
30	c91935_g1_i1	Flavin-containing monooxygenase	monooxygenase activity	-	Oxidation-reduction process	10.846860
DOWN REGULATED GENES						
31	c22778_g2_i1	peroxidase 70-like	Peroxidase activity	Extracellular region	Response to oxidative stress	-146.692552
32	c79432_g1_i2	Calvin cycle protein CP12-2	Protein binding	Chloroplast	Reductive pentose-phosphate cycle	-121.782986
33	c22778_g1_i1	Cationic peroxidase 1-like	Peroxidase activity	Extracellular region	Response to oxidative stress	-83.490394
34	c91200_g1_i1	peroxidase 5-like	Peroxidase activity	Cell wall	Plant-type cell wall organization	-69.003335
35	c84135_g2_i1	MYB36	Transcription factor activity	nucleus	cell differentiation	-57.558788
36	c60482_g1_i1	Proline-rich extensin-like protein EPR1	-	-	-	-41.462491
37	c73290_g2_i1	Serine/threonine-protein kinase HT1-like	-	-	-	-39.447026
38	c151802_g1_i1	LTP_2	Lipid binding	Extracellular region	Lipid transport	-39.286353
39	c80309_g1_i4	Glutamate decarboxylase-like	Pyridoxal phosphate binding	Cytoplasm	Glutamate metabolic process	-36.037157
40	c94450_g1_i2	Patellin-4-like	Transporter activity	Nucleus/plasma membrane/cytoplasm	cell cycle	-27.429015
41	c75199_g1_i4	Vesicle transport protein GOT1B-like	Vesicle-mediated transport	Plasma membrane	Vesicle-mediated transport	-25.375719

42	c49131_g1_i2	Lipid-transfer protein-like protein	Lipid binding	Plasma membrane	Lipid transport	-24.182679
43	c91627_g2_i1	Putative germin-like protein 2-1	Oxalate decarboxylase activity	Cell wall	Oxalate metabolic process	-22.590016
44	c74581_g1_i1	Cysteine protease inhibitor 8-like	-	Vacuole	-	-21.546766
45	c92242_g1_i1	Putative two-component response regulator-like APRR6	-	-	-	-18.374051
46	c96280_g6_i1	Histone deacetylase 2-like	Histone deacetylase activity	Nucleus	Regulation of transcription	-18.083386
47	c29479_g2_i1	3-ketoacyl-CoA synthase 6-like	Integral component of membrane	Endoplasmic reticulum membrane	Fatty acid biosynthetic process	-17.883296
48	c94012_g4_i8	Uncharacterized	Integral component of membrane	Plasma membrane	Integral component of membrane	-17.003308
49	c137410_g1_i1	Stress-inducible protein TAS14-like	-	-	-	-16.975060
50	c100522_g5_i1	Amino acid permease 6-like	amino acid transmembrane transporter activity	Plasma membrane	Amino acid transmembrane transport	-16.533300
51	c97639_g2_i2	ABI five binding protein 2	Protein binding	Nucleus	response to water deprivation/ Signal transduction	-16.055005
52	c96544_g2_i3	Transmembrane 9 superfamily member 11-like	integral component of membrane	Plasma membrane	integral component of membrane	-16.048396
53	c94029_g1_i1	Vacuolar cation/proton exchanger 3-like	Calcium:cation antiporter activity	Vacuole	Cellular calcium ion homeostasis	-16.030373
54	c29831_g1_i1	Defensin-like protein 19	-	-	-	-15.675318
55	c97101_g1_i5	ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like	Transcription factor activity	Nucleus	water deprivation/salt	-15.653345
56	c136888_g1_i1	Protein LE25-like	-	-	Embryo development ending in seed dormancy/response to cold and water deprivation	-15.607630
57	c78801_g4_i1	Defensin-like protein 1	-	-	-	-14.977649
58	c96101_g1_i5	Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2-like	-	Nucleus	-	-13.794202
59	c87626_g1_i3	Uncharacterized	Beta-glucosidase activity	-	Response to salt stress	-13.195476
60	c91874_g1_i1	HB-12	Transcription factor activity	Nucleus	Response to virus, salt and water deprivation	-12.562572

3.3.3 Análisis de DEGs que codifican para factores de transcripción

La identificación de los FTs diferencialmente expresados se realizó a través de la búsqueda de dominios de unión al DNA en la base de datos de Pfam que generamos a partir de la información de los DEGs. Se identificaron 127 FTs diferencialmente expresados, 67 regulados positivamente y 60 negativamente (Figura 3.8 y 3.9). Los cinco genes con mayor expresión fueron MYB5, MYB14, bHLH162, bHLH120 y DELLA RGL1-Like, por otro lado, los cinco FTs más reprimidos fueron MYB36, ABI5, HB12 (Homeobox 12), ERF12 y HB7 (Homeobox 7). Las 10 familias de FTs con mayor número de DEGs fueron AP2/ERF (17 DEGs), WRKY (14 DEGs), MYB (11 DEGs), bHLH (8 DEGs), HB (6 DEGs), NAC (5 DEGs), C2H2 (4 DEGs), AGL (4 DEGs), MADS (3 DEGs) y NFY (2 DEGs) (Figura 3.10). Estos resultados nos brindan un panorama general de como el gen *MaWRKY45* coordina la dinámica transcripcional probablemente de manera directa e indirecta mediante la activación y represión de otros FTs amplificando así su alcance regulatorio.

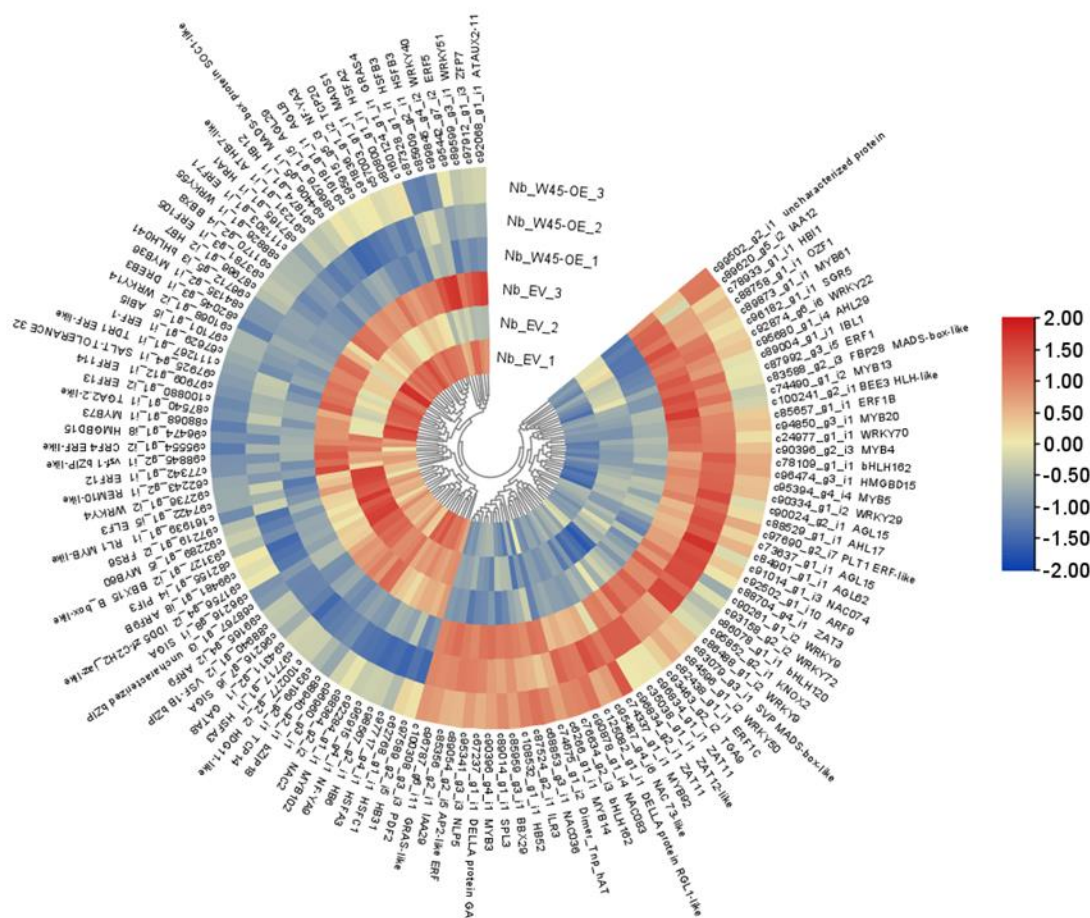


Figura 3.8. Análisis de 127 genes expresados diferencialmente que codifican para factores de transcripción. a) Agrupación jerárquica de 127 DEGs que codifican para diversos FTs de *N. benthamiana* de la comparación de las muestras control (EV 1-3) vs las muestras del tratamiento (W45-OE-1-3). b) Análisis de dispersión de los 127 FTs diferencialmente expresados. A los genes con mayor cambio en la expresión se les agregó un identificador.

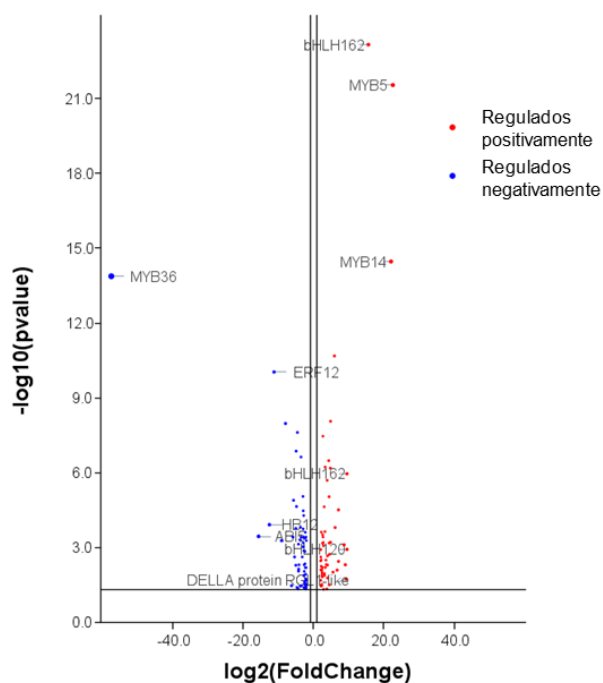


Figura 3.9. Análisis de dispersión de los 127 FTs diferencialmente expresados. A los genes con mayor cambio en la expresión se les agregó un identificador.

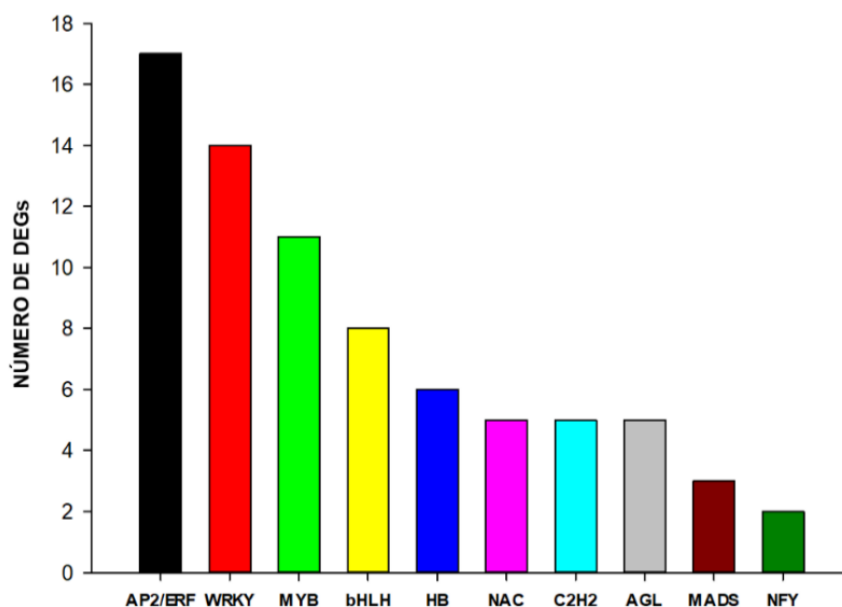


Figura 3.10. Distribución por familia de 127 FTs expresados diferencialmente en hojas de *N. benthamiana* que sobreexpresan a *MaWRKY45* de plátano. Las 10 familias con mayor número de miembros se representaron.

3.4 DISCUSIÓN

La expresión génica es un proceso vital para el crecimiento, desarrollo e interacción de las plantas con su entorno. Los factores de transcripción (FTs) juegan un papel importante en el proceso de transcripción de los genes. Estos coordinan de manera regulada la expresión espacio-temporal de los genes. La respuesta de las plantas contra el estrés biótico no es la excepción y en este sentido, muchos FTs han demostrado ser reguladores maestros como lo es la proteína NPR1 en la vía del SAR en plantas dicotiledóneas. El gen *MaWRKY45* de plátano es un FT de la familia WRKY que pertenece al grupo III y que es por AS y MeJA (García-Laynes *et al.*, 2022). Este gen es el posible homólogo de *OsWRKY45* de arroz, el cual ha demostrado ser un regulador de la defensa alterna a la vía del SAR e independiente de NHI (homólogo de NPR1). La sobreexpresión de *OsWRKY45* en arroz confiere resistencia de amplio espectro contra microorganismos biotrófos como *M. griseae* y *X. oryzae* (Shimono *et al.*, 2012). En este trabajo se sobreexpresó transitoriamente el CDS del gen *MaWRKY45* en hojas de *N. benthamiana* y se secuenció por RNAseq con el fin de tener un mejor entendimiento de los genes y los mecanismos moleculares que son activados corriente abajo por dicho FT.

Un total de 2473 DEGs fueron identificados de los cuales 1381 genes tuvieron una regulación positiva de la expresión y 1092 una regulación negativa. El análisis GSEA (análisis de enriquecimiento de conjunto de genes) revela múltiples procesos biológicos y funciones moleculares relativas a la respuesta de las plantas contra el estrés biótico y abiótico como lo son la fosforilación de proteínas, transducción de señales, respuesta a hormonas y estímulos químicos y una alta actividad del proceso de transcripción (Figura 3.5) (Martin *et al.*, 2010). Interesantemente los dos procesos biológicos enriquecidos fueron la regulación negativa de los procesos de organismos multicelulares (básicamente esta categoría contiene “GO terms” relacionados al rompimiento de la dormancia de las semillas) y el proceso de ubiquitinación de proteínas. Este último, está involucrado en el recambio proteico, consistente con la dinámica a la que se sujetan las plantas cuando hacen frente a un estrés (Winter *et al.*, 2021). La respuesta a lípidos, fue también uno de los procesos biológicos más activos, en este caso se detectaron genes involucrados en el metabolismo de lípidos para generar compuestos que funcionan como mensajeros químicos intracelulares y que participan en la biosíntesis de estructuras como la cutícula, pared celular y lignina como la citocromo P450 94A1 (CYP94A1) que tuvo una regulación positiva de su expresión (Figura 3.7) y se sabe que oxida ácidos grasos para la síntesis de cutina (Tijet *et al.*, 1998), principal componente de la cutícula. Por otro lado, ALD1

(AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN 1) que también tuvo una regulación positiva en la expresión (Figura 3.7), es una aminotransferasa indispensable para la acumulación de AS en la SAR e imprescindible para la resistencia de *Arabidopsis* contra *P. syringae*. ALD1 participa en la vía catabólica de la lisina para producir ácido pipecólico, que, en las plantas, es un importante regulador de la inmunidad que se acumula inmediatamente a la infección de un patógeno y está asociada al SAR, a la amplificación y memoria de la defensa de las plantas (Wang *et al.*, 2018; Návarová *et al.*, 2012). Con el fin de conocer mejor los DEGs involucrados en la respuesta contra el estrés biótico, nosotros realizamos una búsqueda de genes responsivos a bacterias, hongos y virus (Figura 3.6) mediante minería de datos. Dentro del repertorio de genes transcripcionalmente activos, encontramos FTs como WRKY70, que en *Arabidopsis* regula la comunicación cruzada entre las vías hormonales del AS y JA, su sobreexpresión favorece el SAR y su mutación favorece la ISR (Li *et al.*, 2004). Encontramos también a WRKY50 con expresión a la alza y cuyo homólogo en *Arabidopsis* está involucrado en la vía de la SAR activando la expresión de PR1 (Pathogenesis-related protein 1) además de que promueve la producción de ácido sinapínico, que tiene propiedades antioxidantes y antibacteriales (Hussain *et al.*, 2018). Por otro lado, los genes que codifican para FTs que se encontraron reprimidos en su expresión fueron WRKY4, que en *Arabidopsis* junto con WRKY3 son reguladores positivos de la resistencia contra microorganismos necrótrofos (Lai *et al.*, 2008). Se encontró también a la baja la expresión de WRKY51, que es un regulador positivo de la defensa en la vía del AS y un regulador negativo en la vía de señalización de JA (Gao *et al.*, 2011). También encontramos genes regulados positivamente que codifican para receptores transmembranales como FLS2 y PIMP1 que están involucrados la defensa mediante el reconocimiento de MAMPs (Hong *et al.*, 2008; Chinchilla *et al.*, 2006) y correceptores como BIR2 (Receptor-Like Kinase) que regula negativamente el PTI, pero regula positivamente la respuesta contra hongos (Halter *et al.*, 2014). Así mismo, identificamos genes a la alza que codifican péptidos con actividad antimicrobial como una quitinasa (CHITINASE 1) y GLIP1 (GDSL LIPASE1) que en *Arabidopsis* es un componente de las vías de defensa que actúa directamente sobre la pared celular de *Alternaria brassicicola* (Kim *et al.*, 2013) y en *Capsicum annuum* contribuye en la resistencia contra el estrés mecánico mediante la modulación de la expresión de *CaPR-4* (Kim *et al.*, 2008). Además, se identificaron genes regulados positivamente que codifican para una variedad de compuestos proteicos que están involucrados en la respuesta de defensa contra microorganismos patógenos como el caso de los genes *SSI2* que participa activamente en la respuesta contra bacterias, insectos y virus (Shah *et al.*, 2001); el gen *ACBP* que participa activamente en el metabolismo de lípidos para la formación de cutícula, mutantes del gen *ACBP* comprometen la resistencia contra hongos y

bacterias (Xia et al., 2012); el gen *HR2* está involucrado en la respuesta de defensa contra hongos y genera resistencia contra la enfermedad oídio (powdery mildew) (Xiao et al., 2004); el gen *VDAC1* que codifica para una proteína que forma parte de un canal iónico involucrada en la apoptosis celular en respuesta al estrés biótico (Godbole et al., 2003); el gen *ELI3-2* que codifica para una alcohol:NADP⁺ oxidoreductasa incrementa sus niveles de transcritos en respuesta a elicitores fúngicos en *Arabidopsis* (Trezza et al., 1993) y *Petroselinum crispum* (Somssich et al., 1989); el gen *Potamin-1* (inhibidor de proteasa tripsina-quimotripsina) en plantas es una proteína de almacenamiento con potente actividad antimicrobial capaz de inhibir el crecimiento de las cepas *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*, y *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (Kim et al., 2005). Se encontraron también, genes regulados positivamente que están involucrados en la respuesta al estrés contra herbívoros como Potato_inhibit-B, Potato_inhibit-C y Potato_inhibit (An et al., 1989). No obstante, se encontraron muy pocos DEGs responsivos a virus (10 DEGs) de los cuales solo cuatro mostraron un incremento en su expresión, estos son *ARGONAUTA-6* y *ARGONAUTA-9* que además de ser inducidos por la infección viral participan en los procesos relacionados al silenciamiento génico (Zhang et al., 2015), el gen *PDLP2* (Plasmodemata Located Proteins) que junto con *PDLP5* participan en el proceso inmune de *Arabidopsis* regulando la deposición de calosa (Caillaud et al., 2014) y el gen *SSI2* descrito previamente.

Se realizó también un análisis de los DEGs responsivos a las fitohormonas AS y JA (Figura 3.7) que modulan las respuestas a patógenos en las plantas. Interesantemente, la mayoría de los genes son FTs que pertenecen a la familia MYB y WRKY, por ejemplo, los genes MYB14 y MYB92 estimulan la producción de estilbeno (antimicrobial) y de suberina (antimicrobial y barrera de la pared celular) respectivamente (Luo et al., 2020; To et al., 2020). Además de que varios genes anotados en esta clasificación son también inducidos por microorganismos patógenos (Figura 3.6), lo que es consistente puesto que la expresión de los genes de defensa está regulada principalmente por las fitohormonas de defensa AS y JA (Ding y Ding 2020; Wasternack, 2015).

Se identificaron los DEGs que codifican para FTs (Figura 3.8). Se detectaron 127 genes que corresponden a diferentes familias proteicas. Las familias más representativas fueron AP2/ERF (16 genes), WRKY (14 genes), MYB (11 genes), bHLH (8 genes) y HB (6 genes) (Figura 3.10). Este es el primer reporte que muestra que múltiples genes de la familia ERF son activados directa o indirectamente por un FT de la familia WRKY. Algunos estudios señalan que la familia bZIP, WRKY, MYB, AP2, NAM y NAC son las principales familias que interaccionan con la familia WRKY a nivel proteína-proteína (Alves et al., 2014). Nuestro análisis sugiere que el gen

MaWRKY45 de plátano tiene un impacto importante en la regulación de miembros de la familia AP2/ERF y WRKY. Miembros de la familia WRKY se han distinguido por tener una cooperación en la dinámica de regulación con genes de la misma familia (Llorca *et al.*, 2014), lo que es consistente con nuestros resultados que sitúan a la familia WRKY como la segunda familia de FTs más regulada por la sobreexpresión de *MaWRKY45* en *N. benthamiana*. Interesantemente los genes MYB5, MYB14 fueron los genes que obtuvieron una mayor tasa de cambio en la expresión con 22 FC a la alza. En *Arabidopsis*, AtMYB14 regula la expresión del gen que codifica para la estilbeno sintasa que participa en la biosíntesis de resveratrol, un metabolito secundario sintetizado por las plantas que funciona como fitoalexina (Fang *et al.*, 2014). En *Medicago truncatula* MtMYB5 y MtMYB14 tienen un papel importante en la biosíntesis de proantocianidina, un polímero que protege a la semilla de organismos herbívoros (Liu *et al.*, 2014). Curiosamente, el gen más reprimido fue el gen MYB36 con un FC de -56 a la baja, el cual es un regulador transcripcional que promueve la diferenciación de la endodermis durante el desarrollo de las raíces (Kamiya *et al.*, 2015). La regulación de la expresión de 127 FTs muy probablemente contribuye en el notable cambio transcripcional que un solo FT puede ejercer en la respuesta contra el estrés biótico.

Es relevante mencionar que el único estudio que se ha realizado para investigar los genes que regula *OsWRKY45* corriente abajo lo realizó Nakayama y colaboradores (2013) mediante un análisis por microarreglo en el que se utilizaron plantas mutadas (*WRKY45*-knockdown) de arroz. En este estudio se identificaron 260 genes dependientes de la expresión del gen *osWRKY45*. Interesantemente se encontró a la familia WRKY de FTs como la más representada (*OsWRKY55*, *OsWRKY62*, *OsWRKY71* y *OsWRKY72*). También se encontraron otros FTs dependientes de *OsWRKY45* como *OsMYB4*, *OsMYB8*, *OsNAC4* y *HSF1* como dependientes de *OsWRKY45*. Esto es consistente con nuestros resultados que indican que la familia WRKY y MYB de FTs son dos de las familias más representadas en nuestro análisis transcriptómico; sin embargo, Nakayama y colaboradores (2013) no reportan FTs de la familia AP2/ERF que fue la familia de proteínas más abundante en nuestro análisis. Además, se encontraron los genes citocromo *P450* y Glutathione S-transferasa (*GST*) *P450* (*P450 94A1*), una glutaredoxina (*GRX480*), quitinasas, una celulosa sintasa, y receptores membranas e intracelulares similares a genes encontrados en nuestro análisis transcriptómico. Por la naturaleza de nuestro análisis (RNASeq) nuestro ensayo transcriptómico proporciona mayor información que la proporcionada por el microarreglo de Nakayama y colaboradores (2013) en arroz, no obstante, se encontraron similitudes relevantes. Este hecho sugiere que *MaWRKY45* podría estar regulando la respuesta contra el estrés biótico

de manera similar a su homólogo en arroz. Este estudio es el primero en implementar la técnica de infiltration-RNAseq para analizar los genes que directa o indirectamente son posibles dianas reguladas por un FT relacionado al estrés biótico en plantas. Nuestro estudio demuestra la versatilidad de esta técnica para generar resultados confiables en tiempos cortos.

Los resultados señalan que MaWRKY45 regula una batería de genes relacionados en la defensa contra el estrés biótico y lo hace mediante radicales cambios a nivel transcripcional. Nuestros resultados nos brindan un mejor entendimiento de la dinámica transcripcional corriente debajo de la activación de un FT. Por lo anterior podemos concluir que el gen *MaWRKY45* puede ser empleado como una herramienta biotecnológica para el fitomejoramiento de plátano contra microorganismos patógenos que son la principal limitante de su producción y amenazan con destruir la industria platanera.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1 DISCUSIÓN

A diferencia de los animales que pueden desplazarse para eludir un peligro, la defensa de las plantas radica exclusivamente en procesos moleculares que vienen codificados en su DNA. Para decodificar el DNA las plantas utilizan un intricado mecanismo molecular que conlleva múltiples pasos. La transcripción es uno de los procesos más importantes de la expresión génica. En este punto, los factores de transcripción (FTs) modulan la expresión de los genes fungiendo como activadores o represores de los genes (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014). Los FTs regulan todos los procesos biológicos a nivel transcripcional, puesto que todos los genes obligatoriamente tienen que ser traducidos a RNA para posteriormente ser traducidos a proteínas.

En este proyecto se caracterizaron los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* que forman parte de la familia WRKY de FTs, una de las familias más numerosas que consta de 164 miembros en plátano (Jia *et al.*, 2022). Nuestros análisis bioinformáticos revelaron que los cuatro FTs se clasificaban en dos grupos, *MaWRKY18* y *MaWRKY60* pertenecen al subclado IIa de la familia WRKY y, además comparten el mismo número de intrones (3) y exones (4) en su estructura genética. Por otra parte, *MaWRKY45* y *MaWRKY70* se clasifican en el grupo III de FTs de la familia WRKY y también comparten similitudes en la cantidad de intrones (2) y exones (3). Los cuatro genes contienen un dominio WRKY, un sitio de localización nuclear y diversas modificaciones postraduccionales como sitios potenciales de fosforilación, miristoilación y glucosilación, características canónicas y esenciales para el correcto funcionamiento de los FTs en general y que se han encontrado en varios FTs de la familia WRKY (Rushton *et al.*, 2010). Los FTs realizan sus funciones regulatorias en el núcleo celular donde se encuentra almacenado el DNA (Liu *et al.*, 2018), para confirmar que las proteínas bajo estudio se localizan en el núcleo, se realizaron fusiones traduccionales con la proteína verde fluorescente (GFP) y se expresaron transitoriamente en células epidermales de cebolla. Los resultados confirmaron que las cuatro proteínas se movilizan al núcleo, por lo que posiblemente así se comportan en las células de plátano. Los FTs son diversos en la distribución de dominios y motivos; no obstante, hay dos dominios básicos y fundamentales de un FT y son el dominio de unión al DNA y el dominio de transactivación o represión (Liu *et al.*, 1999). Evaluamos la actividad de transactivación de *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* en levadura y encontramos que las cuatro proteínas tienen dominio de

transactivación, prueba que confirma que nuestras proteínas de estudio son FTs funcionales. La proteína OsWRKY45, cuyo gen es un posible ortólogo de *MaWRKY45*, mostró actividad de transactivación en un ensayo en protoplastos de arroz (Shimono *et al.*, 2007) y *MaWRKY60* de la variedad Cavendish mostró también actividad de transactivación en hojas de tabaco (Luo *et al.*, 2017). Se ha demostrado que las plantas se defienden distintamente de microorganismos necrótrofos y biótrofos. Esto lo logran mediante las vías de la SAR y de la ISR que son reguladas por las fitohormonas de defensa AS y JA respectivamente (Yu *et al.*, 2022; Ding and Ding, 2020; Gao *et al.*, 2015). En la mayoría de los casos el SAR va acompañado de una muerte celular programada en el sitio de infección para aislar al patógeno de los nutrientes indispensables para completar su ciclo de vida. Los cuatro genes WRKY mostraron ser inducidos por ambas fitohormonas (a excepción de *MaWRKY18* que solo respondió al tratamiento por AS) pero notablemente por el tratamiento con MeJA, esto sugiere que podrían estar involucradas en la comunicación cruzada de AS y JA como se ha documentado para el caso de *AtWRKY70* en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2004) y que muy probablemente tienen un papel en el mecanismo de defensa de plátano.

En los últimos años se han realizado contribuciones significativas en la identificación de diversos FTs en una gran variedad de cultivos de importancia agronómica, un ejemplo de ello es el incremento de análisis de secuenciación masiva para identificar puntualmente los FTs relacionados a un mecanismo de defensa específico (Huang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021). Sin embargo, poco se sabe sobre la dinámica molecular que ocurre corriente abajo de un FT activo. Por lo tanto, en este trabajo se realizó un ensayo de infiltración-RNAseq (Bond *et al.*, 2016), en el que utilizamos el sistema heterólogo *N. benthamiana* para sobreexpresar transitoriamente en hojas el gen *MaWRKY45*. El análisis de DEGs reveló un incremento en la actividad de procesos biológicos relacionados al estrés como la actividad de fosforilación, ubiquitinación, señalización y transducción de señales, actividad en el proceso de la transcripción y en respuesta a hormonas y estímulo químico. Esto sugiere que *MaWRKY45* tiene la capacidad de activar estos procesos para hacer frente al estrés, lo cual es consistente con los procesos biológicos que se han reportado cuando las plantas están sujetas a algún tipo de estrés (Martin *et al.*, 2010). Para defenderse, las plantas sintetizan un arsenal de compuestos antimicrobiales (Akter *et al.*, 2015; Debona *et al.*, 2012) y refuerzan las estructuras más importantes, como la membrana, pared celular, y las ceras cuticulares para impedir el acceso de agentes infecciosos (Kaur *et al.*, 2022). En nuestro análisis encontramos DEGs que participan en el metabolismo de lípidos que participan en la biosíntesis de cutina y lignina y lípidos que fungen como mensajeros químicos.

También se detectaron genes de proteínas con propiedades antifúngicas como quitinasas y GLIP1 (GDSL LIPASE1) que actúan en la degradación de la pared celular (Kim *et al.*, 2013). Se identificaron DEGs que están involucrados en los procesos anabólicos de producción de metabolitos con actividad antimicrobial como suberina, estilbeno y ácido sapínico. Se encontraron DEGs de 127 FTs diferencialmente expresados y las familias más representadas fueron AP2/ERF, WRKY, MYB, bHLH y BH. Es bien sabido que los FTs WRKY interaccionan con un amplio repertorio de proteínas como MAP cinasas, receptores transmembranales e intracelulares, remodeladores de la cromatina, calmodulina y una diversidad de FTs (Llorca *et al.*, 2014; van Verk *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2007; Andreasson *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Además de interaccionar con FTs, la familia WRKY sostiene una red de comunicación mediante la regulación de la transcripción de otros FTs, incluso es usual que miembros de la familia WRKY se autorregulen o regulen a miembros de la misma familia (Chi *et al.*, 2013). No es sorpresa que la familia WRKY sea la segunda familia más regulada por la sobreexpresión de *MaWRKY45*; sin embargo, es interesante que la familia AP2/ERF es la familia con más miembros regulados diferencialmente, suceso que solo se ha reportado en sésamo, en el cual se encontró que la familia WRKY y ERF cooperan en la respuesta y recuperación de sésamo contra el estrés por inundación (Wang *et al.*, 2021). Esto sugiere que existe una cooperación entre la familia WRKY y la familia ERF para regular la expresión de múltiples genes de defensa relacionados con el estrés biótico.

La caracterización funcional de los FTs *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* y los datos transcriptómicos derivados de la sobreexpresión de *MaWRKY45* proporcionan evidencia sobre la naturaleza y función de los FTs de estudio así como de la dinámica transcripcional en la que opera *MaWRKY45*. Nuestros resultados sugieren que estos genes podrían estar involucrados en la respuesta de plátano contra el estrés biótico mediante profundos cambios transcripcionales que involucren detener procesos de crecimiento y desarrollo de la planta para dar prioridad a la sobrevivencia a través de la transcripción de genes de defensa.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

Se demostró que los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* de una especie silvestre de plátano (*M. acuminata* ssp. *malaccensis*) codifican FTs de la familia WRKY de plátano funcionales, que se movilizan al núcleo y que son inducidos por las fitohormonas de defensa AS y MeJA, sugiriendo una posible función en la SAR y la ISR respectivamente. Se

encontró que MaWRKY18 y MaWRKY60 pertenecen al subgrupo IIa y, MaWRKY45 y MaWRKY70 al grupo III de la familia WRKY, grupos que tienen muchos miembros relacionados a la respuesta contra el estrés biótico especialmente el grupo IIa. Además, se determinó que, MaWRKY45 modula la expresión de una multitud de genes de defensa relacionados a la respuesta contra el estrés biótico en *N. benthamiana* mediante profundos cambios en la dinámica transcripcional. Los resultados de este trabajo hacen de los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* candidatos interesantes para la generación de resistencia de amplio espectro en variedades de plátano susceptibles a *P. fijiensis* o FOC raza 4 mediante ingeniería genética.

4.3 PERSPECTIVAS

El uso de FTs como herramientas biotecnológicas para el fitomejoramiento de plantas de interés agronómico es clave dada la importancia de estas proteínas como reguladores maestros de la respuesta al estrés. Este estudio proporciona evidencia funcional sobre los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY45*, *MaWRKY60* y *MaWRKY70* que codifican para FTs de la familia WRKY de plátano y nos brinda una panorámica de la dinámica transcripcional que se enciende corriente debajo de la sobreexpresión del FT *WRKY45*. Sin embargo, se necesita generar líneas transgénicas de plátano susceptible a la Sigatoka negra y el Mal de Panamá, como la variedad Cavendish que es la más importante para la industria platanera. Sería deseable no solo sobreexpresar los genes si no también hacer uso de la tecnología CRISPR/Cas9 para realizar mutaciones y así tener un mejor entendimiento del papel de estos cuatro genes WRKY en la respuesta contra estos hongos hemibiótrofos. La tecnología CRISPR sería de gran utilidad para aquellos genes que son reguladores negativos de la defensa contra microorganismos biótrofos. Dos de nuestros genes, *MaWRKY18* y *MaWRKY60*, junto con *MaWRKY40* (no caracterizado en este trabajo) forman parte de un sistema que regula la comunicación cruzada entre la defensa contra microorganismos biótrofos y necrótrofos. Sería interesante generar triples mutantes de plátano con mutaciones específicas en los genes *MaWRKY18*, *MaWRKY40* y *MaWRKY60* de tal modo que las ausencias de estos reguladores negativos causarían que el sistema de defensa contra biótrofos estuviese siempre activo como se ha demostrado en *Arabidopsis* y cebada (Chang *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2006), se ha establecido que la defensa contra microorganismos biótrofos (SAR) genera resistencia de amplio espectro contra virus, bacterias, oomicetos y hongos de tipo biótrofos y hemibiótrofos (Wani *et al.*, 2018), por lo tanto, en nuestro grupo de trabajo formulamos

la hipótesis de que la mutación de estos tres genes generaría resistencia contra los hongos hemibiótrofos *P. fijiensis* y FOC raza 4 causantes de la Sigatoka negra y el Mal de Panamá. Para el caso de los genes *MaWRKY45* y *MaWRKY70* se deben utilizar promotores constitutivos de fuerza moderada o promotores inducibles por patógenos para modular su expresión de modo que confieren resistencia, pero sin causar efectos pleiotrópicos que mermen la producción de plátano. En México se necesita con urgencia invertir en programas de mejoramiento genético de este cultivar que genera empleos y dividendos para miles de personas. Además, contamos con recursos humanos especializados con las habilidades necesarias para generar nuestras propias tecnologías que converjan en soluciones para nuestros agricultores.

BIBLIOGRAFÍA

- Akankwasa, K., Ortmann, G.F., Wale, E., Tushemereirwe, W.K. (2013). Farmers' choice among recently developed hybrid banana varieties in Uganda: A multinomial logit analysis. *Agrekon*, 52, 25-51.
- Akter, S., Huang, J., Waszczak, C., Jacques, S., Gevaert, K., Van Breusegem, F., Messens, J. (2015). Cysteines under ROS attack in plants: a proteomics view. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2935-2944.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215, 403-410.
- Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. B., De Souza, G. B., Barros, V. A., Fietto, L. G. (2014). Transcription factor functional protein-protein interactions in plant defense responses. *Proteomes*, 2, 85-106.
- An, G., Mitra, A., Choi, H. K., Costa, M. A., An, K., Thornburg, R. W., Ryan, C. A. (1989). Functional analysis of the 3'control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *The Plant Cell*, 1, 115-122.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N. H., Zhu, S., Mundy, J. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO journal*, 24, 2579-2589.
- Antoni, R., Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G.A., Rodriguez, P.L. (2011). News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Current opinion in plant biology*, 14, 547-553.
- Arango Isaza, R.E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C.F., Kema, G.H. (2016). Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *PLoS Genetics*, 12, e1005876.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25, 25-29.

-
- Barberis, A., Petrascheck, M. (2003). Transcription activation in eukaryotic cells. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7.
- Becker, P., Esker, P., Umaña, G. (2021). Incorporation of microorganisms to reduce chemical fungicide usage in black sigatoka control programs in Costa Rica by use of biological fungicides. *Crop Protection*, 146, 105657.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57, 289-300.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-2120.
- Bond, D. M., Albert, N. W., Lee, R. H., Gillard, G. B., Brown, C. M., Hellens, R. P., Macknight, R. C. (2016). Infiltration-RNAseq: transcriptome profiling of *Agrobacterium*-mediated infiltration of transcription factors to discover gene function and expression networks in plants. *Plant methods*, 12, 1-13.
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59-60.
- Buddenhagen, I. (2007, September). Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of Tropical Race 4 to better manage banana production. In *III International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for Sustainable*, 828, 193-204.
- Caillaud, M. C., Wirthmueller, L., Sklenar, J., Findlay, K., Piquerez, S. J., Jones, A. M., Faulkner, C. (2014). The plasmodesmal protein PDL1 localises to haustoria-associated membranes during downy mildew infection and regulates callose deposition. *PLoS pathogens*, 10, e1004496.
- Castillo, L.E., Ruepert, C., Solis, E. (2000). Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the north Atlantic zone of Costa Rica. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19, 1942-1950.
-

-
- Chang, C., Yu, D., Jiao, J., Jing, S., Schulze-Lefert, P., Shen, Q. H. (2013). Barley MLA immune receptors directly interfere with antagonistically acting transcription factors to initiate disease resistance signaling. *The Plant Cell*, 25, 1158-1173.
- Chen, C., Chen, Z. (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. *Plant physiology*, 129, 706-716.
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., Yu, D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819, 120-128.
- Chen, X., Li, C., Wang, H., Guo, Z. (2019). WRKY transcription factors: evolution, binding, and action. *Phytopathology Research*, 1, 1-15.
- Chi, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Fan, B., Yu, J. Q., Chen, Z. (2013). Protein–protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. *Molecular plant*, 6, 287-300.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell*, 18, 465-476.
- Chow, C.N., Lee, T.Y., Hung, Y.C., Li, G.Z., Tseng, K.C., Liu, Y.H., Chang, W.C. (2019). PlantPAN3. 0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucleic acids research*, 47, D1155-D1163.
- Churchill, A.C. (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., Armache, K. J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Vannini, A. (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 337-352.
- Cui, H., Tsuda, K., Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual review of plant biology*, 66, 487-511.
-

-
- D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J.M., Baurens, F.C., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., Da Silva, C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lengelle, J., Rodier-Goud, M., Alberti, A., Bernard, M., Correa, M., Ayyampalayam, S., Mckain, M.R., Leebens-Mack, J., Burgess, D., Freeling, M., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Chabannes, M., Wicker, T., Panaud, O., Barbosa, J., Hribova, E., Heslop-Harrison, P., Habas, R., Rivallan, R., Francois, P., Poiron, C., Kilian, A., Burthia, D., Jenny, C., Bakry, F., Brown, S., Guignon, V., Kema, G., Dita, M., Waalwijk, C., Joseph, S., Dievart, A., Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi, M., Dolezel, J., Roux, N., Risterucci, A.M., Weissenbach, J., Ruiz, M., Glaszmann, J.C., Quétier, F., Yahiaoui N., Wincker P. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 488, 213-219.
- Dai, X., Wang, Y., Zhang, W. H. (2016). OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *Journal of Experimental Botany*, 67, 947-960.
- Dale, J., James, A., Paul, J.Y., Khanna, H., Smith, M., Peraza-Echeverria, S., Harding, R. (2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium wilt* tropical race 4. *Nature communications*, 8, 1496.
- Debona, D., Rodrigues, F. Á., Rios, J. A., Nascimento, K. J. T. (2012). Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 102, 1121-1129.
- De Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic acids research*, 34, W362-W365.
- Dehghan Nayeri, F. (2014). Identification of transcription factors linked to cell cycle regulation in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, 9, e972864.
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54, 2325-2340.
-

-
- Denham, T.P., Haberle, S.G., Lentfer, C., Fullagar, R., Field, J., Therin, M., Winsborough, B. (2003). Origins of agriculture at Kuk Swamp in the highlands of New Guinea. *Science*, 301, 189-193.
- Dhatterwal, P., Basu, S., Mehrotra, S., Mehrotra, R. (2019). Genome wide analysis of W-box element in *Arabidopsis thaliana* reveals TGAC motif with genes down regulated by heat and salinity. *Scientific Reports*, 9, 1681.
- Ding, P., Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: a plant defense hormone. *Trends in plant science*, 25, 549-565.
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S., Staver, C.P. (2018). Fusarium wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in plant science*, 9, 1468.
- Drenth, A., Guest, D.I. (2016). Fungal and oomycete diseases of tropical tree fruit crops. *Annual Review of Phytopathology*, 54, 373-395.
- Duan, M.R., Nan, J., Liang, Y.H., Mao, P., Lu, L., Li, L., Su, X.D. (2007). DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY1 protein. *Nucleic acids research*, 35, 1145-1154.
- Edwards, K. D., Fernandez-Pozo, N., Drake-Stowe, K., Humphry, M., Evans, A. D., Bombarely, A., Mueller, L. A. (2017). A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC genomics*, 18, 1-14.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science*, 5, 199-206.
- Eulgem, T., Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology*, 10, 366-371.
- Fang, L., Hou, Y., Wang, L., Xin, H., Wang, N., Li, S. (2014). Myb14, a direct activator of STS, is associated with resveratrol content variation in berry skin in two grape cultivars. *Plant Cell Reports*, 33, 1629-1640.

-
- FAO (2014). Technical manual: prevention and diagnostic of Fusarium wilt (Panama disease) of banana caused by Fusarium Oxysporum f. sp. Cubense Tropical Race 4 (TR4). <http://www.fao.org/3/a-br126e.pdf> [Acceso 17 de febrero 2019]
- FAO (2017a). Banana Market Review 2015-16. <http://www.fao.org/3/a-i7410e.pdf>. [Acceso 27 diciembre 2021].
- FAO (2017b). Global Programme on Banana Fusarium Wilt Disease. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/11348b20-56ae-40ff-aecc-b4df62ddf711/> [Acceso 23 diciembre 2021].
- Feng, B., Yang, S., Du, H., Hou, X., Zhang, J., Liu, H., Huang, Y. (2012). Molecular characterization and functional analysis of plant WRKY genes. *African Journal of Biotechnology*, 11, 13606-13613.
- Fouré, E., Grisoni, M. (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., López-Vidriero, I., Carrasco, J.L., Godoy, M., Vera, P., Solano, R. (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., Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual review of plant biology*, 64, 839-863.
- Gao, Q. M., Venugopal, S., Navarre, D., Kachroo, A. (2011). Low oleic acid-derived repression of jasmonic acid-inducible defense responses requires the WRKY50 and WRKY51 proteins. *Plant physiology*, 155, 464-476.
- Gao, Q.M., Zhu, S., Kachroo, P., Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in plant science*, 6, 228.
- Garcia Ruiz, M.T., Knapp, A.N., Garcia-Ruiz, H. (2018). Profile of genetically modified plants authorized in Mexico. *GM crops & food*, 9, 152-168.
-

-
- García-Bastidas, F.A., Quintero-Vargas, J.C., Ayala-Vasquez, M., Schermer, T., Seidl, M. F., Santos-Paiva, M., Kema, G.H.J. (2020). First report of Fusarium wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant disease*, 104, 994-994.
- García-Laynes, S. (2016). Caracterización estructural y filogenética de genes de la familia WRKY de plátano relacionados con la respuesta al estrés biótico. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 65-81.
- Ghag, S.B., Shekhawat, U.K., Ganapathi, T.R. (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.
- Ghag, S.B., Shekhawat, U.K.S., Ganapathi, T.R. (2012). Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of *Fusarium* wilt resistance in transgenic banana plants. *PLoS One*, 7, e39557.
- Giacomelli, J.I., Ribichich, K.F., Dezar, C.A., Chan, R.L. (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.
- Godbole, A., Varghese, J., Sarin, A., Mathew, M. K. (2003). VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1642, 87-96.
- Goel, R., Pandey, A., Trivedi, P.K., Asif, M.H. (2016). Genome-wide analysis of the *Musa* WRKY gene family: evolution and differential expression during development and stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, 299.
- 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.
- Gong, X., Zhang, J., Hu, J., Wang, W., Wu, H., Zhang, Q., Liu, J.H. (2015). FcWRKY 70, a WRKY protein of *Fortunella crassifolia*, functions in drought tolerance and modulates putrescine

-
- synthesis by regulating arginine decarboxylase gene. *Plant, cell & environment*, 38, 2248-2262.
- González-Torralva, F., Brown, A.P., Chivasa, S. (2017). Comparative proteomic analysis of horseweed (*Conyza canadensis*) biotypes identifies candidate proteins for glyphosate resistance. *Scientific Reports*, 7, 42565.
- Goto, S., Sasakura-Shimoda, F., Suetsugu, M., Selvaraj, M. G., Hayashi, N., Yamazaki, M., Takatsuji, H. (2015). Development of disease-resistant rice by optimized expression of WRKY45. *Plant biotechnology journal*, 13, 753-765.
- Goto, S., Sasakura-Shimoda, F., Yamazaki, M., Hayashi, N., Suetsugu, M., Ochiai, H., Takatsuji, H. (2016). Development of disease-resistant rice by pathogen-responsive expression of WRKY45. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 1127-1138.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29, 644-652.
- Guo, D., Zhang, J., Wang, X., Han, X., Wei, B., Wang, J., Qin, G. (2015). The WRKY transcription factor WRKY71/EXB1 controls shoot branching by transcriptionally regulating RAX genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27, 3112-3127.
- Häkkinen, M. (2013). Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). *Taxon*, 62, 809-813.
- Hall, T.A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*, 41, 95-98.
- Halter, T., Imkampe, J., Mazzotta, S., Wierzbza, M., Postel, S., Bücherl, C., Kemmerling, B. (2014). The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. *Current Biology*, 24, 134-143.
- Hawksworth, D.L. (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA fungus*, 2, 155-162.
-

-
- He, Y., Mao, S., Gao, Y., Zhu, L., Wu, D., Cui, Y., Qian, W. (2016). Genome-wide identification and expression analysis of WRKY transcription factors under multiple stresses in *Brassica napus*. *PloS one*, 11, e0157558.
- Hernández-Plaza, A., Szklarczyk, D., Botas, J., Cantalapiedra, C. P., Giner-Lamia, J., Mende, D. R., Huerta-Cepas, J. (2023). eggNOG 6.0: enabling comparative genomics across 12 535 organisms. *Nucleic Acids Research*, 51, D389-D394.
- Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T. (2007). Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of botany*, 100, 1073-1084.
- Hong, J. K., Choi, D. S., Kim, S. H., Yi, S. Y., Kim, Y. J., Hwang, B. K. (2008). Distinct roles of the pepper pathogen-induced membrane protein gene CaPIMP1 in bacterial disease resistance and oomycete disease susceptibility. *Planta*, 228, 485-497.
- Hu, C.H., Wei, Y.R., Huang, Y.H., Yi, G.J. (2013). An efficient protocol for the production of chit42 transgenic Furenzhi banana (*Musa* spp. AA group) resistant to *Fusarium oxysporum*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 584-592.
- Huang, J., Liu, F., Chao, D., Xin, B., Liu, K., Cao, S., Xia, J. (2022). The WRKY Transcription Factor OsWRKY54 Is Involved in Salt Tolerance in Rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 11999.
- Huangfu, J., Li, J., Li, R., Ye, M., Kuai, P., Zhang, T., Lou, Y. (2016). The transcription factor OsWRKY45 negatively modulates the resistance of rice to the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *International journal of molecular sciences*, 17, 697.
- Hussain, R. M., Kim, H. K., Khurshid, M., Akhtar, M. T., Linthorst, H. J. (2018). Overexpression of AtWRKY50 is correlated with enhanced production of sinapic derivatives in *Arabidopsis*. *Metabolomics*, 14, 1-11.
- Ilham, B., Noureddine, C., Philippe, G., Mohammed, E. G., Brahim, E., Sophie, A., Muriel, M. (2019). Induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis thaliana* by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma harzianum* used as seed treatments. *Agriculture*, 9, 166.

-
- Ishiguro, S., Nakamura, K. (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.
- Jia, C., Wang, Z., Wang, J., Miao, H., Zhang, J., Xu, B., Liu, J. (2022). Genome-wide analysis of the banana WRKY transcription factor gene family closely related to fruit ripening and stress. *Plants*, 11, 662.
- Jiang, J., Ma, S., Ye, N., Jiang, M., Cao, J., Zhang, J. (2017). WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *Journal of integrative plant biology*, 59, 86-101.
- Jing, S., Zhou, X., Song, Y., Yu, D. (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*, 3-7.
- Jones, D.R. (1994). The improvement and testing of Musa: a global partnership. INIBAP, France. pp. 303.
- Jones, D.R. (1999). Diseases of banana, abaca and enset. CABI, United Kingdom, pp. 139.
- Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444, 323-329.
- Justine, A.K., Kaur, N., Pati, P.K. (2022). Biotechnological interventions in banana: current knowledge and future prospects. *Heliyon*, e11636.
- Kaliyappan, R., Viswanathan, S., Suthanthiram, B., Subbaraya, U., Marimuthu Somasundram, S., Muthu, M. (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.
- Kamiya, T., Borghi, M., Wang, P., Danku, J. M., Kalmbach, L., Hosmani, P. S., Salt, D. E. (2015). The MYB36 transcription factor orchestrates Casparian strip formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 10533-10538.
-

-
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research*, 44, D457-D462.
- Kanyuka, K., Rudd, J. J. (2019). Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Current opinion in plant biology*, 50, 1-8.
- Kaur, S., Samota, M. K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A. K., Sharma, A., Thakur, J. (2022). How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28, 485-504.
- Kim, H. G., Kwon, S. J., Jang, Y. J., Nam, M. H., Chung, J. H., Na, Y. C., . Park, O. K. (2013). GDSSL LIPASE1 modulates plant immunity through feedback regulation of ethylene signaling. *Plant physiology*, 163, 1776-1791.
- Kim, J. Y., Park, S. C., Kim, M. H., Lim, H. T., Park, Y., Hahm, K. S. (2005). Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and biophysical research communications*, 330, 921-927.
- Kim, K. C., Lai, Z., Fan, B., Chen, Z. (2008). Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *The Plant Cell*, 20, 2357-2371.
- Kim, K. J., Lim, J. H., Kim, M. J., Kim, T., Chung, H. M., Paek, K. H. (2008). GDSSL-lipase1 (CaGL1) contributes to wound stress resistance by modulation of CaPR-4 expression in hot pepper. *Biochemical and biophysical research communications*, 374, 693-698.
- Kosky, R.G., Chong-Pérez, B., López-Torres, J., Reyes, M., Bermúdez-Caraballosa, I., Martín, N.M., Hernández, L. (2010). Plantain (Musa spp. cv. 'Navolean' AAB) transgenic plants from *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions. *Biotechnología Vegetal*, 10, 209-218.
- Kovács, G., Sági, L., Jacon, G., Arinaitwe, G., Busogoro, J. P., Thiry, E., Remy, S. (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., MacLeod, B.J., Després, C. (2015). Integrating data on the Arabidopsis NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. *Frontiers in plant science*, 6, 235.
- Lai, Z., Vinod, K. M., Zheng, Z., Fan, B., Chen, Z. (2008). Roles of Arabidopsis WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC plant biology*, 8, 1-13.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Huala, E. (2011). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, 40, D1202–D1210.
- Langmead, B., Salzberg, S. (2012). Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359.
- Li, B., Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12, 1-16.
- Li, J., Brader, G., Kariola, T., Tapio Palva, E. (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal*, 46, 477-491.
- Li, J., Brader, G., Palva, E.T. (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.
- Li, W., Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22, 1658-1659.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., Perata, P. (2013). APETALA 2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, 199, 639-649.
- Liu, C., Jun, J. H., Dixon, R. A. (2014). MYB5 and MYB14 play pivotal roles in seed coat polymer biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant physiology*, 165, 1424-1439.
- Liu, G., Zeng, H., Li, X., Wei, Y., Shi, H. (2019). Functional analysis of MaWRKY24 in transcriptional activation of autophagy-related gene 8f/g and plant disease susceptibility to soil-borne *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Pathogens*, 8, 264.
-

-
- Liu, L., White, M. J., MacRae, T. H. (1999). Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry*, 262, 247-257.
- Liu, Y., Li, P., Fan, L., Wu, M. (2018). The nuclear transportation routes of membrane-bound transcription factors. *Cell Communication and Signaling*, 16, 1-9.
- Llorca, C. M., Potschin, M., Zentgraf, U. (2014). bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in plant science*, 5, 169.
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15, 1-21.
- Luo, D.L., Ba, L.J., Shan, W., Kuang, J.F., Lu, W.J., Chen, J.Y. (2017). Involvement of WRKY transcription factors in abscisic-acid-induced cold tolerance of banana fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65, 3627-3635.
- Luo, Y., Wang, Q., Bai, R., Li, R., Chen, L., Xu, Y., Duan, D. (2020). The effect of transcription factor MYB14 on defense mechanisms in *Vitis quinquangularis*-Pingyi. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 706.
- Mahdavi, F., Sariah, M., Maziah, M. (2012). Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to *Fusarium wilt*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1008-1019.
- Majeran, W., Le Caer, J.P., Ponnala, L., Meinnel, T., Giglione, C. (2018). Targeted profiling of *Arabidopsis thaliana* subproteomes illuminates co-and posttranslationally N-terminal myristoylated proteins. *The Plant Cell*, 30, 543-562.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dietrich, R.A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature genetics*, 26, 403-410.
- Marin, D.H., Romero, R.A., Guzman, M., Sutton, T.B. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant disease*, 87, 208-222.

-
- Martin, R. C., Kronmiller, B. A., Dombrowski, J. E. (2020). Transcriptome analysis of responses in *Brachypodium distachyon* overexpressing the BdbZIP26 transcription factor. *BMC plant biology*, 20, 1-18.
- Maziah, M., Sariah, M., Sreeramanan, S. (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 and K.V. Ravishankar (Eds.). Springer. Singapore. pp. 13-34.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L., Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic acids research*, 49, D412-D419.
- Molina, A.B., Kudagamage, C. (2002). The International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP): PGR Activities in South Asia. p.7. In: *Proceedings of South Asia Network on Plant Genetic Resources (SANPGR) Meeting*, Peradeniya (LKA), 2002/12/09-11. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP): PGR Activities in South Asia. INIBAP-BAPNET, Los Baños (PHL).
- Mur, L.A., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of experimental Botany*, 59, 501-520.
- Muthamilarasan, M., Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of biosciences*, 38, 433-449.
- Nakayama, A., Fukushima, S., Goto, S., Matsushita, A., Shimono, M., Sugano, S., Takatsuji, H. (2013). Genome-wide identification of WRKY45-regulated genes that mediate benzothiadiazole-induced defense responses in rice. *BMC plant biology*, 13, 1-11.
- Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi, M., Narusaka, Y. (2009). RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant Journal*, 60, 218-226.
-

-
- National Geographic (2016). The miracle of the modern banana. <https://www.nationalgeographic.com/people-and-culture/food/the-plate/2016/08/the-miracle-of-bananas/> [Acceso 13 junio 2022].
- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A. C., Zeier, J. (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell*, 24, 5123-5141.
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L., Cox, M.M. (2008). Lehninger principles of biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York, Macmillan. (Ed.). pp. 1023.
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*, 44, D733-D745.
- Ortiz, R., Vuylsteke, D. (1995). Inheritance of dwarfism in plantain (Musa spp., AAB group). *Plant breeding*, 114, 466-468.
- Park, C. Y., Lee, J. H., Yoo, J. H., Moon, B. C., Choi, M. S., Kang, Y. H., Cho, M. J. (2005). WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS letters*, 579, 1545-1550.
- Park, C.Y., Lee, J.H., Yoo, J.H., Moon, B.C., Choi, M.S., Kang, Y.H., Cho, M.J. (2005). WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS letters*, 579, 1545-1550.
- Passos, M.A., de Cruz, V.O., Emediato, F.L., de Teixeira, C.C., Azevedo, V.C.R., Brasileiro, A., Miller, R.N. (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., CHEN, S.K., WEN, R.M., Ye, S., HUANG, J.Q., ZHANG, Y.Q., JIA, S.R. (2005). Creation of transgenic bananas expressing human lysozyme gene for Panama wilt resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47, 971-977.
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F., Denham, T. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (Musa spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 11311-11318.
-

-
- Phukan, U.J., Jeena, G.S., Shukla, R.K. (2016). WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 760.
- PlantTFDB, (2022). Plant Transcription Factor Database v5.0. <http://planttfdb.gao-lab.org/family.php?fam=WRKY> [Acceso 01 de mayo 2023].
- 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., Kema, G.H., Ma, L.J. (2015). Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annual review of phytopathology*, 53, 269-288.
- Promusa (2018). Tropical race 4 distribution. <http://www.promusa.org/Tropical+race+4+-+TR4#Distribution> [Acceso 7 diciembre 2021].
- Pruitt, K. D., Tatusova, T., Maglott, D. R. (2007). NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research*, 35, D61-D65.
- Qiu, Y., Yu, D. (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., Manley, J.L. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & development*, 23, 1247-1269.
- Robatzek, S., Somssich, I.E. (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., Saúco, V.G. (2010). Bananas and plantains. CABI, United Kingdom. pp. 1-7.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P.R., Després, C. (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.
- Rodríguez-García, C.M., Canché-Gómez, A.D., Sáenz-Carbonell, L., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché, B., Islas-Flores, I., Peraza-Echeverría, S. (2016). Expression of MfAvr4
-

-
- in banana leaf sections with black leaf streak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis*: A technical validation. *Australasian Plant Pathology*, 45, 481-488.
- Rombauts, S., Déhais, P., Van Montagu, M., Rouzé, P. (1999). PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic acids research*, 27, 295-296.
- Ross, C.A., Liu, Y., Shen, Q.J. (2007). The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 827-842.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in plant science*, 15, 247-258.
- Samaras, A., Roumeliotis, E., Ntasiou, P., Karaoglanidis, G. (2021). *Bacillus subtilis* MBI600 promotes growth of tomato plants and induces systemic resistance contributing to the control of soilborne pathogens. *Plants*, 10, 1113.
- Sánchez Timm, E., Hidalgo Pardo, L., Pacheco Coello, R., Chávez Navarrete, T., Navarrete Villegas, O., Santos Ordóñez, E. (2016). Identification of differentially-expressed genes in response to *Mycosphaerella fijiensis* in the resistant *Musa* accession 'Calcutta-4' using suppression subtractive hybridization. *PLoS One*, 11, e0160083.
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3, 1101-1108.
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3, 1101-1108.
- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Jackson, S.A. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *nature*, 463, 178-183.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31, 3381-3385.
- Shah, J., Kachroo, P., Nandi, A., Klessig, D. F. (2001). A recessive mutation in the Arabidopsis SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *The Plant Journal*, 25, 563-574.
-

-
- Shan, W. E.I., Chen, J.Y., Kuang, J.F., Lu, W.J. (2016). Banana fruit NAC transcription factor MaNAC5 cooperates with MaWRKYs to enhance the expression of pathogenesis-related genes against *Colletotrichum musae*. *Molecular plant pathology*, 17, 330-338.
- Shekhawat, U.K.S., Ganapathi, T.R., Srinivas, L. (2011). Cloning and characterization of a novel stress-responsive WRKY transcription factor gene (MusaWRKY71) from *Musa* spp. cv. Karibale Monthan (ABB group) using transformed banana cells. *Molecular biology reports*, 38, 4023-4035.
- Shen, Q. H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Schulze-Lefert, P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *science*, 315, 1098-1103.
- Shimono, M., Koga, H., Akagi, A.Y.A., Hayashi, N., Goto, S., Sawada, M., Takatsuji, H. (2012). Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Molecular Plant Pathology*, 13, 83-94.
- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C.J., Ono, K., Toki, S., Takatsuji, H. (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. <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017> [Acceso 5 agosto 2021].
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7, 539.
- Simmonds, N.W. (1962). The evolution of the bananas. Evolución del banano. CABI. Longmans, Cornell University. pp. 170.
- Simons, A. (2010). A quality control tool for high throughput sequence data. *A quality control tool for high throughput sequence data*, 10, f1000research.
- Singh, K.B., Foley, R.C., Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5, 430-436.
-

-
- SNIIM (2019). Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. <http://www.economia-sniim.gob.mx/2010prueba/PreciosHoy.asp?prodC=9069> [Acceso 4 agosto 2021].
- Somssich, I. E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E., Schulz, W. (1989). Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Molecular Biology*, 12, 227-234.
- Spitz, F., Furlong, E.E. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature reviews genetics*, 13, 613-626.
- Ssebuliba, R., Makumbi, D., Pillay, M. (2009). Patterns of seed set in East African Highland Banana (*Musa* spp.) hybrids. *Journal of New Seeds*, 10, 160-170.
- Su, H.J., Hwang, S.C. Ko, W.H. (1986). Fusarial wilt of Cavendish bananas in Taiwan. *Plant Disease*, 70, 814-818
- Sun, Y., Shang, L., Zhu, Q. H., Fan, L., Guo, L. (2021). Twenty years of plant genome sequencing: achievements and challenges. *Trends in plant science*.
- Swennen, R., Arinaitwe, G., Cammue, B., François, I., Panis, B. (2002). Transgenic approaches for resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases in *Musa* spp. *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*, 209.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-2729.
- Tang, D., Wang, G., Zhou, J.M. (2017). Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. *The Plant Cell*, 29, 618-637.
- The guardian (2016). The banana as we know it is in imminent danger. <https://www.theguardian.com/commentisfree/2016/oct/25/banana-farming-danger-cavendish-crop-genetics> [Acceso 8 mayo 2021].
- Tian, F., Yang, D.C., Meng, Y.Q., Jin, J., Gao, G. (2020). PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic acids research*, 48, D1104-D1113.

-
- TIJET, N., HELVIG, C., PINOT, F., BOUQUIN, R. L., LESOT, A., DURST, F., BENVENISTE, I. (1998). Functional expression in yeast and characterization of a clofibrate-inducible plant cytochrome P-450 (CYP94A1) involved in cutin monomers synthesis. *Biochemical Journal*, 332, 583-589.
- Timmermann, T., Poupin, M.J., Vega, A., Urrutia, C., Ruz, G.A., González, B. (2019). Gene networks underlying the early regulation of *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 14, e0221358.
- Toska, E., Campbell, H.A., Shandilya, J., Goodfellow, S.J., Shore, P., Medler, K.F., Roberts, S.G. (2012). Repression of transcription by WT1-BASP1 requires the myristoylation of BASP1 and the PIP2-dependent recruitment of histone deacetylase. *Cell reports*, 2, 462-469.
- Trezzini, G. F., Horrichs, A., Somssich, I. E. (1993). Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant molecular biology*, 21, 385-389.
- Tzean, Y., Hou, B.H., Tsao, S.M., Chen, H.M., Cheng, A.P., Chen, E.G., Yeh, H.H. (2021). Identification of MaWRKY40 and MaDLO1 as effective marker genes for tracking the salicylic acid-mediated immune response in bananas. *Phytopathology*®, 111, 1800-1810.
- Ülker, B., Shahid Mukhtar, M., Somssich, I.E. (2007). The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta*, 226, 125-137.
- UniProt, 2023. UniProt: the Universal Protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51, D523-D531.
- USDA (2018). National Nutrient Database for Standard Reference. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/09040?n1=%7BQv%3D1%7Dyfgcd=yman=yIfacet=ycount=yman=ymsort=yqlookup=yoffset=yformat=Fullynew=ymeasureby=yQv=1yds=yqt=yqp=yqa=yqn=yq=yng=> [Acceso 10 abril 2022].
- Vallejo-Reyna, M.A., Santamaría, J.M., Rodríguez-Zapata, L.C., Herrera-Valencia, V.A., Peraza-Echeverría, S. (2015). Identification of novel ERF transcription factor genes in papaya and analysis of their expression in different tissues and in response to the plant defense
-

-
- inducer benzothiadiazole (BTH). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91, 141-151.
- Van den Berg, N., Berger, D.K., Hein, I., Birch, P.R., Wingfield, M.J., Viljoen, A. (2007). Tolerance in banana to Fusarium wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Molecular plant pathology*, 8, 333-341.
- Van den Berg, N.; Berger, D.K.; Hein, I.; Birch, P.R.; Wingfield, M.J.; Viljoen, A. Tolerance in banana to Fusarium wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Mol. Plant Pathol.* 2007, 8, 333–341.
- van der Burgh, A.M., Joosten, M.H. (2019). Plant immunity: thinking outside and inside the box. *Trends in plant science*, 24, 587-601.
- van Verk, M. C., Neeleman, L., Bol, J. F., Linthorst, H. J. (2011). Tobacco transcription factor NtWRKY12 interacts with TGA2. 2 in vitro and in vivo. *Frontiers in plant science*, 2, 32.
- Vishnevetsky, J., White, T.L., Palmateer, A.J., Flaishman, M., Cohen, Y., Elad, Y., Perl, A. (2011). Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. *Transgenic research*, 20, 61-72.
- Vlot, A.C., Sales, J.H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A., Nayem, S. (2021). Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*, 229, 1234-1250.
- Von Arnim, A.G., Deng, X.W., Stacey, M.G. (1998). Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene*, 221, 35-43.
- Wairegi, L., van Asten, P. (2011). Norms for multivariate diagnosis of nutrient imbalance in the East African highland bananas (*Musa* spp. AAA). *Journal of plant nutrition*, 34, 1453-1472.
- Wang, C., Liu, R., Lim, G. H., de Lorenzo, L., Yu, K., Zhang, K., Kachroo, P. (2018). Pipecolic acid confers systemic immunity by regulating free radicals. *Science advances*, 4, eaar4509.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N., Dong, X. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS pathogens*, 2, e123.
-

-
- Wang, F., Li, X., Zuo, X., Li, M., Miao, C., Zhi, J., Xie, C. (2021). Transcriptome-wide identification of WRKY transcription factor and functional characterization of RgWRKY37 involved in Acteoside biosynthesis in *Rehmannia glutinosa*. *Frontiers in Plant Science*, 2083.
- Wang, L., Dossa, K., You, J., Zhang, Y., Li, D., Zhou, R., Zhang, X. (2021). High-resolution temporal transcriptome sequencing unravels ERF and WRKY as the master players in the regulatory networks underlying sesame responses to waterlogging and recovery. *Genomics*, 113, 276-290.
- Wani, M. Y., Mehraj, S., Rather, R. A., Rani, S., Hajam, O. A., Ganie, N. A., Kamili, A. S. (2018). Systemic acquired resistance (SAR): A novel strategy for plant protection with reference to mulberry. *Int. J. Chem. Stud*, 2, 1184-1192.
- Wasternack, C. (2015). How jasmonates earned their laurels: past and present. *Journal of plant growth regulation*, 34, 761-794.
- Wendehenne, D., Gao, Q. M., Kachroo, A., Kachroo, P. (2014). Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Current opinion in plant biology*, 20, 127-134.
- Wesseling, C., Corriols, M., Bravo, V. (2005). Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicology and applied pharmacology*, 207, 697-705.
- Winter, N., Novatchkova, M., Bachmair, A. (2021). Cellular control of protein turnover via the modification of the amino terminus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 3545.
- Xia, Y., Yu, K., Gao, Q. M., Wilson, E. V., Navarre, D., Kachroo, P., Kachroo, A. (2012). Acyl CoA binding proteins are required for cuticle formation and plant responses to microbes. *Frontiers in Plant Science*, 3, 224.
- Xiao, S., Emerson, B., Ratanasut, K., Patrick, E., O'Neill, C., Bancroft, I., Turner, J. G. (2004). Origin and maintenance of a broad-spectrum disease resistance locus in *Arabidopsis*. *Molecular biology and evolution*, 21, 1661-1672.
- Xu, X., Chen, C., Fan, B., Chen, Z. (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *The Plant Cell*, 18, 1310-1326.
-

-
- Xu, Y. P., Xu, H., Wang, B., Su, X.D. (2020). Crystal structures of N-terminal WRKY transcription factors and DNA complexes. *Protein & cell*, 11, 208-213.
- Yang, B., Jiang, Y., Rahman, M.H., Deyholos, M.K., Kav, N.N. (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.
- Ye, Y.J., Xiao, Y.Y., Han, Y.C., Shan, W., Fan, Z.Q., Xu, Q.G., Chen, J.Y. (2016). Banana fruit VQ motif-containing protein5 represses cold-responsive transcription factor MaWRKY26 involved in the regulation of JA biosynthetic genes. *Scientific Reports*, 6, 1-14.
- Yilmaz, A., Grotewold, E. (2010). Components and mechanisms of regulation of gene expression. *Computational Biology of Transcription Factor Binding*, 23-32.
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., Niu, D. (2022). Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants*, 11, 386.
- Yuan, M., Huang, Y., Ge, W., Jia, Z., Song, S., Zhang, L., Huang, Y. (2019). Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. *BMC genomics*, 20, 1-13.
- Zhang, C.Q., Xu, Y., Lu, Y., Yu, H.X., Gu, M.H., Liu, Q.Q. (2011). The WRKY transcription factor OsWRKY78 regulates stem elongation and seed development in rice. *Planta*, 234, 541-554.
- ZHAO, M.L., WANG, J.N., Shan, W., FAN, J.G., KUANG, J.F., WU, K.Q., LU, W.J. (2013). Induction of jasmonate signalling regulators MaMYC2s and their physical interactions with MaICE1 in methyl jasmonate-induced chilling tolerance in banana fruit. *Plant, Cell & Environment*, 36, 30-51.
- Zurbriggen, M.D., Carrillo, N., Hajirezaei, M.R. (2010). ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for?. *Plant signaling & behavior*, 5, 393-396.