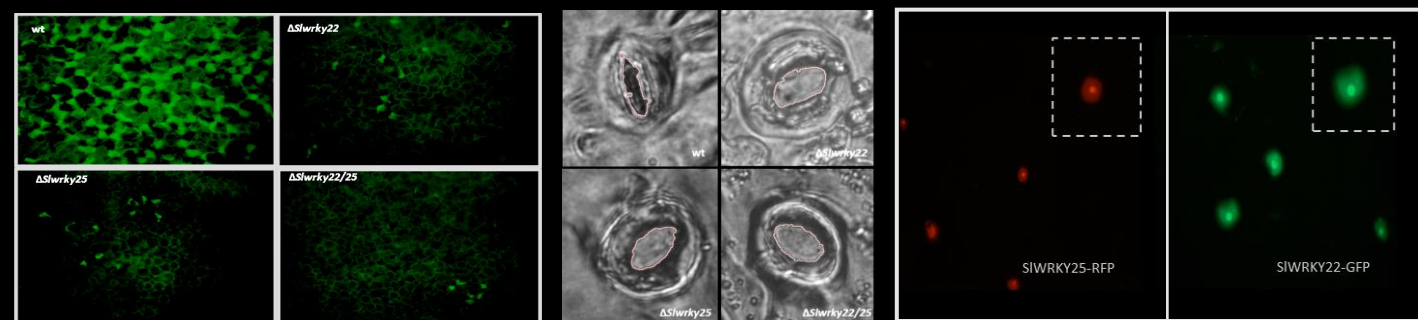


TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE DOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY DE TOMATE EN LA DEFENSA CONTRA *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

ROMINA N. RAMOS



Director: Dr. Hernán G. Rosli
Co-directora: Dra. Marina A. Pombo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Estudio de la participación de dos factores de transcripción WRKY de tomate en la defensa contra *Pseudomonas syringae*

Tesista: Romina N. Ramos

Director: Hernán G. Rosli

Co-directora: Marina A. Pombo

2023

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE-UNLP-CONICET), bajo la dirección del Dr. Hernán G. Rosli y la codirección de la Dra. Marina A. Pombo

“But you know, happiness can be found even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”

J. K. Rowling, *Harry Potter and the prisoner of Azkaban*.

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme la posibilidad de poder realizar el doctorado dentro del ámbito de la institución. Por brindar siempre educación pública, gratuita y de calidad.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la beca otorgada.

Al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), por brindarme el espacio y los recursos necesarios para poder llevar a cabo este trabajo.

Mi agradecimiento,

A mis directores, Hernán y Marina, por abrirme las puertas del lab para poder realizar mi trabajo de tesis cuando recién se estaban estableciendo en el INFIVE. Por su dedicación y compromiso incansables durante todo este trabajo. Gracias por cada idea, cada propuesta y por todo lo que me enseñaron.

A mi papá y mi mamá que, aunque nunca van a entender porque y para que elegí hacer esto, siempre están presentes *en todo y para todo* apoyándome, ayudándome y brindándome todo su cariño sin importar los 500km de distancia que nos separan.

A Facu, por ser mi apoyo incondicional día a día y por ser el mejor compañero de vida que se pudiera tener. Gracias por TODO, los vectores y los insumos, los protocolos, los viajes y la compañía en el INFIVE, los revelados de los WB, los consejos, las charlas, la calma y el amor en los momentos más difíciles. Gracias por alentarme siempre a nunca bajar los brazos y a confiar en mí. Este trabajo fue un gran desafío y una evaluación constante y sin tu ayuda yo no hubiera podido llegar acá. Gracias, Te amo!!!!

A Vicki, Core, Anto y Cata, por ser *mis amigas* y mis compañeras. Gracias por siempre prestarme algo, por cada mate y cada charla. Por alentarme a seguir y por la calidad humana y la generosidad que siempre tuvieron conmigo. Su compañía y su cariño fueron fundamentales para llegar hasta acá. Las quiero mucho!!! Y... aguanten los michis!!!

A Mau y Agus, dos personas que conocí gracias a este trabajo y que sin dudarlo me ayudaron y me aconsejaron siempre que se los pedí (incluso cuando ya no trabajaban en el INFIVE). Muchas gracias chicos, los quiero!! Como se extraña esa lista de té para tres!!

Al team secretaría, Cata, Agus, Santi y Maurito, por cada risa y cada mate. Sin lugar a duda los mejores almuerzos laborales son con ustedes.

A Diana, por ser la mejor profe de microscopia! Gracias por ayudarme en cada ensayo y por cada charla, estoma de por medio.

Al los VVs del IBBM, en especial a Edu, Facu y Gabo, por prestarme/regalarme/ayudarme con un montón de cosas desinteresadamente que me ayudaron mucho para poder realizar este trabajo.

Quiero hacer una mención especial para quienes me mimaron y me alimentaron durante las extensas jornadas de escritura en este último tiempo, los mejores vecinos del mundo mundial. ¡¡Vayan preparando el juguito, la timba y el karaoke!!

Y por último, pero no por eso menos importante, a las 3 bendiciones de 4 patas que elegí tener: Aramis, Intrusa y Merli. Gracias por maullarme/ladrarme todos los días y regalarme el amor más puro e incondicional que existe, que sin dudarlo me ayudó a llegar hasta acá.

A todos, muchas gracias!!!

Romi.

Publicaciones

Los resultados mostrados en la siguiente tesis han sido publicados en las siguientes revistas con referato internacional:

Ramos, R. N., Martin, G. B., Pombo, M. A. y Rosli, H. G. (2021).

“WRKY22 and WRKY25 transcription factors are positive regulators of defense responses in *Nicotiana benthamiana*”. *Plant Molecular Biology*, 105(1–2):65–82.

Ramos, R. N., Zhang N., Lauff D. B., Valenzuela-Riffo F., Figueroa C. R., Martin, G. B., Pombo, M. A. y Rosli, H. G. (2023).

“Loss-of-function mutations in WRKY22 and WRKY25 impair stomatal-mediated immunity and PTI and ETI responses against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*”. *Plant Molecular Biology*, 1-17.

En las siguientes actas de congresos:

Ramos, R. N., Pombo, M. A. y Rosli, H. G. (2018)

“Study of the role of two tomato WRKY transcription factors in the activation of the ETI response”

XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV) y XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal.

Ramos, R. N., Pombo, M. A. y Rosli, H. G. (2019)

“*NbWRKY22* and *NbWRKY25* VIGS-silenced plants are impaired in PTI and ETI defense responses”

XIV Congreso de la Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology y LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular.

Ramos, R. N., Zhang N., Martin, G. B., Pombo, M. A. y Rosli, H. G. (2020)

“Generación de plantas de tomate Δ WRKY22 y Δ WRKY25/22 mediante CRISPR-cas9”

IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina.

Ramos, R. N., Pombo, M. A. y Rosli, H. G. (2021)

“*SIWRKY22* and *SIWRKY25* are positives regulators of plant immunity”

XXXIII Argentinian meeting of plant physiology.

INDICE

Abreviaturas y unidades.....	8
1- Introducción general.....	12
1-1 Inmunidad Vegetal.....	13
1-1-1 <i>Pattern triggered immunity</i> (PTI).....	14
1-1-2 Patogenenesis bacteriana en plantas: supresión de la respuesta PTI.....	15
1-1-3 <i>Effector/NLRs triggered immunity</i> (ETI/NTI).....	16
1-1-4 Inmunidad estomática.....	17
1-1-5 <i>Feedback</i> ETI PTI.....	19
1-2 El tomate.....	20
1-3 Solanáceas como modelo de estudio: <i>Nicotiana benthamiana</i> y tomate.....	21
1-4 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , el agente causal de la enfermedad de la peca bacteriana.....	22
1-5 <i>Pst</i> DC3000 como modelo de estudio.....	23
1-6 Interacción tomate- <i>Pst</i>	25
1-7 Interacción <i>Nicotiana benthamiana</i> - <i>Pst</i>	26
1-8 Transcriptómica RNA-seq: identificación de genes involucrados en la inmunidad de tomate.....	26
1-9 La familia de factores de transcripción WRKY.....	27
1-10 WRKYs involucrados en estrés biótico.....	29
Hipótesis general y objetivos.....	30
2- Materiales y Métodos.....	31
2-1 Materiales.....	32
2-1-1 Reactivos químicos.....	32
2-1-2 Medios de cultivo utilizados.....	32
2-1-3 Cepas bacterianas.....	33
2-1-4 Vectores de clonado.....	33
2-1-5 Vectores binarios.....	33
2-1-6 Cebadores.....	34
2-1-7 Fragmentos para VIGS.....	35
2-1-8 Sueros.....	35
2-1-9 Especies vegetales utilizadas y condiciones de crecimiento.....	36
2-2 Métodos.....	36
2-2-1 Análisis filogenéticos.....	37
2-2-2 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).....	37
2-2-3 Análisis de regiones promotoras.....	38
2-2-4 Ensayos de muerte celular programada (MCP).....	38
2-2-5 Ensayos de enfermedad usando <i>P.s. tabaci</i>	39
2-2-6 Desafío de plantas de tomate con <i>Pst</i>	39
2-2-7 Ensayos de MCP utilizando elicitores no bacterianos.....	39
2-2-8 Ensayos de deposición de calosa.....	40
2-2-9 Ensayos de pérdida de electrolitos.....	40
2-2-10 Ensayos de supresión de muerte celular.....	40
2-2-11 Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Miniprep).....	41
2-2-12 Extracción total de ARN de tejido vegetal.....	41
2-2-13 Tratamiento con ADNasa del ARN total extraído.....	41

2-2-14 Reacción de transcripción reversa (RT).....	42
2-2-15 Reacciones de PCR a tiempo final.....	42
2-2-16 PCR cuantitativa (qPCR).....	42
2-2-17 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	42
2-2-18 Preparación de bacterias competentes químicas.....	43
2-2-19 Transformación de bacterias competentes químicas.....	43
2-2-20 PCR de colonia.....	44
2-2-21 Generación y genotipado de líneas de tomate <i>knock out</i> mediante la técnica de CRISPR-Cas9.....	44
2-2-22 Evaluación de potenciales genes <i>off-target</i> en el diseño de los ARNg.....	44
2-2-23 Determinación del número y conductancia de estomas en plantas de tomate.....	44
2-2-24 Determinación de la apertura estomática en plantas de tomate.....	45
2-2-25 Análisis estadístico.....	45
2-2-26 Ensayos de localización subcelular.....	46
2-2-27 Extracción de proteínas totales de tejido vegetal.....	46
2-2-28 Electroforesis en gel desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	46
2-2-29 Análisis de proteínas por Western blot.....	46
2-2-30 Co-inmunoprecipitación de proteínas: GFP-Trap.....	47
2-2-31 Complementación Bi-molecular de Fluorescencia (BiFC).....	47
2-2-32 Ensayos de levadura de doble híbrido (Y2H).....	48
2-2-33 Reacción histoquímica para el sistema reportero β -glucuronidasa (GUS).....	48
2-2-34 Análisis de correlación.....	48
3- Capítulo 1: Caracterización de la respuesta inmune de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> silenciadas para los genes <i>NbWRKY22a/b</i> y <i>NbWRKY25a/b</i>	50
3-1 Introducción.....	51
3-1-1 Estudio de las interacciones planta-patógeno utilizando <i>N. benthamiana</i> como planta modelo.....	51
3-1-2 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).....	51
3-1-3 Identificación de los genes candidatos <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i>	53
3-2 Resultados.....	55
3-2-1 Identificación de los genes <i>NbWRKY22a/b</i> y <i>NbWRKY25a/b</i> a partir de análisis filogenéticos.....	55
3-2-2 El silenciamiento de los genes ortólogos de <i>SIWRKY25</i> y <i>SIWRKY22</i> en <i>N. benthamiana</i> compromete el desarrollo de la MCP asociada al reconocimiento del efector AvrPto.....	57
3-2-3 Determinación de la eficiencia y especificidad del silenciamiento.....	60
3-2-4 <i>NbWRKY25ab</i> y <i>NbWRKY22ab</i> contribuyen a la resistencia contra <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (AvrPto).....	61
3-2-5 Las plantas con los genes <i>NbWRKYs</i> silenciados tienen comprometida la resistencia desencadenada por Roq1 luego del reconocimiento del efector HopQ1-1 en <i>N. benthamiana</i>	64
3-2-6 <i>NbWRKY22ab</i> y <i>NbWRKY25ab</i> participan en el desarrollo de la MCP asociada a otros pares de proteínas R/elicitores.....	66
3-2-7 <i>NbWRKY22ab</i> y <i>NbWRKY25ab</i> no se encuentran río abajo de la vía de señalización de M3K α	68
3-2-8 <i>NbWRKY22ab</i> y <i>NbWRKY25ab</i> participan en la activación de la respuesta PTI.....	70

3-2-8.1 <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i> se inducen transcripcionalmente durante la PTI temprana.....	70
3-2-8.2 El silenciamiento de <i>NbWRKY22ab</i> y <i>NbWRKY25ab</i> reduce la deposición de calosa en la pared celular en plantas de <i>N. benthamiana</i>	71
3-2-8.3 La supresión de la muerte celular se ve afectada en plantas silenciadas para los genes <i>NbWRKYs</i>	73
3.3 Conclusiones.....	75
4- Capítulo 2: Caracterización de la respuesta inmune de plantas de tomate <i>knock out</i> para los factores de transcripción <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i>	76
4-1 Introducción.....	77
4-1-1 Enfermedad de la peca bacteriana y la importancia de su estudio en tomate	77
4-1-2 Edición de genomas utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 en plantas.....	77
4-2 Resultados.....	81
4-2-1 Generación de plantas de tomate <i>knock out</i> para <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i> utilizando la técnica CRISPR-Cas9.....	81
4-2-2 Determinación de la especificidad de <i>SIWRKY22</i> -ARNg y <i>SIWRKY25</i> -ARNg.....	85
4-2-3 Las plantas mutantes para los FT <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i> poseen afectada la respuesta ETI mediada por Pto/Prf.....	86
4-2-4 Las plantas de tomate simples y doble mutantes para los <i>SIWRKYs</i> tienen una inmunidad PTI comprometida.....	88
4-2-4.1 Determinación de la deposición de calosa en la pared celular de las plantas de tomate KO para <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i>	88
4-2-4.2 Recuento bacteriano en plantas KO para los genes <i>SIWRKYs</i> desafiadas con <i>Pst</i> DC3000 Δ <i>avrPto</i> Δ <i>avrPtoB</i>	90
4-2-5 Las plantas mutantes tienen afectada la inmunidad estomática.....	91
4-2-5.1 Recuento de bacterias <i>Pst</i> DC3000 Δ <i>avrPto</i> Δ <i>avrPtoB</i> en las plantas KO para <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i> infiltradas por inmersión.....	91
4-2-5.2 Medida de la conductancia estomática y del número de estomas en las plantas Δ <i>Slwrky22</i> , Δ <i>Slwrky25</i> y Δ <i>Slwrky22/25</i>	92
4-2-5.3 Determinación de la apertura estomática en condiciones basales y de infección	94
4-3 Conclusiones.....	97
5- Capítulo 3: Análisis del mecanismo de acción de <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i>	98
5-1 Introducción.....	99
5-1-1 Localización celular de factores de transcripción involucrados en las respuestas inmunes de las plantas.....	99
5-1-2 Factores de transcripción WRKY y su mecanismo de unión a ADN.....	99
5-1-3 WRKYs involucrados en cascadas de señalización activadas por las respuestas inmunes de las plantas.....	100
5-2 Resultados.....	103
5-2-1 Análisis de la localización subcelular de <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i> en presencia y ausencia de <i>Pst</i> DC3000.....	103
5-2-2 Estudio de la interacción entre <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	105
5-2-3 Búsqueda de <i>W-box</i> y análisis de expresión temporal de <i>SIWRKY22</i> y <i>SIWRKY25</i> en tomate mediante RT-qPCR.....	107

5-2-4 Determinación de la activación del promotor de <i>SIWRKY25</i> por <i>SIWRKY22</i> mediante reacción histoquímica de GUS.....	110
5-2-5 Confirmación de la funcionalidad de <i>SIWRKY22</i> (-3bp).....	111
5-2-6 Búsqueda de genes candidatos a ser co-regulados por los <i>SIWRKY</i> s en la inmunidad de tomate.....	112
5-3 Conclusiones.....	118
6- Discusión general.....	119
7- Bibliografía.....	126
8- Anexos.....	147

ABREVIATURAS

Aa: aminoácido
ABA: *abscisic acid*
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADNg: ADN genómico
ADP: adenosindifosfato
APIP5: *AVRPIZ-T-INTERACTING PROTEIN 5*
ARD1: *ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1*
ARN: ácido ribonucleico
ARNdc: ARN doble cadena
ARNg: ARN guía
ARNm: ARN mensajero
ATP: adenosintrifosfato
BiFC: *Bimolecular fluorescence complementation*
BIK1: *Arabidopsis Botrytis-induced kinase 1*
BPH14: *Brown planthopper resistance 14*
CC-NB-LRR: *coiled-coil-NB-LRR*
CCR-NB-LRR: *coiled-coil resistance to powdery mildew 8-NB-LRR*
CDPK: *calcium-dependent protein kinases*
CoIP: coinmunoprecipitación
COR: coronatina
crARN: ARN CRISPR
CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*
DAMPs: *damage-associated molecular patterns*
DBD WRKY: *DNA Binding Domain WRKY*
DEPC: pirocarbonato de dietilo
Dpi: días post infiltración
EDTA: ácido etilendiamintetracético
Epk1: *ETI-specific protein kinase 1*
ETI: *effector-triggered immunity*
FT: factor de transcripción
GUS: β -glucuronidasa
GFP: *green fluorescent protein*
HDR: *homology directed repair*
Hrc: *hrp conserved*
Hrp: *hypersensitive response and pathogenicity*
Hpi: horas post infiltración
HR: *hypersensitive response*
IAA: ácido indol-3-acético
ID: *integrated domain*
INDELS: inserciones-deleciones
JA: *jasmonic acid*
kDa: kilo Dalton
KO: *knock out*
LRR-RLK: *leucine-rich repeat receptor-like kinases*
LRR: *leucine rich repeat*
LSD1: *LESIONS SIMULATING DISEASE 1*
MAPK: *mitogen-activated protein kinases*

MC: muerte celular
MCP: muerte celular programada
M3K α : MAP quinasa quinasa quinasa α
MKK2: MAP quinasa quinasa 2
NAD: Nicotiamida Adenina Dinucleotido
NBD: *nucleotide-binding domain*
NB-LRR: *nucleotide binding-leucine rich repeat*
NEA: noreste argentino
NHEJ: *non homologous endjoining*
NLR: *nucleotide binding-leucine rich repeat*
NO: *nitric oxid*
NOA: noroeste argentino
NRC: *protein required for hypersensitive-response-associated cell death*
NRG1: *N REQUIREMENT GENE 1*
ON: *over night*
OST1: *OPEN-STOMATA 1*
PAM: *protospacer adjacent motif*
PAMPs/MAMPs: *pathogen/microbe associated molecular patterns*
PTGS: *Post-Transcriptional Gene Silencing*
PTI: *pattern-triggered immunity*
PRRs: *pattern-recognition receptors*
Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
P.s. tabaci: *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*
RdRp: *RNA-dependent RNA polymerase*
RFP: *red fluorescent protein*
RG-PtoR: Río grande Pto-R
RISC: *RNA Induced Silencing Complex*
RLCK: *receptor-like cytoplasmic kinase*
ROS: *reactive oxygen species*
Roq1: *recognition of XopQ 1*
RRP1: *RIPENING-REGULATED PROTEIN 1*
RPKM: *Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*
RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real
SA: *salicylic acid*
SDS: dodecil sulfato de sodio
siRNA: *small interfering RNA*
SMC: supresión de la muerte celular
T2SS: sistema de secreción tipo 2
T3SS: sistema de secreción tipo 3
T4SS: sistema de secreción tipo 4
TAE: buffer Tris-Ácido acético glacial-EDTA
TIDE: *Tracking of Indels by Decomposition*
TIR-NB-LRR: *toll/interleukin-1 receptor-NB-LRR*
Tm: temperatura de *melting*
U2B": ribonucleoproteína nuclear pequeña U2 B"
VIGS: *virus induced gene silencing*
VV: vector vacío
Wt: *wild type*
Y2H: *yeast two-hybrid*
YFP: *yellow fluorescent protein*

ZAR1: NLR HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1

UNIDADES

µg: microgramos

mg: miligramos

g: gramos

µM: micromolar

mmol: milimol

µL: microlitros

mL: mililitros

nm: nanómetros

mm: milímetros

cm: centímetros

m: metros

seg: segundos

min: minutos

h: horas

µS: microsiemens

ufc: unidades formadoras de colonias

°C: grados Celsius



1- INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Inmunidad vegetal:

Las diferentes especies de plantas pueden ser infectadas por una gran variedad de organismos patógenos tales como bacterias, hongos, virus o nemátodos. Dichos patógenos están especializados en invadir distintos órganos de la planta, ya sea en su parte aérea o en las raíces y favorecer su proliferación. Durante su evolución los patógenos han adquirido la capacidad de multiplicarse y propagarse, utilizando a las plantas como su fuente de nutrientes. Estos microorganismos patógenos se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a las características de su estrategia de infección y nutrición: 1-biotróficos, aquellos que se nutren de las células vegetales vivas (p. ej., el oomicete *Hyaloperonospora arabidopsidis*), 2-necrotróficos, caracterizados por matar a las células vegetales del hospedante para tomar provecho de su contenido (p. ej., el hongo *Botrytis cinerea*) y 3-hemibiotróficos, cuyo ciclo de vida comparte características de los biotróficos y necrotróficos, ya que en una primera etapa requieren de tejido vivo pero en etapas más avanzadas de la infección se produce la necrosis del tejido infectado (p. ej., la bacteria *Pseudomonas syringae*) (Kemen y Jones, 2012).

En general, las plantas contrarrestan el ataque de dichos microorganismos utilizando distintos tipos de barreras y mecanismos de inmunidad. Por un lado, las plantas poseen características estructurales que actúan como barreras físicas que impiden el ingreso y la propagación dentro la planta a una gran cantidad de patógenos. Dichas barreras físicas son la cutícula y la pared celular. La cutícula está presente en la superficie externa de la epidermis aérea de todas las plantas terrestres y está compuesta principalmente por cutina y ceras (Yeats y Rose, 2013). Las ceras en las superficies de las hojas y los frutos repelen al agua, por lo que evitan la formación de una película sobre la cual los patógenos puedan depositarse y germinar sus esporas (hongos) o multiplicarse (bacterias). Algunas plantas pueden formar una capa de pelos (tricomas) en su superficie que cumple una función similar. Sin embargo, existen patógenos fúngicos capaces de secretar cutinasas que hidrolizan el poliéster de la cutina, lo que les permite romper esta barrera (Mendgen y col., 1996; Longhi y Cambillau, 1999). Por otro lado, la pared celular es un exoesqueleto que rodea la célula vegetal y consiste en microfibrillas de celulosa y hemicelulosas, embebidas en una matriz de pectinas. También posee proteínas y, en ciertos casos, depósitos de lignina (Somerville y col., 2004). Proporciona soporte estructural y protección contra los patógenos y es estrictamente regulada mediante diversos mecanismos moleculares (Hamann, 2012). La combinación de cutícula y pared celular vegetal hace que las bacterias y algunos hongos no pueden penetrar directamente a través de la epidermis de la planta. Sin embargo, existen aberturas naturales por las cuales son capaces de ingresar, como los nectártodos (Bubán y col., 2003), los hidátodos (Paauw y col., 2023) y, los más relevantes, los estomas (Melotto y col., 2006). Además, las heridas de las plantas, causadas por plagas, herbívoros o tormentas, constituyen otras posibles vías de entrada.

Otro mecanismo de defensa de las plantas frente a los patógenos involucra la producción de compuestos antimicrobianos conocidos como fitoanticipinas (Osborn, 1996). Tales propiedades las tienen varias proteínas, compuestos fenólicos, taninos y algunos metabolitos, como los glucosinatos y sus derivados, que son metabolitos secundarios producidos en *Brassicaceae* (Tierens y col., 2001).

Aquellos patógenos que sortean con éxito estas barreras tienen que enfrentar posteriormente al sistema inmune de la planta. El mismo consta de dos estratos de defensa denominados, PTI (del inglés, *Pattern-triggered immunity*) y ETI o NTI (del inglés, *effector-triggered immunity*

o *NLR-triggered immunity*, respectivamente). Dichos estratos de la inmunidad vegetal serán explicados a continuación.

1.1.1 *Pattern-triggered immunity (PTI)*

El primer estrato de la inmunidad vegetal se denomina PTI, la cual se activa principalmente luego de la percepción de patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs/MAMPs, del inglés, *pathogen/microbe associated molecular patterns*) a través de receptores de membrana denominados PRRs (del inglés, *pattern-recognition receptors*) (Bigeard y col., 2015). Ejemplos de receptores del tipo PRR que participan en la respuesta PTI son el receptor FLS2 que detecta el epítipo flg22 de la flagelina, el receptor del factor de elongación bacteriano (EF-Tu) ERF (presente en *A. thaliana*, entre otras especies) que detecta un péptido de 18 aminoácidos de EF-Tu (elf18) y el receptor FLS3 (sólo presente en algunas Solanáceas, como tomate) que detecta el epítipo flgII-28 de la flagelina (Gómez-Gómez y col., 2001; Macho y Zipfel, 2014; Hind y col., 2016).

Las plantas también tienen la capacidad activar respuestas similares a la PTI por la percepción de patrones moleculares endógenos asociados al daño (DAMPs, del inglés, *damage-associated molecular patterns*), que pueden ser moléculas endógenas que cambian su localización o son degradadas como consecuencia de la infección de patógenos (Macho y Zipfel, 2014).

En general, la PTI es una respuesta rápida que contribuye a la resistencia basal de las plantas frente a microbios y patógenos. La activación de esta respuesta induce una serie de mecanismos de defensa que incluye el cierre de estomas para limitar la entrada de microorganismos (Melotto y col., 2006), la reducción del transporte de moléculas desde el citosol hacia el apoplasto a fin de disminuir la disponibilidad de nutrientes (Chen y col., 2010a; Wang y col., 2012), la producción y secreción de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas y péptidos relacionados con la defensa (Cowan, 1999; Ahuja y col., 2012; Bednarek, 2012), la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que poseen efectos tóxicos sobre algunos patógenos (O'Brien y col., 2012), la deposición de calosa en la pared celular y el aumento de la concentración intracelular de calcio (Li y col., 2016). Además, la percepción de diferentes PAMPs por sus correspondientes PRRs desencadena la reprogramación transcripcional de un gran conjunto de genes. En *A. thaliana*, una gran cantidad de genes son regulados positivamente por tratamientos con flg22 y elf18 (Zipfel y col., 2006). En dicha especie está descrito que tanto FLS2 como EFR, luego de la detección de sus correspondientes PAMPs, inician una cascada de señalización mediante la heterodimerización con el correceptor BAK1 de la familia LRR-RLK (del inglés *leucine-rich repeat receptor-like kinases*) que finaliza en la producción transitoria de ROS (Böhm y col., 2014; Macho y Zipfel, 2014). La detección de los PAMPs también produce la activación de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinases*) y proteína quinasas dependientes de calcio (CDPK, del inglés *calcium-dependent protein kinases*), proteínas implicadas en la regulación de la deposición de calosa, el cierre estomático, la producción de etileno y de componentes antimicrobianos (Macho y Zipfel, 2014). Las vías de señalización de estos dos grupos de quinasas son posibles puntos convergentes aguas abajo de la detección de los PAMPs para controlar la reprogramación transcripcional de la PTI, por lo que entre las moléculas que son

genes blanco de las MAPKs se destacan los factores de transcripción (Tena y col., 2011). Miembros de las familias WRKY, bZIP y ERF se han reportado como importantes genes blanco en las cascadas de señalización de MAPKs durante la activación de la PTI (Andreasson y col., 2005; Mao y col., 2011; Brader y col., 2007; Bethke y col., 2009).

En conjunto, todos estos eventos conducen a la inhibición de la multiplicación del patógeno y a la contención de la progresión de la enfermedad.

1.1.2 Patogénesis bacteriana en plantas: supresión de la respuesta PTI

Una estrategia eficaz de virulencia de los patógenos de plantas es secretar proteínas efectoras o ADN en la célula huésped para suprimir la inmunidad vegetal. En las bacterias patógenas se han estudiado ampliamente tres tipos de sistemas de secreción: tipo II, tipo III y tipo IV. El sistema de secreción tipo II (T2SS), característico en el género *Erwinia*, es utilizado para la secreción de enzimas del tipo pectinasas, endoglucanasas y celulasas que degradan la pared celular y causan la pudrición blanda, fenotipo característico asociado a estos patógenos (Jha y col., 2005). El sistema de secreción tipo IV (T4SS) tiene un papel crítico en la patogénesis de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) por el cual transfiere proteínas y ADN dentro de la célula vegetal (Gelvin y col., 2000). Por último, el sistema de secreción tipo III (T3SS) es el más estudiado en patógenos de plantas, típico de patovares de *Pseudomonas syringae* como *Pst* (Abramovitch y col., 2006). El T3SS está codificado por los genes *hrp* (del inglés, *hypersensitive response and pathogenicity*) y *hrc* (del inglés, *hrp conserved*) y es un complejo multiproteico, con el que las bacterias forman un pilus en el espacio apoplástico por donde inyectan proteínas efectoras (efectores) dentro del citoplasma de la célula vegetal. Dichos efectores pueden inhibir la respuesta inmune PTI y provocar alteraciones metabólicas en la célula para favorecer su propio desarrollo y virulencia (Macho, 2016). Por ejemplo, diferentes especies de los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas* que poseen T3SS son capaces de inducir la expresión de genes de la familia SWEET encargados de transportar azúcares promoviendo posiblemente de esta manera la salida de este tipo de moléculas desde las células vegetales infectadas hacia el apoplasto para satisfacer las necesidades nutricionales bacterianas (Yang y col., 2006; Chen y col., 2010a). Además de proporcionar una fuente de carbono, la liberación de azúcares muy probablemente altere el gradiente osmótico entre las células vegetales y el espacio apoplástico, provocando la liberación de agua hacia el apoplasto y proporcionando así una fuente de agua para los patógenos bacterianos en los sitios de infección.

Otra estrategia utilizada por bacterias patógenas que poseen T3SS es la manipulación de las vías de señalización de hormonas vegetales debido a que dichas hormonas son reguladoras claves de la inmunidad vegetal y de la mayoría de los aspectos fisiológicos de las plantas (Kazan y Lyons, 2014). Un ejemplo ampliamente estudiado de esta estrategia es la manipulación de la señalización del ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) por parte de la mayoría de los patógenos bacterianos (Kazan y Lyons, 2014). SA es una hormona esencial para la inmunidad de las plantas contra los patógenos biotróficos, y la supresión de la señalización del SA tiene un gran impacto en la facilitación de la infección. Se ha reportado también que distintos efectores bacterianos activan la señalización de JA para promover la

infección (Jiang y col., 2013a; Gimenez-Ibanez y col., 2014). La hipótesis más fuerte es que estos patógenos bacterianos inducen la señalización de JA para modificar el antagonismo entre las vías de SA y JA y así interrumpir las respuestas de defensa de manera indirecta (Kazan y Lyons, 2014).

1.1.3 *Effector-triggered immunity (ETI) o NLR-triggered immunity (NTI)*

Como se mencionó anteriormente, algunas plantas evolucionaron un segundo estrato de defensa denominado ETI o NTI, a través de la adquisición de proteínas de resistencia (R) o NLRs. Estas proteínas, del tipo NB-LRR (del inglés, *nucleotide binding-leucine rich repeat*), poseen una estructura que consta de un dominio N-terminal variable, un dominio central de unión a nucleótidos NBD (del inglés, *nucleotide-binding domain*) y el dominio de repetición rico en leucina C-terminal LRR (del inglés, *leucine rich repeat*) (Jones y col., 2016). Sin embargo, algunas de ellas pueden desviarse de esta estructura común, por ausencia de dominios o incorporación de otros adicionales. Algunas de ellas pueden poseer distintos dominios integrados (ID, del inglés *integrated domain*), por ejemplo, *Arabidopsis* RRS1-R la cual incluye un dominio WRKY en la región C-terminal. Estos dominios accesorios pueden desempeñar un papel crítico en el reconocimiento de efectores y su regulación (Barragan y Weigel, 2021; Saucet y col., 2021). En función de su dominio N-terminal se las puede clasificar como TIR-NB-LRR (del inglés, *Toll/interleukin-1 receptor-NB-LRR*), CC-NB-LRR (del inglés, *coiled-coil-NB-LRR*) y CCR-NB-LRR (del inglés, *coiled-coil resistance to powdery mildew 8-NB-LRR*) (Jacob y col., 2013; Shao y col., Zhong y Cheng, 2016).

Estas proteínas tienen la capacidad de reconocer la presencia de efectores de manera directa o indirecta para luego activar la respuesta ETI (Cui y col., 2009; Kourelis y col., 2018). En el caso de la directa las NLRs se unen a través de alguno de sus dominios funcionales al efector, lo que provoca un cambio conformacional y su consecuente activación. La indirecta involucra la percepción por medio de alguna proteína adicional perteneciente al hospedador. De acuerdo a las características que posea esa proteína se las denomina "*guardee*" o "*decoy*". Las *guardee* son aquellas proteínas que poseen una función celular específica (a parte de su rol en el reconocimiento del patógeno) y son blanco directo de algún efector, la modificación de las mismas es monitoreada por la NLR y es lo que lleva a la activación de la respuesta inmune. Las denominadas *decoy* se diferencian de las *guardee* porque no poseen una clara función biológica excepto el reconocimiento del patógeno.

Cuando las proteínas R tienen la capacidad de reconocer (directa o indirectamente) a los efectores y esa misma proteína puede activar la señalización de la respuesta inmune, se denominan "*functional singletons*" (Adachi y col., 2019). Sin embargo, existen proteínas que sólo reconocen al patógeno denominadas "*sensor*" y proteínas que se encargan de activar la cascada de señalización de la ETI denominadas "*helper*". Ejemplos de proteínas *helper* importantes en la detección de patógenos para la activación de la respuesta ETI son ARD1 (*ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1*), NRG1 (*N REQUIREMENT GENE 1*), y en solanáceas la familia de las NRC (NB-LRR, *protein required for hypersensitive-response-associated cell death*) (Lapin y col., 2019; Lapin y col., 2020; Feehan y col., 2020). En general, las TIR-NB-LRR y las CC-NB-LRR actúan como *sensor* detectando directa o indirectamente los efectores y las CCR-NB-LRR se desempeñan como *helper* (Adachi y col., 2019). El

mecanismo de activación típico de estas proteínas involucra una serie de cambios conformacionales en ellas. En ausencia del patógeno el dominio LRR interactúa estrechamente con el dominio NBD el cual permanece unido al ADP y mantiene así inactiva a la proteína (Hu y col., 2013, Wang y col., 2019a). En presencia de efectores, se produce la liberación del dominio NBD lo que permite el intercambio de ADP por ATP y la unión del ATP promueve la oligomerización de la proteína dando como resultado la activación de diferentes cascadas de señalización (Jones y col., 2016).

La primera proteína R del tipo CC-NB-LRR de la cual se reportó su estructura y modo de activación fue la proteína de *A. thaliana* ZAR1 (*NLR HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1*). Esta proteína puede encontrarse en un estado inactivo unido a ADP, un estado de transición libre de ligandos y un estado oligomérico activo unido a ATP (Wang y col., 2019a,b). Luego de ser activada ZAR1 puede formar un canal permeable al Ca^{+2} en la membrana plasmática a través de sus dominios CC lo que conlleva a un flujo de iones Ca^{+2} , la producción de ROS y la muerte celular (Bi y col., 2021). Otros dos estudios más recientes en donde se analizaron dos proteínas del tipo TIR-NB-LRR, RRP1 (*RIPENING-REGULATED PROTEIN 1*) y Roq1 (*Recognition of XopQ 1*) pertenecientes a *A. thaliana* y *N. benthamiana* respectivamente, reportaron que estas proteínas poseen funciones NAD^+ hidrolasas que ayudan a desencadenar vías de señalización que conducen en la muerte celular (Wan y col., 2019a,b; Ma y col., 2020; Martin y col., 2020).

En general, la activación de dichas proteínas, y en consecuencia la de la ETI, conlleva a la generación de ROS, la biosíntesis y acumulación de SA, la pérdida de electrolitos hacia el apoplasto por parte de las células que están muriendo, el aumento de la expresión de genes relacionados con la patogenicidad (PR), culminando en una muerte celular programada (MCP), también conocida como respuesta hipersensible (HR). Este proceso conduce a que las células infectadas mueran para contener el crecimiento y la dispersión del patógeno bacteriano (Martin, 2011). Por dichas características la ETI es una respuesta rápida, robusta y localizada.

El inicio de la ETI se correlaciona con una compleja red de vías de señalización de la defensa, lo que da como resultado respuestas celulares defensivas y eventos de reprogramación transcripcional a gran escala (Bigeard y col., 2015; Meng y Zhang, 2013; Pombo y col., 2014; Rosli y Martin, 2015).

Se han reportado efectores que tienen la capacidad de inhibir la activación de la ETI debido a que las interacciones patógeno-hospedador se encuentran en constante evolución (Wei y col. 2018).

1.1.4 Inmunidad estomática

Los estomas son poros microscópicos formados por pares de células denominadas células de la guarda que se encuentran en la epidermis de las plantas terrestres y son esenciales para el intercambio de gases de la planta con el medio ambiente y el control de la pérdida de agua. En consecuencia, las plantas regulan la apertura de los estomas en respuesta a las condiciones ambientales, como la humedad relativa, la concentración de CO_2 y la intensidad de la luz (Zeng y col., 2010). Como se mencionó anteriormente, la apertura de los estomas se ha reconocido durante mucho tiempo como un importante punto de entrada para las bacterias patógenas dentro

de las plantas (Huang, 1986). En consecuencia, las plantas han desarrollado mecanismos para regular dicha apertura como parte de la respuesta inmune contra la invasión de patógenos (Melotto y col., 2006). En este sentido, se ha demostrado que los estomas se cierran una hora luego de su exposición con la bacteria debido a la detección de PAMPs para evitar la entrada de patógenos como *Pst* DC3000 (Melotto y col., 2006). Estudios utilizando PAMPs purificados han demostrado que el cierre de los estomas en respuesta al estrés biótico requiere de la fitohormona ácido abscísico (ABA), la quinasa OPEN-STOMATA 1 (OST1), la producción de ROS y NO, la proteína G y la regulación de canales de K⁺ (Figura 1a) (Melotto y col., 2006; Zhang y col., 2008; Neill y col., 2008). El cierre de estomas desencadenado por bacterias patógenas o PAMPs requiere también de la proteína quinasa MPK3 (Gudesblat y col., 2009), la hormona vegetal de defensa SA (Melotto y col., 2006) y el componente de señalización de SA NRP1 (Zeng y col., 2010). El análisis de epistasis realizado por Zeng y colaboradores (2010) sugiere que la señalización de PAMPs precede a la señalización de SA, que a su vez es previa a la de ABA.

Como contra-defensa, los patógenos han desarrollado factores de virulencia específicos para suprimir la defensa estomática. *Pst* DC3000 produce una toxina de policétido, llamada coronatina (COR), para abrir activamente los estomas y promover la infección (Figura 1b) (Xin y He, 2013). COR es un factor de virulencia clave para la infección por *Pst* DC3000 en *A. thaliana* y tomate (Ma y col., 1991; Mittal y Davis, 1995; Brooks y col., 2004; Cui y col., 2005). En este sentido, se sabe que COR interviene en la señalización de ABA para producir la reapertura de los estomas y, además, afecta la inhibición de flg22 sobre los flujos de K⁺ en las células de la guarda, involucrados en el cierre estomático (Melotto y col., 2006; Zhang y col., 2008). Adicionalmente, la toxina COR es un potente agonista del receptor de JA en plantas, produciendo la activación de su vía de señalización y consecuentemente reprimiendo la vía del SA, vía de vital importancia para la resistencia a *Pst* (Sheard y col., 2010; Xin y col., 2013).

Recientemente se ha demostrado que el cierre estomático también es manipulado por algunos efectores (Figura 1c). Se reportó que *Pst* utiliza los efectores AvrE1 y HopM1 para manipular los estomas en etapas avanzadas de la infección, induciendo el cierre de los estomas al afectar la acumulación de ABA. Como consecuencia de esto, se favorece un aumento de la humedad en el apoplasto que facilita la proliferación del patógeno (Hu y col., 2022, Roussin-Léveillé y col., 2022).

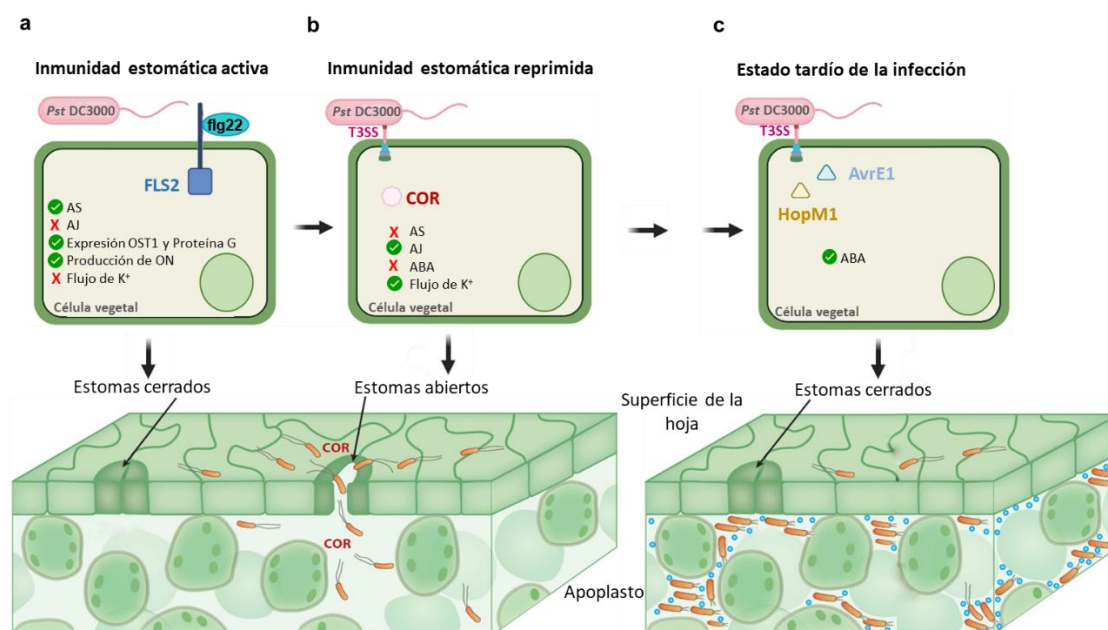


Figura 1. Esquema representativo de la inmunidad estomática. (a) Como consecuencia de la detección de PAMPs como flg22, las plantas cierran sus estomas para evitar la entrada de bacterias patógenas como *Pst* DC3000, activando procesos tales como la acumulación de SA y NO, aumentando la expresión de las proteínas OST1 y G, entre otros. (b) *Pst* DC3000 introduce dentro de la célula la toxina COR la cual interfiere en el flujo de iones K^+ de las células de la guarda y activa la vía de señalización del JA para producir la apertura de los estomas y favorecer la proliferación bacteriana. (c) En estadios tardíos de infección algunos efectores de *Pst* DC3000 como HopM1 y AvrE1 conducen a la acumulación de ABA, provocando el cierre estomático. Esto produce un aumento de la humedad en el apoplasto y favorece la proliferación del patógeno. Adaptado de Xin y col., 2013.

1.1.5 Feedback PTI-ETI

Aunque las respuestas PTI y ETI se activan mediante el reconocimiento de diferentes ligandos por parte de diferentes clases de receptores y que, además, involucran distintas cascadas de señalización temprana, creciente evidencia sugiere que estas dos respuestas de defensa están funcionalmente interconectadas y que no son dos estratos independientes, como se pensaba. Recientemente se ha demostrado que las triples mutantes de los receptores y co-receptores PRRs de *A. thaliana* *fls2 efr cerk1* (del inglés, *chitin elicitor receptor kinase 1*) y *bak1 bkk1 (bak1-like1) cerk1* están notablemente afectadas en la respuesta inmune ETI cuando se desafían con el patógeno *Pst* (Yuan y col., 2021). En este trabajo se observó que el receptor BIK1 es necesario para la activación completa de la NADPH oxidasa RBOHD y que la producción de ROS por parte de esta enzima es un evento crítico de señalización temprana que conecta la inmunidad mediada por PRRs y NLRs. Además, observaron que el receptor BIK1 es necesario también para la resistencia bacteriana durante la respuesta ETI. Por otro lado, la señalización de las NLRs aumenta rápidamente los niveles de transcritos y/o proteínas de componentes claves de la respuesta PTI (Yuan y col., 2021). En este trabajo se propone un modelo de acción que conceptualmente dos importantes cascadas de señalización de las respuestas inmunes PTI y ETI y, además, se hace un enfoque mecanístico con respecto a algunas similitudes observadas durante mucho tiempo entre ambas respuestas.

Ngou y colaboradores (2021) observaron que el reconocimiento de patógenos por parte de PRRs activa múltiples proteínas quinasas y NADPH oxidasas y a su vez, la activación de los receptores NLRs conllevan a un aumento en la expresión de los receptores de membrana, contribuyendo a su activación. La HR desencadenada por las proteínas R es fuertemente potenciada por receptores PRRs, por lo que la activación de cualquiera de los dos estratos de la inmunidad vegetal por sí solos son insuficientes para proporcionar una resistencia eficaz contra el patógeno bacteriano *Pst*.

Otros dos trabajos publicados recientemente se focalizaron en estudiar si componentes importantes de la respuesta ETI, como las proteínas EDS1, PAD4, SAG101 y NRG1 se encontraban implicadas en la PTI (Pruitt y col., 2021; Tian y col., 2021). Pruitt y colaboradores observaron que en plantas de *A. thaliana* mutantes *eds1* y *pad4* la producción de etileno, de ROS y la deposición de calosa fueron sustancialmente menores en comparación con las plantas del tipo salvaje luego del desafío con el elicitor de oomicetes nlp20. Por otro lado, Tian y colaboradores encontraron que la PTI está afectada en mutantes para la señalización TNL (EDS1, PAD4, ADR1, SAG101 y NRG1) en términos de producción de SA y el crecimiento de patógenos.

Estos importantes trabajos demuestran que las respuestas inmunes PTI y ETI se potencian mutuamente para activar respuestas de defensa más fuertes frente a la infección de patógenos.

1.2 El tomate

El tomate cultivado es originario de Perú, Ecuador y América Central en donde crece de manera salvaje, pero se cree que los primeros pueblos en domesticar su cultivo fueron poblaciones aztecas (Prance y Nesbitt, 2006). Pertenece a la familia de las Solanáceas y la especie se denomina *Solanum lycopersicum*. Es una planta perenne de porte arbustivo y se la cultiva tradicionalmente como anual. Puede desarrollarse en forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas).

Si bien el tomate botánicamente es un fruto, el mismo se incluye entre los vegetales denominados hortalizas. El consumo de esta hortaliza aporta componentes nutritivos y funcionales como carotenoides, ácido ascórbico, vitamina E, ácido fólico, flavonoides, potasio, fibras y proteínas. Los beneficios a la salud asociados a su consumo se atribuyen en parte a la presencia de compuestos antioxidantes que poseen la capacidad de reducir la presencia de radicales libres que dañan a las células (Clinton, 1998; Gerster, 1997).

El tomate es la segunda hortaliza más importante del mundo en cuanto al volumen de producción, después de la papa. Su demanda aumenta continuamente desde los últimos 15 años y con ella su cultivo, producción y comercialización. Su consumo a nivel mundial tuvo un incremento de 4,9 a 5,6 kg/hab/año en los últimos 10 años (Secretaría de Alimentos y Bioeconomía, 2018). Su producción a nivel mundial llegó a las 186.821.216 toneladas, ocupando un área de 5.051.983 hectáreas en el año 2020 (fao.org/faostat).

La producción promedio anual de tomate argentino en los últimos años se ubica en torno a 1.100.000 toneladas, ocupando 17.000 hectáreas. En el año 2022, se exportaron 25.000 toneladas, un 66% más que lo que se registró en el año 2021. Las exportaciones de tomate

fresco tienen a Paraguay como el destino principal, seguido por Brasil, Chile y Uruguay. Éste tiene dos principales destinos, el consumo de su fruto fresco y la elaboración de productos industrializados (puré, salsas, deshidratados, etc.). De la producción anual aproximadamente 60-70% se destina al mercado de consumo fresco y un 30-40% a la industria (Dirección de Producción Agrícola, 2022). A lo largo del territorio argentino muchas provincias poseen las condiciones agroecológicas favorables para el desarrollo del cultivo de tomate. En la Figura 2 se muestra un mapa de Argentina en el que se señalan las principales provincias productoras: Mendoza y San Juan (región cuyana), Salta y Jujuy (región NOA), Corrientes y Formosa (NEA), Río Negro, y Buenos Aires (donde se destaca el cinturón hortícola de Buenos Aires y de La Plata), Mar del Plata y el Sur de Buenos Aires (Dirección de Producción Agrícola, 2021).



Figura 2. Cultivo de tomate en Argentina. Mapa de las principales zonas productoras de tomate. El tamaño de los tomates en cada región es proporcional a la superficie de cultivo en dicha área. Cuyo: 4900 ha, NOA: 3400 ha, cinturón hortícola de Bs. As. y La Plata: 1500 ha, Río Negro: 1250 ha, Corrientes: 625 ha. Adaptado de Dirección de Producción Agrícola, 2021-2022.

1.3 Solanáceas como modelo de estudio: *Nicotiana benthamiana* y tomate

La familia de las solanáceas contiene más de 3000 especies, muchas de importante interés económico como la papa, el tomate, la berenjena y el tabaco. Una solanácea de importante interés científico es *Nicotiana benthamiana*, perteneciente al género *Nicotiana* (Solanaceae: Linnaeus 1753), que incluye 76 especies que se distribuyen principalmente en áreas tropicales y subtropicales, la mayoría en América del Sur y Australia (Knapp y col., 2004). El interés científico de *N. benthamiana* radica en distintas características de la especie. Es el huésped experimental más utilizado en virología vegetal, debido principalmente a la gran cantidad de diversos virus que pueden infectarla con éxito. Además, *N. benthamiana* es susceptible a una amplia variedad de otros agentes patógenos de plantas (como bacterias, oomicetos, hongos, etc.), lo que convierte a esta especie en modelo para la investigación de patógenos de plantas

y para el estudio y caracterización de las respuestas inmunes asociadas. Dos características muy importantes a la hora de trabajar en el laboratorio con *N. benthamiana* son, por un lado, que es muy eficiente el silenciamiento de genes utilizando la técnica de VIGS (del inglés, *virus induced gene silencing*) y, por el otro, la sencilla y eficiente expresión transitoria de proteínas utilizando *A. tumefaciens*. Esta última característica permite realizar ensayos de localización subcelular de proteínas, estudio *in vivo* de la interacción entre ellas, entre muchos otros (Goodin y col., 2008). Además, esta planta cuenta con un tamaño de hoja grande lo que es beneficioso para realizar distintos ensayos de observación fenotípica. Finalmente, su genoma se encuentra secuenciado desde hace unos años (Bombarely y col., 2012), lo cual facilita el uso de esta especie.

Por otro lado, la popularidad del tomate ha ido en aumento a lo largo de los años, hasta convertirse en un organismo modelo para programas de investigación, tanto con fines aplicados como de ciencia básica. Esto se debe a diferentes características que posee tales como su ciclo de vida relativamente corto; su alta autofertilidad y homocigosidad; la facilidad de polinización controlada e hibridación; que posee un genoma relativamente pequeño estimado en aproximadamente 950 Mb el cual se encuentra secuenciado; su capacidad para transformarse con *A. tumefaciens* y para regenerar plantas completas a partir de diferentes órganos y tejidos de la planta (Park y col., 2003; Sato y col., 2012; Bergougnoux, 2014).

Otra característica importante del tomate es la posibilidad de cultivarlo en diferentes condiciones, lo que permite comprender su adaptabilidad a diferentes estreses abióticos (frío, sequía, etc.) (Foolad, 2007). Además, los cultivos de tomate son atacados por patógenos de orígenes diversos como virus, bacterias y hongos que causan enfermedades a nivel mundial, lo que convierte a esta especie en un buen modelo para el estudio de la interacción planta-patógeno (Arie y col., 2007).

1.4 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, el agente causal de la enfermedad de la peca bacteriana

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (*Pst*) es el causante de la enfermedad denominada peca bacteriana. Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial afectando economías regionales de las aéreas productoras de tomate. Si bien la enfermedad puede afectar cualquier parte de la planta los síntomas más marcados se observan frecuentemente en el follaje y tallos (Figura 3), aunque también pueden presentarse en el fruto. En un principio estos síntomas aparecen como pequeñas pecas necróticas rodeadas de un halo amarillento o clorótico que pueden expandirse necrosándose aún más y provocando una disminución del valor de mercado del producto y del rendimiento de la cosecha (Xin y He, 2013).

Pst es una bacteria gram negativa, aeróbica, posee forma de bacilo y flagelo polar que le da movilidad. Es considerado un patógeno hemibiotrófico que infecta localmente sin distribuirse de manera sistémica (Figura 4). En este sentido, *Pst* posee dos estilos de vida en la planta que están interconectados espacial y temporalmente. En su fase inicial epifítica puede ubicarse sobre la superficie de la planta (Figura 4a y b). En condiciones ambientales favorables tales como lluvias, alta humedad y temperaturas moderadas, ingresa al espacio apoplástico a través de aperturas naturales (como estomas) o heridas, iniciando la fase endofítica (Figura 4c). La fase exponencial de la multiplicación de *Pst* en la planta ocurre en ausencia de muerte aparente

de la célula huésped. Sin embargo, en la etapa tardía de la patogénesis (después de que las bacterias casi hayan alcanzado la población máxima en los tejidos infectados), las células huésped mueren y los tejidos infectados muestran una necrosis extensa (Figura 4d y e). Estas lesiones necróticas suelen estar rodeadas por un halo clorótico causado por la toxina coronatina liberada por el patógeno (Martin, 2011). Este modelo de patogénesis se puede considerar un modelo mixto entre los modelos biotróficos y necrotróficos, ya que en una primera etapa requiere de tejido vivo, pero la etapa más avanzada de infección termina en necrosis (Xin y He, 2013).

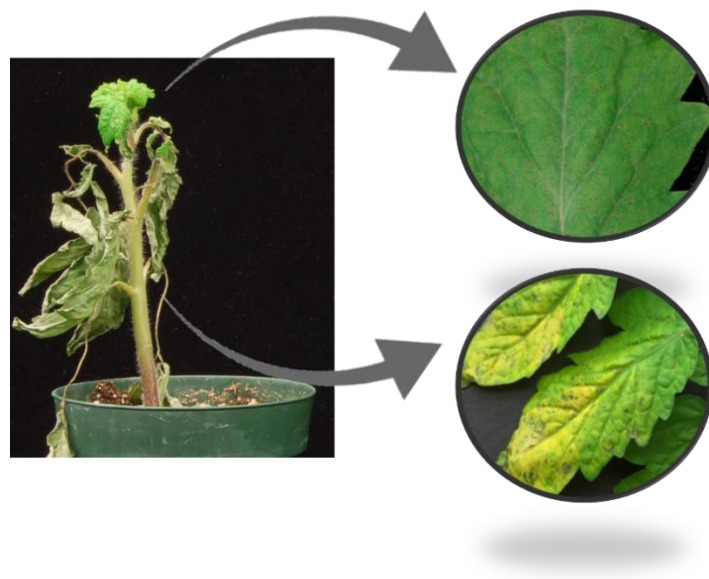


Figura 3. Enfermedad de la peca bacteriana. Imagen de una planta de tomate infectada con *Pst*. Se pueden observar las pecas con necrosis en hojas.

1.5 *Pst* DC3000 como modelo de estudio

Pst DC3000 es un derivado resistente a la rifampicina de la cepa *Pst* DC52, que es un patógeno natural del tomate y fue generada en el laboratorio por la Dra. Cuppels (Cuppels, 1986). En el año 1991, el Profesor Staskawicz descubrió su habilidad para infectar también a la planta modelo *A. thaliana*. Además, *Pst* DC3000 también se puede manipular para infectar otras plantas modelos como *N. benthamiana* (Wei y col., 2007), razón por la cual *Pst* es utilizada extensivamente en el estudio de interacciones planta-bacteria.

Si bien *Pst* DC3000 se considera una bacteria epífita débil, debido a que las poblaciones bacterianas en la superficie de la hoja sólo sobreviven aproximadamente 48 h, una vez dentro del tejido huésped resulta altamente infecciosa, lo que la convierte en un modelo de estudio adecuado para estudiar los mecanismos de invasión de las bacterias a los tejidos y la patogénesis.

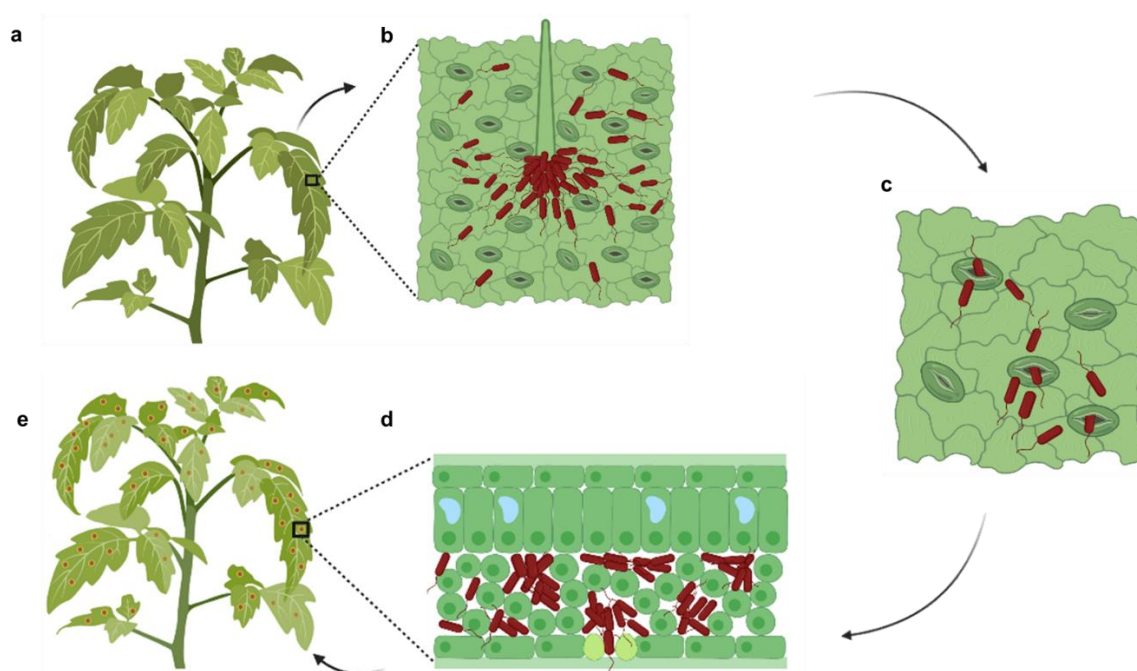


Figura 4. Diagrama del ciclo de infección de *Pseudomonas syringae*. (a) Hojas de plantas sanas. (b) Bacterias en la superficie de la hoja. Ilustración de la agregación de algunas bacterias que se pueden formar cerca de un tricoma. (c) Ingreso de bacterias a la planta a través de estomas abiertos. (d) Sección transversal de una hoja que muestra bacterias colonizando y multiplicándose en el apoplasto de la planta. (e) Aparición de síntomas como necrosis y clorosis asociadas a la enfermedad denominados pecas. Adaptado de Xin y col., 2013.

Su genoma completo se publicó en el año 2003 por Buell y colaboradores. *Pst* posee un cromosoma circular y dos plásmidos. Se predijeron un total de 5.763 marcos abiertos de lectura los cuales se pueden clasificar en diferentes categorías funcionales. Alrededor del 5% del genoma corresponde a categorías que pueden ser relevantes para la virulencia como toxinas, hormonas vegetales, factores de unión a la superficie bacteriana, flagelos y sideróforos. *Pst* DC3000 también posee varios transportadores ABC para azúcares, aminoácidos y compuestos potencialmente antimicrobianos, y contiene genes relacionados con la tolerancia a la radiación UV y ROS, entre otros (Buell y col., 2003). Cabe destacar como factores de virulencia más relevantes a los sistemas especializados de secreción de proteínas T3SS mencionados en la sección 1.1.2. Se conocen alrededor de 36 efectores distintos codificados por el genoma de *Pst* DC3000 (Wei y col., 2015). Otros factores de virulencia importantes son la toxina COR, mencionada en la sección 1.1.5, y los genes que codifican para las enzimas triptófano monooxigenasa (*iaaM*) e indoleacetamida hidrolasa (*iaaH*), proteínas encargadas de la biosíntesis de la hormona auxina ácido indol-3-acético (IAA) (Buell y col., 2003).

1.6 Interacción *Pst*-tomate

La interacción entre tomate y *Pst* es un sistema modelo para investigar las bases moleculares de la patogénesis bacteriana y la inmunidad de las plantas (Pedley y Martin, 2003).

En el inicio de la infección por *Pst*, tomate reconoce principalmente dos PAMPs de flagelina. El receptor de membrana FLS2 detecta al epítipo flg22 (Gómez-Gómez y col., 2001) y FLS3 al epítipo flgII-28 (Hind y col., 2016), conduciendo a la activación de la respuesta PTI en tomate (Figura 5). Como consecuencia de esta activación se producen cambios transcripcionales en una gran cantidad de genes (Rosli y col., 2013).

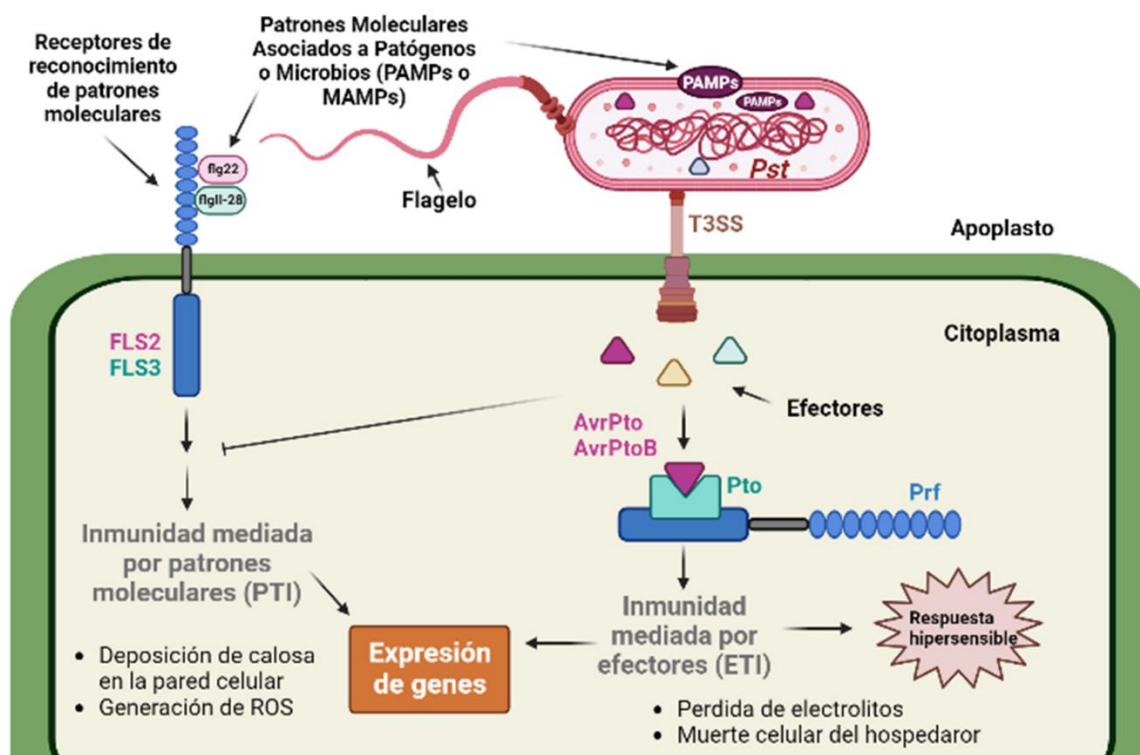


Figura 5. Modelo simplificado de la interacción molecular entre tomate y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. El reconocimiento de MAMPs/PAMPs mediante receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs) dispara la inmunidad mediada por patrones moleculares (PTI). Particularmente en tomate, la detección de flagelina se basa en la percepción de dos PAMPs: flg22, que es reconocido por el receptor *flagelin sensing 2* (FLS2) y flgII-28, por *flagelin sensing 3* (FLS3). Esta respuesta conduce a la activación de mecanismos de defensa como el refuerzo de la pared celular y la generación de especies reactivas de oxígeno, entre otras. Las bacterias patógenas como *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), pueden ingresar proteínas efectoras (efectores) en la célula vegetal para promover la virulencia. Sin embargo, algunas plantas poseen proteínas de resistencia (R) que reconocen estos efectores específicos que conducen a la activación de la inmunidad mediada por efectores (ETI). Las plantas de tomates resistentes Río Grande-PtoR (RG-PtoR), reconocen dos efectores de *Pst* (AvrPto y AvrPtoB) a través del complejo Pto/Prf para activar la respuesta ETI. La ETI es una respuesta rápida y localizada que culmina con la muerte celular programada en el sitio de infección (respuesta hipersensible o HR), limitando de esta manera la propagación del patógeno.

Para contrarrestar la respuesta PTI y favorecer la virulencia, *Pst* DC3000 inyecta más de 30 efectores dentro del citoplasma de las células de tomate. Entre ellos se encuentran AvrPto y AvrPtoB, los cuales actúan tempranamente y su principal función de virulencia es inhibir o bloquear el comienzo de la vía de señalización que se da cuando se activa la PTI (Xin y He,

2013). En tomate se ha reportado que AvrPtoB interacciona con la proteína Bti9 inhibiendo su actividad quinasa para bloquear la señalización de la respuesta PTI (Zeng y col., 2012).

El descubrimiento de la resistencia a la enfermedad de la peca bacteriana en tomate se realizó a fines de la década de 1970 y se denominó 'Pto' (resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) (Pitblado y col., 1980). El gen *Pto*, que codifica para una proteína quinasa intracelular *Ser/Thr*, se aisló en 1993 y fue el primer gen de resistencia (R) clonado de una planta (Martin y col., 1993). La quinasa Pto interactúa directamente con cualquiera de los dos efectores AvrPto o AvrPtoB y junto con Prf, una proteína del tipo NB-LRR, activa la respuesta ETI en tomate (Tang y col., 1996; Kim y col., 2002; Pedley y Martin, 2003). Esta ETI está asociada a una HR que desencadena la MCP en las células que fueron infectadas, para evitar la propagación del patógeno.

Estas plantas de tomate resistentes a *Pst* son denominadas Rio Grande PtoR (RG-PtoR) y derivan de la introgresión del locus de *Solanum pimpinellifolium*, que incluye los genes que codifican para las proteínas Pto y Prf (Pedley y Martin, 2003).

1.7 Interacción *Pst*-*N. benthamiana*

Como se mencionó anteriormente, *Pst* DC3000 es un patógeno natural de *A. thaliana* y tomate, pero no de *N. benthamiana*. Wei y colaboradores (2007) desafiaron *N. benthamiana* con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* modificada para expresar las proteínas que conforman el T3SS, y de esta manera introducir de manera individual los 28 efectores de *Pst* DC3000 conocidos hasta ese momento. Encontraron que ocho de ellos, incluido HopQ1-1, mostraron cierta capacidad para causar muerte celular como consecuencia de la activación de la ETI de *N. benthamiana*. Posteriormente, se determinó que HopQ1-1 es reconocido en la planta por la proteína Roq1, una proteína de resistencia del tipo TIR-NB-LRR (Schultink y col., 2017). En esta vía de señalización también están involucrados EDS1 y SAG101 (Gantner y col., 2019).

1.8 Transcriptómica RNAseq: identificación de genes involucrados en la inmunidad de tomate

Debido a la importancia agroeconómica del tomate, comprender cómo esta planta se defiende de los patógenos es de vital importancia, dado que permitiría el desarrollo de estrategias para mejorar la calidad de la hortaliza y el rendimiento de su cultivo.

En las plantas de tomate, tanto la PTI como la ETI producen cambios transcripcionales en una gran cantidad de genes (Rosli y col., 2013; Pombo y col., 2014). El uso de la genómica funcional ha permitido caracterizar dichos cambios transcripcionales. En este sentido, investigar las diferencias en la abundancia de transcritos al comparar diferentes condiciones puede permitir la identificación de un conjunto de genes candidatos, que probablemente participen en la defensa de la planta.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se empleó la secuenciación de transcritos (RNA-seq) para estudiar los cambios transcripcionales en hojas de tomate infiltradas con diferentes PAMPs y cepas mutantes de *Pst*, que permiten evaluar qué genes modifican su expresión debido a la activación de la PTI y/o la ETI (Pombo y col., 2014; Rosli

y col., 2013). Por un lado, se infiltraron plantas de tomate Rio Grande (RG)-*prf3* (plantas susceptibles a *Pst* dado que poseen una mutación en el gen *Prf*) con dos diferentes PAMPs (*flg22* y *flgII-28*), *Pseudomonas fluorescens* 55 (bacteria no patogénica que induce una fuerte PTI en tomate), *Pst* DC3000 y la cepa mutante *Pst* DC3000 Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* (que no posee los efectores *AvrPto* y *AvrPtoB*). Dentro del grupo de genes inducidos por la PTI, se identificó una quinasa asociada a la pared celular 1 (*SIWak1*) cuyo silenciamiento afecta dicha respuesta (Rosli y col., 2013). Posteriormente se demostró que *SIWak1* participa activamente formando un complejo junto con *FLS2* y *FLS3* y que es de importancia en etapas tardías de activación de la PTI en el apoplasto (Zhang y col., 2020).

Utilizando un criterio similar, se infiltraron plantas resistentes de tomate RG-PtoR con tres cepas mutantes de *Pst* DC3000 (Δ *fliC*, que carece de flagelina; Δ *avrPto* Δ *avrPtoB*; Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* Δ *fliC*). Comparando los datos de RNA-seq de la doble con la triple mutante y la simple con la triple, se identificaron genes que modifican su expresión luego de la activación de la PTI y la ETI, respectivamente. El análisis funcional, utilizando la técnica de VIGS, de un grupo de genes específicamente inducidos durante la ETI permitió identificar a una proteína quinasa denominada *Epk1* (del inglés, *ETI-specific protein kinase 1*) como involucrada en la activación de esta respuesta debido al reconocimiento de diferentes efectores bacterianos (Pombo y col., 2014). También, se identificaron dos factores de transcripción (FT) del tipo WRKY que se inducen en la PTI temprana (a los 30 min luego del tratamiento con *flg22*) y en la ETI a las 6 h, los cuales son el objeto de estudio de este trabajo de tesis.

1.9 La familia de los factores de transcripción WRKY

La familia WRKY se encuentra entre las diez familias más grandes de FT en plantas superiores y se han descrito aún en algas verdes (Ülker y Somssich, 2004). Hace 29 años se produjeron los primeros reportes de FT WRKYs, en los cuales se informaron proteínas de unión a ADN mal definidas que desempeñaban potenciales funciones en la regulación de la expresión génica por sacarosa o durante la germinación (Ishiguro y Nakamura, 1994; Rushton y col., 1995). Un tercer reporte en el año 1996 publicado por Rushton y colaboradores, proporcionó la primera evidencia de que las proteínas WRKY juegan un papel importante en la regulación de las respuestas de las plantas a los patógenos, y desde entonces muchos informes han demostrado que este es un rol destacado de los FT WRKYs. A lo largo de los años se ha reportado que también están involucrados en otros diversos mecanismos de las plantas como la germinación, senescencia, floración, respuesta al estrés abiótico como frío y sequía e inundación y desarrollo de tricomas (Robatzek y Somssich, 2001; Huang y col., 2002; Rizhsky y col., 2002; Johnson y col., 2002; Sanchez-Ballesta y col., 2003).

La característica definitoria de los factores de transcripción WRKY es su dominio de unión al ADN. Éste se llama dominio WRKY debido a la presencia de una secuencia de aminoácidos WRKYGQK casi invariable (Figura 6) (Eulgem y col., 2000). En algunas proteínas WRKY, las secuencias de aminoácidos WRKY han sido reemplazadas por WRRY, WSKY, WKRY, WVKY o WKKY (Xie y col., 2005). El dominio WRKY tiene una longitud de aproximadamente 60 residuos y, además de contener el motivo WRKYGQK, también tiene una estructura del tipo *zinc-finger* en su extremo C-terminal. Dicha estructura es Cx4–5Cx22–23HxH o Cx7Cx23HxC. Esta familia se divide en cuatro grandes grupos (I, II, III, IV) según el número de dominios WRKY y su estructura *zinc-finger* (Eulgem y col., 2000). Los miembros

del grupo II se dividieron además en IIa, IIb, IIc, IId y IIe según la secuencia de aminoácidos primaria (Zhang y Wang 2005; Rushton y col., 2008).

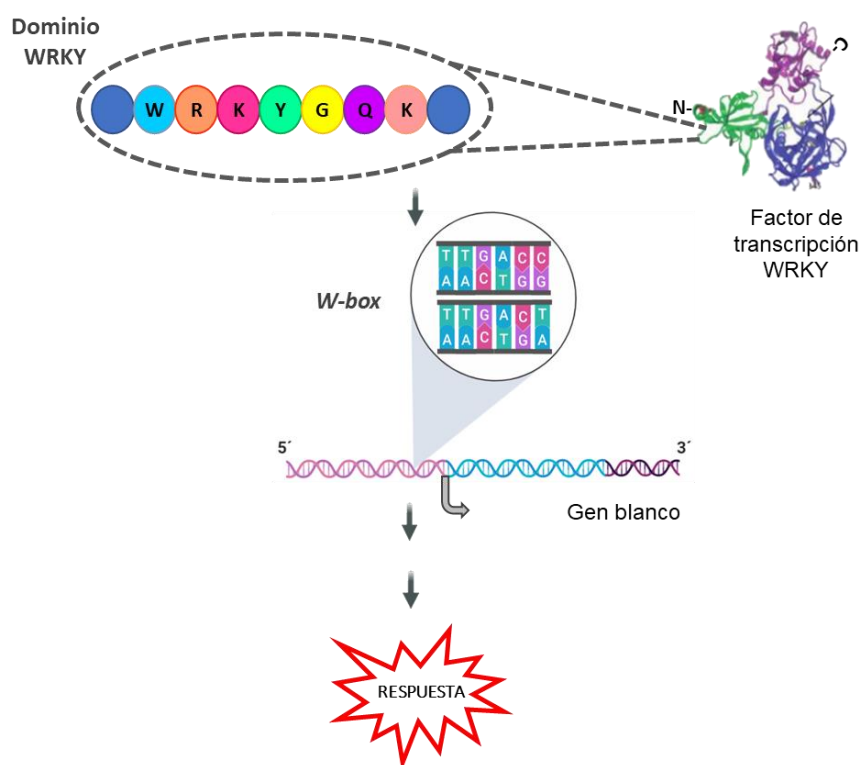


Figura 6. Esquema representativo del mecanismo de acción de los factores de transcripción WRKY. Su dominio de unión a ADN se une a los *W-box* ubicados en las regiones promotoras de sus genes blanco para modular su expresión y así activar o reprimir distintos procesos metabólicos.

Las proteínas WRKY regulan la expresión de sus genes diana como reguladores positivos o negativos (Chi y col., 2013). En respuesta a estímulos internos o externos, los WRKY modulan la expresión de los genes al unirse a los elementos en cis denominados *W-box* [TTGAC(C/T)] presentes en sus regiones promotoras. Los *W-box* también están presentes en los promotores de la mayoría de los genes WRKY, lo que sugiere que pueden autorregularse o ser regulados de forma cruzada por otros WRKYs (Eulgem y Somssich, 2007; Rushton y col., 2010). Muchos genes regulados por WRKYs, particularmente genes relacionados con la defensa están enriquecidos en elementos *W-box* en sus regiones promotoras, los cuales pueden actuar de manera sinérgica (Dong y col., 2003).

1.10 WRKYs involucrados en estrés biótico

El rol de los WRKYs como reguladores de la defensa de las plantas contra los patógenos se ha estudiado intensamente (Pandey y Somssich, 2009; Liu y col., 2017; Birkenbihl y col., 2018;

Luan y col., 2019). En particular, en *A. thaliana* se ha demostrado que diferentes WRKYs están implicados en las respuestas frente a diversos patógenos. AtWRKY22 y AtWRKY29 se han identificado como importantes componentes aguas abajo de una vía de señalización MAPK asociada a la resistencia a patógenos bacterianos y fúngicos (Asai y col., 2002; Hsu y col., 2013). Además, AtWRKY18 puede modular positivamente la expresión génica relacionada con la defensa y la resistencia a enfermedades (Chen y Chen, 2002). De manera similar, AtWRKY33 (Birkenbihl y col., 2012), AtWRKY41 (Higashi y col., 2008), AtWRKY52 (Lahaye, 2002), AtWRKY70 (Knoth y col., 2007), AtWRKY38 y AtWRKY62 (Kim y col., 2008) están implicados en la respuesta inmune de las plantas frente a diferentes patógenos.

El genoma de tomate tiene 83 genes WRKY (SIWRKY) predichos (Huang y col., 2012; Karkute y col., 2018), algunos de los cuales funcionan como reguladores positivos de las respuestas de las plantas al estrés biótico. SIWRKY31 y SIWRKY33, ortólogos de AtWRKY33, complementaron la respuesta comprometida a *Botrytis cinerea* de los mutantes *atwrky33* de *A. thaliana* (Zheng y col., 2006). La sobreexpresión de SIWRKY45, el ortólogo de AtWRKY40, mejoró la susceptibilidad de tomate frente al nemátodo *Meloidogyne javanica* (*M. javanica*) (Chinnapandi y col., 2017). La expresión del gen *SIWRKY39* aumentó significativamente en tomate tras el desafío con *Pst* y su sobreexpresión condujo a una disminución en la aparición de síntomas de enfermedad y en el recuento bacteriano en hojas de tomate infiltradas con *Pst* DC3000 (Huang y col., 2012; Sun y col., 2015). Por su parte SIWRKY72a y SIWRKY72b, contribuyeron positivamente a la respuesta basal y la resistencia mediada por Mi-1, contra *M. javanica* y el pulgón de la papa (*Macrosiphum euphorviae*) (Bhattarai y col., 2010).

Por lo expuesto en la introducción general se planteó la siguiente hipótesis general junto con los objetivos generales y específicos, que se detallan a continuación.

HIPÓTESIS GENERAL

La ausencia de los genes *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en tomate y sus correspondientes genes ortólogos en *N. benthamiana* altera las respuestas inmunes PTI y ETI de dichas plantas frente a la infección con patógenos bacterianos y no bacterianos.

OBJETIVO GENERAL

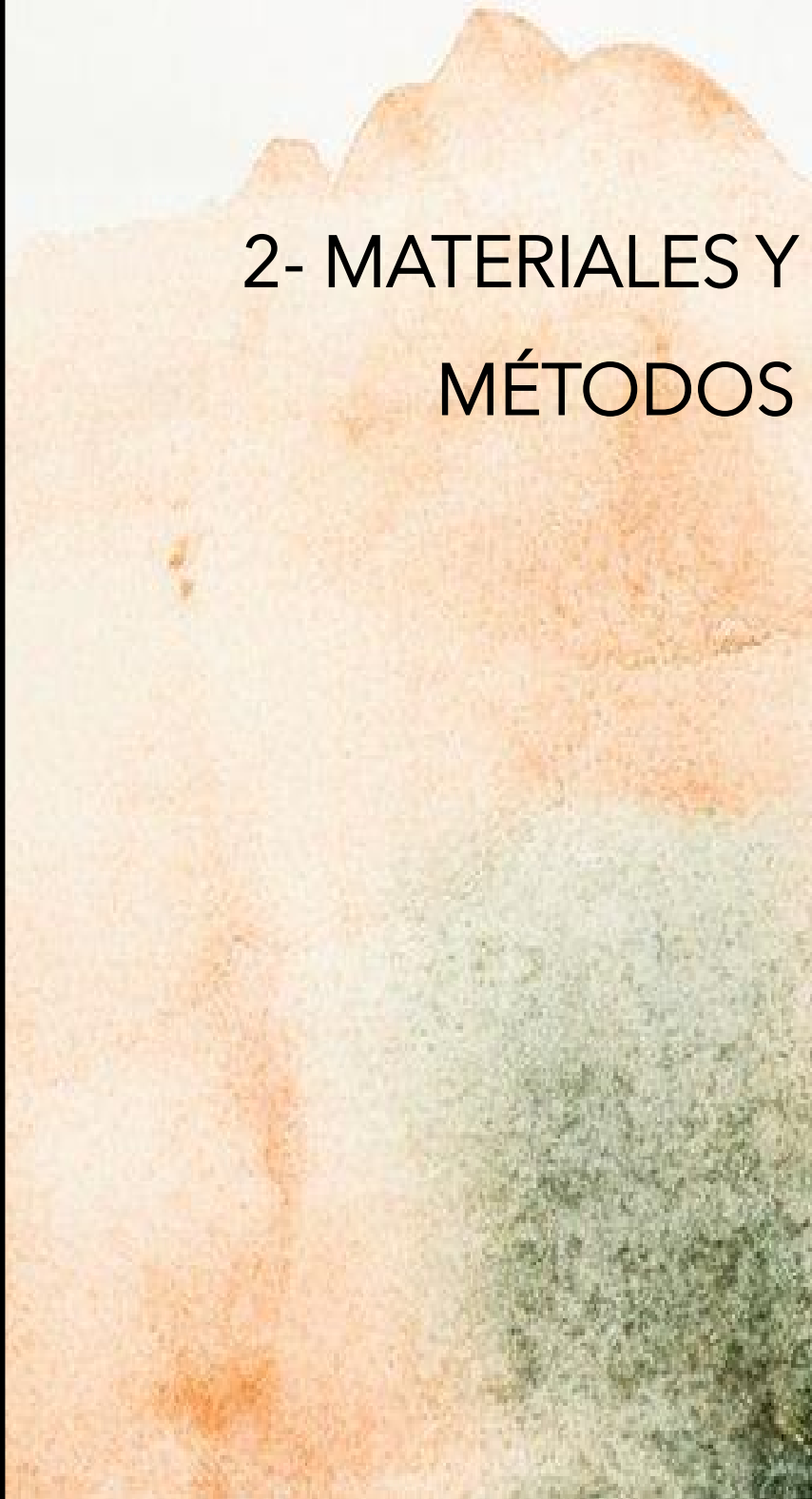
Estudiar la participación de estos factores de transcripción WRKY en la defensa y evaluar de qué manera regulan a nivel molecular las respuestas inmunes de las plantas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la respuesta inmune de plantas de *N. benthamiana* silenciadas en los genes ortólogos de *SIWRKY22* y *SIWRKY25*.
2. Analizar el efecto del silenciamiento de estos genes en la activación de la ETI mediada por elicitores no bacterianos en *N. benthamiana*.
3. Estudiar la contribución de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en las respuestas PTI y/o ETI en tomate.
4. Analizar los posibles mecanismos moleculares y el modo de acción de ambos factores de transcripción WRKY.
5. Identificar genes regulados transcripcionalmente por dichos factores de transcripción.



2- MATERIALES Y MÉTODOS



2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos químicos

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania) y Sigma (St. Louis, EE.UU.) y grado Biología Molecular de: Sigma (St. Louis, EE.UU.), Promega (Madison, EE.UU.), PB-L (Argentina), Anedra (Argentina), Cicarelli (Argentina), Biopack (Argentina). Kits de clonado de Thermo Fisher Scientific (USA), y de coimmunoprecipitación (Chromotek, Alemania).

2.1.2 Medios de cultivo utilizados:

- LB (*Luria Broth*):

Ingredientes	Cantidades para 1 L
NaCl	5 g
Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g

pH 7,5. Para LB agar se adicionó 15 g de agar.

- SOC (Super Óptimo Crecimiento):

Ingredientes	Cantidades para 1 L
Extracto de levadura	5 g
Peptona	20 g
NaCl 5 M	2 mL
KCl 2.5 M	1,25 mL
Dextrosa 1 M	5 mL

pH 7,0

- KBM (*King's B Medium*) agar:

Ingredientes	Cantidades para 1 L
Glicerol	10 mL
Peptona	20 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,4 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
Agar	18 g

2.1.3 Cepas bacterianas:

Se utilizaron cepas bacterianas de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*P.s. tabaci*) y *Pseudomonas fluorescens* 55 detalladas a continuación:

- *E. coli*:
 - DH5 α : supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1
 - DB3.1: gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 glnV44 (=supE44) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl5 leuB6 mtI1
- *A. tumefaciens*:
 - LBA4404
 - GV3101::pMP90: con resistencia a rifampicina (Rif^R) en el genoma y gentamicina (Gen^R) el plásmido Ti, pTiC58 Δ T-DNA
 - GV2260: sin plásmido Ti; Rif^R
 - 1D1249: Wroblewski y col., 2005
- *Pst*:
 - DC3000 cepa salvaje: Rif^R
 - DC3000 Δ hopQ1-1: Rif^R (Wei y col., 2007)
 - DC3000 Δ hopQ1-1 Δ avrPto Δ avrPtoB: Rif^R (Wei y col., 2007)
 - DC3000 Δ hopQ1-1 Δ fliC: Rif^R (Wei y col., 2007)
 - DC3000 Δ hopQ1-1 Δ fliC Δ avrPto Δ avrPtoB: Rif^R (Wei y col., 2007)
- *P.s. tabaci*:
 - Cepa salvaje: Rif^R (Thilmony y col., 1995)
 - *P.s. tabaci* HopQ1-1: pCPP5372::hopQ1-1; Rif^R, Gen^R (Kvitko y col., 2009)
 - *P.s. tabaci* AvrPto: pDSK519::avrPto; Rif^R, Kan^R (Thilmony y col., 1995)
 - *P.s. tabaci* empty vector: pDSK519; Rif^R, Kan^R (Yeam y col., 2010)
- *Pseudomonas fluorescens* 55:
 - Cepa salvaje: Amp^R, Chl^R, Nx^R, Spc^R (Wei y col., 2013)

2.1.4 Vectores de clonado

- pCRTM8/GW/TOPO, Thermo Fisher Scientific (USA)
- pENTR/D/TOPO, Thermo Fisher Scientific (USA)
- pDONRTM221, Thermo Fisher Scientific (USA)

2.1.5 Vectores binarios

- pQ11: para realizar VIGS. TRV2 adaptado para Gateway (Liu y col., 2002)
- TRV1: para realizar VIGS
- pGWB417: para el desarrollo de fusiones traduccionales al tag c-terminal 4xMyc (Nakagawa y col., 2007)
- pBTEX: para sobreexpresión de elicitors de muerte celular programada
- pB7RWG2.0: para el desarrollo de fusiones traduccionales C-terminales a RFP (Karimi y col., 2002)

- pB7FWG2.0: para el desarrollo de fusiones traduccionales C-terminales a eGFP (Karimi y col., 2002)
- pGDG: para la expresión de GFP citosólicas (Goodin y col., 2002)
- pRFP: para la expresión de la proteína mRFP libre (Robles Luna y col., 2013)
- pKGWFS7: para el análisis de promotores, posee los genes eGFP y GUS (Karimi y col., 2002)
- pAS054 y pAS059: para los ensayos de BiFC (Manavella y col., 2012; Cambiagno y col., 2021)

2.1.6 Cebadores

A continuación, se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante este trabajo

Tabla 1. Descripción de los cebadores utilizados en este trabajo de tesis. T_m, Temperatura de *melting*.

Nombre	Gen	Secuencia	T _m (°C)	Eficiencia (%)	Referencias
NbWRKY22a/b_f	Niben101Scf09512g02006.1	CCCGAAACAAGTGGAGCGA	59.8	110	Ramos y col., 2021
NbWRKY22a/b_r	Niben101Scf03239g00001.1	CTCCGGCGAGAGAGTCCG	59.7	110	
NbWRKY25a/b_f	Niben101Scf09057g01009.1	CATCGGTGGTCAGAACTG	58.7	100	
NbWRKY25a/b_r	Niben101Scf04871g19004.1	CCGTGGAACACTAGTGGTGGT	58.8	100	
NbWRKYs_off_f	Niben101Scf00581g01013.1	CAAGGGTGTGGCCGTGGA	60.3	90.5	
NbWRKYs_off_r	Niben101Scf02531g02001.1	GCACGACGCGCAATTCCTA	59.1	90.5	
NbNQO_fl	Niben101Scf00578g05006.1	AAGGCGGTGGTCAAGAAA	53.9	97.7	Pombo y col., 2019
NbNQO_rl	Niben101Scf00578g05006.1	CAAACATACCAGACCGAATG	59.4	97.7	
NbUbe35_fl	Niben101Scf00398g00015.1	CTTCAGATTCGCACCGTTCT	58.4	92.4	
NbUbe35_rl	Niben101Scf00398g00015.1	CCAATGCTTCGCAATGTTCTC	59.4	92.4	
fWRKY25-2Nb	Niben101Scf04871g19004.1	CATCCTATGCCACACACAG	55.7	-	Ramos y col., 2021
rWRKY25-2Nb	Niben101Scf04871g19004.1	TATTTTCCGGGTCAACCAC	52.9	-	
fWRKY22-2Nb	Niben101Scf09512g02006.1	GCCTTTCTCCCAAATCTC	53.6	-	
rWRKY22-2Nb	Niben101Scf03239g00001.1	CCCTCAGCTGGTACTTGACA	56.5	-	
ConcWRKY25/22Nb_r	Niben101Scf09512g02006.1	GAGATTTGGGGAAGAAAGGCTATTTTC	76.0	-	
	Niben101Scf03239g00001.1	CGGGTCAACCAC			
ConcWRKY25/22Nb_f	Niben101Scf09057g01009.1	GTGGTTGACCCGAAAAATAGCCTTTCT	76.0	-	
	Niben101Scf04871g19004.1	TCCCAAATCTC			
qRT-WRKY25F	Solye10g011910	GATTTCTTCGACGGTTTGGGA	60	95	Ramos y col., 2023
qRT-WRKY25R	Solye10g011910	GCCGTAGTTGCTGCGTTATT	60	95	
qRT-WRKY22F	Solye01g095100	CGAATCCGAAGCTGGTACT	60	91	
qRT-WRKY22R	Solye01g095100	TTTCATCCCTGCTGCTTTCT	60	91	Pombo y col., 2017
SIARD2_F	Solye01g104170	TGTTATCAGTGTGCTAGTG	60	99	
SIARD2_R	Solye01g104170	GCTGTCTTCTTCTGAATC	60	99	
SIVIN3_F	Solye07g018270	ACTGGTTTGCTGTGAAG	60	99	
SIVIN3_R	Solye07g018270	CTCAGAGAGAAGGCATCTA	60	99	
M13F(-20)	pDONR221, pENTRD, etc	GTAACACGACGGCCAG	55	-	
M13R	pDONR221, pENTRD, etc	CAGGAAACAGCTATGAC	55	-	-
pGWBFB	todos los vectores pGWB	CGTCCAACCACGCTTCAAAGC	50	-	Nakagawa y col., 2007
pGWB417R	pGWB417	GCTCTAAGCGCTACCGTTCAAG	50	-	
Cas9F	Cas9	GGGTCTCCCGAAGATAATGAGC	55	-	Ramos y col., 2023
Cas9R	Cas9	CAAGACCGGCAACAGGATTCATC	55	-	
gRNAF	gRNA	GCATCCCAGTAGGTGAAAGTCGAG	55	-	
gRNAR	gRNA	CGGCCGAATTCTAGTGATCG	55	-	
NPTIIF	NPTII	CCACAGTCGATGAATCCAGAAAAG	55	-	
NPTIIR	NPTII	GGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGA	55	-	
genWRKY22-F	Solye01g095100	CCACTCATTATGCCTCTCCTCAGATC	55	-	
genWRKY22-R	Solye01g095100	GGATCTATTCGCTCCACTTGTTTTCG	55	-	
genWRKY25-F	Solye10g011910	CAAAACTCTCAAAGCCTATAAGACTACA	55	-	
genWRKY25-R	Solye10g011910	CCATCAGCAGCTACTTGACATACTTTC	55	-	
Off-target_SlWRKY25-1f	SL3.0ch1: -45582332	CAGTTGGGTTCTTCCAATACT	55	-	
Off-target_SlWRKY25-1r	SL3.0ch1: -45582332	TGCTTCAAATAAAGGTGTTACT	55	-	
Off-target_SlWRKY25-2f	SL3.0ch06: -43486764	GGAGCAAGATTGAACACATCAC	55	-	
Off-target_SlWRKY25-2r	SL3.0ch06: -43486764	GTATCTTCAACTCTGTGTCAAG	55	-	
Off-target_SlWRKY25-3f	SL3.0ch10: -21401033	CGTGTGCGTTATGACACCAG	50	-	
Off-target_SlWRKY25-3r	SL3.0ch10: -21401033	GTTGAAGAAGCAACTTGGGA	50	-	
Off-target_SlWRKY25-4f	Solye02g022830	GCCTCAATCCGGGTTTCTCGA	55	-	
Off-target_SlWRKY25-4r	Solye02g022830	GCTGGAGTTGCTTGCCAAC	55	-	
Off-target_SlWRKY25-5f 1	Solye08g068470	AAGTAGAGCTGAGTCCCTATA	55	-	
Off-target_SlWRKY25-5r 1	Solye08g068470	GCTGTGGCATGGCAAGGTAAT	55	-	
Off-target_SlWRKY25-5f 2	Solye08g068470	CATTCTTGCCACGTACTCCC	55	-	
Off-target_SlWRKY25-5r 2	Solye08g068470	GTCTGTGCTGTGGCATGGC	55	-	
Off-target_SlWRKY22-1f	SL3.0ch11: -14405510	TACACAATTGCGACTATGTCG	55	-	
Off-target_SlWRKY22-1r	SL3.0ch11: -14405510	GAGTGTACCTACCGACAC	55	-	
Off-target_SlWRKY22-2f	Solye05g009240	TCGACGGTTCGTTTATGTCGGA	55	-	
Off-target_SlWRKY22-2r	Solye05g009240	CAGGCAACTGTACTCCTC	55	-	
GatePromoterSlWRKY22f	Solye01g095100	CACCTGAATTATTTAACACTACAA	50	-	
GatePromoterSlWRKY22r	Solye01g095100	TTTGTAAATTTCTTGGCTACG	50	-	
GatePromoterSlWRKY25f	Solye10g011910	CACCCGGGCAAAACCTTTTGA	50	-	
GatePromoterSlWRKY25r	Solye10g011910	TTTTACATCCCCTACTCTTTA	50	-	
GatePromoterNRG1f	Solye02g090380	CACCCTCTGCTTTGTGTACAAC	50	-	-
GatePromoterNRG1r	Solye02g090380	TGCTACGTAACACTGCAAGA	50	-	-
GatePromoterSAURf	Solye08g077020	CACCTAAGGGCAAACTATAATTTTAC	50	-	-
GatePromoterSAURr	Solye08g077020	GTAGTTGAAAAGAAGAGATAATTG	50	-	-

2.1.7 Fragmentos para VIGS

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los fragmentos utilizados para VIGS en este trabajo.

Gen	Secuencia
<i>Ecl</i> (Fragmento de <i>Escherichia coli</i>)	CGCAAACGGAGCAGTTTCCTTGCCGACAATGGTCTGCGCCCGGCATTCTGATCGCTAAGATGGGC CAGGATGGACACGATCGCGGCGCGAAAGTGATCGCCAGCGCCTATCCGATCTCGGTTTCGACGT AGATTTAAGCCCGATGTTCTCTACACCTGAAGAGATCGCCCGCCTGGCCGTAGAAAAACGACGTT ACGTAGTGGGCGCATCCTCACTGGTGCCTGTCATAAAACGCTGATCCCGGAACTGGTCGAAGC GCTGAAAAAATGGGGACGCGAAGATATCTGCGTGGTGCCTGGGTCATTCCGCCGAGGAT TACGCCTTCTGCAAGAGCGCGGCTGGCGGCGATTTATGGTCCAGGTACACCTATGCTCGACAG TGTGCGCGACGTACTGAATCTGATAAGCCAGCATCATGATTAATGAAGCCACGCTGGCAGAAAG
<i>NbWRKY22</i>	GCCTTTCTTCCCAAATCTCAACCACAACAACAGCCACCTTTCTCTCAAAAATATACCTATTTCA CCCCTCTGTTCTTGAGGACTACAAGATCTATCACCCCAACAAACGCTAATAAAAACAGCAGCA ACAACAACATATTCATCAGCTAAACACAAGAGTATTAACACAACCAAGCAGTCACTATCTGTA AATGGTTCCACAAATAGTACAACCTAGCCTTTACATACTCAAAGCCCAAGACCTAAAAGAAGGA AAAATCAATTGAAGAAGGTATGTCAAGTACCAGCTGAG
<i>NbWRKY25</i>	CATCCTATGCCACACACAGAAATTCCTTAGCCGGAATCAGCCGCCATAACAAGAGACAAATT CAACAAGACCACTAGCCCATCGCCGGTATCTTCGCGGACAACCAACTCGCCAGCGCCGAAAA TCAAGAAAGCAGCAGGGATGAGAAAGAAGACATTTTGAAGACGAAAATGATGATTCTCCGAG GGTTTGGAAAGAATTGAAAGTCCGGCTGCCGGAGATAGCTTGACGGAGAATTTACCGAGGACTTT ACAGTTTCTTGGATGACAAATAACGCCGCAACTACGGCGGCTGGCGGTGGTTGACCCGGAAAA ATAGCCTTTCTTCCCAAATCTCAACCACAACAACAGCCACCTTTCTCTCAAAAATATACCTAT TTCACCCCTCTGTTCTTGAGGACTACAAGATCTATCACCCCAACAAACGCTAATAAAAACAGC AGCAACAACAACATATTCATCAGCTAAACACAAGAGTATTAACACAACCAAGCAGTCACTATC TGTAATGGTTCCACAAATAGTACAACCTAGCCTTTACATACTCAAAGCCCAAGACCTAAAAGA AGGAAAAATCAATTGAAGAAGGTATGTCAAGTACCAGCTGAGGG
<i>NbWRKY25/22</i>	CATCCTATGCCACACACAGAAATTCCTTAGCCGGAATCAGCCGCCATAACAAGAGACAAATT CAACAAGACCACTAGCCCATCGCCGGTATCTTCGCGGACAACCAACTCGCCAGCGCCGAAAA TCAAGAAAGCAGCAGGGATGAGAAAGAAGACATTTTGAAGACGAAAATGATGATTCTCCGAG GGTTTGGAAAGAATTGAAAGTCCGGCTGCCGGAGATAGCTTGACGGAGAATTTACCGAGGACTTT ACAGTTTCTTGGATGACAAATAACGCCGCAACTACGGCGGCTGGCGGTGGTTGACCCGGAAAA ATAGCCTTTCTTCCCAAATCTCAACCACAACAACAGCCACCTTTCTCTCAAAAATATACCTAT TTCACCCCTCTGTTCTTGAGGACTACAAGATCTATCACCCCAACAAACGCTAATAAAAACAGC AGCAACAACAACATATTCATCAGCTAAACACAAGAGTATTAACACAACCAAGCAGTCACTATC TGTAATGGTTCCACAAATAGTACAACCTAGCCTTTACATACTCAAAGCCCAAGACCTAAAAGA AGGAAAAATCAATTGAAGAAGGTATGTCAAGTACCAGCTGAGGG
<i>NbM3Kα</i>	CAAGGTCTACAAAAGTTACTCATGTTGGTGTAAACCAACGAAGCATATCCTCGTTCCTTTGATGGA AACCGGACGCCCGCAGTGTGGATTCCGGTGAAGGAATATTTCTCAACTAAAGGAAACTATG CAAGCCATCCAGTGATACCATCTTAGACCATTGAGCTGCCAAGGGAAATGTAAAAACCAT AACATCTTTACCAGTATCCCCACTTCTAGCCATTAAGACAGTATGAACCTGCACGTAGGAGCT GTTATCTTCTTCCCAACCGACTTATGGTATTGGGGGTCATAGTGGATATGATGAGAATGAT TACTTAATGTTTCAAGCCAGACCCACCACAAGAAACACACTAGAACCATGGCTTGAATCCCTCA ATTTAAAGTTCAGACACCGTCTAGATCGCCAAAACCTAAGACCAATTCTTTAGTACCTCGGCCG ACCACCGTACCCAGCTTCTGTACAAAGTGGTGATATCGTCGACCGCGATGAACGGTTAAGTT TCCATTGATACTCGAAAGATGTCAGCACCAGCTAGCACAACACAGCCATAGGGTCAACTACCTC AACTACCACAAAACCTGCAGGCGGCAACTCCNTGCCACAGCTTCAGGCCTGTTCACTATCCCGGA TGGGGGATTTCTTTA
<i>SIPrf</i>	TGTCATCTCAATCGTTGGCATGCCAGGATTGGGCAAGACTACACTAGCAAAGAAGATTTACAATG ATCCAGAAGTACCTCTCGCTTCGATGTCATGCTCAATGTGTTGTGACTCAATTATATTCATGG AGAGAGTTGTTGCTCACCATTTGAATGATGTGCTTGAGCCTTCTGATCGCAATGAAAAAGAAGA TGGAGAAATAGCTGATGAGCTACGCCGATTTTGTGACCAAGAGATTTGATTCTCATTGATG ATGTGTGGGAC
<i>NbSAG101</i>	TGCTAGGTCTTTTGGGGTCTTCAACTACTCCAAAGGCCAAGAATATGAGTCAGGATTCCCTGT TTAGTAGTGGCCAAGAATTGGCAAAGTTGGTGGTGAGCTCAGATCTACTGCATGATTCTTGGGCT AGAAATTGTGATCTTCTTAATCATGCTTATTTGGATAATCCAACCAACCCAGTCCAATTGTGTT AAAGTTTATTACCCATATTATACAAATGGTGTCTATTGTTGCTTTTGTATCTCCCTACCTGTAGT ATTCATCATCTTCAGAAAGAAATGGTCTCTTCAGAAGATCTTAAAGGTTCCCAAGTTGATTTGA
<i>FLS2</i>	AAAGTGTACCCGACGACTGAGCCTCCAGAGATTTATCAAAAAGGATTTGGAACATGCTACCAAT AATTTCCGTCCGAAAAACATTATTTGGAGCCAGCAGTTTAAAGTACTGTGTACAAAGGAACACTGG AAGATGGGAAGATTGTAGCAGTTAAGAAGCTGAATCACCAGTTCTCAGCAGAATCTGGTAAATG TTTTGATAGGGAAGTCAAGACTCTGAGCCAACTCAGACACAGGAACCTAGTTAAGGTGCTAGGT TACGCTTGGGAAAGCAAGAAGCTAAGGGCTTTAGTTTTAGAATACATGGAGAATGGGAACCTGG ACAACATGATTTATGGTCAAGTAGAGGATGACTGGACGTTGTCCAACAGGATTGATATTTAGTT TCAGTTGCAAGTGGACTATCATACCTGCATTCAGGCTATGATTTTCCAATAGTGCCTGTGACAT GAAGCCTTCAACATTTCTGGACAAAATATGGAAGCACATGTGAGTGACTTTGGGACGGCT AGGATGTTGGGTATTTCA

2.1.8 Sueros

Suero anti ratón IgG-HRP: goat anti-Mouse-IgG (H+L) – HRP conjugado (Invitrogen)

Anticuerpo monoclonal anti-GFP (JL-8) (Roche)

Anticuerpo monoclonal anti-RFP (RF5R) (Invitrogen)

Anticuerpo monoclonal anti-Myc (9E10) (Covance Ic.)

2.1.9 Especies vegetales utilizadas y condiciones de crecimiento

Para los distintos ensayos con *N. benthamiana* se utilizaron las especies: *N. benthamiana* salvaje (Nb-1; Bombarely y col. 2012) y *N. benthamiana* 35S::*Pto* que sobreexpresa de forma estable la proteína Pto de tomate.

Para los ensayos realizados con tomate se utilizaron las siguientes líneas de cuatro semanas de edad:

- Río Grande Pto-R (RG-PtoR), plantas resistentes que poseen introgresado el locus Pto. Utilizando estos tomates resistentes se generaron tres eventos de transformación en los que se modificaron los genes de estudio mediante la técnica CRISPR-Cas9: $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$, $\Delta Slwrky22/25$.

- Río Grande *prf3* (RG-*prf3*) que poseen una delección de 1 kb en la proteína Prf, por lo que son susceptibles a *Pst* DC3000.

A menos que se indique lo contrario, las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo a 22 °C, con un fotoperíodo de 8 h de oscuridad y 16 h de luz desde su germinación hasta su utilización.

2.2 Métodos

2.2.1 Análisis filogenético

Las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de los factores de transcripción WRKY pertenecientes al grupo IIe de *Arabidopsis thaliana*, tomate y *N. benthamiana* se obtuvieron de TAIR (Huala y col., 2001), Sol Genomics Network (SGN) (Fernandez-Pozo y col., 2015) e iTAK (Zheng y col., 2016), respectivamente. El análisis filogenético (PhyML) se llevó a cabo haciendo uso del programa SeaView (Gouy y col., 2010) utilizando parámetros predeterminados para el método JTT con 100 *bootstraps*. La figura del árbol se creó usando FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

2.2.2 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

Los genes de *N. benthamiana* Niben101Scf09512g02006.1 y Niben101Scf03239g00001.1 (ortólogos de *SIWRKY22*), y Niben101Scf09057g01009.1 y Niben101Scf04871g19004.1 (ortólogos de *SIWRKY25*), fueron seleccionados para diseñar construcciones VIGS (*NbWRKY22* silencia los genes ortólogos a *SIWRKY22* y *NbWRKY25* los de *SIWRKY25*). Se eligieron fragmentos de alrededor de 350 pb utilizando la herramienta SGN VIGS Tool (Fernandez-Pozo y col. 2015) y se introdujeron en programa Primer3 (Untergasser y col. 2012) para el diseño de los cebadores correspondientes. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados. La amplificación por PCR se realizó usando ADN complementario (ADNc) sintetizado a partir de tejido de hoja de *N. benthamiana*, como se explica más adelante.

Los fragmentos *NbWRKY22* y *NbWRKY25* se combinaron mediante PCR para crear una construcción concatenada denominada *NbWRKY25/22*. Los productos de PCR se clonaron en el kit de clonación pCRTM8/GW/TOPOTM (Life Technologies, EE. UU.) y se recombinaron en un vector TRV2 compatible con Gateway (pQ11) (Liu y col., 2002). Después de la confirmación por secuenciación, los plásmidos se utilizaron para transformar *A. tumefaciens* GV2260.

La técnica de VIGS se realizó como se describe en Velasquez y col. (2009). Se utilizaron cultivos crecidos *over night* (ON) en medio LB con sus respectivos antibióticos de los clones de *A. tumefaciens* conteniendo los fragmentos en cuestión junto con otro clon conteniendo el vector pTRV1. Se les realizaron dos lavados con una solución MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM. Finalizado el último lavado las células se resuspendieron en 1 mL de la misma solución y se determinó la densidad óptica a 600 nm (DO^{600nm}). Se realizaron mezclas binarias de *A. tumefaciens* GV2260 con pTRV1 y pQ11 conteniendo los distintos fragmentos a utilizar con DO^{600nm} = 0,15 de cada una. Luego de adicionar acetosiringona a concentración final 200 µM, se infiltraron con jeringa sin aguja cotiledones y primeras hojas de plantas de *N. benthamiana* de 2 semanas de edad aproximadamente (del tipo salvaje o 35S:*Pto*). En cada ensayo se silenciaron 4-6 plantas por construcción. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura por 4-5 semanas hasta la realización del experimento correspondiente.

Se usó como control negativo una construcción TRV2 que contenía un fragmento basado en un gen de *E. coli* (*Ecl1*, que contiene un 56% de GC y ninguna secuencia de >17 pb de longitud que tenga 100% de identidad en *N. benthamiana*) (Rosli y col., 2013), mientras que los fragmentos de secuencias pertenecientes a los genes *NbM3Ka* (Niben101Scf01795g10003.1), *SIPrf* (Solyc05g013280), *SIFls2* (Solyc02g070890), *NbSAG101* (Niben101Scf01300g01009.1) (Pombo y col. 2014; Gantner y col. 2019), se utilizaron como controles positivos dependiendo del tipo de experimento. Como control general del silenciamiento se empleó una construcción basada en la fitoeno desaturasa, *SIPDS*. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento utilizado para esta técnica se proporciona en la Tabla 2 de la sección 2.1.7.

2.2.3 Análisis de regiones promotoras

Las secuencias de ADN de *SIWRKY22*, *SIWRKY25*, *NbWRKY22a* y *b*, *NbWRKY25a* y *b*, *NRG1* y *SAUR* se obtuvieron de SGN (Fernandez-Pozo y col., 2015). Para el análisis, se utilizó una región de 1500 pb aguas arriba del sitio de inicio de la traducción anotado. La identificación de las *W-Box* (TTGAC/T) se realizó utilizando la plataforma Plant.PAN 2.0 (Chow y col., 2015).

2.2.4 Ensayos de muerte celular programada (MCP)

Cepas de *A. tumefaciens* GV2260 transformadas con los vectores pBTEX:*Pto* o pBTEX:*avrPto* se cultivaron ON en medio LB sólido (rifampicina y kanamicina). Al día siguiente, las cepas se incubaron 4 h en un buffer de inducción (MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 200 µM). Los cultivos inducidos se lavaron dos veces con buffer de lavado (MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM) y se combinaron en una proporción de 1:1 con una DO⁶⁰⁰ final = 0,10 y acetosiringona

200 μ M. Las suspensiones resultantes se infiltraron con jeringa dentro de un círculo marcado en hojas de plantas silenciadas de seis semanas de edad. Se evaluó visualmente el desarrollo de MCP macroscópica durante varios días empleando la siguiente categorización: MCP, más del 80% del área infiltrada con MCP; MCP parcial, entre 80 a 25% del área infiltrada con MCP; Sin MCP, menos del 25% del área infiltrada con MCP. Luego se utilizó el número total de áreas infiltradas en cada categoría para calcular el porcentaje de MCP en cada caso.

2.2.5 Ensayos de enfermedad usando *P.s. tabaci*

Para estos ensayos se emplearon plantas de *N. benthamiana* o *N. benthamiana*-35S::*Pto* silenciadas mediante la técnica de VIGS, que fueron infiltradas en círculos previamente marcados utilizando jeringa, con *P.s. tabaci* expresando los efectores HopQ1-1 o AvrPto. Además, se utilizó una cepa que lleva el vector vacío como control positivo del desarrollo de enfermedad. En todos los casos, se partió de una fracción de la cepa crecida ON en medio KBM con los antibióticos correspondientes la cual se resuspendió en 1 mL de MgCl₂ 10 mM y se lavó dos veces con esta misma solución, mediante centrifugación. La concentración final del inóculo fue de 10⁵ unidades formadoras de colonias (ufc)/mL. El desarrollo de sintomatología de enfermedad se realizó empleando el mismo criterio que se utilizó para los ensayos de MCP, detallados anteriormente.

2.2.6 Desafío de plantas de tomate con *Pst*

Para los ensayos de PTI, se infiltraron plantas de tomate *knock-out* (KO) para *SIWRKY22*, *SIWRKY25* y *SIWRKY22/25* (Δ *Slwrkys*) y salvajes con *Pst* DC3000 Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* mediante jeringa (5×10^4 ufc/mL) e inmersión (1×10^5 ufc/mL). Para los ensayos de inmersión, las plantas se conservaron en condiciones de alta humedad 12 h antes y 2 h después de la inoculación para asegurar la apertura de los estomas. Se tomaron fotografías de los síntomas de enfermedad tres días después de la inoculación.

En los ensayos de ETI, las plantas de tomate Δ *Slwrkys*, salvajes (RG-PtoR) y RG-*prf3* se infiltraron con jeringa con 5×10^4 ufc/mL de *Pst* DC3000 o *Pst* DC3000 Δ *fliC*.

La cuantificación bacteriana se realizó tomando tres discos de hoja de 0,38 cm² del área infiltrada y se procesaron en 0,25 mL de MgCl₂ 10 mM. El volumen se ajustó a 1 mL y se sembraron 20 μ L de diluciones seriadas en medio LB sólido con los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron hasta el día siguiente a 28 °C y se realizó el recuento en la dilución que tuviera entre 20 y 200 colonias, con una lupa binocular. Se utilizaron cuatro réplicas biológicas por línea. Las ufc/mL se calcularon como $[(n^\circ \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución}) \div \text{mL sembrados}] \div \{[(\text{Diámetro del disco} \div 2) \times \pi] \times n^\circ \text{ de discos}\}$.

2.2.7 Ensayos de MCP con elicitors no bacterianos

Los elicitors no bacterianos se expresaron transitoriamente en plantas silenciadas de *N. benthamiana* para inducir MCP. Se utilizó como control positivo el par ya caracterizado Pto/AvrPto. Se expresaron bajo el promotor 35S (pBTEX) los siguientes pares de proteína de reconocimiento/elicitor: Rx2 de papa (*Solanum tuberosum*)/proteína de cubierta de PVX (Van

Der Vossen y col., 2000), RPP13 de *Arabidopsis thaliana* /ART13^{Emco5}- Δ 41aa del oomicete *Hyalosporospora arabidopsidis* (Rentel y col., 2008), Gpa2 de papa/RBP-1 del nematodo del quiste de la papa (Sacco y col., 2009). Se incluyó además la expresión de Pto de manera individual como control negativo. Se utilizó en todos los casos un inóculo con $DO^{600nm} = 0,1$ total. El control positivo M3K α se expresó usando un sistema inducible por estradiol (pER8). La expresión se indujo 48 h después de la infiltración (hpi) con estradiol 2 μ M junto con Tween 20 0,02% v/v.

2.2.8 Ensayos de deposición de calosa

La determinación de deposición de calosa se realizó como describió anteriormente Nguyen y col., (2010) con modificaciones menores. Las hojas de plantas de *N. benthamiana* silenciadas o de tomate de 4 semanas de edad se infiltraron con jeringa con una suspensión de 1×10^8 ufc/mL de *Pseudomonas fluorescens* 55. Se tomaron del área infiltrada discos de hojas de 10 mm de diámetro a las 24 y 48 hpi. Posteriormente, los discos se incubaron a temperatura ambiente con 2 mL de etanol 96% v/v hasta la eliminación completa de la clorofila (24 h). Los discos foliares sin clorofila se lavaron dos veces con etanol 70% v/v y tres veces con agua bidestilada (ddH₂O).

Los discos de hojas se tiñeron en azul de anilina 1% p/v en K₂HPO₄ 150 mM (pH 9,5/KOH) y se incubaron en oscuridad durante 1 h. Los discos de hoja teñidos se montaron con ddH₂O en portaobjetos de vidrio y se observaron desde la superficie adaxial con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) utilizando luz ultravioleta y objetivo de 20x. Se capturaron imágenes de campos microscópicos de 0,4 mm² utilizando una cámara digital Olympus, evitando las áreas cercanas a las heridas generadas por la inoculación o por la toma de la muestra. El número y el área total de los depósitos de calosa se cuantificaron en campos completos utilizando el software de análisis ImageJ-win64 (Schneider y col., 2012).

2.2.9 Ensayos de pérdida de electrolitos

La cuantificación de la pérdida de electrolitos de las células se realizó como describió anteriormente del Pozo y col. (2004) con menores modificaciones. Se infiltraron con jeringa hojas de plantas de *N. benthamiana* silenciadas, con una suspensión de 10^5 ufc/mL *P.s. tabaci* expresando AvrPto o HopQ1-1. Para el caso de tomate, las hojas se infiltraron con jeringa utilizando un inóculo 10^5 ufc/mL de *Pst* DC3000. Se tomaron cinco discos (1 cm de diámetro) de las áreas infiltradas y se incubaron en 5 mL de ddH₂O durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se midió la conductividad usando un conductímetro (Digicond IV, Luftman Co.).

2.2.10 Ensayo de supresión de muerte celular

Se evaluó el compromiso en la respuesta PTI en plantas de *N. benthamiana* silenciadas como describió anteriormente Chakravarthy y col. (2010), con pequeñas modificaciones. A círculos de hojas marcados previamente se les indujo la PTI por infiltración con jeringa con *P. fluorescens* 55 a $DO^{600} = 0,5$ y 6 h más tarde se desafiaron, en una región del círculo parcialmente superpuesta, con *Pst* DC3000 Δ hopQ1-1 $DO^{600} = 0,1$. La aparición de muerte celular asociada a la enfermedad en el área superpuesta se determinó a 3 dpi, utilizando las

categorías: ruptura de PTI (>80% del área superpuesta con muerte celular), ruptura parcial de PTI (entre 80 y 25% del área superpuesta con muerte celular) y sin ruptura de PTI (<25% del área superpuesta con muerte celular). Se utilizaron cuatro plantas por construcción con cuatro áreas de infiltración cada una.

2.2.11 Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Miniprep)

La purificación de ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina desarrollado por Birnboim y Doly (1979) con algunas modificaciones. Una alícuota de 1 mL de cultivo bacteriano saturado en medio LB con el antibiótico correspondiente se centrifugó a 14000 x g durante 1 min. El pellet se resuspendió en 200 µL de Solución I (Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 10 mM), se agregaron 300 µL de Solución II (NaOH 0,2 N; SDS 1% v/v) y se incubó en hielo durante 5 min. Luego se agregaron 300 µL de Solución III (acetato de potasio 3 M, pH 4,8) permitiendo la neutralización de la solución. Luego de mezclar por inversión se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó 10 min a 14000 x g. Al sobrenadante se le agregó ARNasa A a una concentración final de 20 µg/mL y se incubó a 37 °C 30 min. Se realizaron luego dos extracciones con un volumen de cloroformo para eliminar proteínas y se precipitó el ADN plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de un volumen de isopropanol frío a -20 °C durante 1 h. Se centrifugó por 30 min a 14000 x g a 4 °C, el pellet se lavó con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en H₂O MilliQ (H₂OMQ).

2.2.12 Extracción total de ARN de tejido vegetal

La extracción de ARN total de material foliar se realizó utilizando el reactivo TriReagent (Molecular Research Center, MRC, EEUU) según especificaciones del fabricante. Partiendo de 50 a 200 mg de tejido, previamente molido en N₂ líquido. El ARN total obtenido se resuspendió en 10 a 50 µL de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), libre de ARNasas. La integridad del ARN extraído se chequeo por electroforesis en gel de agarosa 1% p/v. Se corrió 1 µg de ARN en 4 µL de agua DEPC + 4 µL 2x buffer de carga con bromuro de etidio, previamente incubado a 70 °C por 10 min y luego 5 min en hielo. La corrida se realizó a 60 V (90 mA aproximadamente).

2.2.13 Tratamiento con ADNasa del ARN total extraído

Para eliminar el posible ADN genómico (ADNg) contaminante en las muestras de ARN total se realizó un tratamiento con ADNasa libre de ARNasas. Se estimó la concentración de ARN total de la muestra a partir de la cuantificación de la absorbancia a 260 nm medida utilizando un lector de microplacas CLARIOstar (BMG Labtech). Se trataron 8 µg de ARN con 1 U de la enzima RQ1 ADNasa libre de ARNasas (Promega, USA) durante 60 min a 37 °C. Luego se realizó un paso de purificación utilizando una mezcla de cloroformo:octanol (24:1). Se centrifugaron los tubos durante 10 min a 12000 x g y se recuperaron las fases acuosas. En los nuevos tubos, se agregaron 200 µL de etanol absoluto frío y 20 µL de NaAc 3 M (pH 6,0). Los ARN se precipitaron durante al menos 2 h a -80 °C. Pasado este tiempo, se centrifugaron 20 min a 12000 g a 4 °C y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados se lavaron con 500 µL de etanol 70% v/v y se centrifugaron y descartaron los sobrenadantes nuevamente. Finalmente se secaron las muestras en flujo laminar. Se resuspendieron los precipitados en 20

μL de H_2OMQ . Estas muestras fueron luego utilizadas para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa.

2.2.14 Reacción de transcripción reversa (RT)

Las reacciones de RT se realizaron en 25 μL finales. Partiendo de 1 μg de RNA total purificado, se agregó la mezcla de cebadores aleatorios (*random primers*) a una concentración final de 2,6 μM y 6,96 μL de H_2OMQ . Se incubó a 80° C durante 10 min y se enfrió rápidamente en agua-hielo por 5 min. Se agregaron 100 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, USA), 5 μL de dNTPs (10 mM de cada uno) y 5 μL del buffer 5X de la enzima. Se incubó a 37° C por 60 min y luego a 95° C durante 15 min. El producto generado en la reacción de RT se utilizó posteriormente como molde en reacciones de PCR o PCR cuantitativa (qPCR).

2.2.15 Reacciones de PCR a tiempo final

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Bio-Rad iCycler *Thermal Cycler Version 3.021*, se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones de cada fabricante, dependiendo de la enzima utilizada (Taq DNA Polimerasa, PB-L Productos Bio-Lógicos; Pfu DNA Polimerasa, Inbio Highway). Las condiciones de ciclado generalmente fueron de 5 min a 95 °C como etapa inicial de desnaturalización, 35 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a la temperatura de *melting* (T_m) dependiendo del par de cebadores usado en cada caso, una etapa de extensión a 72 °C durante el tiempo requerido por la polimerasa para amplificar cada fragmento (por cada 500 pb a amplificar se utilizó 30 seg de extensión con la Taq y 1 min para la Pfu) y una etapa de elongación final de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% p/v en buffer TAE 1X (Tris 40 mM; EDTA 1 mM pH 8; ácido acético glacial 5,71% v/v) en presencia de bromuro de etidio.

2.2.16 PCR cuantitativa (qPCR)

Esta técnica se utilizó para determinar la eficiencia y especificidad del silenciamiento mediante VIGS utilizando las construcciones *NbWRKY22*, *NbWRKY25* y *NbWRKY25/22* en *N. benthamiana*, para realizar el análisis de expresión temporal de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en plantas de tomate salvaje y para analizar los posibles genes co-regulados por los SIWRKYs. Las reacciones se realizaron en un termociclador StepOnePlus system (Applied Biosystem). La reacción (10 μL finales) contuvo 2 μL de una dilución del ADNc (1:5 ó 1:10), 5 μL de 2X SYBRGreen Master Mix (PB-L, Bio-Logic Products), 2 μL de la mezcla de cebadores 2 μM , 0,2 μL de solución ROX 50X y H_2OMQ . Las condiciones de ciclado fueron: 94 °C por 5 min y 45 ciclos de 92 °C por 15 seg, 60 °C por 20 seg y 72 °C por 15 seg. Para los ensayos en *N. benthamiana* los datos fueron normalizados utilizando *NbUbe35* y *NbNQQO* como genes de referencia (Pombo y col., 2019), mientras que para tomate se emplearon *VIN3* y *ARD2* (Pombo y col., 2017).

2.2.17 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

El procedimiento utilizado es el que se detalla en el protocolo de EasyPure Quick Gel Purification Kit (TransGen Biotech). El fragmento de gel que contenía el ADN a recuperar se disolvió con 3 volúmenes de buffer de solubilización de NaI 6 M, calentando a 60 °C por 15 min o hasta disolución completa. Esta solución se dejó enfriar por unos minutos, se

homogeneizó y se hizo pasar por una columna de sílica (para fragmentos 3 kb se agregó 1 volumen de isopropanol antes de pasar por la columna). La columna se lavó dos veces con solución de lavado (provista por el fabricante) y se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar restos de alcohol. Finalmente se agregaron 40 μL de H_2OMQ sobre la matriz de sílica de la columna, se incubó por unos minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 1 min a 14.000 x g. La solución resultante, que contiene el ADN de interés, se utilizó posteriormente con distintos fines.

2.2.18 Preparación de bacterias competentes químicas

Para la obtención de bacterias competentes químicas de *E. coli* se utilizó el método de KCl. Partiendo de colonia aislada se creció ON un cultivo de 5 mL, que luego se colocó en 250 mL de medio Psi (250 mL: 1,25 g de extracto de levadura, 5 g triptona, 1,25 g MgSO_4 , pH 7,6) y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una $\text{DO}^{600\text{nm}} = 0,48$. Luego se enfrió 15 min en hielo y se centrifugó a 4000 x g por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 mL de buffer TbfI (Acetato de potasio 30 mM; KCl 100 mM; CaCl_2 10 mM; MgCl_2 50 mM; glicerol 15% v/v, pH 5,8/ácido acético). Se colocó en hielo por 15 min y luego se centrifugó a 4000 x g por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 4 mL de buffer TfbII (MOPS 10 mM; CaCl_2 75 mM; KCl 10 mM; glicerol 15% v/v; pH 6,5/NaOH). La suspensión de bacterias se colocó 15 min en hielo y finalmente, se fraccionó en alícuotas de 50 μL que fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Para la generación de bacterias competentes químicas de *A. tumefaciens* se partió de 2 mL de un pre-cultivo crecido a 28 °C ON con los antibióticos correspondientes. Se utilizaron 2 mL saturados de pre-cultivo para inocular 50 mL de medio con antibiótico. Se creció en agitación a 28 °C hasta alcanzar una $\text{DO}^{600\text{nm}} = 0,5-1$. Una vez alcanzado este valor se colocó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 3000 x g por 8 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 10 mL de CaCl_2 20 mM frío. Se volvió a centrifugar a 3000 x g a 4 °C durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de CaCl_2 20 mM en hielo. Se distribuyó en alícuotas de 50 μL en tubos estériles fríos, que fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

2.2.19 Transformación de bacterias competentes químicas

Para el caso de bacterias *E. coli* competentes, se mezclaron las suspensiones con 2 μL de producto de recombinación o 0,5 μL de miniprep y se incubaron durante 30 min en agua-hielo. Luego se aplicó un shock térmico por 45 seg a 42 °C e inmediatamente se transfirió nuevamente a agua-hielo durante 2 min. Posteriormente se agregaron 750 μL de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación durante 1 h. Una fracción de esta suspensión se sembró en placas de LB con el antibiótico adecuado, que fueron incubadas ON a 37 °C.

Para el caso de *A. tumefaciens* competentes generadas por método químico, se mezclaron las bacterias con 1-10 μg del plásmido de interés en hielo durante 2 min. Posteriormente, se congelaron rápidamente en N_2 líquido durante 5 min. Se dejaron 10 min a temperatura ambiente, se agregaron 250 μL de medio SOC y se incubó a 28 °C con agitación durante 4 h.

Una fracción de esta suspensión se sembró en placas de LB con el antibiótico adecuado incubando a 28 °C durante 2 días.

2.2.20 PCR de colonia

Esta técnica tiene como finalidad determinar de manera rápida la presencia de los vectores/insertos introducidos en *E. coli* o *A. tumefaciens* en los distintos pasos de clonado. Para ello, se utilizó como molde de PCR, una pequeña cantidad de una colonia aislada del cultivo bacteriano en medio sólido, resultante del paso de transformación. Mediante la adecuada combinación de cebadores y resolución del producto de PCR en geles de agarosa al 1% p/v con bromuro de etidio, se estableció la presencia y direccionalidad del fragmento de interés. En algunos casos, fundamentalmente cuando el inserto superó las 1000 pb, se utilizó como molde el plásmido purificado por miniprep.

2.2.21 Generación y genotipado de líneas de tomate *knock-out* mediante la técnica de CRISPR/Cas9

Para mutar los genes *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en tomate se diseñó un ARN guía (ARNg) para cada uno de ellos dirigido al primer exón (*SIWRKY22*-ARNg: GATCTACATGCGGTGGTCAGAGG y *SIWRKY25*-ARNg: GGTAAAACTGATGTCGCCGGCGG) utilizando el software *Geneious* R11 (Kearse y col., 2012). Ambos ARNg se clonaron por separado (para generar las líneas mutantes simples $\Delta Slwrky22$ y $\Delta Slwrky25$) y juntos (para generar la línea doble mutante $\Delta Slwrky22/25$) en un vector binario que expresa Cas9 (p201N:*Cas9*) (Jacobs y col., 2017). Se transfirió cada construcción a *A. tumefaciens* LBA4404 y se transformaron explantos de tomate RG-PtoR, para posteriormente realizar la regeneración *in-vitro*. Para determinar presencia y tipo de mutación, se extrajo ADN genómico (ADNg) de cotiledones u hojas jóvenes de cada planta utilizando el método CTAB modificado (Murray y Thompson, 1980). Las regiones genómicas que abarcan el sitio blanco de los ARNg se amplificaron con cebadores específicos (Tabla 1, sección 2.1.6) y se secuenciaron. Se utilizó la herramienta *online* llamada *Tracking of Indels by Decomposition* (TIDE; <https://tide.deskgen.com>) (Brinkman y col., 2014) para determinar el tipo de mutación y la frecuencia utilizando los archivos de secuenciación (formato .ab1) como describe (Zhang y col., 2020).

2.2.22 Evaluación de potenciales genes *off-target* en el diseño de los ARNg

Mediante la plataforma CRISPR-P 2.0 (Liu y col., 2017a), empleando *SIWRKY22*-ARNg y *SIWRKY25*-ARNg, se identificaron las posibles mutaciones *off-target* en todo el genoma de tomate. Se obtuvieron para la evaluación tres sitios *off-target* para *SIWRKY22*-ARNg, siendo uno de ellos *SIWRKY25*. Para *SIWRKY25*-ARNg la herramienta arrojó varios posibles *off-target* de los que cinco fueron elegidos por poseer el off-score más alto (>0.000). Las regiones genómicas que abarcan estos supuestos sitios se amplificaron por PCR con cebadores específicos (Tabla 1, sección 2.1.6) y los amplicones se secuenciaron para determinar si existían mutaciones usando la plataforma *online* TIDE (Brinkman y col., 2014).

2.2.23 Determinación del número y conductancia de estomas en plantas de tomate

Para la determinación del número de estomas en todas las líneas de tomate en estudio se realizaron improntas utilizando esmalte de uñas de hojas de plantas $\Delta Slwrkys$ y salvajes. Se tomaron fotografías de la epidermis abaxial y adaxial utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) y se contaron manualmente el número de células y estomas, tanto cerrados como abiertos, utilizando el software de análisis ImageJ-win64 (Schneider y col., 2012). El número de estomas se calculó como el número de estomas por superficie de área foliar (mm^2). La conductancia estomática se midió a las 2 pm (8 h después de que se encendieron las luces en la cámara de cultivo), usando un porómetro de hoja (SC1 Decagon Devices, Inc.) en el lado abaxial y adaxial de dos folíolos de la tercera hoja de cuatro plantas por línea.

2.2.24 Determinación de la apertura estomática en plantas de tomate

El método utilizado se basa en el realizado por Scarpeci y colaboradores, 2017 con menores modificaciones. Se tomaron moldes de hojas de plantas $\Delta Slwrkys$ y salvajes utilizando una silicona de baja viscosidad (Speedex ColteneTM) en diferentes condiciones: basales (16 h de luz y 8 h de oscuridad), oscuridad (5 h de oscuridad) y 1 h luego de la infiltración de las plantas con *Pst* DC3000. Para realizar dichos moldes se mezcló la silicona de baja viscosidad y el catalizador con una espátula durante aproximadamente 30 seg y luego se aplicó a la superficie abaxial de las hojas. Después del endurecimiento, el material se despegó longitudinalmente y fue utilizado para realizar improntas utilizando esmalte de uñas. Se tomaron fotografías utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51). La apertura estomática se determinó manualmente empleando el software de análisis ImageJ-win64 (Schneider y col., 2012).

2.2.25 Análisis estadísticos

Para los ensayos realizados en *N. benthamiana* de supresión de la muerte celular, enfermedad y MCP, se realizó un análisis no paramétrico utilizando la prueba exacta de Fisher con un nivel de significancia del 5,0 % (* $P < 0,05$) o del 1,0 % (** $P < 0,01$), usando plantas silenciadas con *Ecl* como control. Para el análisis computamos sitios de infiltración con $>80\%$ junto con aquellos con 80-25%.

Se seleccionó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5,0% (* $P < 0,05$) o del 1,0% (** $P < 0,01$) seguido de la prueba de Dunnet para la comparación de las medias de las mediciones de pérdida de electrolitos, cuantificación de la deposición de calosa, recuento bacteriano y determinaciones de RT-qPCR. El control utilizado fue plantas silenciadas con *Ecl*.

Para los ensayos realizados en tomate se seleccionó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5,0 % (* $P < 0,05$) o del 1,0% (** $P < 0,01$) seguido de la prueba post hoc de diferencia significativa honesta de Tukey para comparar las medias de todas las condiciones.

Previo a cada análisis paramétrico, se verificaron los supuestos de normalidad (QQ-plot y prueba de Shapiro Wilks) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene). Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independiente.

2.2.26 Ensayos de localización sub-celular

Las regiones codificantes completas sin codón de terminación de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* se clonaron en pENTR/D (ThermoFisher Scientific). Los plásmidos de entrada resultantes se recombinaron con los vectores de expresión de plantas pB7RWG2 y pB7FWG2 (Karimi y col., 2002) para obtener fusiones C-terminales a mRFP o eGFP, respectivamente, utilizando el kit de mezcla de enzimas LR Clonase II (ThermoFisher Scientific). La clonación correcta se confirmó mediante secuenciación de minipreps. Los plásmidos recombinantes verificados se utilizaron para transformar químicamente *A. tumefaciens* GV3101::pMP90. Se coinfiltraron *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido de interés ($DO^{600nm} = 0,3$) y un plásmido para la sobreexpresión de la proteína supresora del silenciamiento génico p19 ($DO^{600nm} = 0,1$) (Voinnet y col., 2003), en plantas de *N. benthamiana* de 3-4 semanas de edad. Se infiltraron además como controles positivos de expresión *A. tumefaciens* conteniendo los vectores 35S:eGFP y 35S:mRFP ($DO^{600nm} = 0,2$). Se observaron muestras de hojas 48 hpi desde la superficie abaxial con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51). La expresión de las proteínas se confirmó por western blot.

2.2.27 Extracción de proteínas totales de tejido vegetal

Inmediatamente después de colectar las hojas o luego de estar almacenadas a -80°C , se pulverizó el tejido foliar en N_2 líquido y 100-200 mg y se homogenizó en 200 μL de buffer de extracción (Tris-HCl 75 mM pH 6,8, glicerol 10% v/v, β -mercaptoetanol 5% v/v, SDS 2% p/v, PMSF 1 mM). Luego se incubó con agitación suave a 4°C durante 20 min. Se centrifugó a $14000 \times g$ por 10 min y al sobrenadante se le agregó un volumen de buffer muestra 3X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2% p/v; glicerol 10% v/v; β -mercaptoetanol 5% v/v; azul de bromofenol 0,001% p/v). Las muestras se incubaron a 100°C por 10 min y se centrifugaron a $14000 \times g$ durante 5 min.

2.2.28 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de las muestras proteicas se efectuó utilizando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación del gel de poliacrilamida se siguió el protocolo descrito por Laemmli (1970) con modificaciones como se describe en Mini-PROTEAN® Tetra Cell Manual, Bio-Rad (California, USA). Las muestras se sometieron a electroforesis a 100 V hasta su entrada en el gel de apilamiento y luego a 200 V en el gel de separación. El buffer de corrida utilizado consistió en Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1% p/v. El porcentaje de acrilamida utilizado para los geles de separación fue de 10% p/v, de acuerdo al tamaño de las proteínas analizadas.

2.2.29 Análisis de proteínas por Western blot

Para la transferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE a una membrana de Fluoruro de polivinilideno (Roti-PVDF, Carl Roth GmbH + Co. KG) se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad (BioRad Laboratorios, California, USA) y se procedió de acuerdo con las especificaciones del fabricante descritas en el manual de instrucciones. La transferencia se llevó a cabo a 100 V durante 90 min en buffer de

transferencia frío (Tris 25 mM; Glicina 192 mM, Metanol 20% v/v) y una vez finalizada se bloqueó la membrana con leche descremada 5% p/v en TBS (Tris-HCl 20 mM; NaCl 500 mM; pH 7,5) durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Se realizó un lavado en TBS durante 5 min en agitación suave. La membrana se incubó en agitación ON a 4 °C con la dilución adecuada del anticuerpo primario (1:300 para anti-Myc, 1:2000 para anti-RFP y 1:1000 para anti-GFP) en 1X de TBS-T (TBS con el agregado de Tween-20 0,05% v/v) y leche descremada 5% p/v. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con TBS-T durante 10 min en agitación y temperatura ambiente. Se incubó durante 120 min a temperatura ambiente con la dilución 1:10000 del anticuerpo secundario diluido en TBS-T con leche descremada 5% p/v. Se realizaron tres lavados con TBS-T durante 10 min en agitación y un último lavado de 5 min en TBS para eliminar las trazas de detergente. Para el revelado de la membrana se prepararon las soluciones A (500 µL Tris-HCl 1 M pH 8,5; 30 µL de H₂O₂ 30% v/v; 4,470 mL de ddH₂O) y B (500 µL Tris-HCl 1M pH 8,5; 50 µL de ácido cumárico 90 mM; 22 µL de luminol 250 mM; 4,428 mL de ddH₂O). Se mezclaron 5 mL de cada solución al momento de ser utilizadas y se incubó la membrana por 30 seg agitando manualmente para cubrir toda la superficie de la misma. Se retiraron los restos del sustrato secando la membrana con papel absorbente y se expuso a una placa radiográfica (Carestream MIN-R S Film) en oscuridad durante el tiempo necesario (3 min para anti-RFP y anti-GFP y de 15 a 60 min para anti-Myc). Las placas fueron sumergidas en solución de revelado (revelador y reforzador Carestream X-OMAT MX) unos minutos, lavadas con ddH₂O y finalmente sumergidas en una solución de fijador (MF-53 Fijador Manual Eco-Ray, Traeco S.A.).

2.2.30 Co-inmunoprecipitación de proteínas: GFP-Trap

Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* de cuatro semanas de edad con una cepa de *A. tumefaciens* transformada con un vector binario (pGWB417) conteniendo las regiones codificantes de *SIWRKY22*, *SIWRKY25* o YFP (control negativo) previamente inducidas en MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 200 µM, en agitación suave a temperatura ambiente por 4 h. Se realizó una extracción de proteínas totales a partir de 500 mg de tejido vegetal en 300 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 150 mM, SDS al 0,1% p/v, Triton X-100 al 1% v/v, desoxicolato de sodio al 1% p/v; suplementado con 2,5 mM MgCl₂ y PMSF 1 mM) y se incubó durante 1 h a 4 °C. Las proteínas solubles (*input*) se incubaron con 25 µL de GFP-Trap_A (ChromoTek) por muestra ON a 4 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 2.500x g por 5 min a 4 °C y se guardó una alícuota de los sobrenadantes para la fracción *output*. Las perlas se lavaron tres veces con buffer de dilución frío (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, EDTA 1 mM PMSF) mediante centrifugación en las mismas condiciones. Las proteínas se eluyeron con 60 µL de buffer de muestra 4x y se incubaron a 100 °C durante 15 min (IP). Para las muestras de *input* y *output*, se cargaron 20 µL de proteínas solubles mezcladas con buffer de muestra 4x para la electroforesis en gel. Las proteínas se corrieron en gel SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF (Roti-PVDF, Carl Roth GmbH + Co. KG) y se incubaron con los anticuerpos apropiados para su inmunodetección.

2.2.31 Complementación Bi-molecular de Fluorescencia (BiFC)

Las regiones codificantes sin codón de terminación de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* se clonaron en pENTR/D/TOPO (ThermoFisher Scientific). Los plásmidos de entrada resultantes se recombinaron con los vectores de expresión de plantas pAS054 y pAS059 (Manavella y col., 2012; Cambiagno y col., 2021) (cedidos gentilmente por el laboratorio de Biología del ARN-IAL, Santa Fe) para generar fusiones N- y C-terminal de los factores de transcripción a la proteína reportera Citrina. La interacción entre YFP^N-HYL1 + YFP^C-24K se utilizó como control positivo (Marmisolle y col., (en revisión)).

Mezclas de cultivos de *A. tumefaciens* conteniendo las diferentes construcciones a ensayar ($DO^{600nm} = 0,2-0,5$) fueron coinfiltrados con el vector conteniendo la proteína supresora del silenciamiento p19 ($DO^{600nm} = 0,1$) (Voinnet y col., 2003) en plantas de *N. benthamiana* de 3-4 semanas de edad. Se tomaron discos de hoja a las 24, 48 y 72 hpi y fueron observados al microscopio de fluorescencia para evaluar la reconstitución de la proteína reportera Citrina.

2.2.32 Ensayos de doble híbrido (Y2H) en levaduras

Se realizaron ensayos de doble híbrido en levaduras utilizando el sistema GAL4 Gateway de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Clontech). Se clonaron las regiones codificantes de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en el vector de expresión Gateway pGADT7 (dominio de activación, AD) y pGBKT7 (dominio de unión a ADN, BD). Estas construcciones se cotransformaron luego en la cepa AH109 de *Saccharomyces cerevisiae* para evaluar las interacciones. Los transformantes se seleccionaron en medio SD/-Leu-Trp (-2). Las interacciones se probaron en medios SD/-Leu-Trp (-2) y SD/-Leu-Trp-Ade-His (-4). Las placas se incubaron a 28 °C durante 5 días. AtJAZ9 fue clonado en cada uno de los vectores, para utilizar la formación de su homodímero como control positivo (Chini y col., 2021). Los vectores vacíos pGADT7 y pGBKT7 se cotransformaron como controles negativos.

2.2.33 Reacción histoquímica para el sistema reportero β-glucuronidasa (GUS)

Las regiones promotoras (región de 1500 pb aguas arriba del sitio de inicio de la traducción anotado) correspondientes a *SIWRKY22*, *SIWRKY25*, *NRG1* y *SAUR* fueron clonadas en el vector pKGWFS7 (prom-*SIWRKY25*:*Gus*, prom-*SIWRKY22*:*Gus*, prom-*NRG1*:*Gus* y prom-*SAUR*:*Gus*). Hojas de *N. benthamiana* de 3-4 semanas de edad se infiltraron con suspensiones de *A. tumefaciens* conteniendo estos vectores ($DO^{600nm} = 0,3$) junto con SIWRKY22-Myc y SIWRKY25-Myc ($DO^{600nm} = 0,3$) y acetosiringona 200 μM en buffer (MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM). YFP-Myc fue utilizado como control negativo ($DO^{600nm} = 0,2$). Para determinar la actividad de la enzima β-glucuronidasa (expresión del gen *uidA*, GUS) las zonas previamente infiltradas con las cepas de *A. tumefaciens*, se infiltraron con una solución del reactivo colorante (Tris-HCl 100 mM pH 7, X-Gluc (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronic acid cycloheximide salt) 2 mM, Tritón-X100 0,01 % v/v, NaCl 50 mM, ferricianuro de potasio 2 mM), se tomaron discos de hojas de esas zonas y se incubaron ON a 37 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno, con Tris-HCl 100 mM pH 7. El tejido se decoloró de la clorofila incubándolo en soluciones crecientes de etanol 30, 50, 70, 90 y 100 % v/v. Se rehidrató el tejido invirtiendo la serie de lavados de etanol durante 10 min y luego se mantuvo en Tris-HCl 100 mM, pH 7,0.

2.2.34 Análisis de correlación

Empleando datos previamente generados por el laboratorio se realizó un análisis de correlación de la expresión con el método Spearman, considerando aquellos genes con coeficiente de correlación $\geq 0,8$, con respecto a *SIWRKY22* y *SIWRKY25*. Se utilizaron datos de ocho tratamientos realizados con tres réplicas biológicas cada uno (Tabla 6, Capítulo 3) (Rosli y col., 2013; Pombo y col., 2014). Dentro de los que tuvieron coeficiente de correlación ≥ 0.8 se seleccionaron aquellos con inducción estadísticamente significativa en ETI 6 h. Las regiones promotoras de este grupo de genes (1500 pb aguas arriba del sitio de inicio de traducción anotado) se obtuvieron de SGN (Fernandez-Pozo y col., 2015) y se les realizó una búsqueda de elementos en cis para detectar posibles motivos *W-box* utilizando la plataforma Plant.PAN 2.0 (Chow y col., 2015). Los candidatos finales se eligieron en base a una búsqueda bibliográfica sobre su posible rol en la respuesta inmune y que contuvieran al menos un *W-box*.



3- CAPÍTULO 1:

Caracterización de la respuesta inmune de plantas de *Nicotiana benthamiana* silenciadas para los genes *NbWRKY22a/b* y *NbWRKY25a/b*

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Estudio de las interacciones planta-patógeno utilizando *N. benthamiana* como planta modelo

N. benthamiana es una especie ampliamente utilizada como planta modelo desde hace años para el estudio de las bases moleculares que rigen las interacciones de plantas con microorganismos patógenos (Goodin y col., 2008). Las principales razones por las cuales es utilizada para el estudio de estas interacciones radican en su susceptibilidad bien caracterizada a diversos patógenos, la alta eficiencia que posee para el silenciamiento de genes utilizando la técnica de VIGS, la facilidad con que se puede expresar de manera transitoria una proteína utilizando *A. tumefaciens* y la posibilidad de manipularla genéticamente de manera estable (Todesco y de Felippes, 2016). Sumado a esto, el hecho de poseer un genoma secuenciado favorece el uso de esta planta para el estudio de estas interacciones a nivel molecular (Bombarely y col., 2012). A su vez *N. benthamiana* pertenece a la familia de las Solanáceas, por lo que se encuentra emparentada con el tomate y otros cultivos de relevancia económica, como el caso de la papa y el tabaco (Goodin y col., 2008).

En el año 2012, Bombarely y colaboradores realizaron un relevamiento de 24 genes pertenecientes a distintas especies de plantas que codifican para proteínas asociadas a la inmunidad tales como proteínas R, PRRs y MAPKs. Este trabajo reveló que existe un 90% de identidad de secuencia nucleotídica entre estos genes de tomate y los de *N. benthamiana*. Cabe destacar que, excepto por dos de ellos, cada gen poseía al menos dos secuencias ortólogas en *N. benthamiana*, como era de esperar por ser una especie alotetraploide.

Otra característica importante de *N. benthamiana* es el gran tamaño de su hoja, que permite realizar ensayos de observación fenotípica de manera sencilla.

Debido a todas las características es que se utilizó esta planta modelo para realizar parte de este trabajo de tesis, en la que se estudió la participación de los genes en estudio en las respuestas inmunes de *N. benthamiana*. Estos experimentos se detallarán a lo largo de este capítulo.

3.1.2 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

La técnica de VIGS utiliza el sistema de defensa que poseen las plantas contra los virus llamado silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, del inglés *Post-Transcriptional Gene Silencing*). Esta técnica involucra el clonado de una pequeña región (de aproximadamente 300 pb) del gen blanco que se desea silenciar en un vector viral modificado (Burch-Smith y col., 2004).

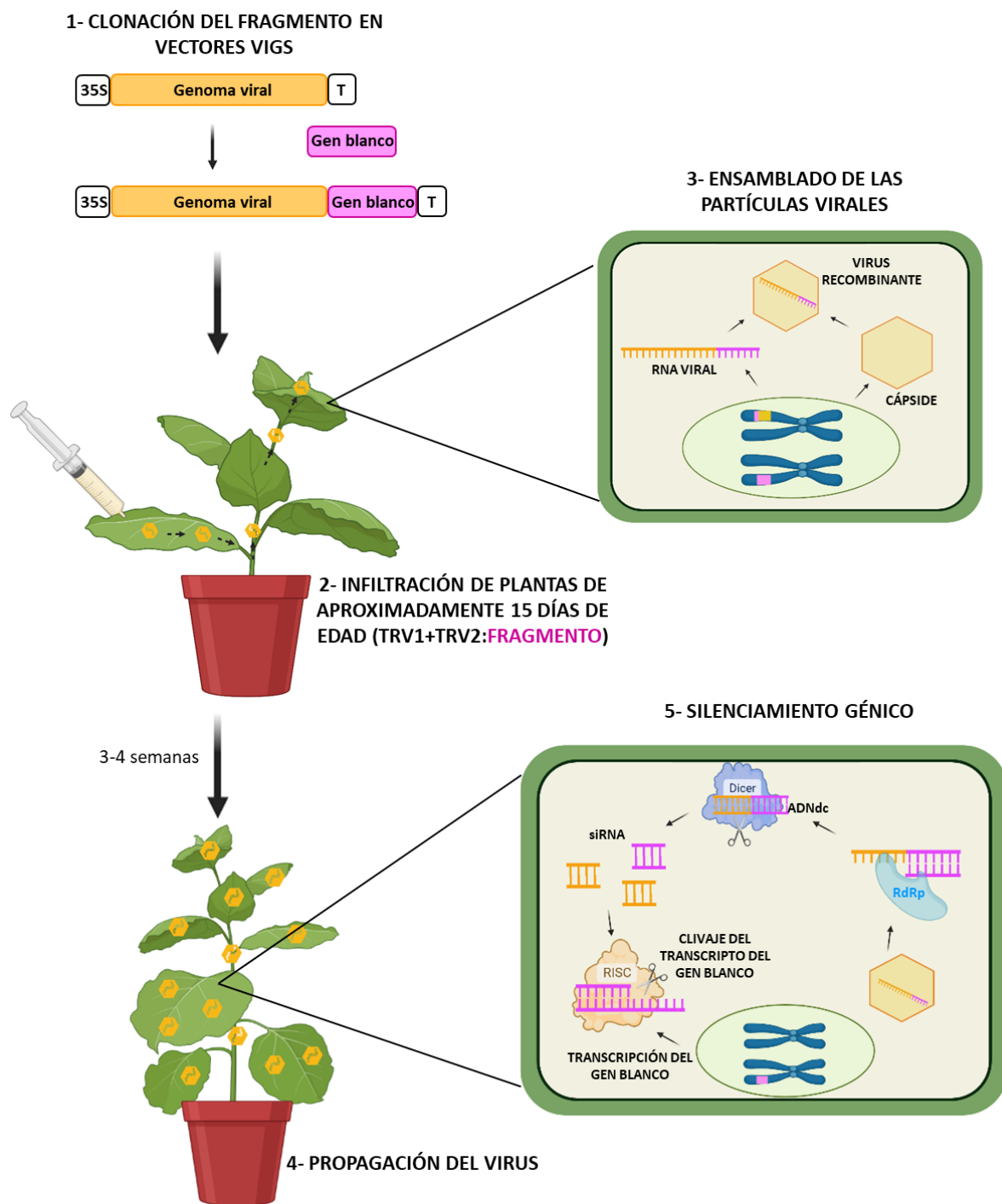


Figura 7. Esquema representativo de los pasos involucrados en la técnica de VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*). 35S, promotor 35S; T, terminador; TRV, *Tobacco Rattle Virus*; RdRp, *RNA-dependent RNA polymerase*; RISC, *RNA Induced Silencing Complex*; siRNA, *small interfering RNA*, ADNdc, ADN doble cadena. Adaptado de Courdavault y col., 2020.

En la Figura 7 se encuentra un esquema de los mecanismos moleculares involucrados en este tipo de ensayos. Este método ha sido adaptado de manera de expresar los genomas virales modificados con parte del gen blanco, empleando *A. tumefaciens*. Diferentes vectores han sido

desarrollados, pero los más frecuentemente utilizados están basados en el virus TRV (del inglés, *Tobacco Rattle Virus*), el cual es bipartito por lo que su empleo requiere de la combinación de dos cultivos de *A. tumefaciens* (TRV1 + TRV2) (Velásquez y col., 2009). Por sus características, el virus que posee el fragmento del gen a silenciar se distribuirá de manera sistémica en toda la planta lo que conducirá a un silenciamiento génico sistémico generalizado (Kalantidis y col., 2008). Una vez insertado dentro del genoma vegetal, el ARN transgénico se transcribe para luego replicarse mediante una enzima endógena, la ARN polimerasa dependiente de ARN o RdRp (del inglés, *RNA-dependent RNA polymerase*). La RdRp produce moléculas de ARN doble cadena (ARNdc) que desencadenan el PTGS. Estas moléculas de ARNdc son reconocidas por enzimas ARNasas tipo III específicas de ARNdc llamadas DICER. Las enzimas DICER escinden el ARNdc en ARN cortos de interferencia (aproximadamente 21-23 nucleótidos) llamados siRNA (del inglés, *small interfering RNA*). Los siRNA son reconocidos por el complejo RISC (del inglés, *RNA Induced Silencing Complex*), transformándolos en siRNA de cadena simple. El complejo RISC utiliza estos últimos para buscar en la célula moléculas de ARN con secuencias complementarias que luego serán degradadas.

3.1.3 Identificación de los genes candidatos *SIWRKY22* y *SIWRKY25*

Como se mencionó en la sección 1.8 de la introducción general, previo a la realización de este trabajo y empleando una estrategia basada en el uso de RNA-seq, se analizó la respuesta de tomate ante el desafío con diferentes PAMPs, cepas mutantes de *Pst* DC3000 y bacterias no patógenas (Rosli y col., 2013; Pombo y col., 2014).

En uno de los análisis de transcriptómica realizados se estudió el efecto del desafío de plantas de tomate resistentes a *Pst* DC3000, por poseer el locus Pto introgresado, denominadas Río Grande (RG)-PtoR con diferentes cepas mutantes de *Pst* DC3000. Las cepas que se utilizaron son: *Pst* DC3000 Δ *fliC*, la cual no posee el gen que codifica para flagelina por lo que no induce la PTI de la planta asociada a esta molécula; *Pst* DC3000 Δ *avrPto* Δ *avrPtoB*, su infiltración en plantas RG-PtoR no activa la ETI debido a que tiene mutados los genes que codifican para los efectores *AvrPto* y *AvrPtoB*; *Pst* DC3000 Δ *fliC* Δ *avrPto* Δ *avrPtoB*, que no provoca la activación de ninguna de las respuestas inmunes anteriormente mencionadas. La comparación entre los desafíos de *Pst* DC3000 Δ *fliC* y *Pst* DC3000 Δ *fliC* Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* implica la respuesta asociada a la ETI. Mientras que la respuesta asociada a la PTI resulta de la comparación de los desafíos con *Pst* DC3000 Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* y *Pst* DC3000 Δ *fliC* Δ *avrPto* Δ *avrPtoB*.

El análisis de los datos de RNA-seq permitió identificar un grupo de genes cuya expresión se induce específicamente ante la activación de la respuesta ETI (genes ETI específicos) o la respuesta PTI (genes PTI específicos) (Pombo y col., 2014). En particular, se identificaron dos factores de transcripción (FT) del tipo WRKY, *SIWRKY25* (Solyc10g011910) y *SIWRKY22* (Solyc01g095100) (Figura 8), cuya expresión es inducida específicamente cuando se encuentra activa la ETI mediada por Pto/Prf a las 6 h post-infiltración (hpi) (Figura 8). Dichos FT pertenecen al grupo IIe de los WRKYs y son el objeto de estudio de este trabajo de tesis. Numerosas publicaciones previas señalan la importancia de este tipo de factores de

transcripción en el reconocimiento de distintos patógenos y la transducción de señales de defensa (Singh y col., 2002; Eulgem y Somssich, 2007; Pandey y col., 2009; Wani y col., 2021). Esto permite suponer que ellos pueden formar parte de la señalización durante la activación de la defensa de la planta, resultando interesante abordar su estudio.

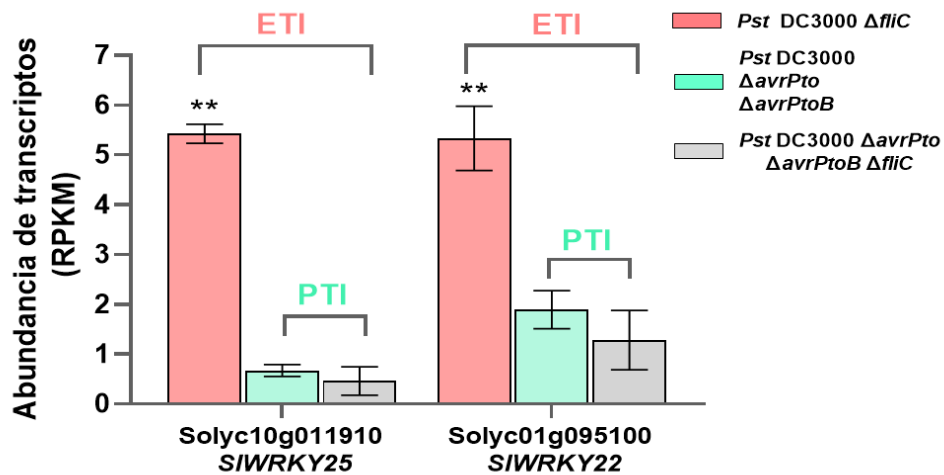


Figura 8. Expresión génica (RNA-seq) en hojas de tomate RG-PtoR infiltradas con diferentes cepas mutantes de *Pst* DC3000 a las 6 h después de la infiltración. Las barras representan la media de tres réplicas biológicas con su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos dobles indican diferencias significativas (** $P < 0,01$) con valores P corregidos para múltiples pruebas usando *false discovery rate* (Pombo y col., 2014). RPKM, *Reads Per Kilobase per Million of mapped reads*.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Identificación de los genes *NbWRKY22a/b* y *NbWRKY25a/b* a partir de análisis filogenéticos

Para comenzar con el estudio de la participación de SIWRKY22 y SIWRKY25 en las respuestas inmunes PTI y ETI, se realizó un análisis filogenético para hacer una búsqueda de sus genes ortólogos en *A. thaliana* y *N. benthamiana*. En el mismo se incluyeron las secuencias de aminoácidos de los miembros del grupo IIe WRKY de *A. thaliana* (8), tomate (18) y *N. benthamiana* (17) (Figura 9).

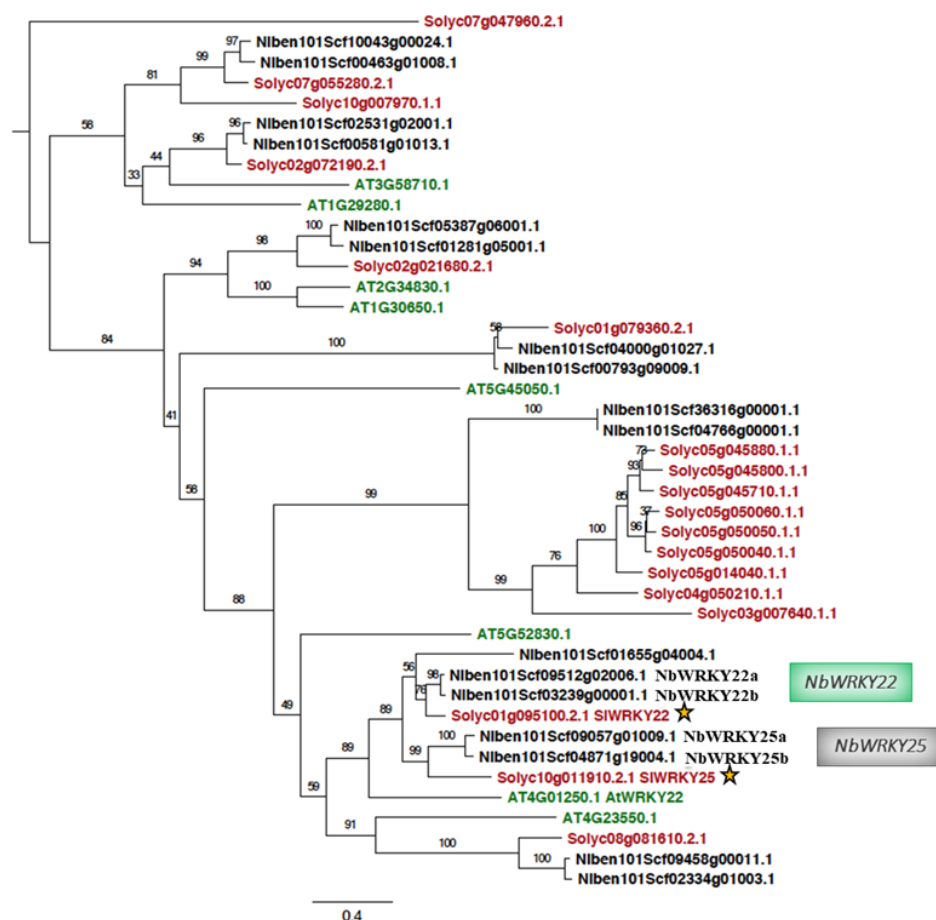


Figura 9. Identificación de los ortólogos de los WRKY de tomate denominados *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab*. Análisis filogenético del grupo IIe de factores de transcripción WRKY utilizando secuencias de aminoácidos. Los identificadores en verde, negro y rojo indican las proteínas de *Arabidopsis*, *N. benthamiana* y tomate, respectivamente. SIWRKY22 y SIWRKY25 y sus proteínas ortólogas de *N. benthamiana* están identificadas junto al número de acceso correspondiente. Los SIWRKYs en estudio en este trabajo están marcados con una estrella. Se indican qué genes de *N. benthamiana* se silencian con las construcciones *NbWRKY22* y *NbWRKY25*, con cuadros verde y gris. Para el análisis se utilizó el método PhyML con *bootstrap* de 100 repeticiones.

Se utilizó el programa SeaView (Gouy y col., 2010), con el que se realizó un alineamiento empleando Clustal Omega (Sievers y col., 2011) y se construyó a partir de dicho alineamiento

un árbol filogenético empleando el algoritmo PhyML (Guindon y col., 2010) con el modelo JTT y 100 repeticiones (*bootstraps*). Por último, se generó una versión a color de dicho árbol con el programa FigTree-v1.4.3 (Figura 9) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Este análisis permitió establecer que existen dos ortólogos en *N. benthamiana* por cada uno de los WRKYs de tomate en estudio. Se puede observar en la Figura 9 que SIWRKY22 posee dos proteínas cercanas en *N. benthamiana*, Niben101Scf09512g02006.1 (NbWRKY22a) y Niben101Scf03239g00001.1 (NbWRKY22b). Por su parte los ortólogos de SIWRKY25 son Niben101Scf09057g01009.1 (NbWRKY25a) y Niben101Scf04871g19004.1 (NbWRKY25b). A su vez, este grupo de proteínas agrupó con una única proteína de *A. thaliana* (AtWRKY22). Otro factor de transcripción WRKY de *N. benthamiana* (Niben101Scf01655g04004.1) está ubicado en el mismo clado, pero no fue considerado para experimentos futuros debido a que según datos previos de RNA-seq tiene muy baja expresión (0-0,14 FPKM) en hojas de *N. benthamiana* (Pombo y col., 2019).

Según la base de datos iTAK (Zheng y col., 2016), SIWRKY22 y SIWRKY25 son más similares entre sí que con cualquier otro WRKY de tomate, sin embargo, su identidad de aminoácidos es sólo del 55%. Teniendo en cuenta esta información, no se pudo excluir la posibilidad de que SIWRKY22 y SIWRKY25 tengan funciones no redundantes y, por lo tanto, se optó por analizar su contribución en la respuesta inmune por separado y en conjunto como se describirá a lo largo de todo este trabajo.

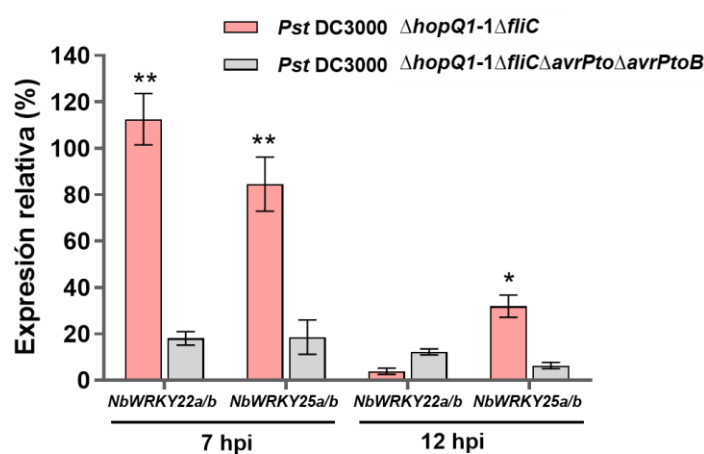


Figura 10. Expresión génica de *NbWRKY22a/b* y *NbWRKY25a/b* durante la activación de la ETI. Hojas de *N. benthamiana*-35S:*Pto* fueron desafiadas con diferentes cepas mutantes de *Pst* DC3000 para evaluar la activación de ETI. Se midió la expresión relativa (RT-qPCR) de los genes a las 7 y 12 hpi. *NbUbe35* y *NbNQO* se utilizaron como genes de referencia. Los asteriscos dobles indican diferencias significativas entre ambas infiltraciones para cada tiempo de muestreo usando el método de Dunnet (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$).

Para analizar si la expresión de los genes *NbWRKY22a/b* y *NbWRKY25a/b* (*NbWRKYs*) es inducida cuando se encuentra activa la respuesta ETI, como la de sus ortólogos en tomate, se infiltraron plantas de *N. benthamiana*-35S::*Pto*, que sobreexpresan de manera estable el gen

Pto de tomate, con las cepas *Pst* DC3000 Δ *hopQ1-1* Δ *fliC* (deficientes en flagelina y el efector HopQ1-1) y *Pst* DC3000 Δ *HopQ1-1* Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* Δ *fliC* (cuádruple mutante, deficiente en flagelina y los efectores AvrPto, AvrPtoB y HopQ1-1). La comparación de la expresión de estos genes frente al desafío de estas dos cepas mutantes permite conocer si son activados transcripcionalmente debido a la ETI asociada a Pto/AvrPto. Se utilizaron cuatro plantas por cada condición y se tomaron muestras de tejido vegetal infiltrado a las 7 y 12 hpi (horas post infiltración) para medir la expresión de estos genes mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Los resultados obtenidos muestran que, como se observó en tomate, los *NbWRKYs* poseen una mayor expresión a las 7 h luego del desafío de las plantas con la doble mutante en comparación con la cuádruple mutante (Figura 10). A las 12 hpi sólo persiste la activación transcripcional de los genes *NbWRKY25a/b*.

3.2.2 El silenciamiento de los genes ortólogos de *SIWRKY25* y *SIWRKY22* en *N. benthamiana* compromete el desarrollo de la MCP asociada al reconocimiento del efector AvrPto

Para caracterizar las respuestas inmunes de plantas de *N. benthamiana* silenciadas para los genes *NbWRKYs*, se diseñaron dos construcciones llamadas *NbWRKY22* y *NbWRKY25* (Figura 9, cuadros verde y gris; Tabla 2 de Materiales y Métodos). La Figura 11a muestra la información generada por la herramienta VIGS tool (<http://vigs.solgenomics.net/>) utilizando como *input* la secuencia de las construcciones *NbWRKY22* y *NbWRKY25* (Fernandez-Pozo y col., 2015).

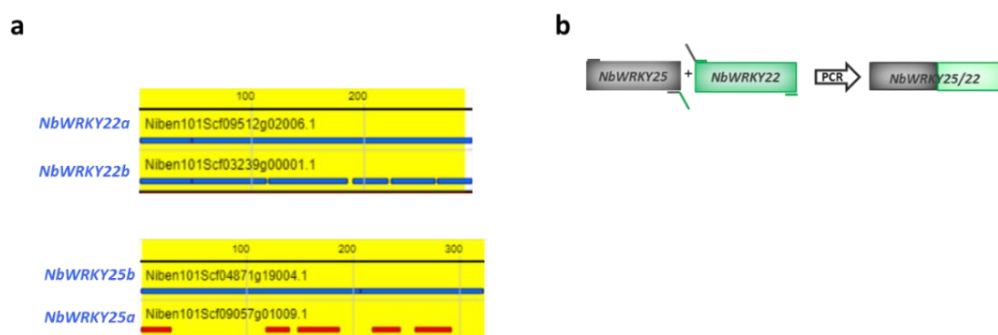


Figura 11. Análisis de los *targets* predichos de las construcciones VIGS en *N. benthamiana* y generación del fragmento *NbWRKY25/22*. (a) Información obtenida de la herramienta VIGS tool (<http://vigs.solgenomics.net/>) utilizando la secuencia de las construcciones *NbWRKY22* y *NbWRKY25*. Representación gráfica de siRNAs de 21 nucleóticos de los posibles blancos de silenciamiento. **(b)** Estrategia utilizada para la generación de una construcción concatenada. Los fragmentos *NbWRKY25* (recuadro gris) y *NbWRKY22* (recuadro verde) se unieron mediante PCR para crear una construcción que permite silenciar los cuatro genes *NbWRKY* de *N. benthamiana* simultáneamente (*NbWRKY25/22*). Las líneas grises y verdes indican la posición de alineamiento de cada cebador (Tabla 1 de Materiales y Métodos).

Según esta herramienta, cada una de estas construcciones silenciaría sus dos genes blanco. Estos dos fragmentos también se unieron mediante PCR para crear una construcción concatenada adicional a fin de silenciar los cuatro genes ortólogos simultáneamente, denominada *NbWRKY25/22* (Figura 11b). Se utilizaron cepas de *A. tumefaciens* GV2260 que contenían las construcciones generadas (*NbWRKY22*, *NbWRKY25* y *NbWRKY25/22*) para realizar VIGS en plantas de *N. benthamiana*.

Para llevar a cabo una primera evaluación de la posible participación de los *NbWRKYs* en la respuesta ETI de *N. benthamiana* se realizó un ensayo de MCP asociada al reconocimiento del par de proteínas Pto y AvrPto. El concepto de este experimento es que, si los genes en estudio participan en la ETI mediada por Pto/AvrPto, al silenciarlos debería observarse un retraso en la aparición de MCP macroscópica.

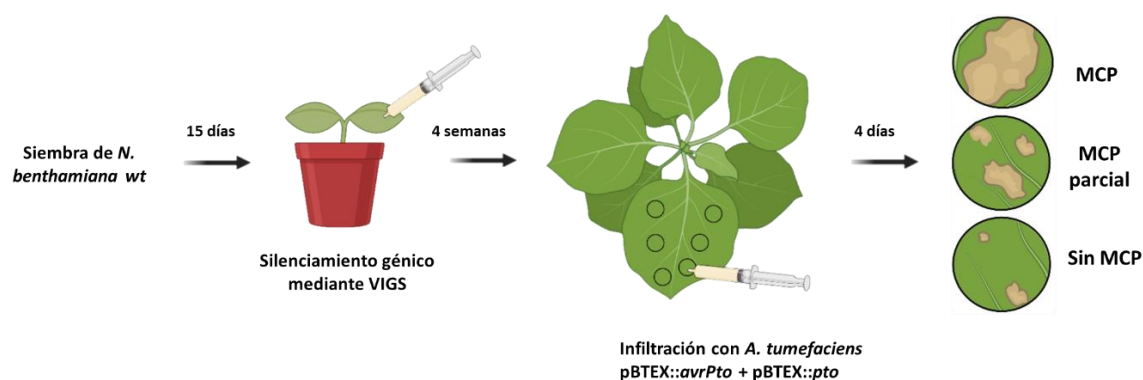


Figura 12. Representación esquemática de las etapas de los ensayos de MCP asociada a Pto/AvrPto. Plantas de *N. benthamiana* wt silenciadas para los genes *NbWRKYs* y sus respectivos controles se infiltraron en los círculos marcados, con una mezcla de cepas de *A. tumefaciens* conteniendo los vectores pBTEX:Pto o pBTEX:avrPto. Se evaluó visualmente el desarrollo de MCP macroscópica a los 4 días empleando la siguiente categorización: MCP, más del 80% del área infiltrada con MCP; MCP parcial, entre 80 a 25% del área infiltrada con MCP; Sin MCP, menos del 25% del área infiltrada con MCP. wt, *wild type*; MCP, muerte celular programada.

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* salvajes silenciadas con las construcciones *Ecl* (control negativo), *NbWRKY22*, *NbWRKY25* y *NbWRKY25/22*. En estos experimentos se utilizó como control positivo un fragmento derivado de la proteína Prf de tomate denominado *SlPrf*. La Figura 12 presenta un esquema representativo de los pasos involucrados en este ensayo. Pasadas 4 semanas desde el silenciamiento VIGS, se realizó una coinfiltración con cepas de *A. tumefaciens* conteniendo las secuencias codificantes para las proteínas AvrPto y Pto bajo el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (Pombo y col., 2014) en círculos previamente marcados en las hojas (Figura 12). La sintomatología fue evaluada diariamente utilizando las tres categorías mencionadas previamente (Figura 12). Los datos se expresaron como porcentaje de cada categoría de desarrollo de MCP para cada construcción de silenciamiento utilizada.

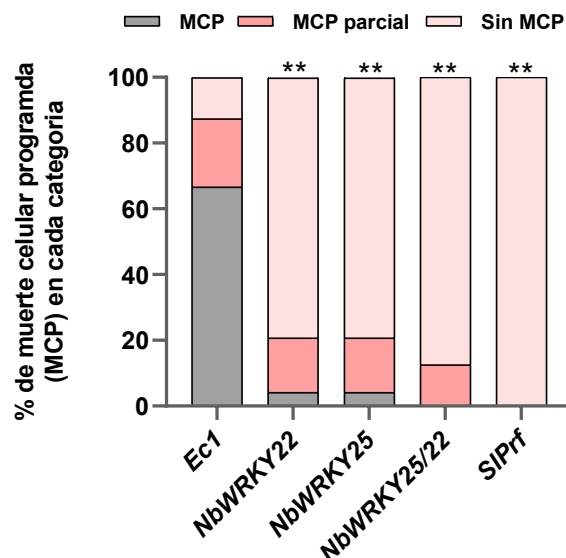


Figura 13. La MPC asociada a Pto/AvrPto se retrasa en las plantas silenciadas para los *NbWRKYs*. Plantas silenciadas de *N. benthamiana* se infiltraron con jeringa con cepas de *A. tumefaciens* para la expresión de las proteínas Pto y AvrPto. El grado de MCP se controló visualmente usando las tres categorías mostradas en la Figura 12. Se analizaron cuatro réplicas biológicas por construcción. Los asteriscos dobles indican diferencias significativas en comparación con las plantas silenciadas con *Ec1* utilizando la prueba exacta de Fisher (** $P < 0,01$).

Al momento de realizar el análisis estadístico (sección 2.2.25 de Materiales y Métodos) los círculos con MCP parcial se consideraron como MCP. Cabe destacar que el relevamiento del desarrollo de MCP se realizó sin conocer la identidad de las plantas silenciadas y que estos experimentos se repitieron cuatro veces con resultados similares. Como se observa en la Figura 13, los controles funcionaron como era de esperar. Es decir, el silenciamiento de *Prf* condujo a un severo retraso de la MCP, mientras que para las plantas silenciadas con *Ec1* se observó más del 60% de los círculos con MCP. Para el caso de las plantas silenciadas para los *NbWRKYs* se observó un retraso significativo del desarrollo de la MCP con respecto al control *Ec1* (Figura 13). Estos resultados indican que uno o ambos genes *NbWRKY22a/b* y *NbWRKY25a/b* contribuyen al desarrollo de la MCP asociada a la activación de la ETI.

Cabe destacar también que las plantas silenciadas con las tres construcciones generadas para los *NbWRKYs* no se vieron afectadas en su crecimiento y morfología y tuvieron un desarrollo normal (Figura 14).

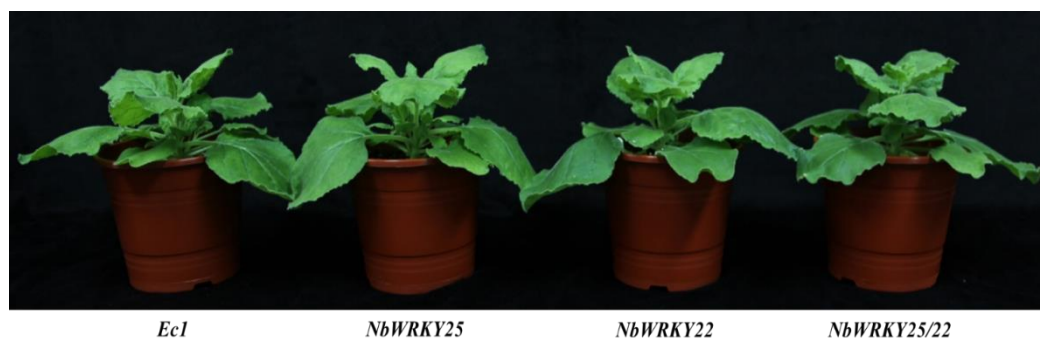


Figura 14. Las plantas de *N. benthamiana* silenciadas con la técnica de VIGS poseen un crecimiento y desarrollo normal. Fotografías de plantas de *N. benthamiana* silenciadas con las construcciones señaladas debajo, tomadas cuatro semanas después del VIGS.

3.2.3 Determinación de la eficiencia y especificidad del silenciamiento

Para evaluar la eficiencia del silenciamiento de las construcciones generadas se estimó por RT-qPCR la abundancia de los transcritos correspondientes a los *NbWRKYs* en las plantas silenciadas. Debido a la alta similitud de secuencia entre cada uno de los pares de genes ortólogos, es decir, entre *NbWRKY22a* y *NbWRKY22b* y entre *NbWRKY25a* y *NbWRKY25b*, se diseñaron en cada caso cebadores para amplificar simultáneamente a ambos (Tabla 1, sección 2.1.6 de Materiales y Métodos). Para ello se silenciaron plantas de *N. benthamiana* salvajes con las tres construcciones en cuestión junto con el control negativo *Ec1*. Luego de cuatro semanas se tomaron muestras de hojas y se procesaron para medir la expresión de los genes por RT-qPCR. Se utilizaron como genes de referencia *NbUBE35* y *NbCENPO* (Pombo y col., 2019). Las plantas silenciadas con las construcciones *NbWRKY22* y *NbWRKY25/22* poseen una reducción en la abundancia de transcritos de *NbWRKY22a/b* de más del 90% en comparación con el control *Ec1* (Figura 15a). Además, se observó un patrón similar para *NbWRKY25a/b*, mostrando una menor expresión cuando se utilizaron las construcciones *NbWRKY25* y *NbWRKY25/22* (80% y 90%, respectivamente) (Figura 15a).

Para analizar la especificidad del silenciamiento, se realizó un análisis filogenético a nivel de nucleótidos que incluye los genes más cercanos a *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* (Figura 15b). De este análisis se escogieron los genes Niben101Scf09458g00011.1, Niben101Scf02334g01033.1, Niben101Scf02531g02001.1 y Niben101Scf00581g01013.1, por ser los genes más cercanos a los *NbWRKYs* en estudio que se expresan en hoja de acuerdo a datos de RNA-seq previamente generados (Pombo y col., 2019). Para el caso de los dos primeros genes mencionados no se pudo cuantificar la abundancia de sus transcritos debido a que no se obtuvieron se observaron Ct altos, cercanos al límite de detección de la técnica que no pudieron emplearse para hacer una cuantificación. Por esta razón se utilizaron para el análisis Niben101Scf02531g02001.1 y Niben101Scf00581g01013.1 y se los denominó VIGS *off targets* (marcados en color rojo en la Figura 15b). Debido a su similitud de secuencia nucleotídica no fue posible diseñar cebadores para cada uno y se recurrió al uso de un único par de cebadores para cuantificar a ambos transcritos (Tabla 1, sección 2.1.6 de Materiales y Métodos). No se encontraron diferencias en la abundancia de transcritos de los VIGS *off*

targets al comparar las plantas silenciadas para *NbWRKY22*, *NbWRKY25* y *NbWRKY25/22* con las *Ec1* (Figura 15a).

Estos resultados indican que las tres construcciones son eficientes y específicas en el silenciamiento de los genes *WRKYs* de *N. benthamiana*, resultando poco probable que los fenotipos observados a lo largo de este capítulo se deban al silenciamiento de otro/s gene/s que no sean *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab*.

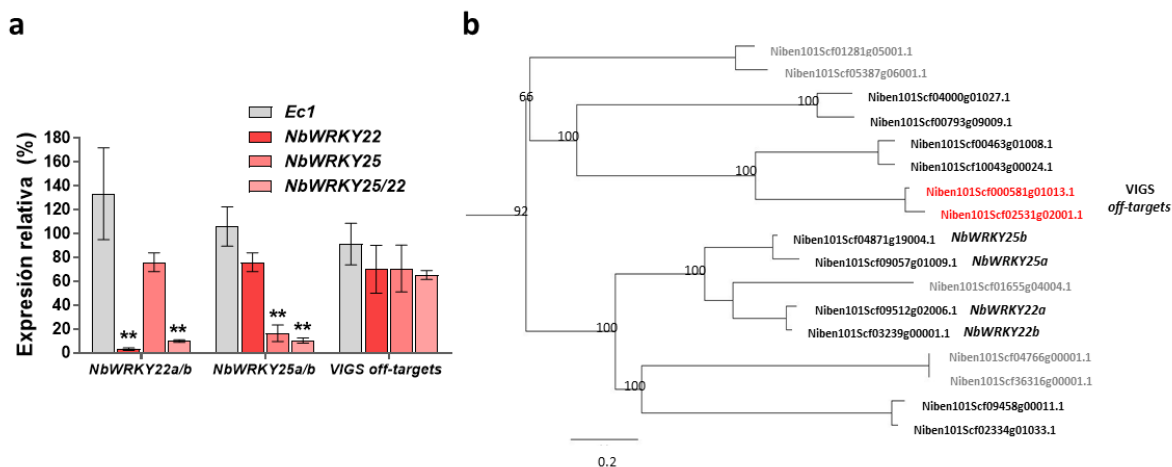


Figura 15. Las construcciones *NbWRKY22*, *NbWRKY25* y *NbWRKY25/22* son eficientes y específicas para el silenciamiento de sus genes blanco. **(a)** Expresión génica de *NbWRKY22a/b*, *NbWRKY25a/b* y los VIGS *off-targets* en plantas silenciadas con las construcciones *Ec1*, *NbWRKY22*, *NbWRKY25* y *NbWRKY25/22* usando RT-qPCR. *NbUbe35* y *NbNQO* se utilizaron como genes de referencia. Los asteriscos dobles indican diferencias significativas en comparación con plantas silenciadas con *Ec1* usando el método de Dunnet (** $P < 0,01$). **(b)** Análisis filogenético del grupo WRKY IIe de *N. benthamiana* utilizando secuencias nucleotídicas. Los genes en estudio están etiquetados junto a su identificador. Los posibles *off-targets* analizados se muestran en rojo. Los genes con identificadores en gris poseen expresión no detectable o muy baja en hoja según datos previos de RNA-seq (Pombo y col., 2019). Para el análisis se utilizó el método PhyML con un *bootstrap* de 100 repeticiones.

3.2.4 *NbWRKY25ab* y *NbWRKY22ab* contribuyen a la resistencia contra *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (AvrPto)

Los experimentos de desarrollo de enfermedad realizados en este trabajo permiten determinar si el silenciamiento de los genes en estudio afecta la sintomatología de la enfermedad causada por el patógeno natural de *N. benthamiana*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*P.s. tabaci*) (Oh y Martin, 2011a; Thilmony y col., 1995). Para este ensayo se silenciaron plantas de *N. benthamiana* que sobreexpresan de manera estable el gen *Pto* de tomate. Las hojas de estas plantas se infiltraron en círculos previamente marcados con una cepa de *P.s. tabaci* que expresa el gen *AvrPto* (*P.s. tabaci* AvrPto) o con el control que posee el vector vacío (*P.s. tabaci* VV). Se silenciaron nuevamente *Prfy Ec1* como controles positivo y negativo, respectivamente. En la Figura 16 se muestra un esquema de los pasos realizados en dicho ensayo. En las plantas

controles *Ec1* la inoculación con un título bajo de *P.s. tabaci* AvrPto (1×10^5 ufc/mL), provoca la activación de la respuesta ETI que conduce a la resistencia (MCP microscópica), controlando al patógeno por lo que no se observan síntomas de enfermedad. Por el contrario, el desafío con *P.s. tabaci* VV resulta en el desarrollo de enfermedad, debido a que el patógeno no expresa el efector AvrPto escapando de esta manera al reconocimiento de la planta y la consecuente activación de la ETI. A este último desafío se lo realiza como control del desarrollo normal de la enfermedad en todas las plantas silenciadas. Bajo este marco teórico, se espera que si los genes *NbWRKYs* estuvieran involucrados en la respuesta ETI asociada a Pto/AvrPto su silenciamiento resultaría en un mayor desarrollo de enfermedad comparado con el control *Ec1*, como ocurre cuando se silencia *Prf*.

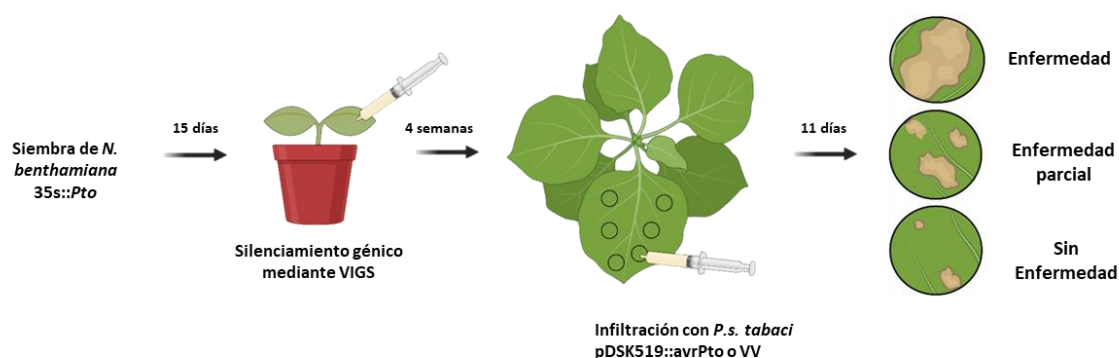


Figura 16. Representación esquemática mostrando las etapas del ensayo de enfermedad. Plantas de *N. benthamiana*-35S::Pto silenciadas para los genes *NbWRKYs* y sus respectivos controles, se infiltraron en cinco de los círculos marcados, con *P.s. tabaci* expresando el efector AvrPto y un círculo con *P.s. tabaci* con el vector vacío (VV). Se monitoreó visualmente el desarrollo de síntomas de enfermedad a los 11 días empleando la siguiente categorización: Enfermedad, más del 80% del área infiltrada con síntomas de enfermedad; Enfermedad parcial, entre 80 a 25% del área infiltrada con síntomas de enfermedad; Sin Enfermedad, menos del 25% del área infiltrada con síntomas de enfermedad.

El fenotipo observado se evaluó a los 11 días luego del desafío y el ensayo fue repetido cuatro veces con resultados similares. La estrategia de categorización de la severidad de la enfermedad fue similar a la detallada en los ensayos de MCP y se esquematiza en la Figura 12. Cuando se infiltraron los círculos con *P.s. tabaci* VV, se observó un alto porcentaje de círculos con desarrollo completo de síntomas de enfermedad en todas las plantas silenciadas (Figura 17, sector izquierdo). En el caso del desafío con *P.s. tabaci* AvrPto se observaron síntomas de enfermedad en todos los círculos infiltrados cuando las plantas se silenciaron con la construcción control *SIPrf*. Las plantas VIGS *NbWRKY22*, *NbWRKY25* y *NbWRKY25/22* desarrollaron mayor porcentaje de sitios con enfermedad que el control *Ec1* (Figura 17, sector derecho), sugiriendo nuevamente que el silenciamiento de los genes *NbWRKYs* afecta la activación de la ETI mediada por Pto/Prf. Como era de esperarse, en el control negativo *Ec1* no se observaron síntomas de enfermedad (Figura 17, sector derecho).

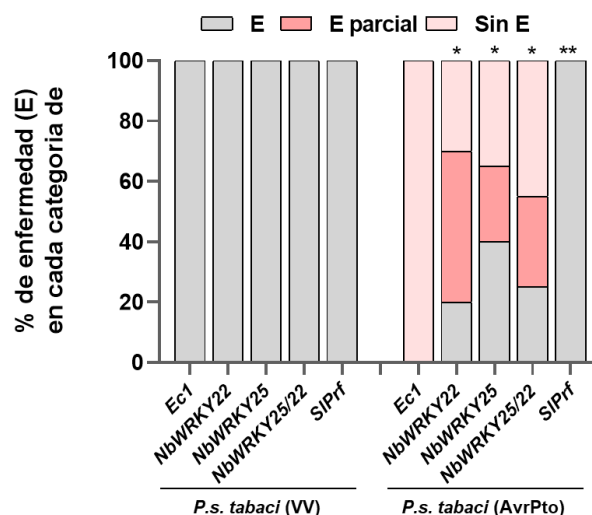


Figura 17. El silenciamiento de los genes *NbWRKYs* compromete la resistencia contra *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (AvrPto). Plantas de *N. benthamiana*-35S::*Pto* se silenciaron para los genes mostrados en el eje x, y posteriormente se infiltraron con jeringa con 1×10^5 ufc/mL de *P.s. tabaci* AvrPto o vector vacío (VV). La severidad de la enfermedad se monitoreó visualmente. Se muestra el porcentaje de círculos que presentaron desarrollo de cada categoría de enfermedad. Se usaron cuatro réplicas biológicas por construcción. Los asteriscos dobles y simples indican diferencias significativas en comparación con las plantas *Ec1* utilizando la prueba exacta de Fisher (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Debido a que se observó un fenotipo similar independientemente de la construcción utilizada (*NbWRKY25*, *NbWRKY22* o *NbWRKY25/22*) en los ensayos presentados hasta el momento, los siguientes experimentos se realizaron usando sólo la construcción concatenada *NbWRKY25/22*, con la que es posible silenciar los cuatro genes en simultáneo (Figura 11b).

Para corroborar si efectivamente los *NbWRKYs* contribuyen a la resistencia contra *P. s. tabaci* en *N. benthamiana* se procedió a cuantificar el crecimiento bacteriano en plantas silenciadas con las construcciones *Ec1*, *NbWRKY25/22* y *SIPrf*. En este caso también se utilizaron cuatro plantas de *N. benthamiana* 35S::*Pto* por cada condición, cuatro semanas después de realizado el silenciamiento génico. Para ello se infiltraron con jeringa dichas plantas con un inóculo de 8×10^4 ufc/mL de *P.s. tabaci* AvrPto. A los 2, 3 y 4 dpi se tomaron discos de hoja de 0.38 cm^2 del área infiltrada y se procesaron como se describe en la sección 2.2.5 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18a, en donde se puede observar un mayor recuento bacteriano en las plantas silenciadas con la construcción *NbWRKY25/22* y el control positivo *SIPrf* en comparación con *Ec1*, lo que indica una respuesta ETI comprometida en las plantas donde se silenciaron los *NbWRKYs*.

Como se mencionó en la sección 1.1.3 de la introducción general, la MCP está asociada con una pérdida de electrolitos de las células que tienen activado este proceso (Baker y col., 1991; Mackey y col., 2002). Es por ello que se cuantificó la pérdida de electrolitos en las plantas silenciadas *Ec1*, *NbWRKYs* y *SIPrf*. Las plantas silenciadas fueron infiltradas con *P.s. tabaci* de 1×10^5 ufc/mL y se tomaron muestras de tejido a los 2 y 3 dpi que se procesaron como se describe en la sección 2.2.9 de Materiales y Métodos. En la Figura 18b se observa que las

plantas silenciadas para los genes *NbWRKYs* y *SIPrf* poseen menor conductividad asociada a la pérdida de electrolitos en comparación con el control negativo *Ec1*.

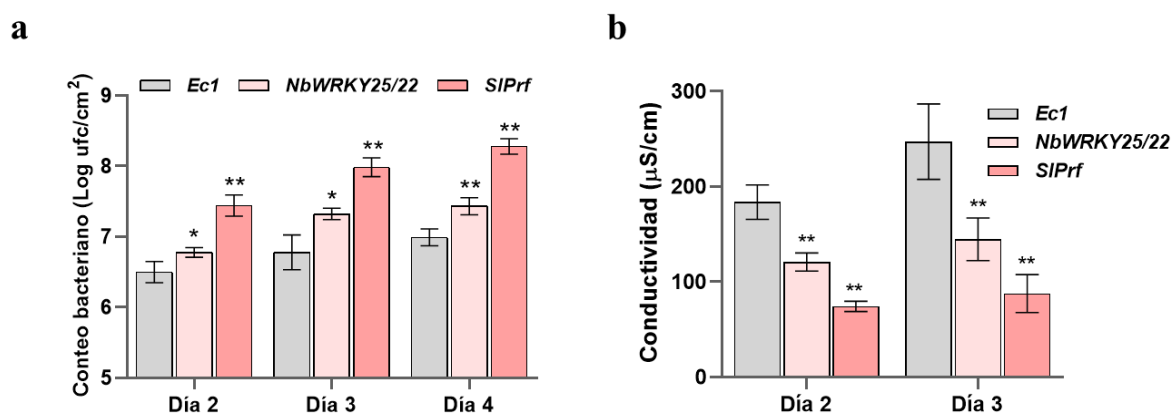


Figura 18. Las plantas silenciadas para los *NbWRKYs* poseen mayor título bacteriano y menor pérdida de electrolitos (a) Crecimiento de *P.s. tabaci* (AvrPto) en hoja. Se infiltraron con jeringa hojas de las plantas silenciadas con 5×10^4 ufc/mL de *P.s. tabaci* (AvrPto). Se tomaron muestras de tejido a los 2, 3 y 4 dpi para recuento de bacterias. **(b)** Pérdida de electrolitos en plantas silenciadas como medida cuantitativa de la MCP. Hojas de plantas silenciadas se infiltraron utilizando jeringa con 1×10^5 ufc/mL de *P.s. tabaci* (AvrPto). Se tomaron discos de tejido para medir la pérdida de electrolitos a los 2 y 3 dpi. En ambos gráficos, los datos representan la media de cuatro plantas por construcción VIGS con su correspondiente desviación estándar y los asteriscos dobles y simples indican diferencias significativas en comparación con las plantas silenciadas con *Ec1* utilizando el método de Dunnet (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Estos resultados en conjunto confirman que tanto *NbWRKY22ab* como *NbWRKY25ab* son reguladores positivos de la ETI mediada por las proteínas Pto y Prf en *N. benthamiana*.

3.2.5 Las plantas con los genes *NbWRKYs* silenciados tienen comprometida la resistencia desencadenada por Roq1 luego del reconocimiento del efector HopQ1-1 en *N. benthamiana*

N. benthamiana expresa Roq1, una proteína de resistencia del tipo TIR-NB-LRR que reconoce la presencia del efector de *Pst* DC3000 HopQ1-1 (Schultink y col., 2017; Wei y col., 2007). Para investigar si *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* desempeñan un papel más amplio en la activación de la respuesta ETI o están específicamente asociados al par Pto/AvrPto, se realizaron ensayos de desarrollo de enfermedad como los explicados en la sección 3.2.4. En este caso, se infiltró una cepa de *P.s. tabaci* que expresa el gen *HopQ1-1* (*P.s. tabaci* HopQ1-1) en plantas de *N. benthamiana* salvajes. También se utilizó la cepa *P.s. tabaci* VV como control positivo del correcto desarrollo de la enfermedad en todas las plantas silenciadas. Como control positivo se realizó VIGS con una construcción que posee un fragmento del gen *SAG101*, proteína involucrada en la señalización río abajo del reconocimiento del efector HopQ1-1 por Roq1 (Gantner y col., 2019). Se pudo observar que el desarrollo de la enfermedad generada por *P.s. tabaci* HopQ1-1 fue significativamente mayor en las plantas silenciadas con

las construcciones *NbWRKY25/22* y *SAG101* en comparación con el control *Ec1* (Figura 19a). Debido al reconocimiento de HopQ1-1 por parte de Roq1 y la consecuente activación de la respuesta ETI que se da en las plantas *Ec1*, no se observaron síntomas de enfermedad en las mismas. Todas las plantas infiltradas con la cepa que contiene el vector vacío desarrollaron un alto porcentaje de síntomas de enfermedad como era de esperar (Figura 19a).

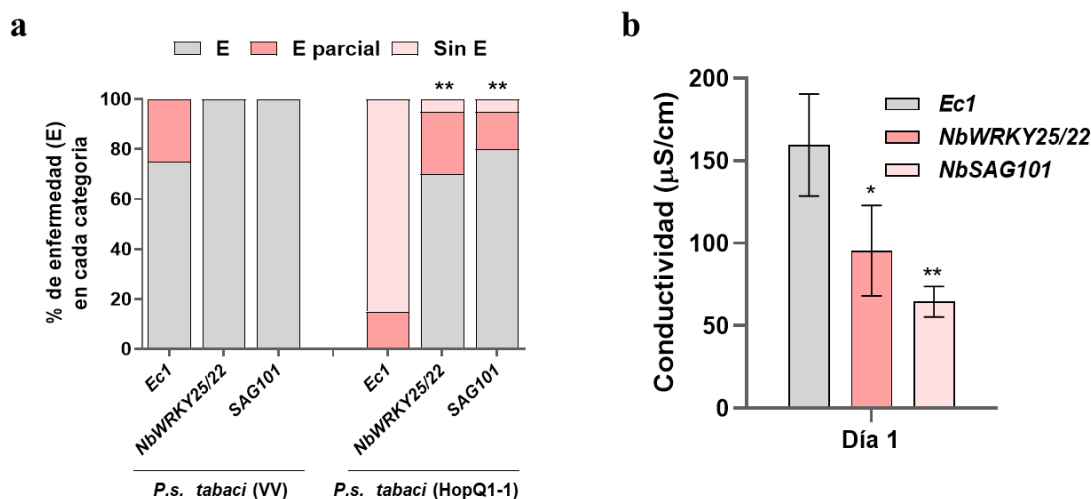


Figura 19. Las plantas silenciadas con *NbWRKY25/22* tienen comprometida la resistencia activada por el reconocimiento de HopQ1-1 en *N. benthamiana*. (a) Hojas de *N. benthamiana* salvaje silenciadas se infiltraron con jeringa con 1×10^5 ufc/mL de *P.s. tabaci* (HopQ1-1) o (VV). El desarrollo de la enfermedad se controló visualmente durante 3 días. Se muestra el porcentaje de círculos de infiltración en las distintas categorías de enfermedad. Se usaron cuatro plantas por construcción. Los asteriscos dobles indican diferencias significativas en comparación con las plantas silenciadas con *Ec1* utilizando la prueba exacta de Fisher (** $P < 0,01$). (b). Empleando plantas silenciadas e infiltradas como en (a), se tomaron discos de tejido a las 24 hpi (horas post-infiltración) y se midió la pérdida de electrolitos. Las barras representan la media de cuatro plantas por construcción con su correspondiente desviación estándar. Asteriscos dobles y simples indican diferencias significativas en comparación con las plantas silenciadas con *Ec1* utilizando el método de Dunnet (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

También se cuantificó la pérdida de electrolitos para analizar de manera alternativa la activación de la ETI mediada por Roq1. Este ensayo se realizó con plantas silenciadas desafiadas con un inóculo de *P.s. tabaci* HopQ1-1 1×10^5 cfu/mL. La conductancia producto de la pérdida de electrolitos se midió a las 24 hpi. Se observó una disminución de la conductividad en las plantas silenciadas para los genes *NbWRKYs* y *SAG101* en comparación con *Ec1* (Figura 19b).

En conjunto, los resultados presentados hasta este momento sugieren que *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* contribuyen a la activación de la ETI mediada por dos tipos diferentes de proteínas de resistencia, CC-NB-LRR (Prf) y TIR-NB-LRR (Roq1).

3.2.6 NbWRKY22ab y NbWRKY25ab participan en el desarrollo de la MCP asociada a otros pares de proteínas R/elicitores

Existe evidencia que sugiere que las señales que llevan a la activación de la respuesta inmune ETI involucran ciertas vías en común que están presentes en distintas especies hospedadoras, a pesar de ser inducidas por el desafío con diferentes patógenos (del Pozo y col., 2004; Oh y col., 2010). Además, las proteínas MAPKs son activadas por varias vías de señalización mediadas por distintos pares de proteína R/elicitores (Zhang y Klessig, 2001). Con esto en mente, se probó el efecto de silenciar los genes *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* en el desarrollo de la aparición de síntomas asociados a la MCP desencadenada por diferentes pares de proteínas R y sus correspondientes elicitores.

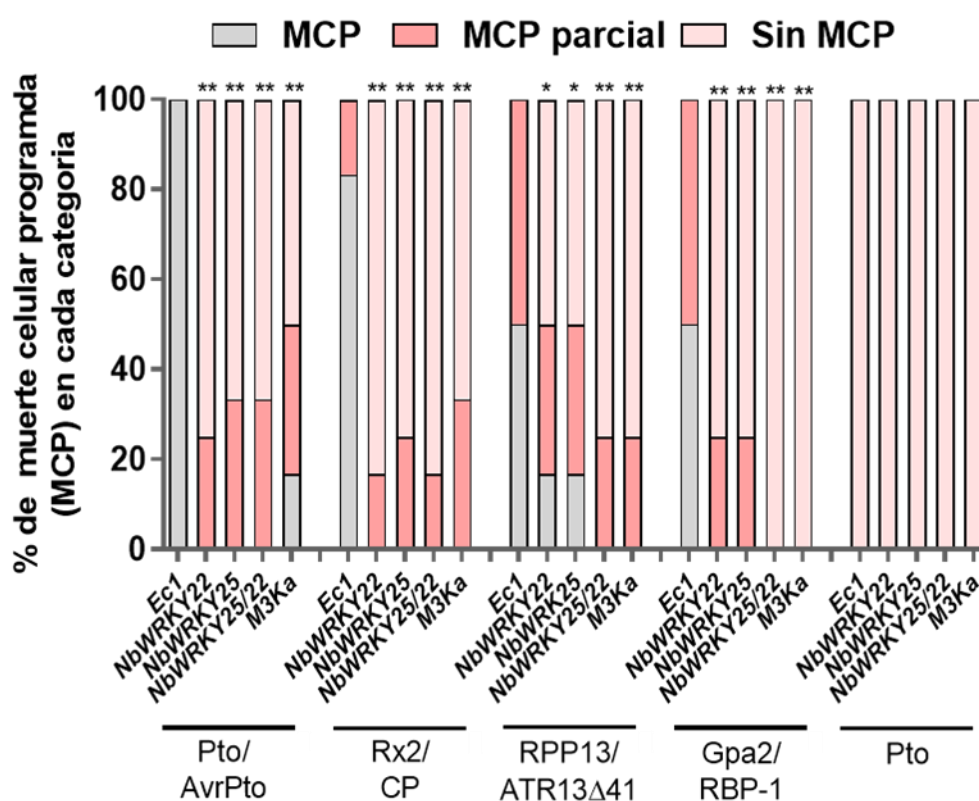


Figura 20. *NbWRKY22* y *NbWRKY25* contribuyen a la MCP asociada a elicitores no bacterianos. Plantas silenciadas de *N. benthamiana* se infiltraron con jeringa con cepas de *A. tumefaciens* que expresan las proteínas R y elicitores para el desarrollo de MCP. El porcentaje de MCP se calculó como se describe en la sección 3.2.2 usando cuatro plantas por construcción de silenciamiento. Los asteriscos dobles y simples indican diferencias significativas en comparación con las plantas silenciadas con *Ec1* utilizando la prueba exacta de Fisher (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

En este ensayo se utilizó como control positivo una construcción que denominamos *M3Kα* basada en el gen que codifica para la proteína MAP quinasa quinasa quinasa alpha ($M3K\alpha$).

Previamente, se reportó que el silenciamiento de este gen compromete la MCP activada por múltiples pares de proteínas R/elicitores (del Pozo y col., 2004).

Las plantas silenciadas con las construcciones *Ec1*, *NbWRKY22*, *NbWRKY25*, *NbWRKY22/25* y *M3Kα* se coinfiltraron, en círculos previamente marcados, con cepas de *A. tumefaciens* para la expresión de los siguientes pares de proteína R junto con su correspondiente proteína elicitora (avirulencia): a) proteína Rx2 de papa (*Solanum tuberosum*)/proteína de la cubierta del virus PVX (Bendahmane y col., 2000); b) RPP13 de *A. thaliana*/ATR13^{Emco5}-Δ41aa del oomicete *Hyalosporospora arabidopsidis* (Rentel y col., 2008) y c) Gpa2 de papa/RBP-1 del nematodo del quiste de la papa (Sacco y col., 2009). La infiltración del par Pto/AvrPto se incluyó como control positivo y la proteína Pto sola como control negativo.

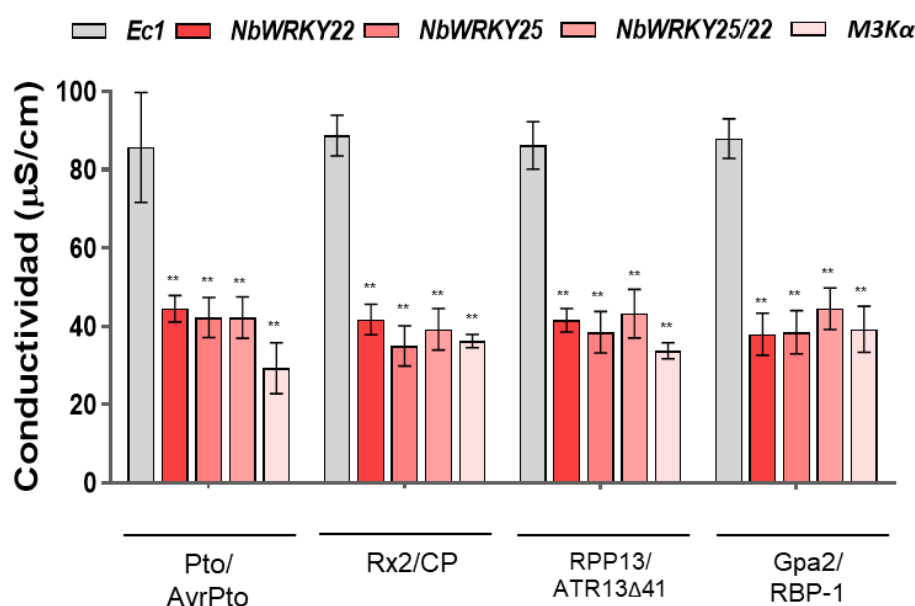


Figura 21. *NbWRKY22* y *NbWRKY25* contribuyen a la muerte celular programada (MCP) asociada a elicitores no bacterianos. Determinación de pérdida de electrolitos en plantas silenciadas con *Ec1*, *NbWRKY25*, *NbWRKY22*, *NbWRKY25/22* y *M3Kα*. Las plantas se infiltraron como se describe en la sección 3.2.6. Se tomaron muestras de discos de hoja a las 24 hpi y se estimó la pérdida de electrolitos. Las barras representan la media de cuatro plantas por construcción con su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos dobles y simples indican diferencias significativas en comparación con las plantas silenciadas con *Ec1* utilizando el método de Dunnet (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

En las condiciones en las que se desarrolló este ensayo la sobreexpresión de los distintos pares desarrolló una MCP macroscópica a los 4 dpi. La evolución de los síntomas se realizó de manera visual y se categorizó del mismo modo que para el ensayo de MCP de la sección 3.2.2 (Figura 12). Los resultados se presentan en la Figura 20 en donde se puede observar que la MCP asociada con cada uno de estos pares de proteína R/elicitor no bacteriano disminuyó significativamente en las plantas silenciadas con *NbWRKY25*, *NbWRKY22* y *NbWRKY25/22*,

al igual que en las plantas del control positivo *M3Kα*. Para el par Pto/AvrPto se observó un comportamiento similar al observado previamente (sección 3.2.2) y al del control positivo *M3Kα*. Como era de esperar la infiltración de la proteína Pto sin el correspondiente efector manifestó una ausencia total de síntomas de MCP en todas las plantas analizadas.

Para corroborar este resultado se cuantificó la pérdida de electrolitos de las células debido al desarrollo de la MCP asociada al reconocimiento de los distintos elicitors no bacterianos. Este experimento se llevó a cabo de manera similar que los mencionados anteriormente. A las 24 hpi se tomaron 5 discos de hoja de 1 cm de diámetro de las regiones infiltradas y se procesaron como se describe en la sección 2.2.9 de Materiales y Métodos. Se observó una menor conductividad asociada a la pérdida de electrolitos en las hojas de plantas silenciadas para los genes *NbWRKYs* y el control positivo *M3Kα*, en comparación con el control *Ec1*. Este resultado se manifestó con todos los pares utilizados y concuerda con lo observado para el desarrollo de MCP (Figura 21).

Estos experimentos sugieren que *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* no son factores de transcripción específicos de *Pst-N. benthamiana* debido a que poseen un rol importante en la activación de la inmunidad mediada por múltiples proteínas R que median el reconocimiento de elicitors no bacterianos.

3.2.7 *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* no se encuentran río abajo de la vía de señalización de *M3Kα*

El ensayo de epistasia realizado implica el silenciamiento y la expresión transitoria de genes que se sabe que componen la cascada río abajo del reconocimiento de *Pst* mediado por el complejo Pto/Prf (del Pozo y col., 2004). Este tipo de experimentos permite determinar la posible ubicación de los FT en estudio en esta vía de señalización. En este caso particular se evaluó si los *NbWRKYs* se encuentran río abajo, río arriba o en una vía independiente de la cascada de señalización que lleva a la activación de la respuesta ETI mediada por Pto/Prf. Previamente, se determinó que en dicha cascada está involucrada la proteína *M3Kα* la cual activa mediante fosforilación a la MAP quinasa quinasa 2 (MKK2) (Oh y col., 2010) (Figura 22).

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* salvaje silenciadas con las siguientes construcciones: *Ec1* como control no silenciado, *NbWRKY22* y *NbWRKY25*, *SIPrf*, *M3Kα* y *MKK2*. Las hojas de las plantas fueron infiltradas con jeringa en círculos marcados previamente con cepas de *A. tumefaciens* conteniendo las secuencias codificantes para *M3Kα* y la versión autoactivada de *MKK2* (*MKK2^{DD}*). Se infiltraron además dos controles negativos que consisten en cepas de *A. tumefaciens* con la secuencia codificante para *M3Kα* con su dominio quinasa mutado (*M3KαKD^r*), que no es funcional por no poseer la capacidad de fosforilar otras proteínas, y *A. tumefaciens* con la secuencia codificante de *MKK2* (*MKK2 WT*), que no se encuentra autoactivada por lo que su sobreexpresión no conduce a la MCP macroscópica. Si una o ambas proteínas *NbWRKYs* participan aguas abajo de la cascada de señalización de *M3Kα* o *MKK2*, su silenciamiento debería resultar en una reducción en el desarrollo de síntomas de MCP macroscópicos, luego de expresar transitoriamente *M3Kα* o *MKK2^{DD}*.

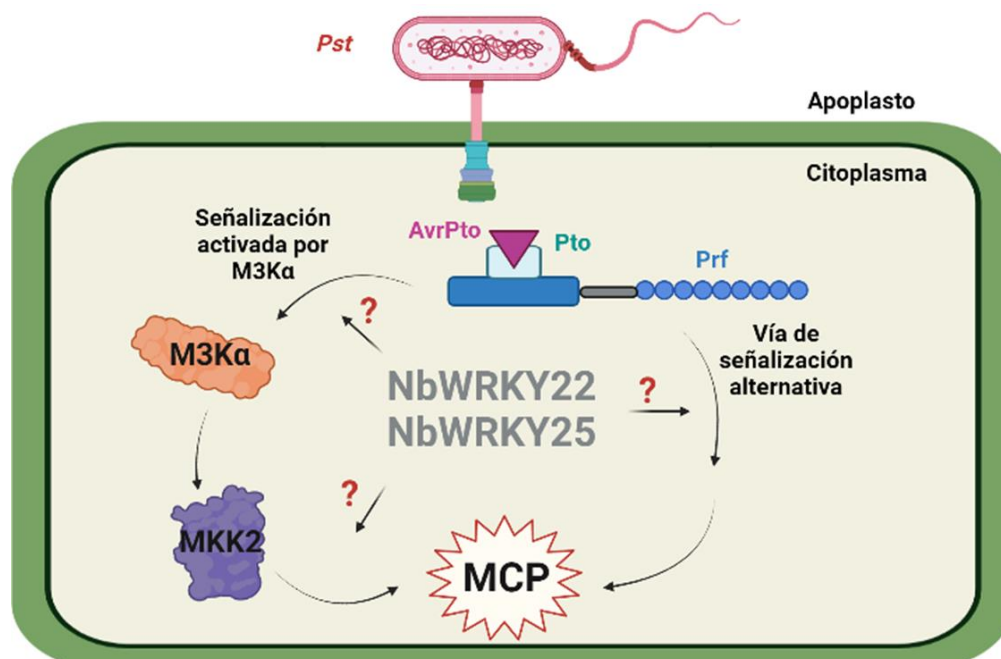


Figura 22. Esquema representativo de las vías de señalización analizadas en el ensayo de epistasia de la sección 3.2.7. *Pst*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; M3K α , mitogen-activated protein kinase kinase kinase alpha; MKK2, mitogen-activated protein kinase kinase 2; MCP, Muerte celular programada.

En las condiciones del ensayo se desarrollaron síntomas de MCP macroscópica a los 4 dpi. Las plantas fueron monitoreadas visualmente como se hizo en el ensayo de MCP de la sección 3.2.2 con la misma categorización de los círculos. Como era de esperar, la sobreexpresión de M3K α o MKK2^{DD} en plantas silenciadas con el control *Ec1* dio como resultado el desarrollo de MCP macroscópica (Figura 23). La MCP inducida por la sobreexpresión de M3K α se retrasó en las plantas silenciadas para este gen y se no se observó MCP en las plantas silenciadas para el gen que actúa corriente abajo, *MKK2*. Inesperadamente, el silenciamiento de *NbWRKY22ab* o *NbWRKY25ab* no tuvo ningún efecto sobre la MCP inducida por la sobreexpresión de M3K α o MKK2^{DD}, lo que indicaría que los NbWRKYs actúan aguas arriba de esta cascada de señalización o participan en una vía independiente (Figura 23).

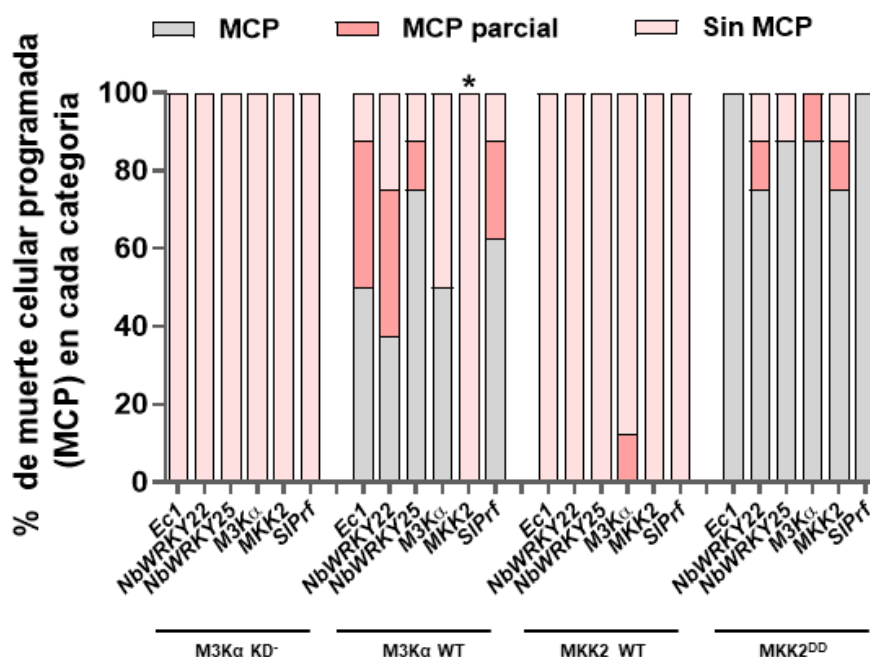


Figura 23. NbWRKY22ab y NbWRKY25ab no actúan aguas abajo de la vía de señalización de M3Kα. Hojas de plantas de *N. benthamiana* silenciadas para *Ec1*, *NbWRKY22ab*, *NbWRKY25ab*, *M3Kα*, *MKK2* o *SIPrf* se infiltraron con jeringa con *A. tumefaciens* para expresar las proteínas M3Kα WT, M3Kα KD⁻ (M3Kα con el dominio de quinasa inactivo), MKK2^{DD} o MKK2. El porcentaje de MCP se controló como se describe en la sección 3.2.2 usando cuatro plantas por construcción. El asterisco indica diferencias significativas en comparación con las plantas silenciadas con *Ec1* utilizando la prueba exacta de Fisher (* $P < 0,05$).

3.2.8 NbWRKY22ab y NbWRKY25ab participan en la activación de la respuesta PTI

3.2.8.1 SIWRKY22 y SIWRKY25 se inducen transcripcionalmente durante la PTI temprana

Previamente, se ha determinado que los principales inductores de la PTI en tomate son los PAMPs derivados de flagelina de *Pst* (flg22 y flgII-28) y que esta percepción da como resultado una extensa reprogramación transcripcional (Rosli y col., 2013). Para estudiar los genes cuya expresión se ve modificada luego de la percepción de estos PAMPs a 30 min luego del desafío, Pombo y colaboradores (2017) realizaron un ensayo de transcriptómica (RNAseq) en el que desafiaron plantas de tomate con flg22.

Indagando en estos datos, los cuales se encuentran disponibles en <http://ted.bti.cornell.edu>, se encontró que los genes *SIWRKY22* y *SIWRKY25* se inducen cuando la respuesta PTI se activa 30 min después del tratamiento con flg22 (Figura 24). Se puede observar un aumento de las RPKM (del inglés, *Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*) para ambos genes con el desafío con flg22 en comparación con el control (*mock*) (Figura 24).

En base a estos datos se realizaron una serie de experimentos que se detallarán a continuación para determinar si los genes *NbWRKYs* estarían implicados también en la respuesta PTI de *N. benthamiana*.

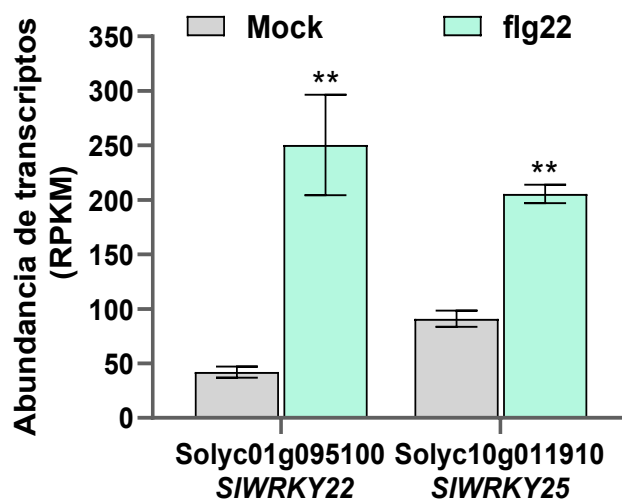
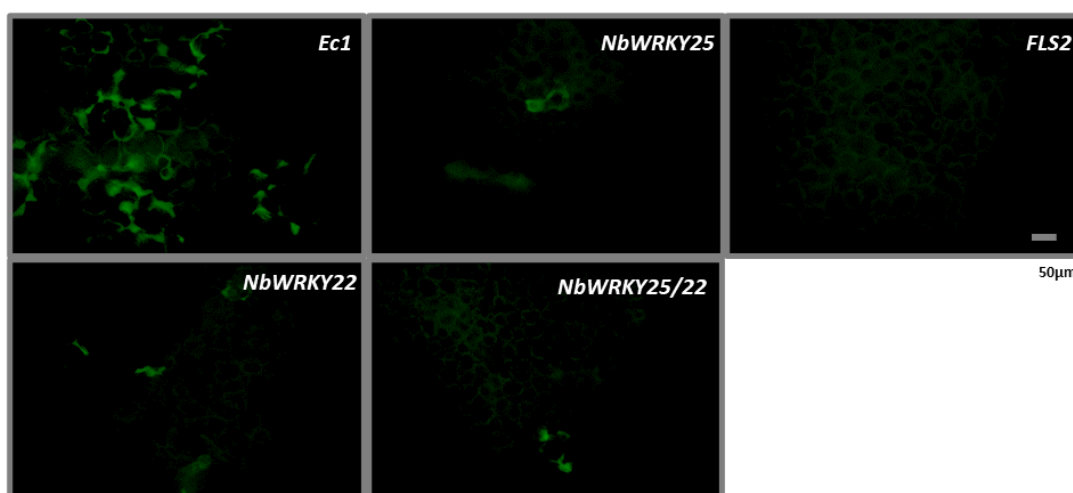


Figura 24. *SIWRKY25* y *SIWRKY22* se inducen transcripcionalmente en la PTI temprana. Expresión génica en plantas RG-*prf3* tratadas con flg22 1 μ M, 30 min después de la infiltración. Las barras representan la media de tres réplicas biológicas con su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos dobles indican diferencias significativas con valores de *P* corregidos para múltiples pruebas usando *false discovery rate* (** $P < 0,01$) (Pombo y col., 2017). *Mock*, MgCl₂ 10 mM.

3.2.8.2 El silenciamiento de *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* reduce la deposición de calosa en la pared celular en plantas de *N. benthamiana*

La deposición de calosa en la pared celular es una respuesta de las plantas a los microbios que se ha utilizado ampliamente como indicador de la funcionalidad de la respuesta PTI (Hann y col., 2007; Nguyen y col., 2010). En este tipo de ensayo se realiza una fuerte inducción de la PTI en la planta, se toman muestras de tejido que se tiñen, para luego ser observadas al microscopio de fluorescencia. Con las fotos capturadas se cuantifican los depósitos de calosa utilizando un software de análisis de imágenes. Si los genes *NbWRKYs* están implicados en la respuesta PTI de *N. benthamiana*, su silenciamiento conduciría a una reducción en los depósitos de calosa.

a



b

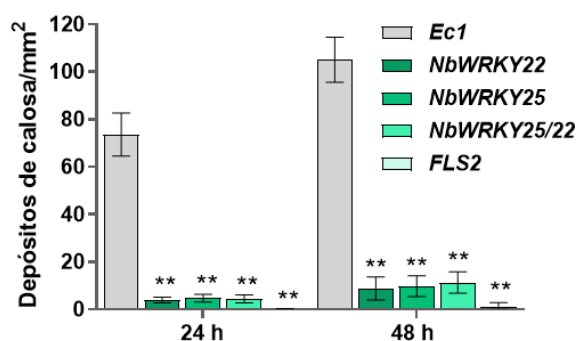


Figura 25. Las plantas silenciadas para los genes *NbWRKYs* poseen menor deposición de calosa en la pared celular. (a) Se infiltraron con jeringa hojas de *N. benthamiana* silenciadas con 1×10^8 ufc/mL de *Pseudomonas fluorescens* 55. Se tomaron muestras de tejido foliar a las 24 y 48 hpi para visualizar la deposición de calosa usando la tinción con azul de anilina. Se muestran campos representativos de depósitos de calosa para cada construcción a las 24 hpi. La barra de escala es de 50 μm y es la misma para todas las fotografías. La fluorescencia de los depósitos de calosa fue pseudocoloreada de verde. (b) Cuantificación de los depósitos. Se midió y expresó el número de depósitos de calosa (de 8,5 a 85 μm de diámetro) por mm^2 de tejido foliar. Para el análisis se usaron 80 campos por cada construcción utilizada para el silenciamiento. Los asteriscos dobles indican diferencias significativas en comparación con plantas silenciadas con *Ec1* usando el método de Dunnet (** $P < 0,01$).

Para este ensayo se utilizó como control la construcción *FLS2* que silencia el gen que codifica para el PRR que detecta flg22 (Gómez-Gómez y col., 2001). Cuatro plantas silenciadas por construcción se infiltraron con un alto inóculo de *Pseudomonas fluorescens* 55 (1×10^8 ufc/mL), una bacteria que se encuentra naturalmente en el suelo y se sabe que induce una fuerte PTI en la planta (Rosli y col., 2013). Se tomaron cuatro discos de hoja por planta a las 24 y 48 hpi y se procesaron como se detalla en la sección 2.2.8 de Materiales y Métodos. Los discos luego de la tinción se observaron por la cara adaxial en el microscopio de fluorescencia utilizando el láser y campo correspondientes. Se tomaron cinco imágenes de campos microscópicos de $0,4 \text{ mm}^2$ por disco y se cuantificaron (número de depósitos de calosa) en

campos completos. La Figura 25a presenta fotos representativas para cada uno de los casos evaluados. Puede observarse que en las plantas en las que se silenciaron los genes *NbWRKYs* y el control *FLS2* hay un muy bajo número de depósitos de calosa (Figura 25a). La cuantificación de los depósitos respaldó esta observación (Figura 25b).

Nuestros resultados muestran que la deposición de calosa en las plantas silenciadas para los *NbWRKYs* es casi 100 veces menor que la observada en el control *Ec1* y por lo tanto dan claros indicios de que los genes en estudio participan también en la activación de la respuesta PTI.

3.2.8.3 La supresión de la muerte celular se ve afectada en plantas silenciadas para los genes *NbWRKYs*

Para corroborar los resultados anteriores acerca de la participación de *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* en la PTI de *N. benthamiana*, se realizó un ensayo de supresión de la muerte celular (SMC) (Chakravarthy y col., 2010). En la Figura 26 se presenta un esquema de los pasos realizados durante este ensayo, que consiste primero en infiltrar en una región de las hojas de *N. benthamiana* previamente delimitada, un fuerte inductor de la respuesta PTI (como por ejemplo *Pseudomonas fluorescens* 55). Varias horas más tarde se realiza una inoculación de manera parcialmente superpuesta a la ya infiltrada con un patógeno que causa muerte celular como *Pst* DC3000 Δ *hopQ1-1*. Esta muerte celular es el resultado de la enfermedad causada por esta bacteria patógena. En el área superpuesta de infiltración en la que se ha inducido previamente la PTI, dicha muerte celular se ve retrasada. Por el contrario, la aparición acelerada de muerte celular en el área solapante de inoculación es indicador de una PTI no funcional.

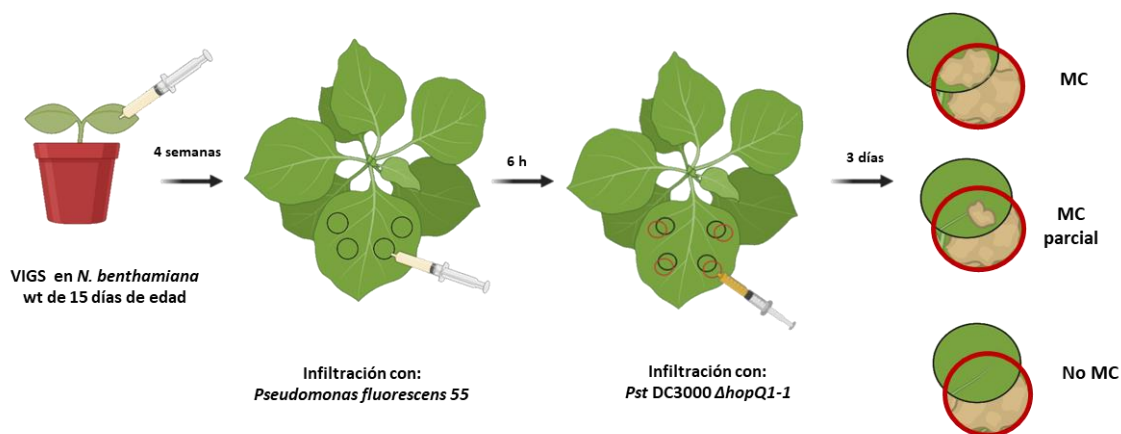


Figura 26. Esquema representativo de los pasos realizados en el ensayo de supresión de muerte celular (SMC). VIGS, virus-induced gene silencing; *Pst*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; MC, muerte celular.

Se utilizaron cuatro plantas *N. benthamiana* salvaje silenciadas con las mismas construcciones utilizadas para el ensayo de cuantificación de calosa de la sección 3.2.8.2. Se infiltraron con jeringa círculos en las hojas de las plantas silenciadas con un inóculo $DO^{600nm} = 0,5$ de

Pseudomonas fluorescens 55 (Figura 26, círculos negros). A las 6 hpi se infiltró de manera parcialmente solapante con *Pst* DC3000 $\Delta hopQ1-1$ $DO^{600nm}=0,01$ (Figura 26, círculos rojos). El desarrollo de muerte celular (MC) en el área superpuesta se monitoreó visualmente con el mismo criterio que se aplicó para los ensayos de MCP (Figura 26). En las condiciones en que se desarrolló este ensayo los síntomas de MC se observaron a los 3 dpi. Las plantas silenciadas con cualquiera de las tres construcciones *NbWRKYs* o *FLS2* desarrollaron niveles más altos de MC asociada a la enfermedad en el área superpuesta en comparación con las plantas control *Ec1* (Figura 27).

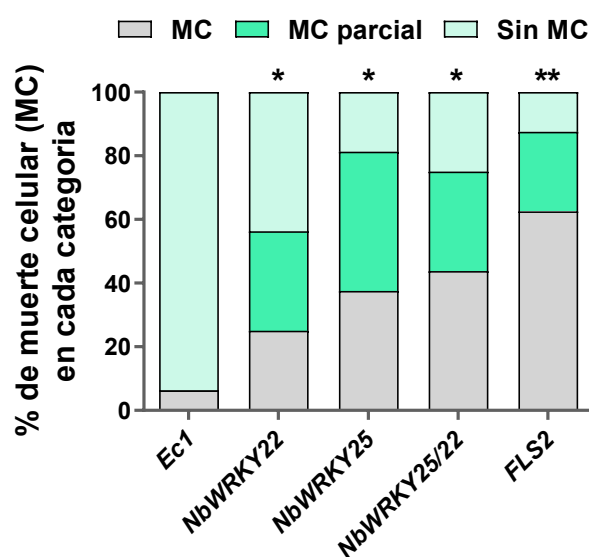


Figura 27. Ensayo de supresión de muerte celular en plantas silenciadas para los *NbWRKYs*. Las plantas silenciadas se infiltraron con jeringa con $DO^{600nm} = 0,5$ de *P. fluorescens* 55 y 6 h más tarde con $DO^{600nm} = 0,01$ de *Pst* DC3000 $\Delta hopQ1-1$ de forma superpuesta. Los síntomas de muerte celular se monitorearon en el área solapante. Los resultados mostrados corresponden a 3 dpi. Los asteriscos dobles y simples indican diferencias significativas utilizando la prueba exacta de Fisher, con *Ec1* como control (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Estos experimentos de supresión de la muerte celular junto con los de deposición de calosa en el apoplasto, indican que los *NbWRKYs* también contribuyen a la respuesta inmune PTI en *N. benthamiana*.

3.3 CONCLUSIONES

- ❖ Se generaron construcciones VIGS que permitieron silenciar de manera individual y en simultáneo los genes *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* en *N. benthamiana*. Este silenciamiento fue eficiente (80-90%) y específico.
- ❖ Los factores de transcripción NbWRKY22a/b y NbWRKY25a/b actúan como reguladores positivos de la respuesta inmune ETI mediada por dos proteínas de resistencia diferentes (el complejo Pto/Prf y Roq1).
- ❖ Ensayos de MCP realizados con otros pares de proteínas R/elicitores determinaron además que actúan como reguladores positivos de la respuesta inmune activada por elicitores no bacterianos.
- ❖ Los NbWRKYs no se encuentran aguas abajo de la vía de señalización de las MAP quinasas previamente reportadas M3K α y MKK2.
- ❖ Dos experimentos diferentes (deposición de calosa y supresión de la muerte celular) demuestran que NbWRKY22a/b y NbWRKY25a/b actúan también como reguladores positivos de la respuesta PTI en *N. benthamiana*.



4- CAPÍTULO 2:

Caracterización de la respuesta inmune de plantas de tomate *knock out* para los factores de transcripción SIWRKY22 y SIWRKY25

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 Enfermedad de la peca bacteriana y la importancia de su estudio en tomate

La enfermedad de la peca bacteriana afecta los cultivos de tomate produciendo grandes pérdidas económicas (Jones, 1991). Como se mencionó anteriormente, el agente causal es *Pst*, una bacteria gram negativa, con forma de bacilo que posee flagelo. Los primeros síntomas de la enfermedad incluyen pequeñas lesiones necróticas negras o marrones, conocidas como pecas, que pueden rodearse de halos cloróticos los cuales son causados por la toxina coronatina (Bender y col., 1987). Las lesiones, además de en las hojas, también se pueden observar en frutos maduros e inmaduros, lo que suele conducir a una disminución de la comerciabilidad de la hortaliza. Además, estas lesiones necróticas pueden expandirse en toda la planta y provocar bajas en la productividad (Jones, 1991).

Debido a que en nuestro país el tomate es la segunda hortaliza más consumida después de la papa y que el 36% de la producción en el cinturón hortícola platense corresponde a este cultivo (Dirección de Producción Agrícola, 2022), el estudio de esta enfermedad posee un gran interés agronómico local y nacional.

Además, el patosistema tomate-*Pst*, es un excelente modelo de estudio de interacciones planta-patógeno, ya que se conocen algunos mecanismos moleculares involucrados en esta interacción (Oh y Martin, 2011b). Debido a que buena parte de la respuesta inmune vegetal está altamente conservada entre distintas especies, los conocimientos generados en este patosistema pueden contribuir en el estudio de otros de interés económico.

4.1.2 Edición de genomas utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 en plantas

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas CRISPR (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*), junto con las endonucleasas Cas, forman los complejos CRISPR-Cas. Este sistema se descubrió como un mecanismo de defensa presente en bacterias y arqueas, que le provee a estos microorganismos la capacidad de defenderse específicamente frente a elementos genéticos invasores de origen viral (Barrangou y col., 2007).

En general, la inmunidad mediada por CRISPR-Cas incluye tres fases fundamentales: la adquisición o adaptación que consiste en un proceso de incorporación de secuencias de ADN extrañas (espaciadores) en la matriz CRISPR, la biogénesis del ARN CRISPR (crARN) y por último la interferencia, en la que, tras reexposición al agente invasor, se emplea un complejo Cas-crARN para degradar el material genético extraño de manera eficaz y potente. La formación de estos complejos depende de cada sistema CRISPR y están compuestos por múltiples proteínas Cas (clase 1) o una única proteína Cas (clase 2) junto con el crARN (Makarova y col., 2020).

1- Seleccionar la secuencia blanco del gen de interés:

- Uso de herramientas *online* para minimizar posibles *off-targets*
- 20 pb seguidas de la secuencia PAM.

2- Diseño del ARNg:

- ARNg se expresa usando un pequeño promotor de ARN (U6p o U3p)
- El primer nucleótido es G si se usa U6p o es A si se usa U3p

3- Clonación del ARNg en un vector de expresión que contenga Cas9

- 4- Transformación de plantas:**
- Transformación de protoplastos
 - Transformación con *A. tumefaciens*
 - Bombardeo de callos

- 5- Regeneración y selección de plantas con el gen mutado:**
- Chequeo de la mutación y de la pérdida del transgén.

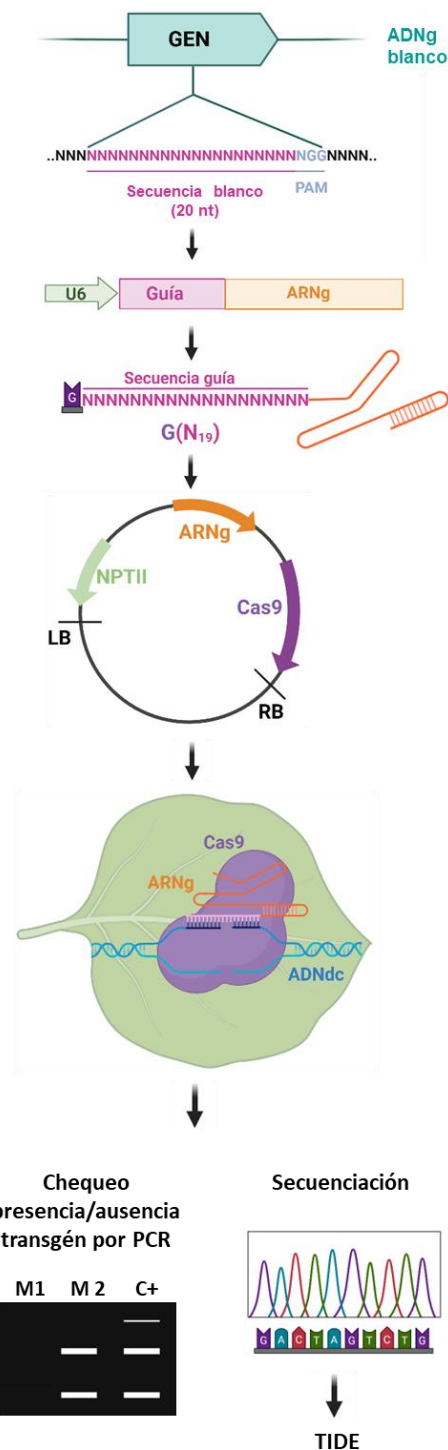


Figura 28. Representación esquemática de las etapas para generar plantas mutantes utilizando la tecnología CRISPR-Cas9. ADNg, ADN genómico; PAM, *protospacer adjacent motif*; nt, nucleótidos; ARNgs, ARN guía simple; NPTII, resistencia a kanamicina; LB, *left border*; RB, *right border*; ADNdc, ADN doble cadena; c, control; m, mutante; TIDE, *Tracking of Indels by Decomposition* <https://tide.nki.nl/>. Adaptado de Belhaj y col., 2015.

El paso de interferencia de algunos sistemas requiere el reconocimiento de un motivo PAM (del inglés, *protospacer adjacent motif*) en el genoma invasor. PAM es una secuencia corta de ADN que no está presente en el genoma del huésped bacteriano y es reconocida por algunas proteínas Cas (Gleditsch y col., 2018).

En el sistema CRISPR-Cas9 primero ocurre la adquisición de espaciadores con información genética por parte de las proteínas Cas1, 2 y 4. La biogénesis y maduración del crARN luego de la transcripción del locus involucra una RNAasa tipo III junto con Cas9 y la formación del complejo CRISPR-Cas9. Por último, ocurre la interferencia en la que, tras reexposición al agente invasor, se emplea el complejo CRISPR-Cas9 para degradar el material genético extraño. En este tipo de sistema es Cas9 la encargada de llevar a cabo el clivaje del ADN extraño (Charpentier y col., 2015; Makarova y col., 2020)

CRISPR-Cas9 ha sido el sistema más empleado en ingeniería genética para la edición de genomas. Este tipo de ediciones genéticas se basa en que el corte dirigido provocado por la endonucleasa, activa los sistemas de reparación de ADN de la planta: HDR (del inglés, *homology directed repair*) y NHEJ (del inglés, *nonhomologous end joining*). Dichos sistemas de reparación eventualmente conducen a la generación de inserciones o deleciones no deseadas dentro del genoma, lo que puede traer aparejada la ocurrencia de cambios en el marco de lectura del gen blanco, con la consecuente aparición de codones de terminación tempranos. Esta tecnología se ha aplicado con éxito en muchos organismos, incluyendo plantas modelo y de cultivo, para activar/reprimir genes, inducir mutaciones e insertar secuencias mediante recombinación homóloga (Nekrasov y col., 2013; Jiang y col., 2013b; Feng y col., 2013; Shan y col., 2013; Brooks y col., 2014). Además, debido al mecanismo de edición empleado, es posible mediante segregación en sucesivas generaciones, seleccionar los individuos que han perdido el *cassette* insertado en el genoma conteniendo el ARNg y la Cas9 (descriptos a continuación) y generar individuos con una mutación homocigota en el gen de interés, limpios de transgén.

En la Figura 28 se presenta un esquema representativo de las etapas para la generación de una línea mutante utilizando esta tecnología. Como se mencionó anteriormente, Cas9 es una endonucleasa de ADN guiada por ARN a secuencias genómicas específicas mediante el diseño de un ARN guía (ARNg). La secuencia de este ARNg debe ser complementaria a la del gen blanco que se quiere mutar y debe ser consecutiva a la secuencia PAM. Su importancia radica en que es el elemento de reconocimiento para Cas9. Una vez clonado este ARNg en un vector de expresión que posea también la secuencia codificante para la Cas9, se procede a incorporarlo en el tejido vegetal mediante transformación de explantos con *A. tumefaciens*, transformación de protoplastos o bombardeo de callos. Una vez finalizada la regeneración de la planta se debe analizar su genotipo para, por un lado, chequear la mutación generada en dicho gen y su cigosis, y por el otro, en las siguientes generaciones analizar la presencia del transgen para seleccionar aquellos individuos que lo hayan perdido.

Como sólo se debe sintetizar una secuencia corta de ARN para conferir el reconocimiento de un nuevo gen blanco, CRISPR-Cas9 es una tecnología relativamente económica y accesible de implementar que ha demostrado ser versátil. Es por ello que en este trabajo de tesis se eligió

este sistema para generar tres líneas de tomate RG-PtoR *knockout* (KO) para *SIWRKY22* y *SIWRKY25* y con ellas poder estudiar la participación de estos FT en las distintas respuestas inmunes de tomate.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Generación de plantas de tomate *knockout* para *SIWRKY22* y *SIWRKY25* utilizando la técnica CRISPR-Cas9

Como se mencionó anteriormente en el Capítulo 1, los ortólogos de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* (NbWRKYs) son reguladores positivos de la inmunidad vegetal contra patógenos bacterianos y no bacterianos en *N. benthamiana* (Ramos y col., 2021). Para estudiar en profundidad el rol que poseen estos WRKYs en la inmunidad de tomate, se generaron plantas RG-PtoR mutantes para cada uno de ellos (sección 2.2.21 de Materiales y Métodos).

La generación de estas plantas fue llevada a cabo en colaboración con el Dr. Gregory B. Martin del Boyce Thompson Institute for Plant Research (Ithaca, Nueva York, EEUU). Para ello, se diseñaron dos ARNg diferentes, *SIWRKY22*-ARNg y *SIWRKY25*-ARNg, con los que se generaron dos eventos de transformación mutantes simples homocigotas para cada factor de transcripción ($\Delta Slwrky22$ y $\Delta Slwrky25$) y uno doble mutante homocigota ($\Delta Slwrky22/25$) (sección 2.2.21 de Materiales y Métodos). Cabe aclarar que la línea $\Delta Slwrky25$ es una línea doble mutante que se generó con ambos ARNg pero que posee una delección de tres bases para el gen *SIWRKY22* que no afecta la funcionalidad de la proteína *SIWRKY22* como se detallará más adelante en este Capítulo.

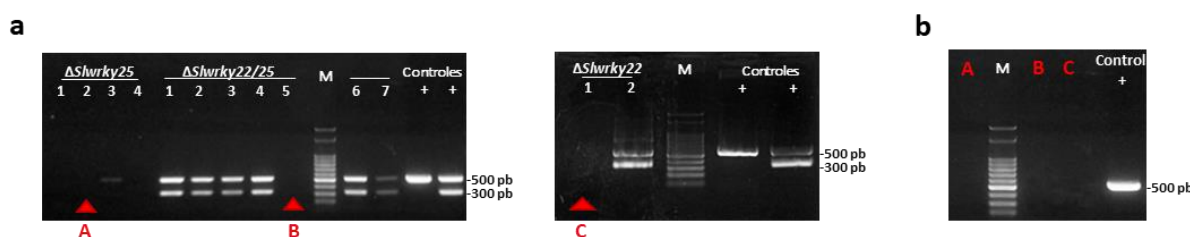


Figura 29. Genotipado de las líneas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$ y $\Delta Slwrky22/25$. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con cebadores específicos para (a) ARNg, Cas9 y (b) NPTII. Se señalan los pesos moleculares de 500 y 300 pb. Los triángulos rojos indican las plantas que perdieron el transgen y fueron seleccionadas para continuar el análisis (A, B y C). M = marcador de peso molecular de 100 pb.

Plantas de la primera (T1) y segunda generación (T2) de cada evento de transformación se utilizaron para analizar la presencia y tipo de mutación generada en cada gen, su cigosis y la correspondiente pérdida del transgén. Este último se realizó mediante PCR utilizando cebadores específicos que amplifican en tres regiones diferentes del vector: el gen de la Cas9 (amplicón de 523 pb), el gen de resistencia a kanamicina NPTII (amplicón de 586 pb) y parte de la región cercana a la inserción del ARNg (amplicón de 316 pb) (Tabla 1, sección 2.1.6 de Materiales y Métodos).

La reacción de PCR utilizando los cebadores para Cas9 y el ARNg se realizó en un mismo tubo, empleando como molde ADN genómico (ADNg) previamente extraído de cada una de las plantas. En la Figura 29a se observa que en tres de las cuatro plantas $\Delta Slwrky25$ analizadas

no se detectó amplificación de ninguno de los fragmentos (plantas Nro. 1, 2 y 4), mientras que en el caso de las doble mutantes sólo para la planta 5 no se detectó amplificación de Cas9 y ARNg. El análisis de amplificación de estos fragmentos con plantas $\Delta Slwrky22$ permitió identificar ausencia de ambas bandas en una de las dos plantas ensayadas (planta 1). Las calles indicadas con un triángulo rojo (planta 2 $\Delta Slwrky25$, planta 5 $\Delta Slwrky22/25$ y planta 1 $\Delta Slwrky22$) señalan los ADNg elegidos para analizar la pérdida del gen de resistencia utilizando sus cebadores específicos. En los tres casos no se observó amplificación asociada a la presencia del gen *NPTII* (Figura 29b), por lo que se consideró a estas plantas libres de transgén y fueron utilizadas para el posterior análisis de presencia y tipo de mutación y su cigosis.

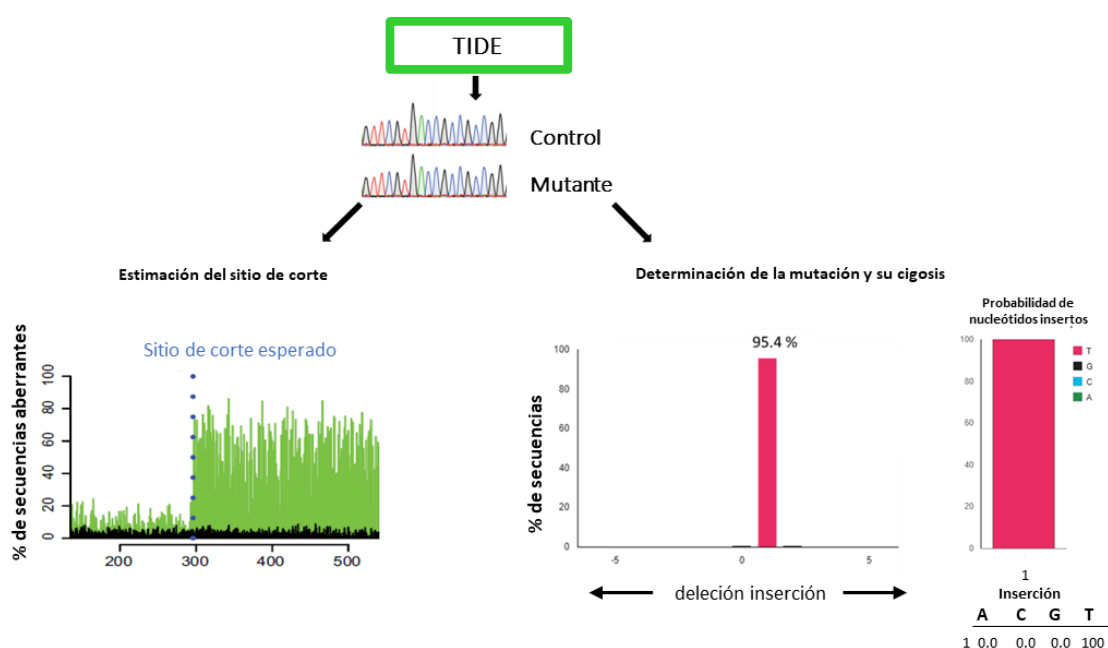


Figura 30. Esquema representativo del análisis de la edición de genomas utilizando el software TIDE (*Tracking of Indels by Decomposition*). Descripción general de un *output* ejemplo. El gráfico de la izquierda representa la estimación del sitio de corte generado por la Cas9. Los gráficos de la derecha representan la determinación de una mutación generada por una inserción +1 de una T, homocigota. Adaptado de Brinkman y col., 2014.

Utilizando como molde los ADNg de cada una de las plantas mencionadas y de una planta de tomate RG-PtoR (wt), se amplificó por PCR una región de 1 kb flanqueante al sitio de corte esperado de la Cas9, con cebadores que anillan 200 pb aguas arriba y 800 pb aguas abajo de dicho sitio (Tabla 1, sección 2.1.6 de Materiales y Métodos). Los productos de amplificación se purificaron y se secuenciaron. Los archivos .ab1 (cromatogramas) se utilizaron como *input* en el software TIDE (*Tracking of Indels by Decomposition*) (<https://tide.nki.nl/>; Brinkman y col., 2014) junto con la secuencia del ARNg utilizada. Este programa basa su análisis en la comparación de los cromatogramas de las muestras a estudiar con el cromatograma control; en este caso el de la secuencia de la planta wt.

Tabla 3. Resultados obtenidos del análisis de las mutaciones generadas en las líneas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$ y $\Delta Slwrky22/25$ de la plataforma TIDE.

Línea	Gen	INDELs	% secuencias	Homocigosis
$\Delta Slwrky22$	<i>SIWRKY22</i>	+T	96.9	Si
	<i>SIWRKY25</i>	-	-	-
$\Delta Slwrky25$	<i>SIWRKY22</i>	- 3pb	97.1	Si
	<i>SIWRKY25</i>	+G	95.4	Si
$\Delta Slwrky22/25$	<i>SIWRKY22</i>	+T	95.9	Si
	<i>SIWRKY25</i>	+G	94.0	Si

La Figura 30 muestra una representación esquemática del análisis que realiza el programa TIDE. Por un lado, se obtiene un gráfico como el del panel izquierdo, donde el programa utiliza la secuencia del ARNg para identificar el sitio de corte de la endonucleasa. Allí se grafica el porcentaje de secuencias aberrantes, es decir, las bases de la muestra que no coinciden con las del control, versus la posición en pb. Este gráfico permite verificar la calidad de las secuencias y si los alineamientos son correctos de manera que el sitio de corte coincida con el esperado y que el porcentaje de bases aberrantes aumente a partir de este sitio y se mantenga elevado río abajo del mismo. Luego, el programa mediante la decomposición de cada base (análisis del pico del cromatograma) con respecto a la secuencia wt determina la naturaleza de la mutación (delección o inserción), y el porcentaje de secuencias que tienen dicha mutación (Figura 30, panel derecho) lo que permite determinar la cigosis de la misma (homo o heterocigota). En el caso de que se trate de una inserción, también brinda información acerca de qué base sería la insertada (Figura 30, panel derecho).

En la Tabla 3 se presentan los resultados del genotipado de las líneas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$ y $\Delta Slwrky22/25$. Las plantas $\Delta Slwrky22$ y $\Delta Slwrky22/25$ poseen una inserción +T en el gen *SIWRKY22*, lo que da como resultado un cambio del marco de lectura de la secuencia, que genera un codón de terminación prematuro después del aminoácido 11 (Figura 31a). Para este gen, la línea $\Delta Slwrky25$ posee una delección de tres nucleótidos que se tratará más abajo.

Para el caso del gen *SIWRKY25*, la $\Delta Slwrky22$ no posee inserciones/delecciones (INDELs). Las plantas $\Delta Slwrky25$ y $\Delta Slwrky22/25$ tienen una inserción +G en este gen, lo que también genera un cambio del marco de lectura de la secuencia que conlleva a la aparición de un codón de terminación prematuro después del aminoácido 34 (Figura 31b).

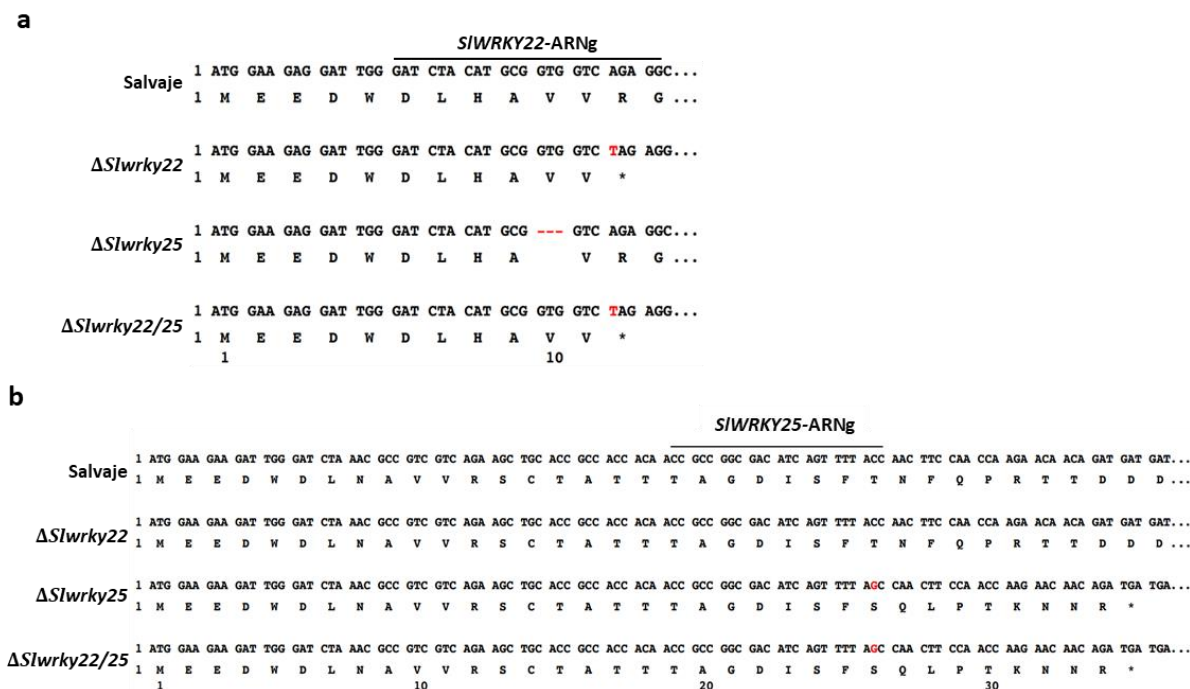


Figura 31. Esquemas que muestran las regiones donde se observaron las mutaciones en las tres líneas. Los ARNg se diseñaron para dirigirse al primer exón de cada uno de los genes. **(a)** Análisis de la región blanco en el gen *SIWRKY22*. **(b)** Análisis de la región blanco en el gen *SIWRKY25*. Las inserciones y deleciones se indican en rojo.

La mencionada deleción de tres bases que se observa en la línea Δ Slwrky25 entre las posiciones +28 y +30, en la secuencia del gen *SIWRKY22*, sólo provoca la eliminación de un aminoácido (valina) en una región fuera del dominio funcional WRKY (ubicado en la posición 517 a 687 de la secuencia de nucleótidos). Por esta razón, consideramos estas plantas como simples mutantes para el gen *SIWRKY25*. Posteriormente, se realizaron análisis de funcionalidad de *SIWRKY22* con la deleción de 3 pb (*SIWRKY22(-3pb)*), que nos confirmaron que estas plantas podrían considerarse mutantes Δ Slwrky25. Los mencionados experimentos se detallan en el Capítulo 3.

Con las plantas seleccionadas se generaron frutos y se obtuvo un buen número de semillas de cada evento de transformación para realizar los ensayos que se detallarán en este capítulo. Cabe destacar que el crecimiento, desarrollo y la morfología general de las plantas Δ Slwrky22, Δ Slwrky25 y Δ Slwrky22/25 utilizadas para los siguientes experimentos no mostraron diferencias con respecto a las plantas wt RG-PtoR (Figura 32).



Figura 32. Las plantas de tomate KO para los *SIWRKYs* no mostraron diferencias de crecimiento, desarrollo y la morfología general con respecto a las wt. Fotografía de plantas de cuatro semanas de edad de todas las líneas CRISPR/Cas9.

4.2.2 Determinación de la especificidad de *SIWRKY22*-ARNg y *SIWRKY25*-ARNg

Para evaluar si los ARNg diseñados para la generación de las plantas mutantes podían dirigirse a otras regiones genómicas y modificarlas, se realizó un análisis utilizando la herramienta CRISPR-P 2.0 (Yang y col., 2014). Esta herramienta analiza, contemplando la secuencia del ARNg, posibles sitios *off-target* en el genoma correspondiente. La misma se basa en el trabajo de Doench y colaboradores (2016) quienes desarrollaron una puntuación de determinación de frecuencia de corte para predecir sitios *off-target* denominada “*off-score*”, de manera que un valor más alto implica mayor probabilidad de edición.

Seleccionando el genoma para tomate (versión SL3.0), la herramienta determinó tres posibles sitios *off-target* para *SIWRKY22*-ARNg (Tabla 4), uno de los cuales es *SIWRKY25* (Solyc10g011910). Este último no fue considerado ya que, mediante la secuenciación para el genotipado, anteriormente ya se había corroborado que *SIWRKY25* no está editado en las plantas $\Delta Slwrky22$ (Tabla 3, Figura 31). En el caso de *SIWRKY25*-ARNg, la herramienta predijo cinco sitios *off-target* con un *off-score* > 0,000 (Tabla 4). De los ocho posibles sitios *off-target* encontrados en total, cuatro se ubican en regiones intergénicas, dos en intrones de otros genes (Solyc05g009240, Solyc02g022830) y otros dos en la región codificante de los genes Solyc10g011910 y Solyc08g068470.

Para evaluar si alguno de estos sitios fue modificado en las líneas generadas se diseñaron cebadores específicos flanqueando estos sitios y se amplificaron por PCR a partir de ADNg de plantas wt y mutantes como se describe en la sección 2.2.22 de Materiales y Métodos. En todos los casos pudo observarse el producto de PCR de tamaño esperado, excepto para la región codificante correspondiente a Solyc08g068470 (*off-target* de *SIWRKY25*-ARNg), a pesar de haber diseñado dos pares de cebadores distintos y probado diferentes condiciones de ciclado. Los productos de PCR se secuenciaron para analizarlos utilizando el programa TIDE. El análisis arrojó como resultado que ninguno de ellos posee modificaciones en su secuencia

(Tabla 4), sugiriendo que existe una alta probabilidad de que los fenotipos que se describirán a lo largo de este Capítulo se deben a la mutación de los factores de transcripción SIWRKY22 y SIWRKY25.

Tabla 4. Análisis por secuenciación de los sitios *off-target* predichos por CRISPR-P 2.0.

ARNg	Secuencia <i>off-target</i>	Off-score	MMs	Locus	Gen	Región	Mut. en $\Delta Slwrky22?$	Mut. en $\Delta Slwrky25?$	Mut. en $\Delta Slwrky22/25?$
SIWRKY22-ARNg	CATCAACAAGTGGTGGTCAAGAAG	0,026	4	SL3.0ch11:-14405510	-	Intergénica	ND	-	ND
	GATCTAAACGCCGTCGTCAGAAG	0,026	4	SL3.0ch10:-4176463	Solyc10g011910 (SIWRKY25)	CDS	ND	-	ND
	TATCTGCATGCTGTGTTCAAGAAG	0	4	SL3.0ch05:-3384019	Solyc05g009240	Intrón	ND	-	ND
SIWRKY25-ARNg	GGTAAACTGATCTACCGGCGG	0,421	2	SL3.0ch11:-45582332	-	Intergénica	-	ND	ND
	GGTAAAAATGGTGC CGCCGG	0,112	4	SL3.0ch06:-43486764	-	Intergénica	-	ND	ND
	TGTAAAAATGATGTCGCGCAGG	0,037	4	SL3.0ch10:-21401033	-	Intergénica	-	ND	ND
	GGTAAACTACTGTGGCAGGAGG	0,01	4	SL3.0ch02:+24613435	Solyc02g022830	Intron	-	ND	ND
	GGTAAAAATTATGTCGCGGTGG	0,006	4	SL3.0ch08:-57692856	Solyc08g068470	CDS	-	no PCR	no PCR

Mut., mutación; ND, No detectado; no PCR, no se pudo amplificar por PCR; MMs, *mismatches*; CDS, *coding sequence*

4.2.3 Las plantas mutantes para SIWRKY22 y SIWRKY25 tienen afectada la respuesta ETI mediada por Pto/Prf

Para comenzar a evaluar la participación de los genes *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en la inmunidad de tomate, estudiamos si estos FT son necesarios para la activación de la ETI mediada por las proteínas Pto y Prf. Para ello se infiltraron plantas wt y mutantes con la cepa *Pst* DC3000 $\Delta fliC$. Esta bacteria tiene delecionado el gen *FliC* que codifica para la flagelina y en consecuencia no posee los PAMPs flg22 y flgII-28. El desafío de las plantas de tomate RG-PtoR con dicha cepa no desencadena una fuerte activación de la PTI, pudiéndose evaluar casi exclusivamente la respuesta ETI. De esta manera, en caso de que los FT en estudio estén involucrados en la activación de la ETI, se espera cuantificar un mayor título de bacterias en las plantas mutantes en comparación con wt. Para este tipo de ensayos se utilizaron como control positivo plantas de tomate RG-*prf3*, que plantas poseen una delección de 1 Kb en el gen que codifica para la proteína Prf y en consecuencia no pueden desencadenar la activación de la respuesta ETI, por el reconocimiento de AvrPto y AvrPtoB.

Se infiltraron plantas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$, $\Delta Slwrky22/25$, RG-*prf3* y wt de 4 semanas de edad con un inóculo 5×10^4 ufc/mL de *Pst* DC3000 $\Delta fliC$. A las 48 hpi se tomaron 3 discos de hoja de la zona infiltrada y se procesaron como se describe en la sección 2.2.6 de Materiales y Métodos. Sorprendentemente, no se observaron diferencias significativas entre las líneas KO con respecto al wt y sólo en las plantas RG-*prf3* se contabilizó un mayor número de bacterias con respecto al resto de las líneas (Figura 33). Este ensayo se repitió cinco veces probando distintas concentraciones de inóculo obteniendo en todos los casos resultados similares.

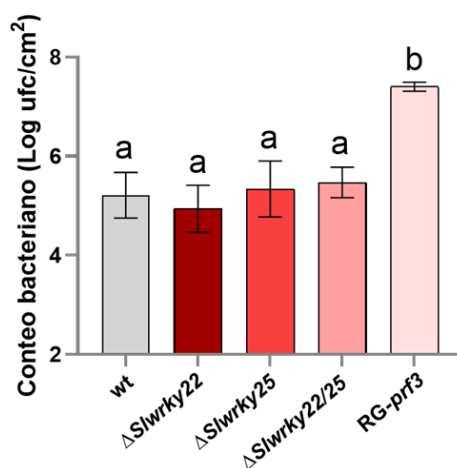


Figura 33. Las plantas $\Delta Slwrkys$ no ven afectada su respuesta ETI asociada al desafío con *Pst* DC3000 $\Delta fliC$. Se infiltraron con jeringa plantas $\Delta Slwrkys$, RG-*prf3* y wt de cuatro semanas de edad con 1×10^4 ufc/mL de *Pst* DC3000 $\Delta fliC$. El recuento bacteriano se realizó el día 2 después de la infiltración. Las barras representan las medias de cinco réplicas biológicas \pm DE (desviación estándar). Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en *one-way* ANOVA seguido de *Tukey's Honest Significant Difference post hoc test* ($P < 0,05$).

Debido a que recientemente se publicaron varios trabajos donde se demuestra que es necesaria una PTI completamente funcional para que la ETI se active correctamente y viceversa (Ngou y col., 2021; Pruitt y col., 2021; Tian y col., 2021; Yuan y col., 2021), se decidió desafiar las mismas plantas con la cepa salvaje *Pst* DC3000 la cual desencadena ambas respuestas inmunes en las plantas de tomate RG-PtoR. El ensayo se realizó del mismo modo que el mencionado anteriormente. Con este desafío, se observó un mayor título bacteriano en las líneas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$, $\Delta Slwrky22/25$ con respecto a las plantas wt y este crecimiento bacteriano fue aún mayor en las plantas RG-*prf3* (Figura 34a).

Debido a que desafiando con *Pst* DC3000 se inducen la PTI y la ETI, también se realizó un ensayo de pérdida de electrolitos como se mencionó previamente (secciones 3.2.4 y 3.2.5 del Capítulo 1) para cuantificar la muerte celular programada como consecuencia de la activación de la respuesta ETI mediante el desafío con un inóculo 1×10^5 ufc/mL de *Pst* DC3000. En la Figura 34b puede observarse un marcado descenso de la conductividad en las tres líneas KO con respecto a las plantas wt (24 hpi). Como era de esperarse, una disminución aún mayor se cuantificó en las plantas RG-*prf3*.

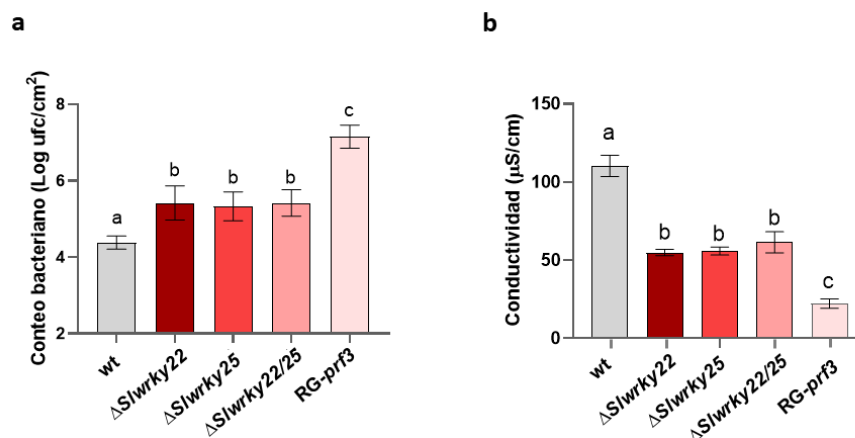


Figura 34. Las plantas KO para los *SIWRKYs* tienen afectada la ETI mediada por Pto/Prf. Plantas simples y doble mutantes, de tipo salvaje (wt) y *RG-prf3* de cuatro semanas de edad se infiltraron con jeringa con 1×10^5 ufc/mL *Pst* DC3000. **(a)** El recuento bacteriano se realizó 2 dpi. Las barras representan la media de cuatro réplicas biológicas \pm desviación estándar (DE). **(b)** Pérdida de electrolitos como medida cuantitativa de muerte celular programada (MCP). Los datos representan la media de cuatro plantas por línea con su correspondiente DE. En ambos gráficos letras diferentes indican diferencias significativas basadas en *one-way* ANOVA seguido de *Tukey's Honest Significant Difference post hoc test* ($P < 0,05$). Los experimentos se realizaron cuatro veces con resultados similares.

Estos resultados en conjunto indican que tanto *SIWRKY22* como *SIWRKY25* contribuyen a la activación de la ETI asociada a Pto/Prf en tomate, confirmando los resultados observados en *N. benthamiana*. Cabe destacar que la participación de estos FT en esta respuesta inmune no puede dissociarse de la PTI.

4.2.4 Las plantas de tomate simples y doble mutantes para los *SIWRKYs* tienen una inmunidad PTI comprometida

4.2.4.1 Determinación de la deposición de calosa en la pared celular de las plantas de tomate KO para *SIWRKY22* y *SIWRKY25*

Teniendo en mente los resultados observados en la sección 3.2.8 del Capítulo 1, mediante los cuales se corroboró la participación de los genes ortólogos a los *SIWRKYs*, *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab*, en la respuesta PTI en *N. benthamiana*, se procedió a analizar su posible participación en la PTI de tomate. Del mismo modo en el que se realizó este análisis en *N. benthamiana* se cuantificaron los depósitos de calosa en la pared celular como medida indicativa de una PTI funcional.

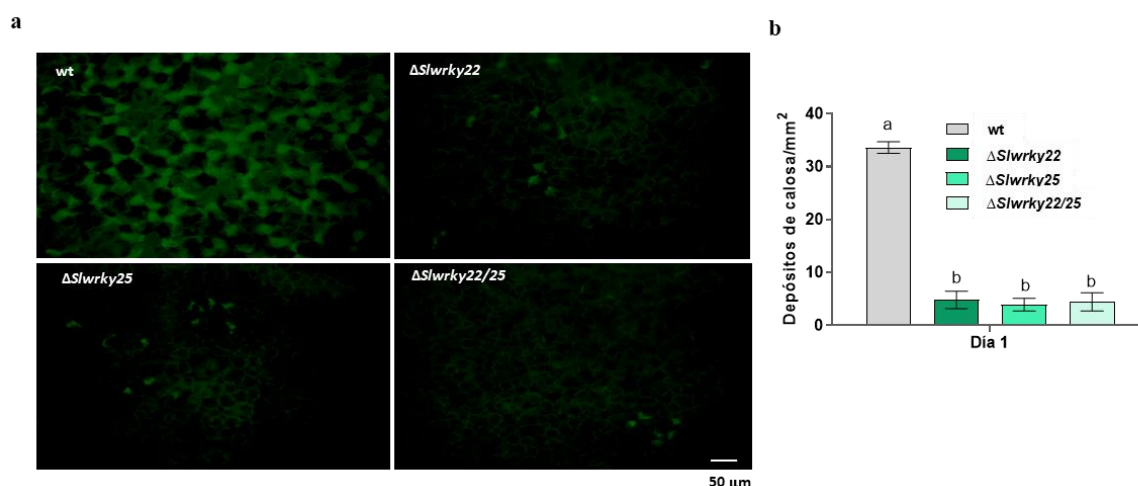


Figura 35. Las plantas de tomate KO para los *SIWRKYs* acumulan menos depósitos de calosa que las plantas salvajes (wt). Se infiltraron con jeringa hojas de plantas de tomate KO y wt con 1×10^8 ufc/mL de *Pseudomonas fluorescens* 55. Luego, se tomaron muestras de tejido a las 24 h para visualizar los depósitos de calosa usando la tinción con azul de anilina. **(a)** Imágenes representativas de los depósitos de calosa para cada línea. La barra de escala representa 50 μm y se aplica a todas las fotografías. La fluorescencia de los depósitos de calosa se pseudocoloreó verde. **(b)** Cuantificación de los depósitos de calosa con diámetro entre 8,5 y 85 μm , expresada como número de depósitos por mm^2 de tejido foliar. Para el análisis se usaron 30 campos de microscopio de cuatro plantas por línea. Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en *one-way* ANOVA seguido de *Tukey's Honest Significant Difference post hoc test* ($P < 0,05$). El experimento se realizó dos veces con resultados similares.

Puede observarse en las imágenes representativas una mayor deposición de calosa en las plantas wt en comparación con las líneas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$, $\Delta Slwrky22/25$ (Figura 35a). La cuantificación de los depósitos respalda esta observación (Figura 35b). En este caso las plantas KO tuvieron 0-7 depósitos por mm^2 , mientras que en las plantas wt se cuantificaron más de 30 depósitos por mm^2 .

Este resultado sugiere que tanto *SIWRKY22* como *SIWRKY25* participan de la activación de la respuesta PTI de tomate y que, además, no parecen ser redundantes funcionalmente, considerando que en todos los ensayos realizados su mutación tanto por separado como en conjunto da resultados similares.

4.2.4.2 Recuento bacteriano en plantas KO para los genes *SIWRKYs* desafiadas con *Pst* DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$

Con el fin de indagar más acerca de la posible participación de los *SIWRKYs* en la respuesta PTI de tomate se desafiaron las líneas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$, $\Delta Slwrky22/25$ junto con plantas wt con *Pst* DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$. Esta cepa posee mutados los genes que codifican para los efectores que son reconocidos por el complejo Pto/Prf, AvrPto y AvrPtoB, por lo cual su desafío no conduce a la activación de la ETI. En este caso las plantas sólo disponen de la PTI para defenderse, lo que permite indagar si *SIWRKY22* y/o *SIWRKY25* participan de dicha respuesta.

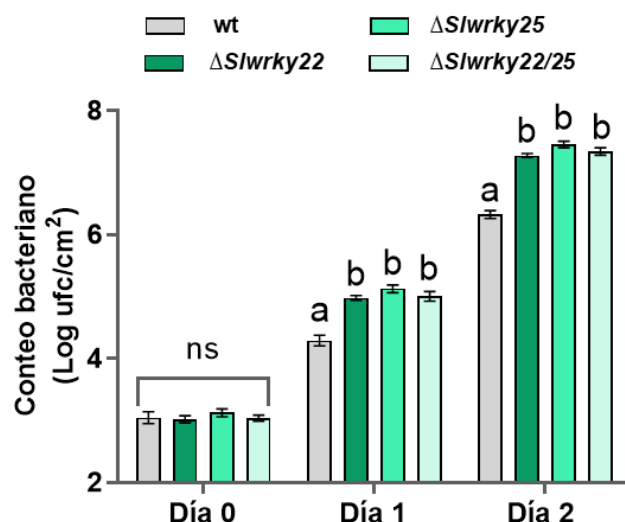


Figura 36. SIWRKY22 y SIWRKY25 están involucrados en la respuesta PTI apoplástica. Plantas KO y salvajes de la misma edad se infiltraron con jeringa con 1×10^4 ufc/mL *Pst* DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$. Las barras representan las medias de cuatro réplicas biológicas \pm su desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en *one-way* ANOVA seguido de *Tukey's Honest Significant Difference post hoc test* ($P < 0,05$). El experimento se llevó a cabo tres veces con resultados similares.

Se utilizaron plantas de cuatro semanas de edad de las líneas mencionadas y se infiltraron con jeringa en su tercera y cuarta hoja con un inóculo 5×10^4 ufc/mL de la cepa doble mutante. De las áreas infiltradas se tomaron discos de hoja a los 0, 1 y 2 dpi. En el recuento del día 0 (2 hpi) no se observaron diferencias significativas entre ninguna de las líneas como era de esperarse debido a que todas se infiltraron del mismo modo y con la misma cantidad de inóculo inicial (Figura 36). Sin embargo, para los 1 y 2 dpi se observó un recuento mayor en las plantas KO para los *SIWRKYs* con respecto a las plantas wt, lo que sugiere que *SIWRKY22* y *SIWRKY25* están involucrados en la activación de la respuesta PTI en tomate.

4.2.5 Las plantas mutantes tienen afectada la inmunidad estomática

4.2.5.1 Recuento de bacterias *Pst* DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$ en las plantas KO para *SIWRKY22* y *SIWRKY25* infiltradas por inmersión

Debido a que los estomas son una importante vía de entrada para patógenos bacterianos, las plantas han desarrollado mecanismos moleculares para regular su apertura como parte de su respuesta a la invasión. Algunos de estos mecanismos moleculares están mediados por el receptor FLS2 (Melotto y col., 2006; Zeng y He, 2010).

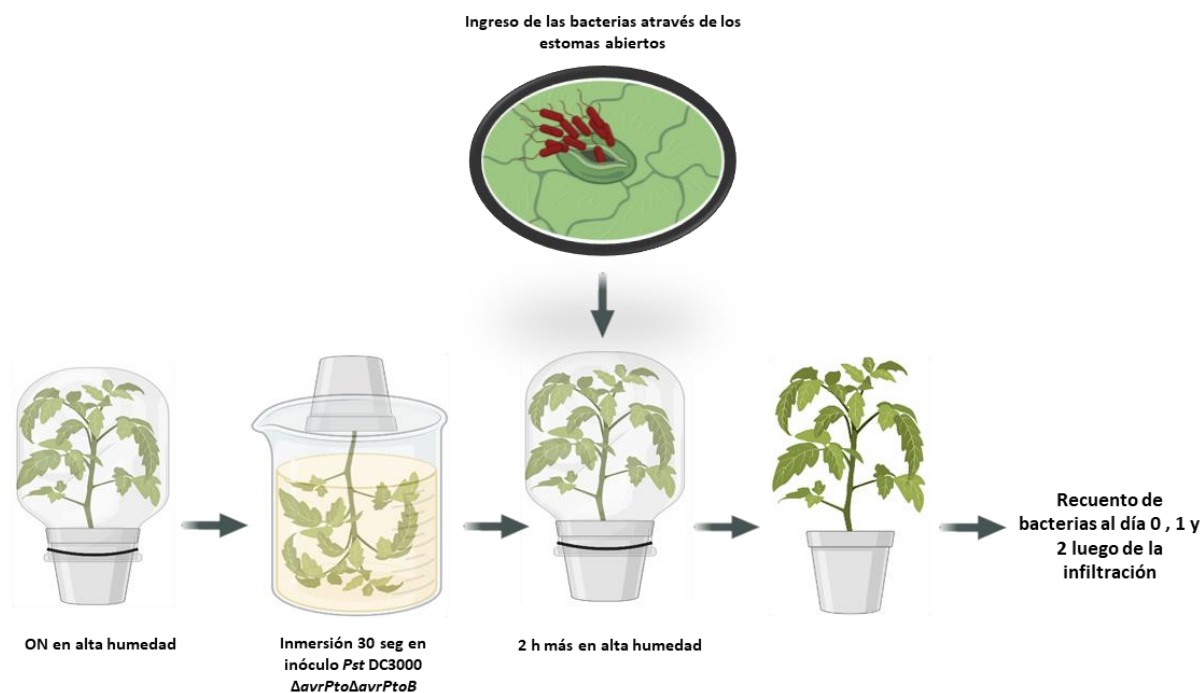


Figura 37. Representación esquemática de la infiltración de las plantas con *Pst* DC3000 Δ avrPto Δ avrPtoB por inmersión. Para favorecer la entrada del patógeno, las plantas son mantenidas en condiciones de alta humedad antes y después del desafío. ON, *overnight*.

Para indagar si alguno de los *SIWRKYs* en estudio participa de la respuesta PTI asociada a la inmunidad estomática las plantas se infiltraron por inmersión con *Pst* DC3000 Δ avrPto Δ avrPtoB. Este método de inoculación requiere que el patógeno ingrese al apoplasto a través de los estomas. Para mantener la mayor cantidad de estomas abiertos y favorecer dicho ingreso del patógeno, las plantas se conservan en condiciones de alta humedad antes y después de la inmersión (Figura 37). Se utilizaron cuatro plantas de tres semanas de edad por línea, que se sumergieron durante 30 seg en una suspensión que contenía 1×10^5 ufc/mL *Pst* DC3000 Δ avrPto Δ avrPtoB. Las bolsas plásticas se mantuvieron por 2 h más y luego se retiraron. Se tomaron discos de hoja a los 0, 1 y 2 dpi para realizar recuento bacteriano como se mencionó anteriormente. La toma de muestras del día 0 se realizó 2 h luego de haberse retirado las bolsas que cubrían las plantas.

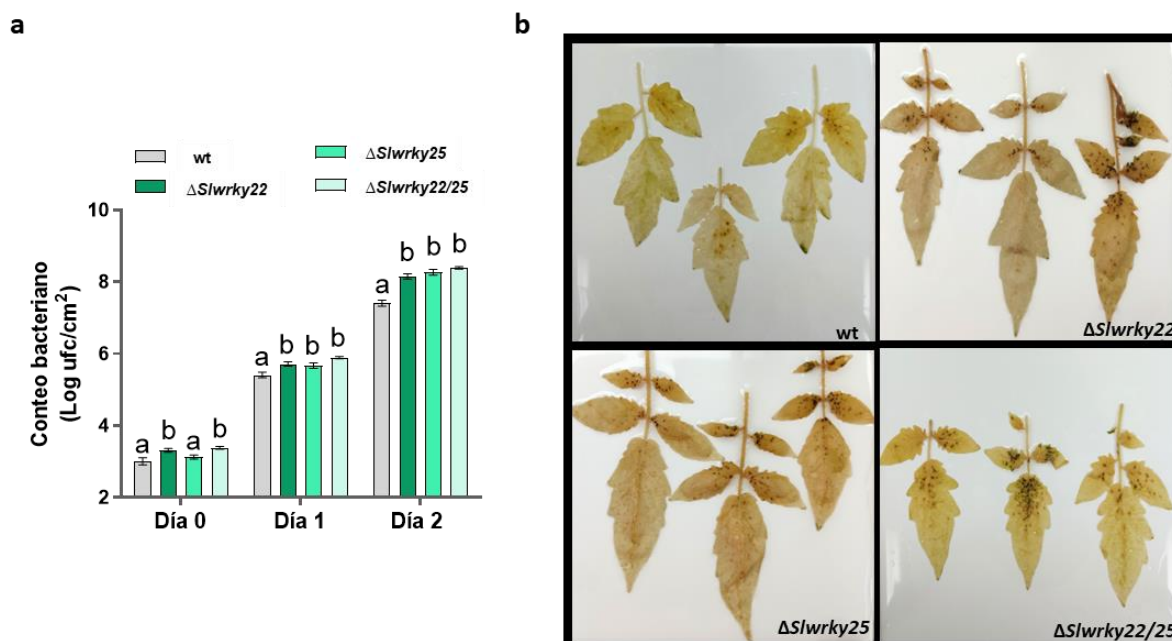


Figura 38. SIWRKY22 y SIWRKY25 participan en la PTI superficial y apoplástica. (a) Plantas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$, $\Delta Slwrky22/25$ y salvajes (wt) de tres semanas de edad se infiltraron por inmersión con 1×10^5 ufc/mL de *Pst* DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$. La cuantificación bacteriana se realizó 0, 1 y 2 dpi. Se utilizaron cuatro plantas para cada genotipo por experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas basadas en *one-way* ANOVA seguido de *Tukey's Honest Significant Difference post hoc test* ($P < 0,05$). El experimento se realizó cuatro veces con resultados similares. **(b)** Fotografías de los síntomas de la enfermedad tomadas 3 dpi por inmersión. Las hojas se decoloraron en etanol 96% v/v para resaltar la presencia de las pecas bacterianas.

Es de destacar que a tiempo 0, el título bacteriano fue significativamente mayor en las mutantes $\Delta Slwrky22$ y $\Delta Slwrky22/25$ (cuando *SIWRKY22* está editado) con respecto a las plantas wt (Figura 38a), lo que sugiere que, en ausencia de este FT, *Pst* puede ingresar más fácilmente en el apoplasto. Aunque el conteo bacteriano fue levemente mayor en las plantas $\Delta Slwrky25$ en comparación con el de las wt, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los experimentos realizados. A los días 1 y 2 después de la infiltración, el recuento de bacterias fue mayor en todas las líneas mutantes, incluido $\Delta Slwrky25$, en comparación con las plantas wt (Figura 38a). Este mayor recuento coincide con los síntomas de enfermedad observados 3 dpi, que fueron más marcados en las plantas simples y doble mutantes para los *SIWRKYs* (Figura 38b).

4.2.5.2 Medida de la conductancia estomática y del número de estomas en las plantas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$ y $\Delta Slwrky22/25$

En las plantas, la conductancia de la hoja es un indicador de la actividad de los estomas porque es una medida del grado de apertura de los mismos. Habiendo observado un mayor recuento bacteriano a tiempo 0 en los ensayos de infiltración por inmersión, en las líneas mutantes $\Delta Slwrky22$ y $\Delta Slwrky22/25$ (Figura 38a), se cuantificó la conductancia estomática para evaluar si *SIWRKY22* y/o *SIWRKY25* participan en la modulación de la apertura/cierre estomático.

A cuatro plantas por línea se les midió la conductancia estomática a las 2 pm (8 h después de que se encendieron las luces de la cámara), en el lado abaxial y adaxial de dos folíolos de la tercera hoja. Se observaron niveles más altos de conductancia en la epidermis abaxial de las plantas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$ y $\Delta Slwrky22/25$ en comparación con las plantas wt, mientras que no se pudo detectar ninguna diferencia en la superficie adaxial de la hoja (Figura 39a).

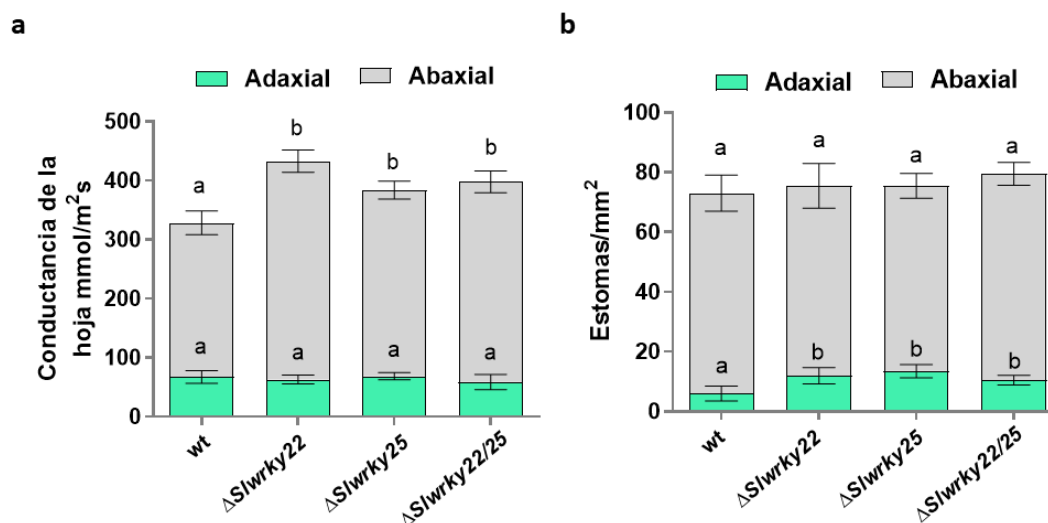


Figura 39. Las líneas de tomate KO están comprometidas en la inmunidad estomática. (a) Se midió la conductancia estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el lado abaxial y adaxial de los folíolos de la tercera hoja de tomates wt y mutantes. Los datos corresponden al promedio de tres folíolos de al menos cuatro réplicas biológicas por línea. Esta medida se repitió tres veces con diferentes tandas de plantas, obteniendo resultados similares. (b) Recuento de estomas de plantas de tomate wt, simples y dobles mutantes. Se tomaron fotografías de improntas de la epidermis foliar adaxial y abaxial utilizando un microscopio de epifluorescencia. Las células epidérmicas y los estomas totales (abiertos y cerrados) se contaron manualmente. Los datos se presentaron como el número de estomas por superficie foliar (mm^2). Se analizaron cinco fotografías por réplica biológica. Las barras representan la media de cuatro réplicas biológicas con su correspondiente DE. Para ambos gráficos, letras diferentes indican diferencias significativas basadas en *one-way* ANOVA seguido de *Tukey's Honest Significant Difference post hoc test* ($P < 0,05$).

Una explicación de estos resultados podría ser que las líneas $\Delta Slwrky$ tienen una mayor proporción de estomas abiertos o alternativamente, más estomas por unidad de superficie que las plantas wt. Para probar esta última posibilidad, se cuantificó el número de estomas en ambos tejidos epidérmicos. El recuento se calculó como el número de estomas por superficie de hoja (mm^2). No se observaron diferencias entre las plantas wt y mutantes en la epidermis abaxial (Figura 39b). Sin embargo, en la cara adaxial de las líneas mutantes se observó un mayor número de estomas por unidad de superficie, en comparación con las plantas wt. La cuantificación de estomas en la cara adaxial fue mucho menor (hasta 15) comparado con la superficie inferior (entre 60 y 80) (Figura 39b).

4.2.5.3 Determinación de la apertura estomática en condiciones basales, oscuridad y ante la infección

Debido a que el número de estomas en la cara adaxial fue mucho menor en comparación con el del tejido abaxial (Figura 39b) y que se observaron pequeñas diferencias en el número de estomas sólo en la epidermis adaxial, pensamos que tal vez la diferencia en la conductancia entre mutantes y wt (Figura 39a), estuviera dada por un distinto grado de apertura estomática.

Se determinó la apertura estomática en condiciones basales (8 h después de que se encendieron las luces en la cámara de cultivo) y en condiciones de oscuridad (5 h oscuridad: 9 am se expusieron a oscuridad y la medida se realizó 2 pm). Esta determinación, se hizo en la cara abaxial, como se detalla en la sección 2.2.24 de Materiales y Métodos.

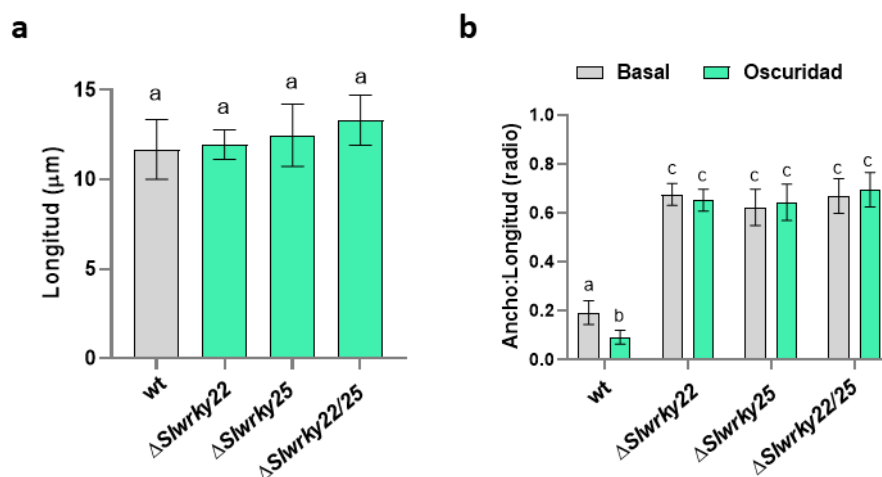


Figura 40. Apertura estomática en hojas de tomate wt y $\Delta Slwrky$. (a) Longitud del ostiolo de estomas en plantas mutantes y salvaje de tomate. (b) Apertura estomática de la cara abaxial en plantas mantenidas en condiciones de luz (basal) o en oscuridad. Los datos se expresan como la relación entre el ancho y el largo del ostiolo de los estomas. En todos los experimentos se midieron 60 estomas de 4 réplicas biológicas por línea analizada. Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en *one-way* ANOVA seguido de *Tukey's Honest Significant Difference post hoc test* ($P < 0,05$).

La apertura de los estomas se informó como la relación entre el ancho y largo del ostiolo. Mediante la determinación del largo de los ostíolos de los estomas y la confirmación de que no hay diferencias entre plantas mutantes y wt (Figura 40a), corroboramos que el uso de la relación ancho:largo estomático es válido para estimar la apertura de los estomas, en nuestro sistema de estudio. En condiciones basales las plantas $\Delta Slwrkys$ exhibieron una mayor apertura estomática, que fue casi tres veces mayor que en las plantas wt (Figura 40b, barras grises), lo que concuerda con lo observado en las medidas de conductancia en la cara abaxial de las hojas (Figura 39a). Los estomas de las plantas mutantes no respondieron al estímulo de oscuridad a través de una reducción de la relación ancho:largo, mientras que las plantas wt mostraron el cierre esperado (Figura 40b, barras verdes). En la Figura 41 se muestran imágenes representativas de todas las líneas en condiciones basales.

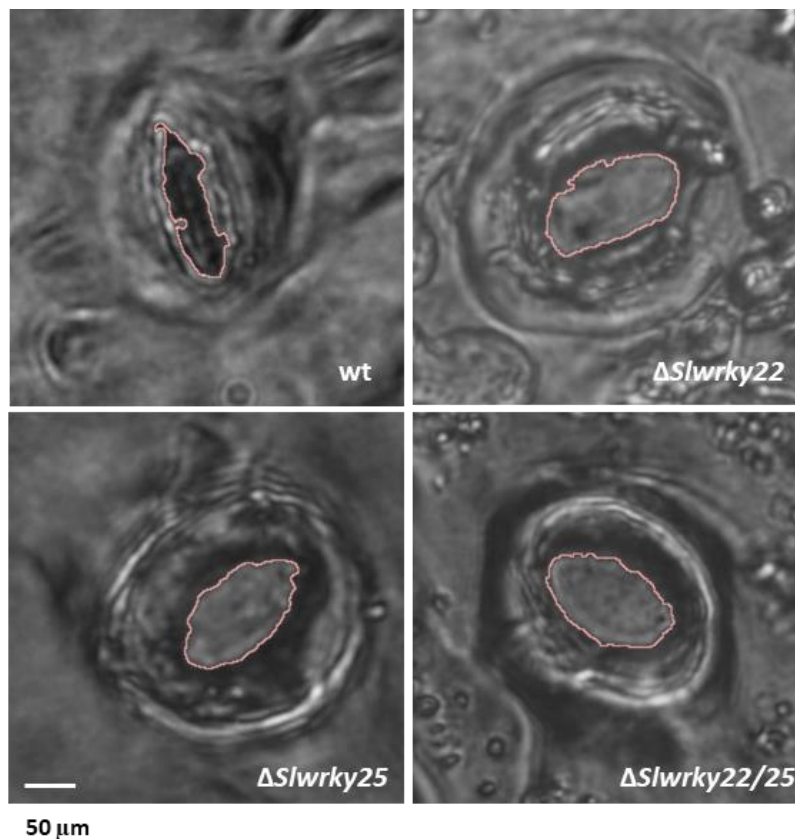


Figura 41. Fotografías microscópicas de estomas de la epidermis abaxial de hojas de todas las líneas de tomate. La barra de escala representa 50 μm y se aplica a todas las fotografías. En color rosa se encuentra delimitado el ostiolo de cada estoma considerado para la cuantificación.

Posteriormente, se probó si las plantas $\Delta Slwrkys$ eran capaces de responder al desafío con *Pst* DC3000 desencadenando el esperado cierre de estomas asociado a la respuesta PTI, que se da aproximadamente 1 h luego del desafío (Melotto y col., 2006). Para ello, plantas de tres semanas de edad se infiltraron con una suspensión 1×10^8 ufc/mL de *Pst* DC3000. Una hora luego de realizado el desafío se hicieron los moldes correspondientes para determinar la apertura estomática. Los estomas de las plantas KO para los *SIWRKYs* tampoco respondieron al desafío con *Pst* DC3000 (Figura 42), resultado que concuerda con haber observado un título bacteriano más alto inmediatamente después de la inoculación por inmersión (Figura 38a, día 0).

Estos resultados sugieren que se requieren ambos factores de transcripción SIWRKY22 y SIWRKY25 para la correcta funcionalidad de los estomas en plantas de tomate.

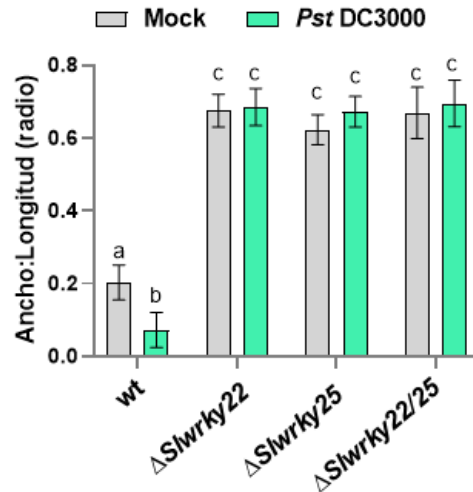


Figura 42. Apertura estomática en hojas de tomate wt y Δ Slwrky en presencia de *Pst* DC3000. Apertura estomática de la cara abaxial de hojas infiltradas con *Pst* DC3000. Los datos se expresan como la relación entre el ancho y el largo del ostiolo de los estomas. Se midieron 60 estomas de cuatro réplicas biológicas por línea analizada. Diferentes letras indican diferencias significativas basadas en *one-way* ANOVA seguido de *Tukey's Honest Significant Difference post hoc test* ($P < 0,05$).

4.3 CONCLUSIONES

- ❖ Utilizando la tecnología de edición de genomas CRISPR-Cas9 se generaron tres líneas de tomate RG-PtoR simples y doble mutantes homocigotas y libres de transgén para los genes *SIWRKY22* y *SIWRKY25*. Se confirmó además que los ARNg utilizados para generar estas líneas fueron específicos.
- ❖ La caracterización de las plantas $\Delta Siwrkys$ demostró que poseen una respuesta ETI mediada por Pto/Prf deficiente cuando se las desafió con *Pst* DC3000 y no con *Pst* DC3000 $\Delta fliC$ (cepa que carece de flagelina, principal inductor de la PTI en tomate), lo que sugiere que estos FT podrían participar en alguna vía de regulación compartida entre ambas respuestas inmunes.
- ❖ Se determinó que ambos factores de transcripción son reguladores positivos de la respuesta PTI a nivel del apoplásto, pero también a nivel de estomas debido a que las líneas mutantes no tienen la capacidad de responder con el cierre de los mismos ante estímulos como la oscuridad, ni tampoco ante el desafío con *Pst* DC3000.



5- CAPÍTULO 3:

Análisis del mecanismo de
acción de SIWRKY22 y
SIWRKY25

5.1 INTRODUCCIÓN

5.1.1 Localización celular de factores de transcripción involucrados en las respuestas inmunes de las plantas

Los factores de transcripción (FT) son componentes importantes de las redes moleculares que regulan las respuestas de las plantas a los estreses bióticos y abióticos (Singh y col., 2002, Burke y col., 2020). Las respuestas inmunes PTI y ETI conducen a la reprogramación transcripcional de un gran conjunto de genes, incluidos aquellos que codifican para FT, que potencialmente pueden formar parte de la regulación de ambas respuestas (Navarro y col., 2004; Rosli y col., 2013; Pombo y col., 2014).

La mayoría de los FT se localizan en el núcleo donde se unen a las regiones promotoras de sus genes blanco y activan o suprimen selectivamente su expresión (Burke y col., 2007). Sin embargo, su ubicación no es exclusivamente nuclear y en presencia de patógenos ésta puede cambiar, ya sea para funcionar como activadores o represores de la inmunidad. En procesos celulares que se activan frente al ataque de patógenos tales como la muerte celular programada, algunos FT ven modificada su localización subcelular pudiendo ser retenidos en el citoplasma o re-dirigidos hacia otros compartimentos celulares para regular tales procesos. Por ejemplo, cuando el FT bZIP10 (*basic leucine zipper 10*) se coexpresó con LSD1 (*LESIONS SIMULATING DISEASE 1*) en *A. thaliana* en presencia del patógeno *Hyaloperonospora parasitica*, bZIP10 fue retenido en el citoplasma para modular la MCP asociada a la presencia del patógeno (Kaminaka y col., 2006). Por otro lado, los FT NTP (*NAC Targeted by Phytophthora*) 1 y 2 de papa que se localizan en la membrana del retículo endoplásmico, son traslocados al núcleo ante el desafío con un filtrado no patogénico de este oomicete. En presencia del efector Pi03192 de *Phytophthora infestans*, que interacciona con NTP1 y NTP2, se inhibe dicha relocalización favoreciendo la patogenicidad (McLellan y col., 2013).

Estudios recientes en animales sugieren que algunos FT pueden interactuar con ARNm específicos en el citoplasma, modulando de esta manera su estabilidad (Hudson y col., 2014; Holmes y col., 2020). En plantas se ha reportado que APIP5 (*AVRPIZ-T-INTERACTING PROTEIN 5*) funciona como FT para regular la expresión génica en el núcleo y como una proteína de unión a ARN en el citoplasma, para regular la renovación del ARNm de algunos genes de defensa durante la respuesta inmune de arroz contra el hongo *Magnaporthe oryzae* (Zhang y col., 2022).

Por lo expuesto, es de vital importancia indagar acerca de la localización celular de los FT involucrados en las respuestas inmunes de las plantas en ausencia y en presencia de los patógenos para comprender sus posibles mecanismos de acción.

5.1.2 Factores de transcripción WRKY y su mecanismo de unión a ADN

Los factores de transcripción WRKY son una de las familias más grandes de FT de las plantas (Rushton y col., 2010). En respuesta a múltiples estreses, tanto bióticos como abióticos, las plantas pueden reprogramar rápidamente su transcriptoma a través de mecanismos de

señalización altamente dinámicos y estrictamente regulados que involucran un gran número de genes, en donde los WRKYs pueden actuar como activadores o represores (Rushton y col., 2010).

Estos FT poseen un dominio de unión a ADN WRKY (dominio WRKY) el cual se caracteriza principalmente por un motivo conservado de aminoácidos WRKYGQK casi invariable en su extremo N-terminal, seguido por un motivo *zinc-finger* (Jiang y col., 2017). Los WRKYs se unen específicamente a través de los dominios WRKY a los elementos en *cis W-box* presentes en las regiones promotoras de sus genes blanco y activan o inhiben su transcripción (Ülker y Somssich, 2004; Yamasaki y col., 2013; Li y col., 2020). Los *W-box* consisten en la secuencia 5'-TTGAC(C/T)-3', que posee un núcleo TTGAC conservado y un residuo flanqueante de citosina o timina variable (C/T) (Jiang y col., 2017; Chen y col., 2019). Estos se encuentran presentes principalmente en la mayoría de los promotores de los genes *WRKYs* sugiriendo una posible autorregulación o regulación cruzada transcripcional entre ellos (Eulgem y col., 2007; Rushton y col., 2010). El modo por el cual se produce el reconocimiento y la unión del dominio WRKY con los *W-box* es variable de acuerdo al WRKY (Xu y col., 2020). Por ejemplo, para el caso de AtWRKY4 se determinó que el motivo WRKYGQK se une al *W-box* principalmente a través de una hélice α o una hoja β con el surco principal del ADN mediante interacciones hidrofóbicas con los grupos metilo de la timina, lo que permite la interacción específica de la base del ADN y la proteína (Yamasaki y col., 2012). La estructura *zinc finger* también es necesaria para que se produzca de manera efectiva la unión entre el *W-box* y el dominio WRKY (Rushton y col., 1995; Xu y col., 2020). Recientemente se reportó que el ion de Zn^{2+} estabiliza la dimerización de los dominios WRKY de dos moléculas OsWRKY45, los cuales interactúan con el surco principal del motivo *W-box* de sus genes blanco (Cheng y col., 2019). Estos resultados también explican por qué los WRKYs pueden formar homo y heterocomplejos para llevar a cabo su regulación. Mutaciones puntuales realizadas en el dominio WRKY han demostrado que Tyr (Y), Trp (W) y dos residuos de Lys (K) en la secuencia WRKYGQK son indispensables también para la unión al ADN (Duan y col., 2007; Ciolkowski y col., 2008).

Por otro lado, existen reportes de WRKYs que poseen versiones variables del dominio WRKY, como por ejemplo WRKYGKK, los cuales se unen a variantes de los *W-box*, como *WK-box* o *WT-box* (van Verk y col., 2008, Machens y col., 2014).

5.1.3 WRKYs involucrados en cascadas de señalización activadas por las respuestas inmunes de las plantas

La activación de las respuestas inmunes PTI y ETI, luego del reconocimiento específico de los diferentes patógenos de plantas por parte de los distintos tipos de receptores PRRs y proteínas R, se encuentran mediados en gran medida por FT entre los cuales se destacan los WRKYs (Wani y col., 2021). La interacción entre proteínas tiene implicancias importantes en la comprensión de las distintas y complejas vías de señalización que ocurren durante la activación de la respuesta inmune. En particular para nuestro sistema de estudio, es de interés identificar con qué proteínas interactúan SIWRKY22 y SIWRKY25 o si interactúan entre ellas.

Por ejemplo, en cebada se ha reportado que el dominio CC de la proteína de resistencia del tipo CC-NLR MLA10 (*barley mildew A 10*) interacciona con HvWRKY1 y HvWRKY2, los cuales son represores de la defensa basal contra el hongo *Blumeria graminis* (Shen y col., 2007). Por otro lado, en un estado basal BIK1 (*Arabidopsis Botrytis-induced kinase 1*) interacciona y fosforila a AtWRKY33, AtWRKY50 y AtWRKY57, lo que resulta en una supresión de los metabolismos de SA y JA. Ante el desafío con *Pst* dicha fosforilación se suprime conduciendo a un aumento en los niveles de SA y JA (Lal y col., 2018). Otra interacción reportada que se produce en el núcleo entre una proteína de resistencia y un WRKY es la de la proteína Pb1 (*Panicle blast 1*) con OsWRKY45, los cuales median la resistencia a *Magnaporthe oryzae* en arroz (Inoue y col., 2013). También, XA21 es un receptor quinasa de arroz que se localiza en la membrana plasmática y que media la resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. La porción intracelular con el dominio quinasa es clivada y traslocada al núcleo donde interacciona con OsWRKY62 y de esta manera se des-reprime el efecto inhibitorio que ejerce este FT sobre la defensa (Peng y col., 2008; Park y Ronald, 2012).

La interacción entre OsWRKY46 y OsWRKY72 con la proteína de resistencia BPH14 (*Brown planthopper resistance 14*) aumenta la estabilidad de dichos WRKYs y conduce a la inducción de la expresión de un gen que codifica para una calosa sintasa y uno que codifica para una proteína RLCK (*receptor-like cytoplasmic kinase*); genes que estarían involucrados en los mecanismos de defensa de arroz frente al ataque de insectos (Hu y col., 2017).

Como se mencionó anteriormente se sabe que las proteínas WRKYs pueden formar homo y heterocomplejos para llevar a cabo sus funciones. En *A. thaliana*, AtWRKY18, AtWRKY40 y AtWRKY60 interaccionan entre ellas mismas y entre sí a través de sus motivos *leucine zipper* (Xu y col., 2006). Las tres proteínas actúan como reguladoras negativas de la defensa en *A. thaliana* frente a la infección por patógenos biotróficos y hemibiotróficos teniendo funciones parcialmente redundantes, aunque sus efectos son aditivos y antagónicos (Xu y col., 2006; Schön y col., 2013). La sobreexpresión de AtWRKY18 aumenta la resistencia a *Pst*, mientras que la coexpresión de AtWRKY18 con AtWRKY40 o AtWRKY60 resulta en plantas más susceptibles al patógeno (Xu y col., 2006).

Por otro lado, en arroz, OsWRKY13 y OsWRKY45-2 se unen entre sí y con sus propios promotores sugiriendo una posible autoregulación y regulación cruzada entre ellos. Ambos reprimen la transcripción de OsWRKY45, proteína encargada de des-reprimir genes relacionados con la síntesis de JA durante la infección por *Magnaporthe oryzae* (Xiao y col., 2013; Cheng y col., 2015).

Recientemente se ha reportado en tomate que SIWRKY30 y SIWRKY81 activan la expresión de los genes que codifican para las proteínas SIPR-STH2a/b/c/d (*pathogenesis-related protein STH2a/b/c/d*) uniéndose directamente a sus regiones promotoras para activar la defensa contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Dang y col., 2023).

Con todos estos antecedentes en mente es que estudiamos si SIWRKY22 y SIWRKY25 interaccionan físicamente y si existe regulación transcripcional entre ellos o si se autorregulan ellos mismos. Analizamos además su localización celular y buscamos posibles genes

candidatos a ser coregulados por ellos en las respuestas inmunes de tomate. Todos estos ensayos se detallarán a continuación a lo largo de este último capítulo.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Análisis de la localización subcelular de SIWRKY22 y SIWRKY25 en presencia y ausencia de *Pst* DC3000

Como se mencionó anteriormente, los WRKYs pueden actuar como activadores o represores transcripcionales y, al hacerlo, establecen una red de señalización que puede participar en procesos citoplasmáticos y nucleares, incluidos eventos de señalización desde las distintas organelas celulares y el citoplasma hasta el núcleo, por lo que estudiar su localización celular es de vital importancia a la hora de analizar su mecanismo de acción (Ülker y Somssich, 2004; Rushton y col., 2010; Eulegem y col., 2007; Ishihama y col., 2012; Bhattacharjee y col., 2013; Pandey y col., 2009).

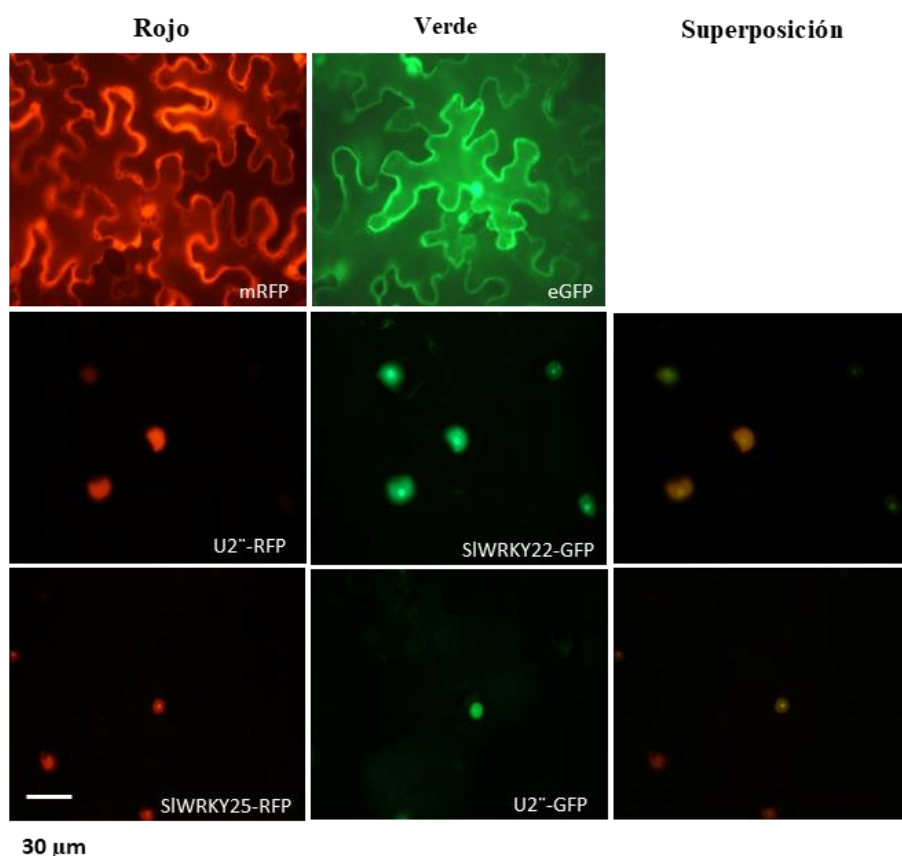


Figura 43. SIWRKY22 y SIWRKY25 se localizan en el núcleo. SIWRKY25-RFP y SIWRKY22-GFP se expresaron transitoriamente en *N. benthamiana* bajo el promotor 35S. Se utilizaron mRFP y eGFP libres como marcadores núcleo-citoplasmáticos y U2''-GFP, U2''-RFP como marcadores de núcleo. Las fotografías se tomaron 2 dpi. La barra de escala representa 30 µm y se aplica a todas las fotografías.

Para estudiar la localización subcelular de SIWRKY22 y SIWRKY25 se generaron fusiones C-terminales a los genes reporteros GFP y RFP (SIWRKY22-GFP y SIWRKY25-RFP) como se describe en la sección 2.2.26 de Materiales y Métodos.

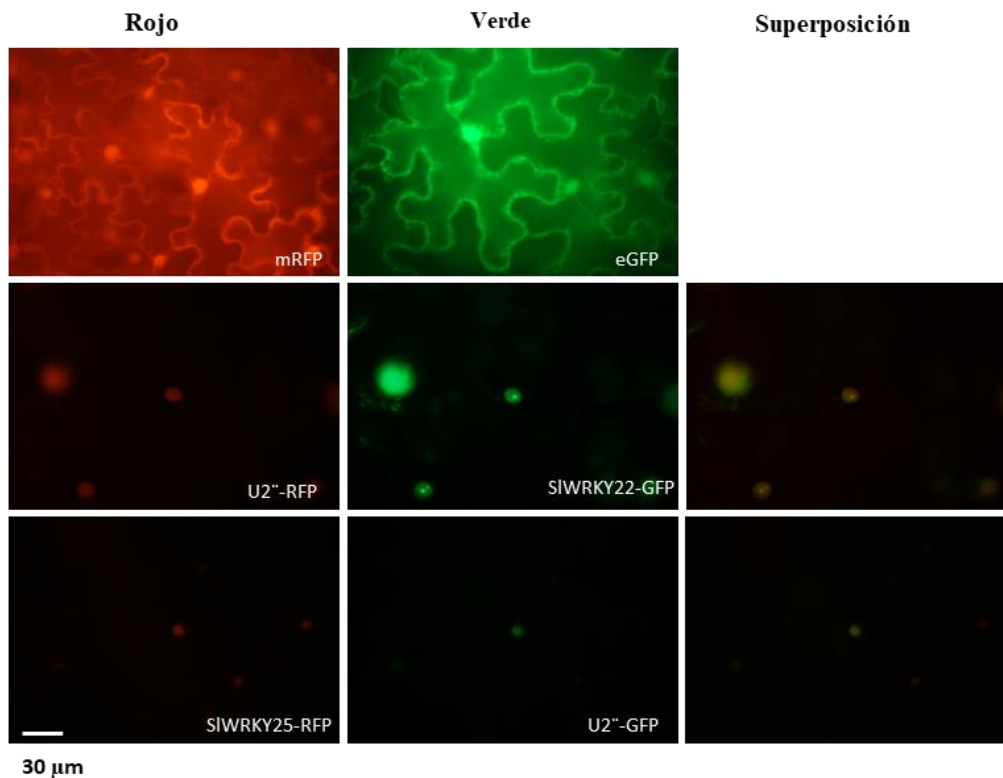


Figura 44. Localización subcelular de SIWRKY22 y SIWRKY25 en presencia de *Pst* DC3000. SIWRKY25-RFP y SIWRKY22-GFP se expresaron transitoriamente en *N. benthamiana* bajo el promotor 35S. Dos días después de la infiltración, las plantas se infiltraron con jeringa con un inóculo 1×10^5 ufc/mL de *Pst* DC3000. Se utilizaron mRFP y eGFP libres como marcadores núcleo-citoplasmáticos y U2''-GFP, U2''-RFP como marcadores de núcleo. Se tomaron fotografías a las 6 h después de la exposición a *Pst* DC3000. La barra de escala representa 30 μ m y se aplica a todas las fotografías.

Se utilizaron cepas de *A. tumefaciens* conteniendo dichos vectores para realizar sobreexpresión transitoria en plantas de *N. benthamiana*. Se utilizó como marcador de núcleo a la proteína U2'' (ribonucleoproteína nuclear pequeña U2 B''), cuya localización es nuclear (Kim y col., 2007). Por un lado, se coinfiltraron SIWRKY22-GFP + U2''-RFP, y por el otro, SIWRKY25-RFP + U2''-GFP. Como controles de expresión se emplearon las proteínas reporteras libres mRFP y eGFP, las cuales se localizan libres en el citoplasma y, por sus pequeños tamaños, difunden fácilmente hacia el núcleo a través de sus poros (Goodin y col., 2002; Robles Luna y col., 2013). En cada una de las infiltraciones se sumó además la proteína supresora del silenciamiento génico p19 (Voinnet y col., 2003).

Cuando se analizó la expresión de las fusiones SIWRKY22-GFP y SIWRKY25-RFP se observó para cada caso que a las 48 hpi se ocupan los núcleos junto con la proteína marcadora U2'' (Figura 43). Además, como se esperaba, se detectaron señales de los controles eGFP y mRFP tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 43).

Seguidamente se investigó su localización celular tras la activación de las respuestas inmunes contra *Pst* DC3000 (PTI y ETI), para profundizar en el estudio de su mecanismo de acción. Para ello se expresaron transitoriamente del mismo modo que el mencionado anteriormente

sólo que en este caso, a las 48 hpi las plantas se desafiaron con un inóculo 1×10^5 ufc/mL de *Pst* DC3000 y se tomaron discos de hoja de las regiones infiltradas 6 h después. La elección de este tiempo postinfiltración con el patógeno se basó en que, a este tiempo, *SIWRKY22* y *SIWRKY25* se encuentran inducidos transcripcionalmente (Figura 8, Capítulo 1). No se observaron cambios en la localización subcelular de los SIWRKYs en presencia de *Pst* DC3000 (Figura 44).

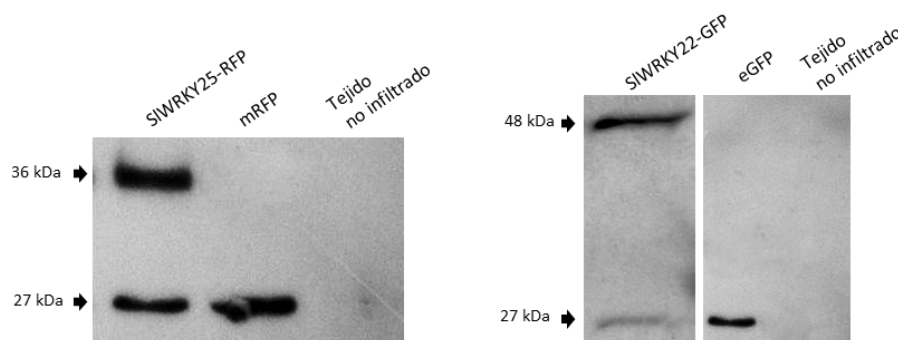


Figura 45. Controles de expresión de SIWRKY22-GFP y SIWRKY25-RFP realizados por western blot. Detección de las proteínas fusionadas a RFP y GFP utilizadas para la localización subcelular.

La expresión de las proteínas SIWRKY22 y SIWRKY25 se confirmó mediante *western blot* utilizando anticuerpos específicos mediante el cual se observaron las bandas de los tamaños esperados para cada una de ellas (36 kDa para SIWRKY25-RFP y 48 kDa para SIWRKY22-GFP) (Figura 45). Este resultado se observó tanto para el experimento de localización en estado basal como ante el desafío con *Pst* DC3000.

5.2.2 Estudio de la interacción entre SIWRKY22 y SIWRKY25 *in vitro* e *in vivo*

Todos los resultados obtenidos hasta el momento, tanto en *N. benthamiana* como en tomate, sugieren que estos factores de transcripción no son funcionalmente redundantes (Ramos y col., 2021; Ramos y col., 2023). Es decir, cuando se comparan los fenotipos que resultan de silenciar (o mutar) de manera conjunta o individual SIWRKY22 y/o SIWRKY25, éstos son muy similares. Una posible explicación para esta observación es que SIWRKY22 y SIWRKY25 interactúan físicamente en el núcleo para modular de forma conjunta la transcripción de sus genes blanco. Para estudiar esta hipótesis se analizó su interacción *in vitro*, mediante ensayos de doble híbrido de levadura Y2H (del inglés, *Yeast two-hybrid*) y ensayos de Co-immunoprecipitación (CoIP), e *in vivo*, mediante Complementación Bi-molecular de Fluorescencia BiFC (del inglés, *Bimolecular fluorescence complementation*).

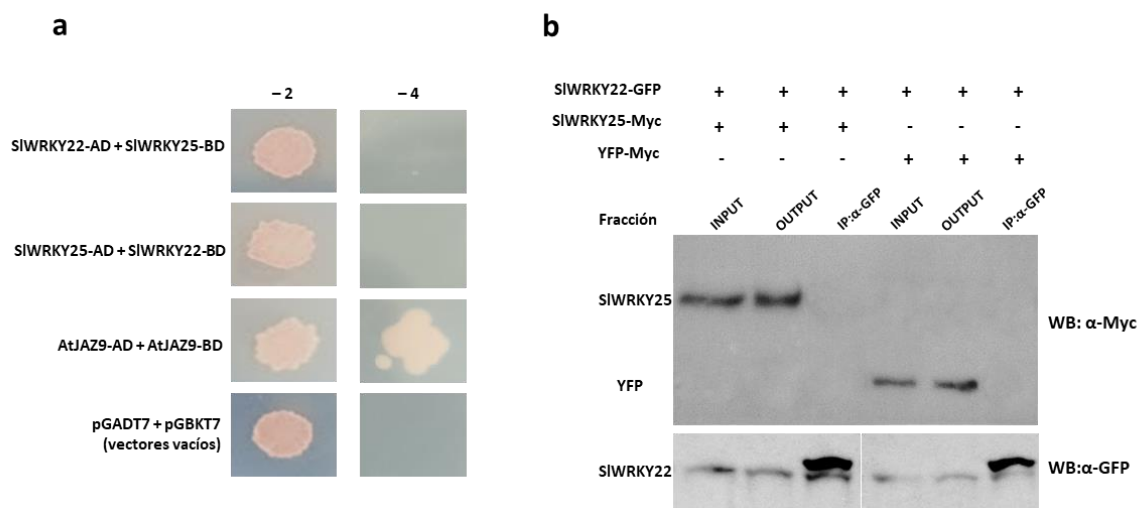


Figura 46. SIWRKY22 y SIWRKY25 no interactúan físicamente *in vitro*. (a) Ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H). AD, dominio de activación en el vector pGADT7; BD, dominio de unión a ADN en el vector pGBKT7; AtJAZ9, *Arabidopsis thaliana* JASMONATE ZIM DOMINIO 9; -2, SD -Leu -Trp; -4, SD -Leu -Trp -His -Ade. (b) Co-inmunoprecipitación de SIWRKY22-GFP y SIWRKY25-Myc. Las proteínas se extrajeron de hojas de *N. benthamiana* que expresaban SIWRKY22-GFP en combinación con SIWRKY25-Myc o YFP-Myc y se usaron para la inmunoprecipitación usando perlas de agarosa anti-GFP. SIWRKY22-GFP, SIWRKY25-Myc e YFP-Myc se detectaron con anticuerpos α-GFP o α-Myc.

El ensayo de Y2H se realizó en colaboración con los doctores Felipe Valenzuela Riffo y Carlos Figueroa del Instituto de Ciencias Biológicas (Talca, Chile) y se llevó a cabo como se describe en la sección 2.2.32 de Materiales y Métodos. Se clonaron las regiones codificantes de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en el vector de expresión pGADT7 (dominio de activación, AD) y pGBKT7 (dominio de unión a ADN, BD) y ambos vectores fueron utilizados para cotransformar las levaduras, las cuales se crecieron en condiciones restrictivas para el chequeo de la posible interacción. Se utilizó como control positivo el homodímero AtJAZ9 (Chini y col., 2021) y la combinación de vectores vacíos como control negativo.

No se observó interacción en la combinación de SIWRKY22-AD + SIWRKY25-BD y SIWRKY25-AD + SIWRKY22-BD en condiciones restrictivas (Figura 46a). La interacción sólo se observó en el control positivo del homodímero AtJAZ9 en el medio -4 (Figura 46a).

Por otro lado, las regiones codificantes para los *SIWRKYs* sin codón de terminación se fusionaron en el extremo C-terminal al tag 4xMyc (SIWRKY25-Myc) y a GFP (SIWRKY22-GFP). Se expresaron transitoriamente en plantas de *N. benthamiana* salvaje para realizar una co-inmunoprecipitación utilizando el sistema GFP-Trap (Chromotek). Se usó la proteína fluorescente amarilla YFP (de sus siglas en inglés, *yellow fluorescent protein*) como control negativo para estos experimentos. Para ello se coinfiltraron por un lado, SIWRKY22-GFP + SIWRKY25-Myc, y por el otro, SIWRKY22-GFP + YFP-Myc.



Figura 47. Estudio *in vivo* de la posible interacción entre SIWRKY22 y SIWRKY25 mediante complementación bi-molecular de fluorescencia (BiFC). La interacción YFP^N-HYL1 + YFP^C-24K se utilizó como control positivo. La barra de escala representa 30 μm y se aplica a todas las fotografías.

No se observó interacción entre SIWRKY22-GFP y SIWRKY25-Myc debido a que no se detectó una banda del tamaño esperado para SIWRKY25-Myc en la fracción IP:α-GFP cuando se realizó la inmunodetección mediante *western blot* con el anticuerpo α-Myc (Figura 46b). Lo mismo se observó para el control negativo YFP.

Por último, se analizó esta posible interacción mediante la técnica de complementación bi-molecular de fluorescencia (BiFC), que permite realizar una observación *in vivo* de las posibles interacciones a estudiar. Para ello, las regiones codificantes sin codón de terminación de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* se clonaron en los vectores de expresión de plantas pAS054 y pAS059 (Manavella y col., 2012; Cambiagno y col., 2021) para generar fusiones de los SIWRKYs con los fragmentos N- y C-terminal de la proteína reportera Citrina. De esta manera, se generaron las construcciones YFP^N-SIWRKY25, YFP^C-SIWRKY25, YFP^N-SIWRKY22 y YFP^C-SIWRKY22. La interacción entre YFP^N-HYL1 + YFP^C-24K se utilizó como control positivo (Marmisolle y col., en revisión). Se infiltraron plantas de *N. benthamiana* salvaje de tres semanas de edad combinando las fusiones C- y N- terminal de cada uno de ellos junto con el control positivo (sección 2.2.31 de Materiales y Métodos). La aparición de fluorescencia verde-amarilla en las muestras coinfiltradas con los fragmentos N- y C- fusionados indica complementación y por lo tanto la interacción entre las dos proteínas ensayadas. La ausencia de fluorescencia de este color, indica falta de interacción.

Discos de hoja de las regiones infiltradas fueron observados al microscopio de fluorescencia a los 1, 2 y 3 dpi. No se observó evidencia de interacción usando las combinaciones de YFP^N-WRKY25 + YFP^C-WRKY22 o YFP^N-WRKY22 + YFP^C-WRKY25 (Figura 47). Sí se observó fluorescencia verde-amarilla para la combinación del control positivo (Figura 47).

Todos estos resultados en conjunto indican que las proteínas SIWRKY22 y SIWRKY25 si bien se localizan en el núcleo, no interaccionan.

5.2.3 Búsqueda de *W-box* y análisis de expresión temporal de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* mediante RT-qPCR

En respuesta a la percepción/interacción con patógenos se activan en las plantas distintos mecanismos de señalización en los que los WRKYs desencadenan la expresión de sus genes blanco al unirse a los elementos en *cis W-box* presentes en sus regiones promotoras. Además,

los *W-box* se encuentran en la mayoría de las regiones promotoras de los genes *WRKYs* lo que sugiere una posible autoregulación o regulación cruzada entre ellos (Eulgem y Somssich 2007; Rushton y col., 2010). Con esto en mente se realizó un análisis bioinformático de elementos *cis* presentes en las regiones promotoras (-1500 pb) de los *SIWRKYs* y *NbWRKYs* para buscar posibles *W-box* (TTGAC(C/T)) utilizando la plataforma Plant.PAN 2.0 (Chow y col., 2015). Se identificaron múltiples *W-box* (entre 1 y 4) en los promotores de los genes de tomate y *N. benthamiana* (Tabla 5). Estos resultados sugieren la posibilidad de autorregulación y/o regulación cruzada entre ellos o por parte de otros *WRKYs*, en ambas especies.

Tabla 5. Análisis de las regiones promotoras de los *SIWRKYs* y *NbWRKYs*. Se indican el número de *W-box* encontradas y su posición. El análisis se realizó contemplando la región de 1500 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción.

Gen	No. de <i>W-box</i>	Distancia desde el ATG
Solyc01g095100 (<i>SIWRKY22</i>)	4	(-1478,-1472); (-674,-668); (-268,-262); (-221,-215)
Solyc10g011910 (<i>SIWRKY25</i>)	4	(-1420,-1414); (-1035,-1029); (-486,-480); (-238,-232)
Niben101Scf09512g02006 (<i>NbWRKY22a</i>)	1	(-1311,-1305)
Niben101Scf03239g00001 (<i>NbWRKY22b</i>)	3	(-1477,-1471); (-528,-522); (-476,-470)
Niben101Scf09057g01009 (<i>NbWRKY25a</i>)	3	(-1327,-1321); (-397,-391); (-49,-43)
Niben101Scf04871g19004 (<i>NbWRKY25b</i>)	2	(-1479,-1473); (-1440,-1434)

Esta regulación podría ser la causa por la que estos FT no parecen funcionar de forma redundante, es decir que uno podría regular transcripcionalmente al otro. Si bien en base a los datos previos de expresión, tanto *SIWRKY22* como *SIWRKY25* son inducidos por la respuesta ETI a las 6 h luego de la inoculación (Pombo y col., 2014), se especuló si su comportamiento transcripcional difería a otros tiempos.

Para indagar sobre esto, se infiltraron con jeringa plantas de tomate salvajes de cuatro semanas de edad con *Pst* DC3000 Δ *fliC*, una cepa en la que se ha eliminado el gen que codifica para la flagelina y, por lo tanto, no es capaz de activar la respuesta PTI y con *Pst* DC3000 Δ *fliC* Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* en la que se eliminaron los genes *avrPto*, *avrPtoB* y *fliC* y, por lo tanto, tampoco puede activar la ETI. La comparación entre estos dos desafíos implica la respuesta asociada a la ETI. Se tomaron muestras de hoja de las regiones infiltradas a las 4, 6 y 8 hpi para analizar su comportamiento transcripcional mediante RT-qPCR con cebadores específicos para cada uno de ellos (Tabla 1, sección 2.1.6 de Materiales y Métodos).

Este experimento permitió confirmar que ambos factores de transcripción se inducen a las 6 hpi, pero curiosamente, *SIWRKY22* se induce a las 4 hpi, mientras que *SIWRKY25* no (Figura 48). No se observó inducción de ninguno de ellos en un momento posterior (8 hpi). Estos resultados respaldaron la idea de que *SIWRKY22* podría modular, de manera directa o indirecta, la expresión del gen *SIWRKY25*.

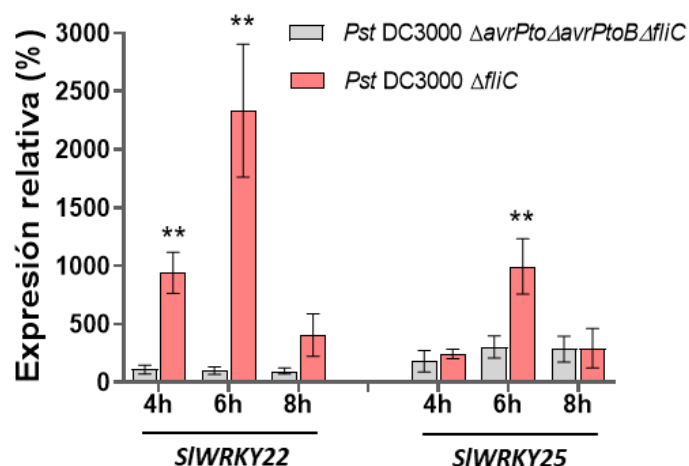


Figura 48. Análisis de expresión temporal de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en tomate. Plantas de tomate RG-PtoR de cuatro semanas de edad se infiltraron con jeringa con una suspensión de 5×10^6 ufc/mL *Pst DC3000 ΔavrPtoΔavrPtoBΔfliC* y *Pst DC3000 ΔfliC*. Se tomaron muestras 4, 6 y 8 hpi. Se cuantificó la abundancia de transcritos mediante RT-qPCR utilizando los genes *SIARD2* y *SIVIN3* como controles internos (Pombo y col., 2017). Los asteriscos dobles indican diferencias significativas basadas en un ANOVA unidireccional seguido de una prueba de Dunnet (** $P < 0,01$).

Con el fin de explorar esta hipótesis, se realizó otro ensayo en el que se sobreexpresó SIWRKY22-Myc en plantas de tomate $\Delta Slwrky22$ y se cuantificó mediante RT-qPCR la expresión relativa del gen *SIWRKY25*. Se utilizó además como control negativo la sobreexpresión de la proteína YFP-Myc. De manera alternativa, se sobreexpresó YFP-Myc o SIWRKY25-Myc en plantas de tomate $\Delta Slwrky25$ y se estimó la expresión relativa del gen *SIWRKY22*.

Se pudo detectar un claro aumento en la expresión del gen *SIWRKY25*, cuando se sobreexpresó SIWRKY22-Myc en comparación con el control YFP-Myc en plantas $\Delta Slwrky22$ (Figura 49a). Por el contrario, cuando se sobreexpresó SIWRKY25-Myc en plantas $\Delta Slwrky25$, no se observaron diferencias en la abundancia de transcritos correspondientes al gen *SIWRKY22* con respecto al control YFP-Myc (Figura 49a). La correcta sobreexpresión de las proteínas se corroboró mediante *western blot* utilizando el anticuerpo α -Myc (Figura 49b).

Estos resultados indican que SIWRKY22, cuya expresión se activa tempranamente, está involucrado en la activación transcripcional del gen *SIWRKY25* y no viceversa.

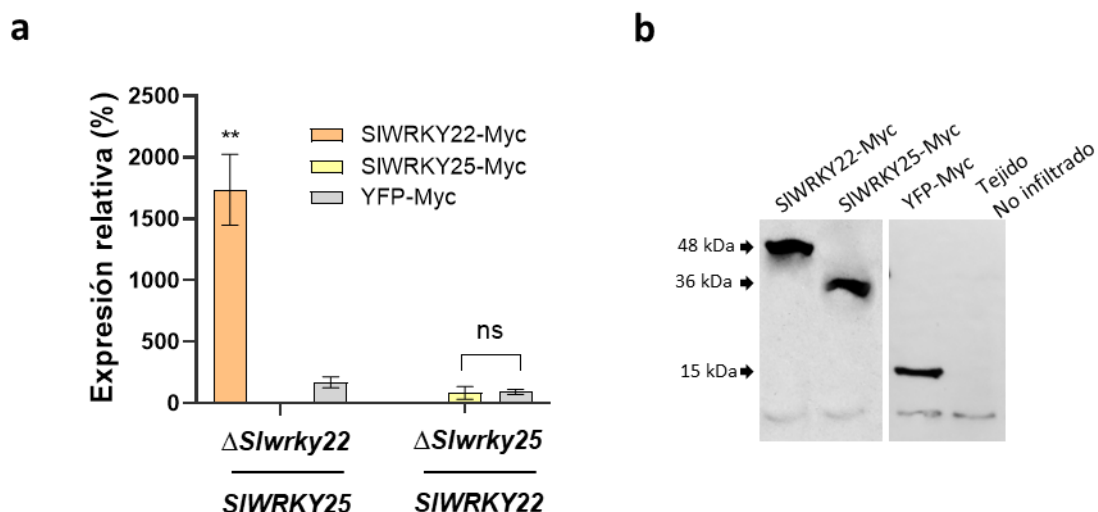


Figura 49. Cuantificación de la abundancia de transcritos de los genes *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en las líneas $\Delta Slwrky25$ y $\Delta Slwrky22$. (a) Expresión génica de *SIWRKY25* en plantas de tomate $\Delta Slwrky22$ cuando *SIWRKY22*-Myc se sobreexpresó transitoriamente y expresión génica de *SIWRKY22* en plantas $\Delta Slwrky25$ cuando *SIWRKY25*-Myc fue transitoriamente sobreexpresado. YFP-Myc se utilizó como control negativo. Los genes *SIARD2* y *SIVIN3* se emplearon como controles internos. Los asteriscos dobles indican diferencias significativas basadas en un ANOVA unidireccional seguido de una prueba de Dunnet (** $P < 0,01$). (b) *SIWRKY22*-Myc, *SIWRKY25*-Myc e YFP-Myc se detectaron mediante *western blot* utilizando el anticuerpo α -Myc.

5.2.4 Determinación de la activación del promotor de *SIWRKY25* por *SIWRKY22* mediante reacción histoquímica de GUS

Teniendo en mente que la falta de redundancia entre *SIWRKY22* y *SIWRKY25* podría estar explicada por una activación transcripcional cruzada, se procedió a estudiar la activación del promotor del gen *SIWRKY25* por parte de *SIWRKY22* y viceversa utilizando el sistema β -glucuronidasa (GUS). Este sistema permite además indagar una posible autoregulación de cada uno de ellos.

Se clonaron las regiones promotoras correspondientes en el vector pKGWFS7 para generar las construcciones prom-*SIWRKY25*:*Gus* y prom-*SIWRKY22*:*Gus*. Se coinfiltraron plantas de *N. benthamiana* salvaje con distintas cepas de *A. tumefaciens* realizando las siguientes combinaciones: prom-*SIWRKY25*:*Gus* + *SIWRKY22*-Myc, prom-*SIWRKY25*:*Gus* + YFP-Myc (control negativo), prom-*SIWRKY25*:*Gus* + *SIWRKY25*-Myc, prom-*SIWRKY22*:*Gus* + *SIWRKY25*-Myc, prom-*SIWRKY22*:*Gus* + YFP-Myc (control negativo), prom-*SIWRKY22*:*Gus* + *SIWRKY22*-Myc. A las 48 hpi se realizó la determinación de la actividad de la enzima β -glucuronidasa (expresión del gen *uidA*, GUS) como se describe en la sección 2.2.33 de Materiales y Métodos. En caso de que existiera la activación de alguno de los promotores ensayados se debería observar la aparición de una tinción azulada en el tejido vegetal, producto de la actividad de dicha enzima.

Se observó dicha tinción azul asociada con la activación del promotor *SIWRKY25* cuando se coinfiltró *SIWRKY22-Myc*, pero no en el sentido contrario (Figura 50a). Además, se pudo observar que ninguno de estos factores de transcripción parece participar en su propia autoactivación transcripcional. La correcta expresión de las proteínas se confirmó mediante *western blot* con el anticuerpo α -Myc (Figura 50b).

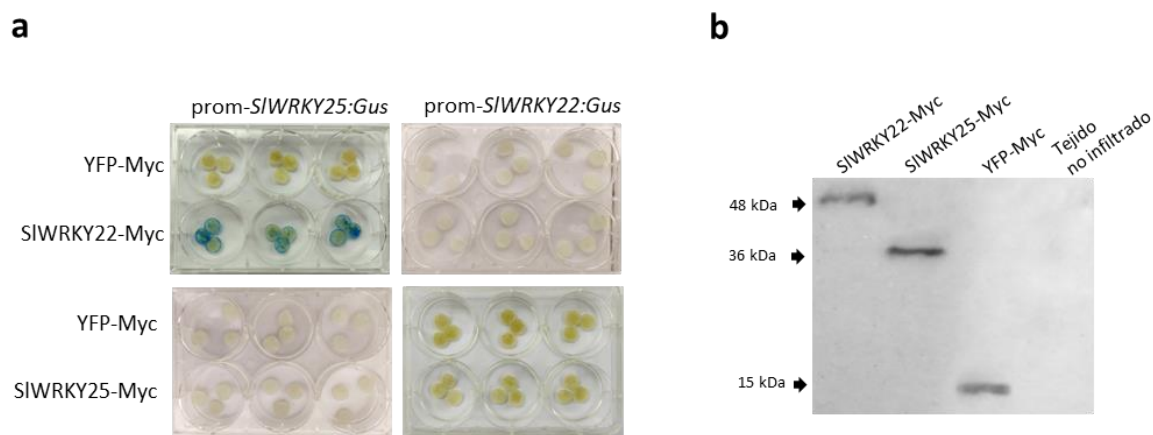


Figura 50. *SIWRKY22* activa el promotor de *SIWRKY25*. (a) Ensayo histoquímico de β -glucuronidasa (GUS) de prom-*SIWRKY22*:Gus y prom-*SIWRKY25*:Gus coinfiltrados con *SIWRKY25-Myc* o *SIWRKY22-Myc*. Se usaron coinfiltraciones con YFP-Myc como controles negativos. (b) *SIWRKY22-Myc*, *SIWRKY25-Myc* e YFP-Myc se detectaron mediante *western blot* utilizando el anticuerpo α -Myc.

5.2.5 Confirmación de la funcionalidad de *SIWRKY22*(-3pb)

Como se comentó en la sección 4.2.1 del Capítulo 2, en la línea Δ *Slwrky25* el gen *SIWRKY22* posee una mutación que corresponde a una delección de 3 pb (*SIWRKY22*(-3pb)) (Tabla 3, Figura 31, Capítulo 2). Con el fin de determinar si la mencionada mutación es silenciosa y por lo tanto el gen *SIWRKY22*(-3pb) conserva su funcionalidad en esta línea de plantas, se realizaron los mismos ensayos que se utilizaron para demostrar que *SIWRKY22* regula transcripcionalmente al gen *SIWRKY25* (sección 5.2.4 de este capítulo), incluyendo a *SIWRKY22*(-3pb).

Para ello se amplificó por PCR el gen *SIWRKY22*(-3pb) utilizando como molde ADNc de la línea Δ *Slwrky25*. Se clonó en el vector de expresión pGWB417 y se chequeó por secuenciación que efectivamente posee la delección de 3 pb. Se utilizó dicho vector para transformar cepas de *A. tumefaciens* competentes y las colonias positivas fueron utilizadas para, por un lado, sobreexpresar a este gen en la línea Δ *Slwrky22* y medir la abundancia de transcritos de *SIWRKY25* y por el otro, analizar mediante ensayos histoquímicos de GUS si *SIWRKY22*(-3pb)-Myc activa a prom-*SIWRKY25*:Gus. Se utilizaron como controles *SIWRKY22-Myc* (positivo) y YFP-Myc (negativo).

En la Figura 51a, puede observarse que cuando se sobreexpresa *SIWRKY22-Myc* o *SIWRKY22*(-3pb)-Myc la expresión relativa de *SIWRKY25* es similar y a su vez mayor que la cuantificada en el control negativo. Además, también se observó la activación transcripcional

de prom-*SIWRKY25:Gus* por parte de SIWRKY22(-3pb)-Myc (Figura 51b). Estos resultados corroboran que la delección de 3 pb en el gen *SIWRKY22* es una mutación que no afecta la capacidad de la proteína de activar transcripcionalmente a *SIWRKY25*, por lo que es razonable considerar a $\Delta Slwrky25$ como una mutante simple.

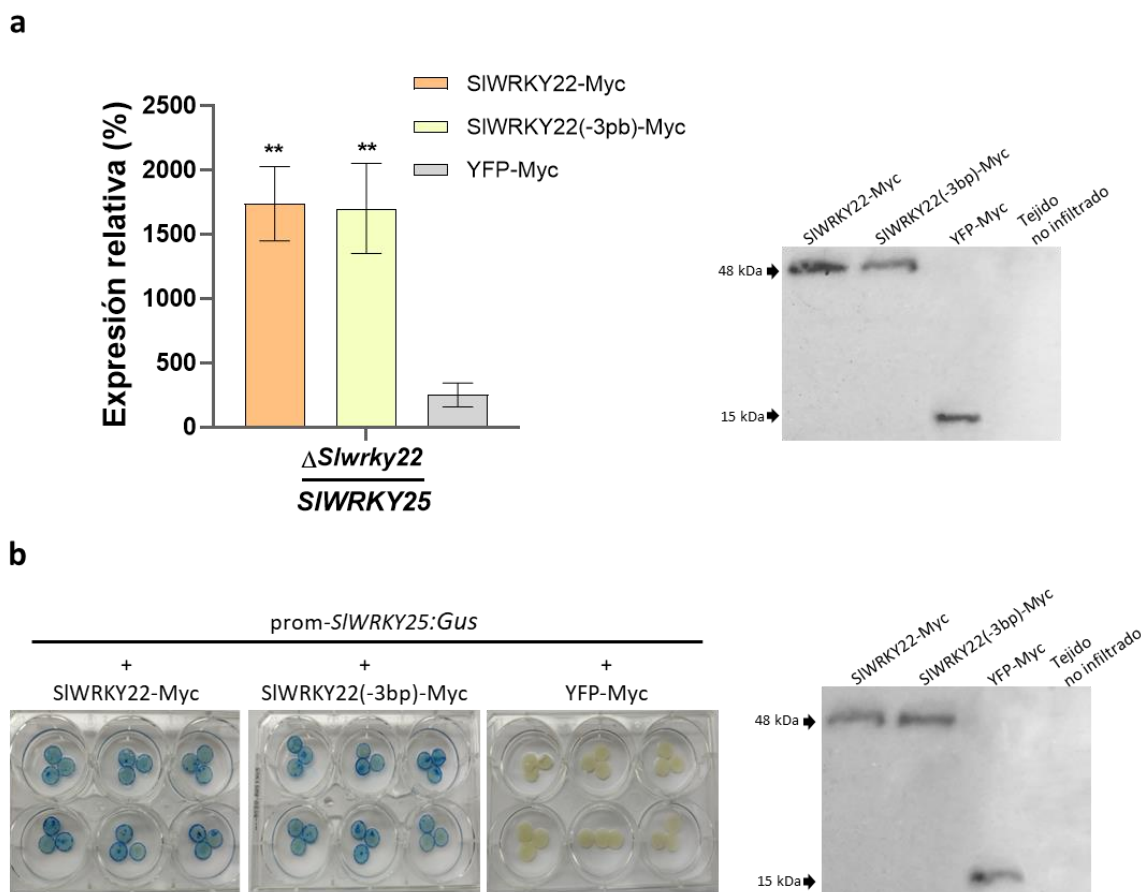


Figura 51. Chequeo de la funcionalidad de SIWRKY22(-3pb). (a) Expresión génica de *SIWRKY25* en plantas de tomate $\Delta Slwrky22$ cuando SIWRKY22(-3pb)-Myc y SIWRKY22-Myc se sobreexpresaron transitoriamente. YFP-Myc se utilizó como control negativo. Los genes *SIARD2* y *SIVIN3* se utilizaron como controles internos. Asteriscos dobles indican diferencias significativas basadas en un ANOVA unidireccional seguido de una prueba de Dunnet (** $P < 0,01$). (b) Ensayo histoquímico de β -glucuronidasa (GUS) de prom-*SIWRKY25:Gus* co-infiltrado con SIWRKY22(-3pb)-Myc o SIWRKY22-Myc. Se usaron coinfiltraciones con YFP-Myc como controles negativos. Para ambos casos SIWRKY22-Myc, SIWRKY22(-3pb)-Myc e YFP-Myc se detectaron mediante *western blot* utilizando el anticuerpo α -Myc (imágenes de la derecha).

5.2.6 Búsqueda de genes candidatos a ser co-regulados por los SIWRKYs en la inmunidad de tomate

Para indagar más acerca del rol que tienen estos FT en la inmunidad de tomate, se realizó una búsqueda de genes que tuvieran patrones de expresión similares a *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en datos transcriptómicos previos (Rosli y col., 2013; Pombo y col., 2014). Para el análisis de

correlación se utilizaron datos de expresión promedio de tres réplicas biológicas en ocho condiciones que se detallan en la Tabla 6.

Considerando aquellos genes con coeficiente de correlación $\geq 0,8$, se identificaron 36 y 23 genes que tenían buena correlación con *SIWRKY22* y *SIWRKY25*, respectivamente. En común se encontraron 17 genes, con patrones similares a ambos FT. Empleando las regiones promotoras (1500 pb aguas arriba del sitio de inicio de traducción anotado) de estos 17 genes se realizó una búsqueda de elementos en *cis* para detectar posibles motivos *W-box* del mismo modo que el descrito en la sección 5.2.3 de este capítulo. Siete de estos genes presentaron al menos un motivo *W-box* en sus regiones promotoras (Tabla 7). En la Figura 52 se muestran los perfiles transcripcionales de cada uno de ellos.

Tabla 6. Resumen de los experimentos de RNA-Seq (Rosli y col., 2013; Pombo y col., 2014) utilizados para el análisis de co-regulación.

Planta	Tratamiento	Tiempo de muestreo	Referencia
RG- <i>prf3</i>	Mock	6 h	Rosli y col., 2013
RG- <i>prf3</i>	flg-II28	6 h	
RG- <i>prf3</i>	Mock	6 h	
RG- <i>prf3</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 55	6 h	
RG- <i>prf3</i>	<i>Pst</i> DC3000	6 h	
RG- <i>prf3</i>	<i>Pst</i> DC3000 Δ <i>avrPto</i> Δ <i>avrPtoB</i>	6 h	
RG-PtoR	<i>Pst</i> DC3000 Δ <i>avrPto</i> Δ <i>avrPtoB</i> Δ <i>fliC</i>	6 h	Pombo y col., 2014
RG-PtoR	<i>Pst</i> DC3000 Δ <i>fliC</i>	6 h	

Con el fin de evaluar la posibilidad de que *SIWRKY22* y/o *SIWRKY25* estén involucrados en la modulación de su expresión se infiltraron con jeringa plantas de tomate wt y Δ *Slwrky22/25* con una suspensión de 5×10^6 ufc/mL *Pst* DC3000 Δ *fliC* (sin activación de la respuesta PTI) o 5×10^6 ufc/mL *Pst* DC3000 Δ *fliC* Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* (sin activación de ninguna de las dos respuestas inmunes). Se utilizaron cuatro plantas por línea por cada cepa utilizada.

Tabla 7. Análisis de las regiones promotoras de los genes candidatos a ser co-regulados por los *SIWRKYs*. Se indican el número de *W-box* encontradas y su posición.

Gen	No. de <i>W-box</i>	Distancia desde el ATG
Solyc04g07855 (WRKY7)	3	(-562, -557); (-519, -514); (-164, -159)
Solyc02g090380 (NRG1)	2	(-563 a -570); (-149, -143)
Solyc10g049630 (PP2C)	4	(-1254, -1248); (-1152, -1147); (-912, -907); (-321, -316)
Solyc08g077020 (SAUR)	5	(-1354, -1348); (-1151, -1145); (-1018, -1022); (-976, -970); (-669, -663)
Solyc03g006610 (Arf-GT Pasa)	1	(-763, 758)
Solyc04g078680 (RING/Ubox)	1	(-501, -496)
Solyc01g010660 (CPK)	2	(-1127, 1122); (-612, 607)

Se tomaron muestras de hojas a las 6 hpi y se analizó la abundancia de transcritos de cada uno de los genes candidatos mediante RT-qPCR con cebadores específicos (Tabla 1, sección 2.1.6 de Materiales y Métodos). El concepto de este ensayo es que, si *SIWRKY22* y/o *SIWRKY25* regularan la expresión de alguno de estos genes, se debería observar una inducción de la

expresión de ellos cuando se activa la respuesta ETI en las plantas wt y no en la línea $\Delta SIWRKY22/25$.

Sólo dos genes (*NRG1* y *SAUR*) tuvieron expresión relativa incrementada por la activación de la respuesta ETI en las plantas wt pero no en plantas doble mutantes, lo que indica que podrían ser genes que actúan río abajo de los *SIWRKYs* (Figura 53).

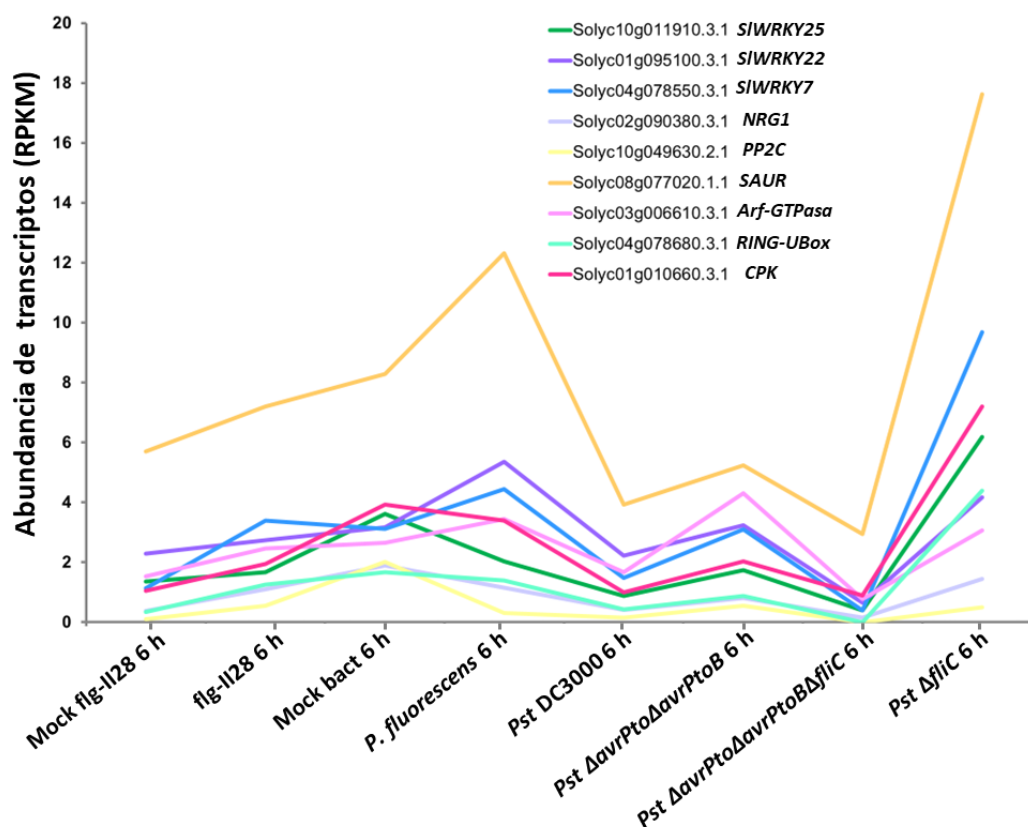


Figura 52. Expresión génica de los genes candidatos a ser co-regulados por SIWRKY22 y SIWRKY25 en los distintos tratamientos analizados.

El gen Solyc02g090380 codifica la proteína NRG1, una proteína del tipo CC-NB-LLR *helper*, es decir, que se encargan de activar la cascada de señalización de la respuesta ETI luego de la percepción de diferentes patógenos por parte de proteínas R *sensor*. Estudios en *N. benthamiana* y *A. thaliana* han demostrado que las proteínas NRG1 se encuentran asociadas a las vías de señalización inmunes mediadas por proteínas receptoras del tipo TIR-NB-LRR (Qi y col., 2018; Castell y col., 2019). Por ejemplo, esta proteína junto con otra proteína del tipo TIR-NB-LRR, proteína N, median la resistencia contra TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) en *N. benthamiana* (Peart y col., 2005). Además, participa en el reconocimiento del efector HopQ1-1 junto con Roq1 en la misma especie (Collier y col., 2011; Qi y col., 2018; Lapin y col., 2019; Castel y col., 2019).

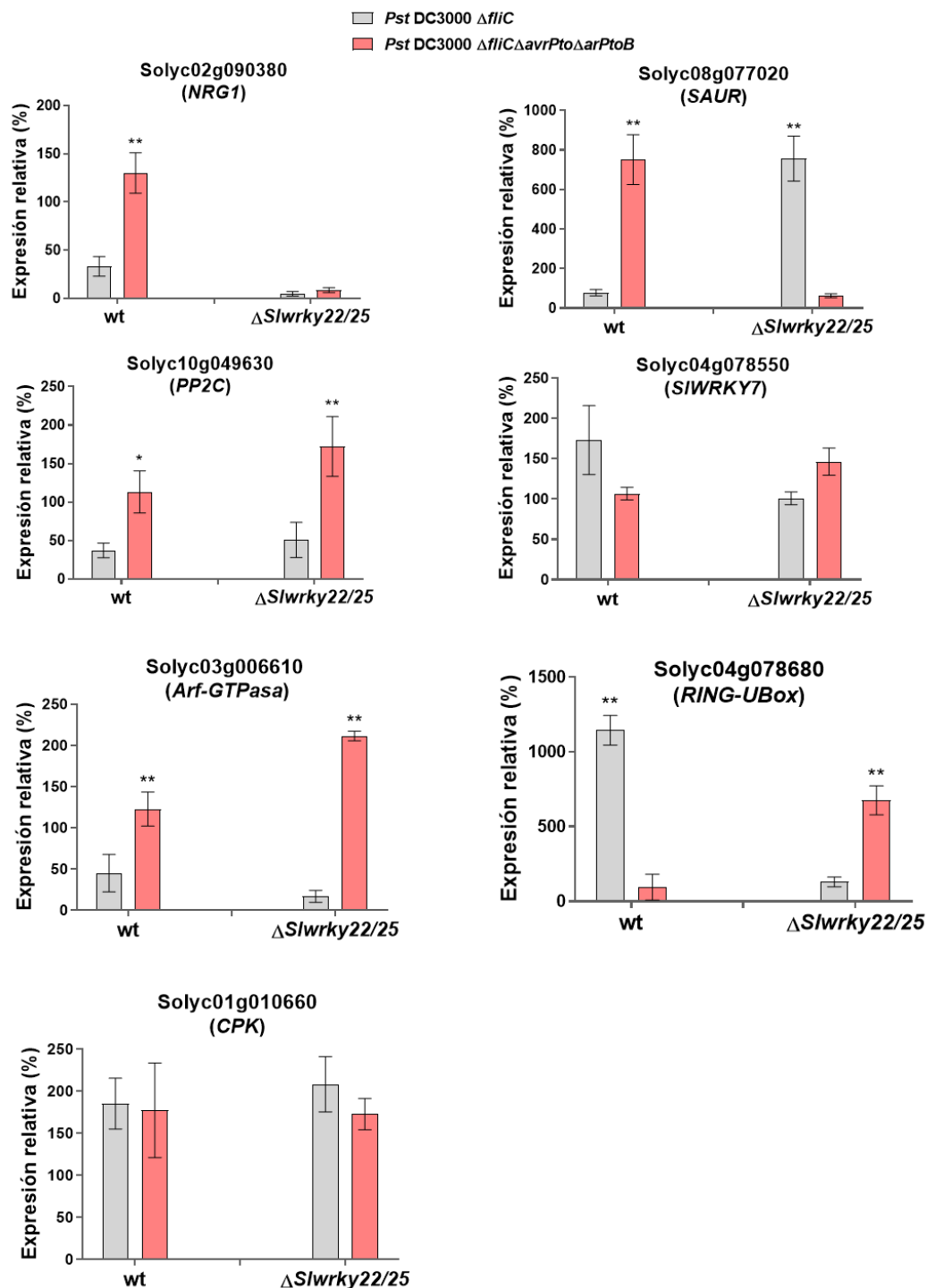


Figura 53. Análisis mediante RT-qPCR de los genes candidatos a ser co-regulados por los SIWRKYs. Plantas de tomate wt y Δ Slwrky22/25 de cuatro semanas de edad se infiltraron con jeringa con 5×10^6 ufc/mL *Pst* DC3000 Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* Δ *fliC* y *Pst* DC3000 Δ *fliC*. Se tomaron muestras a las 6 hpi. La expresión génica de los siete genes candidatos se midió mediante RT-qPCR utilizando *SLARD2* y *SIVIN3* como controles internos. Los asteriscos simples y dobles indican diferencias significativas en comparación con la expresión medida cuando se desafió con la triple mutante basadas en un ANOVA unidireccional seguido de una prueba de Dunnet (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Por otro lado, el gen Solyc08g077020 codifica para SAUR (*SMALL AUXIN UP RNA*), una proteína involucrada en el reconocimiento de la hormona vegetal auxina. Wong y colaboradores (2019), describieron que las proteínas SAUR interactúan con alguna región de las fosfatasa PP2C (*D-CLADE TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASE*), proteínas involucradas en la expansión celular, en donde, esta interacción provoca su inactivación. Las fosfatasa PP2C (que se encuentran en la membrana plasmática) son encargadas de desfosforilar las H⁺-ATPasas provocando su inactivación. Las H⁺-ATPasas bombean H⁺ al apoplasto haciendo que el medio sea ácido, lo que ayuda a las expansinas y otras enzimas que degradan la pared celular a relajar la pared celular. Además, el agua se incorpora al interior del citoplasma elevando la turgencia celular, provocando la expansión celular. Si bien al día de la fecha no se han reportado trabajos que involucren a las proteínas SAUR con la inmunidad de las plantas, resultan interesantes debido a que las H⁺-ATPasas están involucradas en la inmunidad (Elmore y Coaker, 2011).

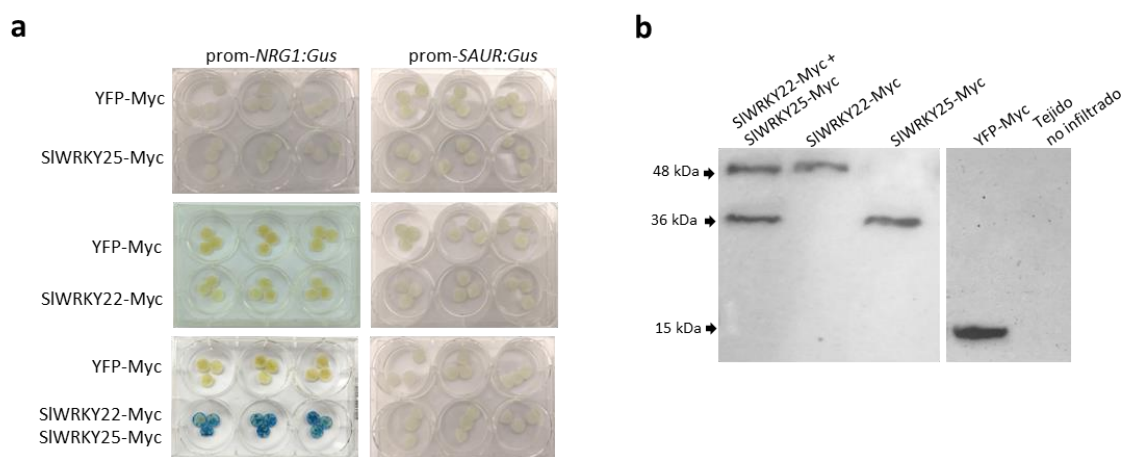


Figura 54. Ensayo histoquímico de β -glucuronidasa (GUS) de *prom-NRG1:Gus* y *prom-SAUR:Gus* co-infiltrados con SIWRKY25-Myc y/o SIWRKY22-Myc. (a) Se usaron coinfiltraciones con YFP-Myc como controles negativos. **(b)** SIWRKY22-Myc, SIWRKY25-Myc e YFP-Myc se detectaron mediante *western blot* utilizando el anticuerpo α -Myc.

Continuando con este análisis, se utilizó el sistema reportero β -glucuronidasa (GUS) en plantas de *N. benthamiana* para investigar si la sobreexpresión de SIWRKY22 y/o SIWRKY25 conduce a la activación de los promotores de los genes *NRG1* y *SAUR*. Se clonaron las regiones promotoras de *NRG1* (*prom-NRG1:GUS*) y *SAUR* (*prom-SAUR:GUS*) en el vector pKWGFS7 (Karimi y col., 2002) río arriba del gen *gus*.

Cuando se infiltraron de manera individual SIWRKY22-Myc o SIWRKY25-Myc junto con los promotores a ensayar, no se observó tinción azul asociada a la activación de ninguno de los promotores (Figura 54a). Sin embargo, se observó dicha tinción asociada sólo con la activación del promotor *NRG1* cuando se coinfiltró SIWRKY22-Myc junto con SIWRKY25-Myc (Figura 54a). La correcta expresión de las proteínas se confirmó mediante *western blot* utilizando el anticuerpo α -Myc (Figura 54b).

Estos resultados sugieren que, si bien *SIWRKY22* participa en la activación transcripcional de *SIWRKY25*, ambos FT son necesarios para inducir la expresión de *NRG1*.

5.3 CONCLUSIONES

- ❖ Ambos factores de transcripción se localizan en el núcleo y su ubicación no se vio alterada en presencia del patógeno *Pst* DC3000.
- ❖ Utilizando tres técnicas diferentes se determinó que estos factores de transcripción no interaccionan físicamente.
- ❖ El análisis de expresión relativa temporal de ambos genes demostró que la transcripción de *SIWRKY22* se activa unas horas antes que la de *SIWRKY25*. Además, la sobreexpresión de *SIWRKY22* en plantas $\Delta Slwrky22$ condujo a un incremento en la expresión relativa de *SIWRKY25*.
- ❖ Mediante reacción histoquímica de GUS se determinó la activación transcripcional del promotor de *SIWRKY25* por parte de *SIWRKY22*, pero no viceversa.
- ❖ Realizando un análisis de co-regulación transcriptómica se identificaron genes con patrones de expresión similares a los que tienen *SIWRKY22* y *SIWRKY25*. Con un análisis más minucioso se encontraron dos posibles genes candidatos a ser regulados por estos *SIWRKYs* (*NRG1* y *SAUR*).
- ❖ Se determinó mediante ensayos histoquímicos de GUS que *NRG1* sería un gen candidato a ser regulado directa o indirectamente por *SIWRKY22* y *SIWRKY25*.



6- DISCUSIÓN GENERAL



Los factores de transcripción (FT) modulan la expresión de sus genes blanco controlando de esta manera muchas funciones celulares, por lo que son considerados claves en procesos tales como el crecimiento, el desarrollo y las respuestas frente a estreses abióticos y bióticos, entre otros (Tsuda y Somssich, 2015; Strader y col., 2022). La familia de factores de transcripción del tipo WRKY que son foco de estudio en esta tesis, se encuentra muy diversificada en las plantas (Chen y col., 2019). Como en el caso de otros tipos de factores de transcripción, se ha reportado que pueden ser reguladores positivos o negativos frente a los distintos estreses y que algunos miembros pertenecientes a las ocho subfamilias de WRKY están implicados en las respuestas PTI y/o ETI de *A. thaliana* y arroz (Pandey y Somssich, 2009; Wani y col., 2021).

En tomate, nuestra especie vegetal de interés, mediante un análisis de secuencias a nivel del genoma completo se lograron identificar 81 factores de transcripción pertenecientes a la familia de los WRKY (Huang y col., 2012; Zheng y col., 2016). SIWRKY22 y SIWRKY25 son muy cercanos entre sí y pertenecen a la subfamilia IIe que posee 17 miembros en tomate, 8 en *A. thaliana* y 10 en arroz (Huang y col., 2012). Dentro de esta subfamilia, sólo unos pocos miembros pertenecientes a algunas especies de plantas han sido implicados o se ha demostrado que tienen un papel en la defensa contra patógenos. Por ejemplo, OsWRKY13 y OsWRKY31 de arroz actúan como reguladores positivos de la defensa frente a diferentes patógenos. Las plantas de arroz que sobreexpresan *OsWRKY13* tienen una mayor resistencia contra un patógeno bacteriano (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) y uno fúngico (*Magnaportha grisea*) (Qiu y col., 2007). También, las plantas sobreexpresantes de *OsWRKY31* son más resistentes a *Magnaportha grisea* (Zhang y Guo, 2008). Trabajos realizados en *A. thaliana* utilizando mutantes de *AtWRKY27*, determinaron que esta mutación provoca un retraso en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad causada por *Ralstonia solanacearum*, y que esto posiblemente se deba a que tienen afectada la señalización del óxido nítrico y el tráfico vascular (Mukhtar y col., 2008). Otro claro ejemplo de un WRKY de la subfamilia IIe implicado en la defensa de la planta es el del gen ortólogo a nuestros WRKYs de interés, *AtWRKY22* de *A. thaliana*. Las líneas mutantes para este gen son menos susceptibles frente al ataque de áfidos y esta regulación de la respuesta inmune se daría porque este gen participa en la modulación de la señalización de las hormonas SA y JA (Kloth y col., 2016).

Si nos referimos sólo a tomate, al día de la fecha existen reportes de algunos de ellos pertenecientes a las distintas familias implicados en las respuestas de defensa (Liu y col., 2014; Li y col., 2015; Cui y col., 2018; Bhattarai y col., 2010; Huang y col., 2016; Dang y col., 2023). En el caso de *SIWRKY37* (miembro de la subfamilia IIe), se observó que la abundancia de su transcrito aumenta 24 h después del desafío con *Trichoderma erinaceum*. Sin embargo, en este trabajo no se hipotetiza cuál es el rol de este gen en la defensa (Aamir y col., 2019). Recientemente se informó que SIWRKY30 y SIWRKY81 son reguladores sinérgicos en la resistencia contra *R. solanacearum* activando la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune (Dang y col., 2023). Si ahondamos aún más y nos referimos a WRKYs de tomate involucrados en la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000, sólo encontramos a SIWRKY39, cuya sobreexpresión conduce a una reducción en el número de bacterias en el apoplasto (Sun y col., 2015). Creemos que aunque estamos hablando de una familia de FT ampliamente estudiada, en este área todavía quedan muchos por identificar y analizar su rol en la inmunidad, particularmente en especies de interés económico como tomate.

Previamente, utilizando la técnica de RNAseq, se identificaron dos genes miembros de la subfamilia IIe de tomate, *SIWRKY22* y *SIWRKY25*, como parte de un grupo de genes cuya expresión aumenta específicamente cuando la ETI se activa 6 h después de la inoculación con *Pst* (Pombo y col., 2014). Sumado a esta inducción asociada a la ETI 6 h, el análisis de datos transcriptómicos, nos indicó que la expresión de *SIWRKY22* y *SIWRKY25* también aumenta a tiempos cortos (30 min) luego del tratamiento con el PAMP flg22 (Pombo y col., 2017). Nuestro análisis filogenético confirmó que la proteína más cercana de *A. thaliana* a ambos SIWRKYs es AtWRKY22 (Huang y col., 2012). Al igual que en tomate, la abundancia de transcritos de *AtWRKY22* aumenta con el tratamiento con flg22 o quitina 30 min después de la infiltración (Navarro y col., 2004; Wan y col., 2004; Libault y col., 2007), por lo que es considerado como un buen marcador de la activación de la PTI temprana. Sin embargo, los antecedentes sobre su participación en la PTI no se restringen sólo a describir dicha inducción transcripcional, ya que existen estudios funcionales del WRKY22 de *A. thaliana* que demuestran su contribución a esta respuesta inmune. Asai y col. (2002) comprobaron que tras la percepción de flg22 por parte del receptor FLS2, se activa una cascada de MAP quinasas que conduce a que AtWRKY22 junto con otro miembro de la familia IIe, AtWRKY29, aumenten la expresión del gen marcador molecular de PTI, FRK1 (*FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1*), pareciendo tener funciones redundantes. Además, AtWRKY22 es necesario para la activación de la respuesta PTI luego de tratamientos de anegamiento por inmersión, contribuyendo a una mayor resistencia de *Arabidopsis* a *Pst* DC3000 (Hsu y col., 2013). Nuestros experimentos silenciando *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* en *Nicotiana benthamiana*, condujeron a una menor deposición de calosa en el apoplasto y a una PTI reducida en respuesta a *Pseudomonas fluorescens* 55. Estos resultados constituyen nuestros primeros indicios que demuestran un papel conservado de SIWRKY25 y SIWRKY22 con su ortólogo AtWRKY22 en la activación de la respuesta PTI.

El silenciamiento génico inducido por virus de *NbWRKY22ab* o *NbWRKY25ab*, o ambos, en plantas de *N. benthamiana* provocó un retraso en el desarrollo de muerte celular programada (MCP) debido a la coexpresión de la proteína Pto junto con el efector bacteriano AvrPto. Además de una reducida MCP, estas plantas desarrollaron síntomas de enfermedad más marcados, poblaciones bacterianas más altas y menor liberación de electrolitos en el apoplasto. Por otro lado, la respuesta ETI activada por la proteína R Roq1 luego del reconocimiento de otro efector bacteriano (HopQ1-1) también se vio comprometida en las plantas silenciadas para estos FT. Esto lo demuestran la aparición de más síntomas de enfermedad y la reducción en la pérdida de electrolitos en las plantas silenciadas para los *NbWRKYs*. La primera respuesta está mediada por la proteína Prf, proteína de resistencia del tipo CC-NB-LRR y en el segundo caso la ETI es activada a través de Roq1, que es del tipo TIR-NB-LRR. Estos resultados indican que *NbWRKY22ab* y *NbWRKY25ab* participan en respuestas mediadas por diferentes proteínas R, que utilizan componentes de señalización río abajo distintos: NRC2/3 en caso de Prf y las proteínas EDS1, SAG101 y NRG1 para Roq1 (Qi y col., 2018; Lapin y col., 2019; Wu y col., 2019; Gantner y col., 2019).

En concordancia con nuestros hallazgos, en otras especies, el factor de transcripción WRKY22 está implicado en la activación de la respuesta ETI (Hussain y col., 2018; Long y col., 2021). Sin embargo, en cuanto a estudios específicos reportados en tomate, se sabe que el silenciamiento de otros WRKYs (*SIWRKY14*, *SIWRKY1* y *SIWRKY71*) no afectó a la ETI

mediada por Pto/Prf (Ekengren y col., 2003). Cabe destacar que ninguno de ellos es miembro de la familia WRKY IIe, a la que pertenecen SIWRKY22 y SIWRKY25 (Huang y col., 2012).

Gran parte de los trabajos que involucran a FT tipo WRKY en la inmunidad vegetal, lo hacen contemplando interacciones compatibles (enfermedad) (Li y col., 2004; Li y col., 2006; Xu y col., 2006; Murray y col., 2007; Hu y col., 2008). Por el contrario, nuestros experimentos con cinco pares de proteínas R con sus correspondientes elicitors indican que los NbWRKYs participan en vías de activación de la respuesta ETI comunes frente a la infección de diferentes tipos de patógenos, como son bacterias, oomicetos, nematodos y virus. Teniendo en mente su participación en la MCP asociada a esta gran diversidad de patógenos, vislumbramos que estos FT podrían ser útiles como herramientas biotecnológicas para la generación de plantas con resistencia de amplio espectro. En este sentido sería interesante generar y caracterizar líneas de tomate que sobreexpresen a *SIWRKY22* y *SIWRKY25*.

Si bien los resultados observados utilizando la planta *N. benthamiana* son consistentes y reproducibles, los mismos implicaron el uso del silenciamiento transitorio en una especie modelo de laboratorio que no posee importancia económica. Como el silenciamiento inducido por virus no es eficiente ni homogéneo en tomate, para tener la posibilidad de estudiar estos FT en esta planta, debimos recurrir a la generación de plantas mutantes utilizando la técnica de CRISPR/Cas9. De esta manera, con esta tecnología se generaron plantas simples y doble mutantes que se utilizaron para la caracterización funcional de los WRKYs en tomate. Primero investigamos su posible participación en la respuesta ETI, infiltrando las plantas con la cepa *Pst* DC3000 y su versión mutante para el gen que codifica para la flagelina (*Pst* DC3000 Δ *fliC*), que es el principal inductor de PTI en tomate (Rosli y col., 2013). Observamos un mayor recuento bacteriano en las plantas mutantes para *SIWRKY22* y *SIWRKY25* cuando se desafiaron con *Pst* DC3000, pero no con la cepa sin flagelina. El hecho de que se requiera la activación de la PTI mediada por flagelina para observar este fenotipo se alinea con aquellos trabajos que indican que las respuestas PTI y ETI se potencian mutuamente y que ambas son necesarias para una fuerte activación de la defensa en la planta (Yuan y col., 2021; Ngou y col., 2021; Pruitt y col., 2021; Tian y col., 2021). Además, plantea la posibilidad de que *SIWRKY22* y *SIWRKY25* puedan ser parte de la intersección entre estas dos respuestas inmunes.

Mediante el uso de infiltración con jeringa e inoculación por inmersión, investigamos si la respuesta PTI apoplástica y la PTI apoplástica/superficial mediada por estomas, se ven afectadas debido a la mutación de estos genes. Las poblaciones bacterianas contabilizadas en lo que denominamos el día 0 (4 h luego de la infiltración por inmersión) indicaron que ingresan más bacterias en las hojas de las plantas Δ *Slwrky22* y Δ *Slwrky22/25*. Aunque se pudo observar una tendencia similar en las plantas Δ *Slwrky25*, el mayor recuento bacteriano no fue estadísticamente significativo. Si no hay daño tisular, la entrada natural de *Pst* al tejido vegetal se da través de los estomas (Xin y He, 2013). Por esta razón, realizamos experimentos que nos permitieron descartar la posibilidad de que existiera un mayor número de estomas en la epidermis de las plantas mutantes, y concluimos que estos dos factores de transcripción participan en el cierre de los estomas, ya que las plantas Δ *Slwrky22*, Δ *Slwrky25* y Δ *Slwrky22/25* no tienen la capacidad de cerrarlos mediante el estímulo de la oscuridad o incluso después del desafío con *Pst* DC3000. Previamente y en concordancia con nuestros resultados se observó

que plantas mutantes de *A. thaliana* para el gen *AtWRKY22* son incapaces de cerrar los estomas frente a los tratamientos con ABA y el crioprotector PVS2 (Stock y col., 2020).

Estudios utilizando PAMPs purificados sugieren que el cierre de los estomas desencadenado por estreses bióticos involucra señales mediadas por la fitohormona ácido abscísico (ABA), la quinasa OPEN-STOMATA 1 (OST1), la producción de ROS y NO, la proteína G y la regulación de canales de K⁺ (Melotto y col., 2006; Zhang y col., 2008; Neill y col., 2008). Esto implica que existen mecanismos comunes de regulación del cierre estomático en respuesta al estrés biótico y abiótico. Sin embargo, el cierre estomático inducido por bacterias o PAMPs requiere también de la proteína quinasa MPK3 (Gudesblat y col., 2009), la hormona vegetal de defensa SA (Melotto y col., 2006) y NPR1 (*NON EXPRESSOR OF PR GENES 1*) (Zeng y col., 2010). Estudios de epistasis sugieren que la percepción de PAMPs precede a la señalización por SA y ésta, a su vez, es previa a la de ABA (Zeng y col., 2010). En consecuencia, este fenotipo de estomas constitutivamente abiertos podría estar relacionado con alteraciones en la vía del SA. En plantas $\Delta Atwrky22$ de *Arabidopsis*, se ve incrementada la expresión de WRKY53 y WRKY70, los cuales median la señalización de SA y son reguladores negativos del cierre de estomas (Stock y col., 2020; Li y col., 2013; Sun y Yu, 2015). Alternativamente, el metabolismo de la fitohormona ABA, podría estar alterado en las líneas $\Delta Slwrky22$, $\Delta Slwrky25$ y $\Delta Slwrky22/25$. Recientemente se ha reportado que el ABA no es esencial para que se dé el cierre estomático por oscuridad pero modula la velocidad de respuesta a este estímulo (Pridgeon y Hetherington, 2021). En nuestros experimentos observamos que las líneas mutantes no evidencian cierre estomático por oscuridad, por lo que creemos poco probable que tengan afectado el metabolismo del ABA. Para comprender los mecanismos de regulación del cierre estomático en que *SIWRKY22* y *SIWRKY25* participan, será interesante determinar si el contenido de las hormonas SA y ABA está afectado en las líneas mutantes, estudiar la tolerancia a la sequía e investigar cuáles son los genes cuya transcripción es modulada de manera directa o indirecta por estos factores de transcripción.

Aunque se sabe que los factores de transcripción mayormente ejercen su función en el núcleo uniéndose a elementos de ADN específicos presentes en los promotores de sus genes blanco (Strader y col., 2022), existen varios reportes que informan acerca de su localización en otros compartimentos celulares y que esto tiene consecuencias para su actividad. Un ejemplo es la bZIP10 (*basic leucine zipper*) de *A. thaliana* (regulador positivo de la defensa basal y la respuesta hipersensible), que es retenida en el citoplasma por la proteína *LESIONS SIMULATING DISEASE 1* (LSD1) para inhibir su función nuclear (Kaminaka y col., 2006). También, el factor de transcripción NAC60 de colza se encuentra asociado a la membrana del retículo endoplásmico y se transloca al núcleo mediante ciertos estímulos, como el estrés oxidativo (Yan y col., 2021). Recientemente se informó que un factor de transcripción bZIP de arroz denominado APIP5, posee una localización dual y diferentes funciones dependiendo de si se encuentra en el núcleo o en el citoplasma. Este estudio también reveló un nuevo mecanismo de acción para este factor de transcripción, uniéndose a ARN mensajeros para regular su vida media en la célula (Zhang y col., 2022). Este abanico de posibilidades nos motivó a explorar la localización subcelular de los SIWRKYs en estudio como primera aproximación para inferir cuál es su modo de acción. Observamos que ambos se localizaban en el núcleo y que esta ubicación no cambiaba en presencia del patógeno, sugiriendo que su

función principal la cumplen en este compartimento subcelular. Por otro lado, en base a esta observación anticipamos que probablemente requieren de un componente río arriba de la ruta de señalización que migre desde el citoplasma hacia el núcleo para su activación.

Tanto los resultados observados utilizando plantas de *N. benthamiana* como de tomate demostraron que el silenciamiento y la mutación de estos genes de manera individual o simultánea conduce a un fenotipo similar. Esto estaría indicando que no existe redundancia funcional entre ellos. Por esta razón nos planteamos diferentes posibilidades en su mecanismo de acción. Por un lado, podría ocurrir que estos WRKYs interactúen físicamente para modular la expresión de sus genes blanco. Esto estaría soportado por el hecho de que la homodimerización y la heterodimerización fueron descritas previamente para otros WRKYs (Chi y col., 2013; Llorca y col., 2014; Chen y col., 2019). Aunque como se mencionó anteriormente ambos se localizan en el núcleo, nuestros experimentos de Y2H, co-IP y BiFC indicaron que no interactúan físicamente. Descartada esta posibilidad, quedaría pendiente evaluar si es posible que se unan a diferentes *W-boxes* que puedan estar en tándem en los promotores de los genes cuya expresión modulan, como se demostró en *A. thaliana* para los WRKY18, WRKY40 y WRKY60 (Liu y col., 2012). Inclusive en algunos casos estas *W-boxes* múltiples pueden estar ubicadas muy distanciadas entre sí, lo que sugiere la posibilidad de que se formen bucles de ADN que permitan acercar físicamente a estos factores de transcripción para la regulación de los genes blanco (Liu y col., 2012; Chi y col., 2013).

Además de la evaluación de la interacción física entre los factores de transcripción en estudio, sería interesante analizar la posible interacción de SIWRKY22 y SIWRKY25 con otras proteínas y si esa interacción se da cuando se activa la inmunidad vegetal. En este sentido, estudios previos demostraron que la actividad de los WRKYs puede activarse mediante la fosforilación por MAP quinasas (Mao y col., 2011; Guan y col., 2014; Adachi y col., 2015; Hou y col., 2019) o mediante la señalización de Ca^{++} mediada por su interacción con las calmodulinas (CaM) (Park y col., 2005). Por lo tanto, analizar la posible interacción de estos FT con dichas proteínas y su asociación con la activación de la defensa de la planta, podría ser útil para comprender el mecanismo de acción de estos factores de transcripción.

Otra explicación para la ausencia de redundancia funcional podría ser que uno de los SIWRKYs regule la expresión génica del otro. Esta posibilidad está respaldada por el hecho de que la mayoría de los WRKYs poseen *W-boxes* en sus promotores (Llorca y col., 2014). El análisis de las regiones promotoras indicó que *SIWRKY22* y *SIWRKY25* no son la excepción. En este sentido, encontramos que la expresión génica de *SIWRKY22* se activa al menos dos horas antes que la expresión de *SIWRKY25*. Luego, utilizando dos métodos diferentes confirmamos que *SIWRKY22* es necesario para la activación de la expresión del gen *SIWRKY25*. Esto no ocurrió a la inversa; es decir *SIWRKY25* no activó la expresión del gen *SIWRKY22*. Tampoco encontramos evidencia de que autoregulen su propia expresión. Un mecanismo de acción similar se informó anteriormente en arroz y *A. thaliana*. *OsWRKY80* se une a la región promotora de *OsWRKY4* y su sobreexpresión aumenta la resistencia de la planta a la enfermedad provocada por *Rhizoctonia solani* (Peng y col., 2016). Además y como se mencionó previamente, río abajo de la percepción de flg22 se activa una cascada de MAP quinasas que provocan que *AtWRKY22* y *AtWRKY29* puedan incrementar la expresión del

marcador molecular de la respuesta PTI FRK1 (Asai y col., 2002). Indagando un poco más en este mecanismo, encontramos que en tomate hay un gen ortólogo de *AtWRKY29* denominado *SIWRKY29* (Huang y col., 2012). Al igual que lo observado para *SIWRKY22* y *SIWRKY25* en tomate, *SIWRKY29* también aumenta su expresión cuando se activa la ETI 6 h posteriores a la inoculación con la bacteria. Sin embargo, la inducción de la expresión génica debido a PTI se observó 6 h luego de la inoculación con *P. fluorescens* 55 y no a tiempos tempranos (30 min después del tratamiento con flg22), como ocurrió con *SIWRKY22* y *SIWRKY25* (Pombo y col., 2014; Pombo y col., 2017). Esto plantea la posibilidad de la existencia de un mecanismo de acción parcialmente divergente entre *A. thaliana* y tomate. En línea con esta idea está el hecho de que *AtWRKY22* es ortólogo tanto de *SIWRKY22* como de *SIWRKY25* en tomate (Huang y col., 2012) y que, según nuestros resultados, estos dos genes de tomate no son funcionalmente redundantes. Se necesitan más experimentos para desentrañar estas redes de regulación en tomate. En este sentido, no sólo se podría explorar si estas proteínas interactúan con otras ya descritas como importantes para la inmunidad de las plantas, sino que sería interesante ampliar este análisis, por ejemplo realizando un *screening* de posibles interactores con ensayos de doble híbrido.

Como una aproximación inicial a explorar dónde se ubican los WRKYs en las vías de señalización que llevan a la activación de la defensa, realizamos un ensayo de epistasis en *N. benthamiana* (del Pozo y col., 2004). En tomate y *N. benthamiana* se han identificado varios miembros de la cascada de señalización que conduce a la MCP mediada por las proteínas Pto y Prf (Ekengren y col., 2003; del Pozo y col., 2004; Pedley y Martin, 2004; Oh y col., 2010; Oh y Martin, 2011b; Hwang y col., 2017; Roberts y col., 2019). Entre ellos, se demostró que NtMEK2 (ortólogo de MKK2 de tomate) participa en la activación de la ETI asociada a estas proteínas en tomate (Ekengren y col., 2003). Además, se ubicó a la MAP quinasa quinasa quinasa alfa (M3K α) de *N. benthamiana* río arriba de MKK2 y se determinó que la fosforila para activarla y continuar con la cascada de señalización (del Pozo y col., 2004; Pedley y Martin, 2004). La sobreexpresión transitoria de ambas MAP quinasa quinasa en *N. benthamiana* produce MCP macroscópica y por este motivo se utilizan para los experimentos de epistasis (del Pozo y col., 2004; Pedley y Martin, 2004; Oh y col., 2010; Oh y Martin 2011b; Hwang y col., 2017; Roberts y col., 2019). Inesperadamente, el desarrollo de la MCP luego de la sobreexpresión de M3K α o MKK2^{DD} no se retrasó cuando silenciemos a los factores de transcripción WRKY en estudio. De hecho, estas plantas silenciadas se comportaron de manera similar a las plantas silenciadas con la construcción *SIPrf*, lo que sugiere que estos factores de transcripción actúan aguas arriba de M3K α o posiblemente en una vía de señalización alternativa.

Para identificar potenciales genes regulados transcripcionalmente por *SIWRKY22* y *SIWRKY25*, utilizamos datos de RNAseq previamente generados (Rosli y col., 2013; Pombo y col., 2014) y con ellos realizamos un análisis de co-regulación. Luego de identificar a aquellos co-regulados con ambos FT, indujimos la respuesta ETI en plantas wt y Δ *Slwrky22/25* para analizar el patrón de expresión de estos en ambas plantas. De los siete genes co-regulados, sólo cuatro tienen una inducción por ETI como predice el RNA-seq (*NRG1*, *SAUR*, *PP2C* y *Arf-GTPasa*). Una posible explicación para esta discrepancia podría ser que estos genes codifiquen para varias isoformas. Es posible que al utilizar RT-qPCR, sólo estemos capturando alguna de

ellas, mientras que por cómo fue realizado el experimento de RNAseq, la cuantificación de la expresión contempla en este caso un solo transcripto consenso.

El patrón de expresión buscado, es decir una menor abundancia de transcriptos en ausencia de SIWRKY22 y SIWRKY25, se observó para dos de los genes analizados (*NRG1* y *SAUR*). Posteriormente observamos en los ensayos histoquímicos que ambos, SIWRKY22 junto con SIWRKY25, regulan la expresión del gen *NRG1* (*N REQUIREMENT GENE 1*). Este gen codifica para una proteína del tipo NLR clasificada como *helper* que actúa río abajo de las *sensor* TNL como por ejemplo Roq1 de *N. benthamiana* (Peart y col., 2005; Qui y col., 2018; Castel y col., 2019; Lapin y col., 2019). Este resultado es muy interesante debido a que nosotros observamos que tanto NbWRKY22ab como NbWRKY25ab participan en la activación de la muerte celular debido al reconocimiento del efector HopQ1-1 por parte de Roq1 en *N. benthamiana*. En esta vía de señalización también están involucrados EDS1 y SAG101 (Peart y col., 2005; Qui y col., 2018; Lapin y col., 2019; Castel y col., 2019; Gantner y col., 2019). Además, en un estudio reciente en *A. thaliana* se reportó que plantas mutantes para los genes *NRG1*, tienen una menor acumulación de SA ante el desafío con flg22 y un menor recuento bacteriano de *Pst* DC3000 *hrcC* (cepa incapaz de translocar efectores y en consecuencia de activar ETI) (Tian y col., 2021). Esto sugiere que *NRG1* sería necesaria para potenciar la respuesta PTI. Este antecedente resulta muy interesante teniendo en mente nuestros resultados que sugieren que *SIWRKY22* y *SIWRKY25* podrían ser parte también de la intersección entre las respuestas PTI y ETI. Experimentos futuros ayudarán a aclarar cómo es que estos dos factores de transcripción regulan las respuestas de defensa de tomate. Sería interesante determinar mediante ensayos de simple híbrido de levadura (Y1H) si *SIWRKY22* y *SIWRKY25* se unen directamente a las *W-box* presentes en la región promotora de *NRG1* para activar su transcripción. Además, mediante la generación de mutantes del promotor del gen *NRG1* en las distintas *W-box* sería posible determinar en cuál de ellas se unirían *SIWRKY22* y *SIWRKY25* para activar su transcripción.

Utilizando datos previos disponibles de RNA-seq, identificamos dos genes WRKY de tomate cuya expresión se induce durante la respuesta inmune temprana PTI y la ETI asociada a Pto/Prf. Nuestra caracterización del silenciamiento de los genes ortólogos en *N. benthamiana* indicó que contribuyen a la ETI activada por elicitores de diversos patógenos, incluidas bacterias, virus, oomicetes y nematodos. La tecnología CRISPR-Cas9 nos permitió generar tres líneas de tomate *knock out* para los *SIWRKYs* de interés. Utilizando estas líneas, pudimos determinar que, tanto *SIWRKY22* como *SIWRKY25*, son reguladores positivos de las respuestas PTI y ETI en tomate. Además, participan en la activación de defensas apoplásica y mediada por estomas, en este último caso regulando el cierre de los mismos. Ambos FT están localizados en el núcleo pero, en nuestras condiciones, no parecen interactuar físicamente. Los experimentos revelaron un mecanismo de acción mediante el cual *SIWRKY22* regula la expresión del gen *SIWRKY25* y que permite explicar la falta de redundancia funcional observada entre estos dos FT en la inmunidad del tomate. Finalmente, realizando un análisis de co-regulación y ensayos histoquímicos para GUS se encontró a *NRG1* como un gen candidato a ser regulado por *SIWRKY22* y *SIWRKY25*.



7- BIBLIOGRAFÍA



- Aamir, M., Kashyap, S. P., Zehra, A., Dubey, M. K., Singh, V. K., Ansari, W. A., Upadhyay, R. S. y Singh, S. (2019). *Trichoderma erinaceum* bio-priming modulates the WRKYs defense programming in tomato against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) challenged condition. *Front. Plant. Sci.* 10:911.
- Abramovitch, R. B., Anderson, J. C. y Martin, G. B. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:601-1.
- Adachi, H., Nakano, T., Miyagawa, N., Ishihama, N., Yoshioka, M., Katou, Y., Yaeno, T., Shirasu, K., y Yoshioka, H. (2015). WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell.* 27:2645–2663.
- Adachi, H., Derevnina, L., y Kamoun, S. (2019). NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 50:121-131.
- Ahammed, G. J., Li, X., Yang, Y., Liu, C., Zhou, G., Wan, H. y Cheng, Y. (2020). Tomato WRKY81 acts as a negative regulator for drought tolerance by modulating guard cell H₂O₂–mediated stomatal closure. *Environ. Exp. Bot.* 171:103960.
- Ahuja, I., Kissen, R., y Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Tren. Plant Sci.* 17:73-90.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N. H., Zhu, S., y Mundy, J. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* 24:2579-2589.
- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M. y Teraoka, T. (2007). Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotech.* 24:135-147.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. y Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature.* 415:977–983.
- Baker, C. J., O'Neill, N. R., Keppler, L. D., y Orlandi, E. W. (1991). Early responses during plant-bacteria interactions in *tobacco* cell suspensions. *Phytopathol.* 81(12):1504-1507.
- Barragan, A. C., y Weigel, D. (2021). Plant NLR diversity: the known unknowns of pan-NLRomes. *Plant Cell.* 33(4):814-831.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., y Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 315(5819):1709-1712.
- Bednarek, P. (2012). Chemical warfare or modulators of defence responses the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:407-414.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., y Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32:76-84.
- Bender, C. L., Stone, H. E., Sims, J. J., y Cooksey, D. A. (1987). Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Tn5 mutants defective in coronatine production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30(2):273-283.

- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotec. Advan.* 32(1):170–189.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J. F., Pöschl, Y., Gust, A. A., Scheel, D., y Lee, J. (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *PNAS.* 106(19):8067-8072.
- Bhattacharjee, S., Garner, C. M., y Gassmann, W. (2013). New clues in the nucleus: transcriptional reprogramming in effector-triggered immunity. *Front. Plant Sci.*, 4:364.
- Bhattarai, K. K., Atamian, H. S., Kaloshian, I. y Eulgem, T. (2010). WRKY72 type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene *Mi-1*. *Plant J.* 63:229–240.
- Bhaya, D., Davison, M., y Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* 45:273-297.
- Bi, G., Su, M., Li, N., Liang, Y. U., Dang, S., Xu, J., y Zhou, J. M. (2021). The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell.* 184(13):3528-3541.
- Bigeard, J., Colcombet, J., y Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol. Plant.* 8(4):521-539.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-1523.
- Birkenbihl, R. P., Diezel, C. y Somssich, I. E. (2012). *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol.* 159(1):266-285.
- Birkenbihl, R. P., Kracher, B., Ross, A., Kramer, K., Finkemeier, I. y Somssich, I. E. (2018). Principles and characteristics of the *Arabidopsis* WRKY regulatory network during early MAMP-triggered immunity. *Plant J* 96:487-502.
- Bombarely, A., Rosli, H. G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L. A., y Martin, G. B. (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Mol. Plant Microbe Interac.* 25(12):1523-1530.
- Böhm, H., Albert, I., Fan, L., Reinhard, A., y Nürnberger, T. (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20:47-54.
- Brader, G., Djamei, A., Teige, M., Palva, E. T., y Hirt, H. (2007). The MAP kinase kinase MKK2 affects disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interac.* 20(5):589-596.
- Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., y Van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* 42(22):168-e168.
- Brooks, D. M., Hernández-Guzmán, G., Kloek, A. P., Alarcón-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., y Kunkel, B. N. (2004). Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant Microbe Interac.* 17(2):162-174.

- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., y Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol.* 166(3):1292-1297.
- Burch-Smith, T. M., Schiff, M., Liu, Y., y Dinesh-Kumar, S. P. (2006). Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142(1):21-27.
- Bubán, T., y Orosz-Kovács, Z. (2003). The nectary as the primary site of infection by *Erwinia amylovora* (Burr.). *Plant Syst. Evol.* 238:183-194.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., y Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PNAS.* 100(18):10181-10186.
- Burke, R., Schwarze, J., Sherwood, O. L., Jnaid, Y., McCabe, P. F., y Kacprzyk, J. (2020). Stressed to death: the role of transcription factors in plant programmed cell death induced by abiotic and biotic stimuli. *Front. Plant Sci.* 11:1235.
- Cambiagno, D. A., Giudicatti, A. J., Arce, A. L., Gagliardi, D., Li, L., Yuan, W., y Manavella, P. A. (2021). HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Mol. Plant.* 14(3):426-439.
- Castel, B., Ngou, P. M., Cevik, V., Redkar, A., Kim, D. S., Yang, Y., y Jones, J. D. (2019). Diverse NLR immune receptors activate defense via the RPW8-NLR NRG1. *New Phytol.* 222(2):966-980.
- Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., y Kroj, T. (2013). The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *Plant Cell.* 25(4):1463-1481.
- Chakravarthy, S., Velásquez, A. C., Ekengren, S. K., Collmer, A., y Martin, G. B. (2010). Identification of *Nicotiana benthamiana* genes involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23(6):715-726.
- Charpentier, E., Richter, H., van der Oost, J., y White, M. F. (2015). Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* 39(3):428-441.
- Chen, C, Chen, Z. (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol.* 129:706-716.
- Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J., Kim, J.G., Underwood, W., Chaudhuri, B. y Wang (2010a). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature.* 468:527-532.
- Chen, H., Lai, Z., Shi, J., Xiao, Y., Chen, Z., y Xu, X. (2010b). Roles of *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biol.* 10(1):1-15.
- Chen, X., Li, C., Wang, H. y Guo, Z. (2019). WRKY transcription factors: evolution, binding, and action. *Phytopathol. Res.* 1(1):1-15.
- Cheng, S., Liu, X. y Gianese, G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature.* 485(7400):635–641.

- Cheng, H., Liu, H., Deng, Y., Xiao, J., Li, X., y Wang, S. (2015). The WRKY45-2 WRKY13 WRKY42 transcriptional regulatory cascade is required for rice resistance to fungal pathogen. *Plant Physiol.* 167(3):1087-1099.
- Cheng, X., Zhao, Y., Jiang, Q., Yang, J., Zhao, W., Taylor, I. A., y Liu, J. (2019). Structural basis of dimerization and dual W-box DNA recognition by rice WRKY domain. *Nucleic Acids Res.* 47(8):4308-4318.
- Chi, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Fan, B., Yu, J. Q. y Chen, Z. (2013). Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. *Mol. Plant.* 6(2):287-300.
- Chini, A., Monte, I., Fernández-Barbero, G., Boter, M., Hicks, G., Raikhel, N., y Solano, R. (2021). A small molecule antagonizes jasmonic acid perception and auxin responses in vascular and nonvascular plants. *Plant Physiol.* 187(3):1399-1413.
- Chinnapandi, B., Bucki, P. y Braun Miyara, S. (2017). SIWRKY45, nematode responsive tomato WRKY gene, enhances susceptibility to the root knot nematode, *M. javanica* infection. *Plant Signal Behav.* 12(12):1356530
- Chow, C. N., Zheng, H. Q., Wu, N. Y., Chien, C. H., Huang, H. D., Lee, T. Y., y Chang, W. C. (2016). PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D1154-D1160.
- Ciolkowski, I., Wanke, D., Birkenbihl, R. P., y Somssich, I. E. (2008). Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol. Biol.* 68:81-92.
- Clinton, S. K. (1998). Lycopene: Chemistry, Biology, and Implications for Human Health and Disease. *Nutr. Rev.* 56(2):35–51.
- Collier, S. M., Hamel, L. P., y Moffett, P. (2011). Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NB-LRR protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24(8):918-931.
- Courdavault, V., Besseau, S., Oudin, A., Papon, N., y O’connor, S. E. (2020). Virus-induced gene silencing: hush genes to make them talk. *Trends Plant Sci.* 25(7):714-715.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4):564-582.
- Cui, J., Bahrami, A. K., Pringle, E. G., Hernandez-Guzman, G., Bender, C. L., Pierce, N. E., y Ausubel, F. M. (2005). *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *PNAS.* 102(5):1791-1796.
- Cui, H., Xiang, T. y Zhou, J. M. (2009). Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cell. Microb.* 11(10):1453-1461.
- Cui J., Xu P., Meng J., Li J., Jiang N. y Luan Y. (2018). Transcriptome signatures of tomato leaf induced by *Phytophthora infestans* and functional identification of transcription factor SpWRKY3. *Theor. Appl. Genet.* 131:787-800
- Cuppels, D. A. (1986). Generation and characterization of Tn 5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *App. Environ. Microbiol.* 51(2):323-327.

- Dang, F., Lin, J., Li, Y., Jiang, R., Fang, Y., Ding, F., y Wang, Y. (2023). SIWRKY30 and SIWRKY81 synergistically modulate tomato immunity to *Ralstonia solanacearum* by directly regulating SIPR-STH2. *Hort. Res.* 26(14):1059-799.
- del Pozo, O., Pedley, K. F. y Martin, G. B. (2004). MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *EMBO J.* 23:3072-3082.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., y Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 471(7340):602-607.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., y Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *PNAS.* 100(13):8024-8029.
- Dirección de Producción Agrícola. (2021 y 2022). Producción de Tomate en Argentina. Diciembre 2022. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. <https://www.argentina.gob.ar/>.
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., y Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 34(2):184-191.
- Dong, J., Chen, C., y Chen, Z. (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* 51:21-37.
- Duan, M. R., Nan, J., Liang, Y. H., Mao, P., Lu, L., Li, L., y Su, X. D. (2007). DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY1 protein. *Nucleic Acids Res.* 35(4):1145-1154.
- Ekengren, S. K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P. y Martin, G. B. (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J.* 36:905-917.
- Elmore, J. M., y Coaker, G. (2011). The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. *Mol. Plant.* 4(3):416-427.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. y Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant. Sci.* 5:199-206.
- Eulgem, T., y Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10(4):366-371.
- Feehan, J. M., Castel, B., Bentham, A. R., y Jones, J. D. (2020). Plant NLRs get by with a little help from their friends. *Curr. Opin. Plant Biol.* 56:99-108.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., y Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res.* 23(10):1229-1232.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Tecle, I. Y., Strickler, S. R., y Mueller, L. A. (2015). The Sol Genomics Network (SGN)-from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Res.* 43(D1):036-041.

- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int. Plant Genomics*. 2007:64358.
- Gantner, J., Ordon, J., Kretschmer, C., Guerois, R., y Stuttmann, J. (2019). An EDS1-SAG101 complex is essential for TNL-mediated immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*. 31(10):2456-2474.
- Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann. Rev. Plant Biol.* 51(1):223-256.
- Gerster, H. (1997). The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr.* 16(2):109-126.
- Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Fernández-Barbero, G., Chini, A., Rathjen, J. P., y Solano, R. (2014). The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 12(2):100-1792.
- Gleditsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., Bange, G., y Randau, L. (2019). PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biol.* 16(4):504-517.
- Guan, Y., Meng, X., Khanna, R., LaMontagne, E., Liu, Y. y Zhang, S. (2014). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 10(5):1004384.
- Gudesblat, G. E., Torres, P. S., y Vojnov, A. A. (2009). *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol.* 149(2):1017-1027.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., y Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59(3):307-321.
- Gómez-Gómez, L., Bauer, Z., y Boller, T. (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 13(5):1155-1163.
- Gouy, M., Guindon, S., y Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27(2):221-224.
- Goodin, M. M., Dietzgen, R. G., Schichnes, D., Ruzin, S., y Jackson, A. O. (2002). pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *Plant J.* 31(3):375-383.
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., y Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interac.* 21(8):1015-1026.
- Hamann, T. (2012). Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front. Plant Sci.* 3:77.
- Hann, D. R., y Rathjen, J. P. (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 49(4):607-618.

- Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. y Ichinose, Y. (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genom.* 279(3):303-312.
- Hind, S. R., Strickler, S. R., Boyle, P. C., Dunham, D. M., Bao, Z., O’Doherty, I. M., Baccile, J. A., Hoki, J. S., Viox, E. G., Clarke, C. R., Vinatzer, B. A., Schroeder, F. C. y Martin, G. B. (2016). Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nat. Plants.* 202(4):00418-19.
- Holmes, Z. E., Hamilton, D. J., Hwang, T., Parsonnet, N. V., Rinn, J. L., Wuttke, D. S., y Batey, R. T. (2020). The Sox2 transcription factor binds RNA. *Nat. Commun.* 11(1):1805.
- Hou, Y., Wang, Y., Tang, L., Tong, X., Wang, L., Liu, L. y Zhang, J. (2019). SAPK10-mediated phosphorylation on WRKY72 releases its suppression on jasmonic acid biosynthesis and bacterial blight resistance. *Science.* 16:499-510
- Hsu, F. C., Chou, M. Y., Chou, S. J., Li, Y. R., Peng, H. P. y Shih, MC. (2013). Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25:2699-2713.
- Hu, J. B. X., Deslandes, L., Hirsch, J., Feng, D. X., Somssich, I. y Marco, Y. (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One.* 3:2589.
- Hu, Z., Yan, C., Liu, P., Huang, Z., Ma, R., Zhang, C., y Chai, J. (2013). Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science.* 341(6142):172-175.
- Hu, L., Wu, Y., Wu, D., Rao, W., Guo, J., Ma, Y., y He, G. (2017). The coiled-coil and nucleotide binding domains of BROWN PLANTHOPPER RESISTANCE14 function in signaling and resistance against planthopper in rice. *Plant Cell.* 29(12):3157-3185.
- Hu, Y., Ding, Y., Cai, B., Qin, X., Wu, J., Yuan, M., y Xin, X. F. (2022). Bacterial effectors manipulate plant abscisic acid signaling for creation of an aqueous apoplast. *Cell Host Microbe.* 30(4):518-529.
- Huang, J. S. (1986). Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24(1):141-157.
- Huala, E., Dickerman, A. W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., y Rhee, S. Y. (2001). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res.* 29(1):102-105.
- Huang, T. y Duman, J. G. (2002). Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant. Mol. Biol.* 48:339-350.
- Huang, S., Gao, Y., Liu, J., Peng, X., Niu, X., Fei, Z., Cao, S. y Liu, Y. (2012). Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Mol. Genet. Genomics.* 287:495-513.

- Huang, Y., Li, M. Y., Wu, P., Xu, Z. S., Que, F., Wang, F., y Xiong, A. S. (2016). Members of WRKY Group III transcription factors are important in TYLCV defense signaling pathway in tomato (*Solanum lycopersicum*). *BMC Genom.* 17(1):1-18.
- Hudson, W. H., y Ortlund, E. A. (2014). The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15(11):749-760.
- Hussain A., Li X., Weng Y., Liu Z., Ashraf M. F., Noman A., Yang S., Ifnan M., Qiu S. y Yang Y. (2018). CaWRKY22 acts as a positive regulator in pepper response to *Ralstonia Solanacearum* by constituting networks with CaWRKY6, CaWRKY27, CaWRKY40, and CaWRKY58. *Int. J. Mol. Sci.* 19(5):1426.
- Hwang, I. S., Brady, J. J., Martin, G. B. y Oh, C. S. (2017). Ser360 and Ser364 in the kinase domain of tomato SIMAPKKK α are critical for programmed cell death associated with plant immunity. *Plant Path. J.* 33(2):163-169.
- Inoue, H., Hayashi, N., Matsushita, A., Xinqiong, L., Nakayama, A., Sugano, S., y Takatsuji, H. (2013). Blast resistance of CC-NB-LRR protein Pb1 is mediated by WRKY45 through protein–protein interaction. *PNAS.* 110(23):9577-9582.
- Ishihama, N., Yamada, R., Yoshioka, M., Katou, S. y Yoshioka, H. (2011). Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *Plant Cell.* 23(3):1153-1170.
- Ishiguro, S., y 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. *Mol. Genet. Genom.* 244:563-571.
- Jacob, F., Vernaldi, S., y Maekawa, T. (2013). Evolution and conservation of plant NLR functions. *Front. Immunol.* 4:297.
- Jacobs, T. B., Zhang, N., Patel, D., y Martin, G. B. (2017). Generation of a collection of mutant tomato lines using pooled CRISPR libraries. *Plant Physiol.* 174(4):2023-2037.
- Jagram, N., y Dasgupta, I. (2022). Principles and practice of virus induced gene silencing for functional genomics in plants. *Virus Gen.* 1:15.
- Jardine, D. J., Stephens, C. T., y Fulbright, D. W. (1988). Potential sources of initial inoculum for bacterial speck in early planted tomato crops in Michigan: debris and volunteers from previous crops. *Plant Dis.* 72(3):246-249
- Jha, G., Rajeshwari, R., y Sonti, R. V. (2005). Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18(9):891-898.
- Jiang, S., Yao, J., Ma, K. W., Zhou, H., Song, J., He, S. Y., y Ma, W. (2013a). Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Path.* 9(10):1003715.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., y Weeks, D. P. (2013b). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, *tobacco*, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41(20):188-188.
- Jiang, J., Ma, S., Ye, N., Jiang, M., Cao, J., y Zhang, J. (2017). WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 59(2):86-101.

- Johnson, C. S., Kolevski, B., y Smyth, D. R. (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell*. 14:1359-1375.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., y Zitter, T. A. (1991). Bacterial speck. In *Compendium of tomato diseases*. APS. 26:27.
- Jones, J. D., Vance, R. E., y Dangl, J. L. (2016). Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*. 354(6316):6395.
- Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T., y Helm, J. M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell*. 100(1):13-26.
- Kaminaka, H., Näke, C., Eppele, P., Dittgen, J., Schütze, K., Chaban, C., y Dangl, J. L. (2006). bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J*. 25(18):4400-4411.
- Karkute, S. G., Gujjar, R. S., Rai, A., Akhtar, M., y Singh, M. (2018). Genome wide expression analysis of *WRKY* genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) under drought stress. *Plant Gene*. 13:8-17.
- Karimi, M., Inzé, D., y Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*. 7(5):193-195.
- Kazan, K., y Lyons, R. (2014). Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell*. 26(6):2285-2309.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., y Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12):1647-1649.
- Kemen, E., y Jones, J. D. (2012). Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles?. *Trends Plant Sci*. 17(8):448-457.
- Kim, Y. J., Lin, N. C., y Martin, G. B. (2002). Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell*. 109(5):589-598.
- Kim, S. H., Ryabov, E. V., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., y Taliansky, M. (2007). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J*. 26(8):2169-2179.
- Kim, K. C., Lai, Z., Fan, B. y Chen, Z. (2008). *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell*. 20(9):2357-2371.
- Kloth, K. J., Wieggers, G. L., Busscher-Lange, J., van Haarst, J. C., Kruijer, W., Bouwmeester, H. J., Dicke, M. y Jongsma, M. A. (2016). AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling. *J. Exp. Bot*. 67(11):3383-3396.
- Knapp, S., Chase, M. W., y Clarkson, J. J. (2004). Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Taxon*. 53:73-82.

- Knoth, C., Ringler, J., Dangl, J. L., y Eulgem, T. (2007). *Arabidopsis* WRKY70 is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:120-128.
- Kourelis, J., y Van Der Hoorn, R. A. (2018). Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *Plant Cell.* 30(2):285-299.
- Kvitko, B. H. (2009). Construction of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 polymutant strains to uncover functional groups in virulence. *Methods Mol Biol.* 712:109-28.
- Lahaye, T. (2002). The *Arabidopsis* RRS1-R disease resistance gene uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense? *Trends Plant Sci.* 7:425-427.
- Lal, N. K., Nagalakshmi, U., Hurlburt, N. K., Flores, R., Bak, A., Sone, P., y Dinesh-Kumar, S. P. (2018). The receptor-like cytoplasmic kinase BIK1 localizes to the nucleus and regulates defense hormone expression during plant innate immunity. *Cell Host Microbe.* 23(4):485-497.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
- Lapin, D., Kovacova, V., Sun, X., Dongus, J. A., Bhandari, D., von Born, P., y Parker, J. E. (2019). A coevolved EDS1-SAG101-NRG1 module mediates cell death signaling by TIR-domain immune receptors. *Plant Cell.* 31(10):2430-2455.
- Lapin, D., Bhandari, D. D., y Parker, J. E. (2020). Origins and immunity networking functions of EDS1 family proteins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 58:253-276.
- Lewis, J. D., Lee, A. H. Y., Hassan, J. A., Wan, J., Hurley, B., Jhingree, J. R., y Desveaux, D. (2013). The *Arabidopsis* ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *PNAS.* 110(46):18722-18727.
- Li, J., Brader, G., y Palva, E. T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell.* 16(2):319-331.
- Li, J., Brader, G., Kariola, T. y Palva, E. T. (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J.* 46(3):477-491.
- Li, J., Besseau, S., Törönen, P., Sipari, N., Kollist, H., Holm, L., y Palva, E. T. (2013). Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 200(2):457-472.
- Li, J. B., Luan, Y. S., y Liu, Z. (2015). SpWRKY1 mediates resistance to *Phytophthora infestans* and tolerance to salt and drought stress by modulating reactive oxygen species homeostasis and expression of defense-related genes in tomato. *PCTOC.* 123:67-81.
- Li, B., Meng, X., Shan, L., y He, P. (2016). Transcriptional regulation of pattern-triggered immunity in plants. *Cell Host Microbe.* 19(5):641-650.
- Li, W., Pang, S., Lu, Z., y Jin, B. (2020). Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants. *Plants.* 9(11):1515.

- Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M. y Stacey, G. (2007). Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:900-911.
- Liu, Y., Schiff, M., y Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31(6):777-786.
- Liu, Z. Q., Yan, L., Wu, Z., Mei, C., Lu, K., Yu, Y. T., y Zhang, D. P. (2012). Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 63(18):6371-6392.
- Liu, B., Hong, Y., Zhang, Y., Li, X., Huang, L., y Zhang, H. (2014). Tomato WRKY transcriptional factor SIDRW1 is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to oxidative stress. *Plant Sci.* 227:145-156.
- Liu, H., Ding, Y., Zhou, Y., Jin, W., Xie, K., y Chen, L. L. (2017a). CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. *Mol. Plant.* 10(3):530-532.
- Liu, Q., Liu, Y., Tang, Y., Chen, J., y Ding, W. (2017b). Overexpression of NtWRKY50 increases resistance to *Ralstonia solanacearum* and alters salicylic acid and jasmonic acid production in tobacco. *Front. Plant Sci.* 8:1710.
- Llorca, C. M., Potschin, M., y Zentgraf, U. (2014). bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Front. Plant Sci.* 5:169.
- Longhi, S., y Cambillau, C. (1999). Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 1441(2-3):185-196.
- Long, Q., Du, M., Long, J., Xie, Y., Zhang, J., Xu, L., y Zou, X. (2021). Transcription factor WRKY22 regulates canker susceptibility in sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) by enhancing cell enlargement and *CsLOB1* expression. *Hort. Res.* 8(1):50.
- Luan, Q., Chen, C., Liu, M., Li, Q., Wang, L. y Ren, Z. (2019). CsWRKY50 mediates defense responses to *Pseudoperonospora cubensis* infection in *Cucumis sativus*. *Plant Sci.* 279:59-69.
- Lukasik, E., y Takken, F.L.W. (2009). STANDING strong, resistance protein instigators of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:427-436
- Ma, S.W., Morris, V.L., y Cuppels, D.A. (1991). Characterization of a DNA region required for production of the phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:69–77.
- Ma, S., Lapin, D., Liu, L. I., Sun, Y., Song, W., Zhang, X., y Chai, J. (2020). Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science.* 370(6521):3069.
- Machens, F., Becker, M., Umrath, F., y Hehl, R. (2014). Identification of a novel type of WRKY transcription factor binding site in elicitor-responsive cis-sequences from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 84:371-385.
- Macho, A. P. y Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell.* 54(2):263-272.

- Macho, A. P. (2016). Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytol.* 210(1):51-57.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., y Dangl, J. L. (2003). *Arabidopsis RIN4* is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell.* 112(3):379-389.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J., y Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Rev. Microbiol.* 18(2):67-83.
- Manavella, P. A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B., y Weigel, D. (2012). Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell.* 151(4):859-870.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., y Zhang, S. (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23(4):1639-1653.
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science.* 262(5138):1432-1436.
- Martin, G. (2011). Suppression and activation of the plant immune system by *Pseudomonas syringae* effectors AvrPto and AvrPtoB. *Plant Microbe Interac.* 10:10271.
- Martin, R., Qi, T., Zhang, H., Liu, F., King, M., Toth, C., y Staskawicz, B. J. (2020). Structure of the activated ROQ1 resistosome directly recognizing the pathogen effector XopQ. *Science.* 370(6521):9993.
- McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., y Birch, P. R. (2013). An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription factors from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *PLoS Path.* 9(10):1003670.
- Meier, I., y Somers, D. E. (2011). Regulation of nucleocytoplasmic trafficking in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(5):538-546.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., y He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell.* 126(5):969-980.
- Mendgen, K., Hahn, M., y Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:367-386.
- Meng, X. y Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Ann. Revi. Phytopathol.* 51:245-266.
- Mittal, S., y Davis, K. R. (1995). Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8(1):165-171
- Mukhtar, M. S., Deslandes, L., Auriac, M. C., Marco, Y., y Somssich, I. E. (2008). The *Arabidopsis* transcription factor WRKY27 influences wilt disease symptom development caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant J.* 56:935-947.

- Murray, M. G., y Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8(19):4321-4326.
- Murray, S. L., Ingle, R. A., Petersen, L. N., y Denby, K. J. (2007). Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:1431-1438.
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., y Ishiguro, S. (2007). Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(8):2095-2100.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., y Jones, J. D. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 135:1113-1128.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., y Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 59(2):165-76.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D., y Kamoun, S. (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnol.* 31(8):691-693.
- Ngou, B. P. M., Ahn, H. K., Ding, P. y Jones, J. D. G. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature.* 592(7852):110-115.
- Nguyen, H. P., Chakravarthy, S., Velásquez, A. C., McLane, H. L., Zeng, L., Nakayashiki, H., y Martin, G. B. (2010). Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23(8):991-999.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S., y Bolwell, G.P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta.* 236:765-779.
- Oh, C. S., Pedley, K. F., y Martin, G. B. (2010). Tomato 14-3-3 protein 7 positively regulates immunity-associated programmed cell death by enhancing protein abundance and signaling ability of MAPKKK alpha. *Plant Cell.* 22:260-272.
- Oh, C. S. y Martin, G. B. (2011a). Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends Plant Sci.* 16(3):132-140.
- Oh, C. S. y Martin, G. B. (2011b). Tomato 14-3-3 protein TFT7 interacts with a MAP kinase kinase to regulate immunity-associated programmed cell death mediated by diverse disease resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 286:14129-14136.
- Osborn, A. E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant cell.* 8(10):1821.
- Paauw, M., van Hulten, M., Chatterjee, S., Berg, J. A., Taks, N. W., Giesbers, M., y van den Burg, H. A. (2023). Hydathode immunity protects the *Arabidopsis* leaf vasculature against colonization by bacterial pathogens. *Curr. Biol.* 33(4):697-710.
- Pandey, S. P., y Somssich, I. E. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol.* 150(4):1648-1655.

- Park, S. H., Morris, J. L., Park, J. E., Hirschi, K. D. y Smith, R. H. (2003). Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *J. Plant Physiol.* 160(10):1253-7.
- Park, C. Y., Lee, J. H., Yoo, J. H., Moon, B. C., Choi, M. S., Kang, Y. H., y Cho, M. J. (2005). WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett.* 579(6):1545-1550.
- Park, C. J., y Ronald, P. C. (2012). Cleavage and nuclear localization of the rice XA21 immune receptor. *Nat. Commun.* 3(1):920.
- Pedley, K. F. y Martin, G. B. (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:215-43.
- Pedley, K. F., y Martin, G. B. (2004). Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *J. Biol. Chem.* 279(47):49229-49235.
- Peng, Y., Bartley, L. E., Chen, X., Dardick, C., Chern, M., Ruan, R., y Ronald, P. C. (2008). OsWRKY62 is a negative regulator of basal and Xa21-mediated defense against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Mol. Plant.* 1(3):446-458.
- Peng, X., Wang, H., Jang, J. C., Xiao, T., He, H., Jiang, D. y Tang, X. (2016) OsWRKY80-OsWRKY4 module as a positive regulatory circuit in rice resistance against *Rhizoctonia solani*. *Rice* 9(1):1-14.
- Peart, J. R., Mestre, P., Lu, R., Malcuit, I., y Baulcombe, D. C. (2005). NRG1, a CC-NB-LRR protein, together with N, a TIR-NB-LRR protein, mediates resistance against *tobacco mosaic virus*. *Curr. Biol.* 15(10):968-973.
- Pitblado, R.E. y Kerr, E.A. (1980). Resistance to bacterial speck (*Pseudomonas tomato*) in tomato. *Acta Hort.* 100:379–382.
- Prance, G. y Nesbitt, M. (2006). The cultural history of plants. Routledge. Taylor y Francis e-Library. (Eds.: Prance, G. y Nesbitt, M.) ISBN 0-203-02090-1.
- Pridgeon, A. J., y Hetherington, A. M. (2021). ABA signalling and metabolism are not essential for dark-induced stomatal closure but affect response speed. *Sci. Rep.* 11(1):5751.
- Pruitt, R. N., Locci, F., Wanke, F., Zhang, L., Saile, S. C., Joe, A., y Nürnberger, T. (2021). The EDS1–PAD4–ADR1 node mediates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Nature.* 598(7881):495-499.
- Pombo, M. A., Zheng, Y., Fernandez-Pozo, N., Dunham, D. M., Fei, Z. y Martin, G. B. (2014). Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins. *Genome Biol.* 15(10):492.
- Pombo, M. A., Zheng, Y., Fei, Z., Martin, G. B., y Rosli, H. G. (2017). Use of RNA-seq data to identify and validate RT-qPCR reference genes for studying the tomato-*Pseudomonas* pathosystem. *Sci. Rep.* 7(1):44905.

- Pombo, M. A., Ramos, R. N., Zheng, Y., Fei, Z., Martin, G. B., y Rosli, H. G. (2019). Transcriptome-based identification and validation of reference genes for plant-bacteria interaction studies using *Nicotiana benthamiana*. *Sci. Rep.* 9(1):1632.
- Qi, T., Seong, K., Thomazella, D. P., Kim, J. R., Pham, J., Seo, E., y Staskawicz, B. J. (2018). NRG1 functions downstream of EDS1 to regulate TIR-NLR-mediated plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. *PNAS.* 115(46):10979-10987.
- Qiu, D. X. J., Ding, X., Xiong, M., Cai, M., Cao, Y., Li, X., Xu, C., y Wang, S. (2007). OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20(5):492-499.
- Ramos, R. N., Martin, G. B., Pombo, M. A. y Rosli, H. G. (2021). WRKY22 and WRKY25 transcription factors are positive regulators of defense responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* 105(1–2):65–82.
- Ramos, R. N., Zhang, N., Lauff, D. B., Valenzuela-Riffo, F., Figueroa, C. R., Martin, G. B., Pombo, M. A. y Rosli, H. G. (2023). Loss-of-function mutations in WRKY22 and WRKY25 impair stomatal-mediated immunity and PTI and ETI responses against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Mol. Biol.* 1:17.
- Rentel, M. C., Leonelli, L., Dahlbeck, D., Zhao, B., y Staskawicz, B. J. (2008). Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *PNAS.* 105(3):1091-1096.
- Rizhsky, L., Liang, H., y Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in *tobacco*. *Plant Physiol.* 130:1143-2115.
- Robatzek, S., y Somssich, I. E. (2001). A new member of the *Arabidopsis* WRKtranscription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* 28(2):123-133.
- Roberts, R., Hind, S. R., Pedley, K. F., Diner, B. A., Szarzanowicz, M. J., Luciano, Rosario D., Majhi, B. B., Popov, G., Sessa, G., Oh, C. S., y Martin, G. B. (2019). Mail protein acts between host recognition of pathogen effectors and mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 32:1496-1507.
- Robles Luna, G., Peña, E. J., Borniego, M. B., Heinlein, M., y Garcia, M. L. (2013). Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology.* 441(2):152-161.
- Rosli, H. G., Zheng, Y., Pombo, M. A., Zhong, S., Bombarely, A., Fei, Z., Collmer, A. y Martin, G. B. (2013). Transcriptomics-based screen for genes induced by flagellin and repressed by pathogen effectors identifies a cell wall-associated kinase involved in plant immunity. *Genome Biol.* 14(12):1-15.
- Rosli, H. G. y Martin, G. B. (2015). Functional genomics of tomato for the study of plant immunity. *Brief. Funct. Genomics.* 14(4):291–301.
- Roussin-Léveillé, C., Lajeunesse, G., St-Amand, M., Veerapen, V. P., Silva-Martins, G., Nomura, K., y Moffett, P. (2022). Evolutionarily conserved bacterial effectors hijack abscisic acid signaling to induce an aqueous environment in the apoplast. *Cell Host Microbe.* 30(4):489-501.

- Rushton, P. J., Macdonald, H., Huttly, A. K., Lazarus, C. M., y Hooley, R. (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of *a-Amy2* genes. *Plant Mol. Biol.* 29(4):691-702.
- Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., y Somssich, I. E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO J.* 15(20):5690-5700.
- Rushton, P. J., Bokowiec, M. T., Han, S., Zhang, H., Brannock, J. F., Chen, X., y Timko, M. P. (2008). *Tobacco* transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the *Solanaceae*. *Plant Physiol.* 147(1):280-295.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., y Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci.* 15:247-258.
- Sacco, M. A., Koropacka, K., Grenier, E., Jaubert, M. J., Blanchard, A., Goverse, A., y Moffett, P. (2009). The cyst nematode SPRYSEC protein RBP-1 elicits Gpa2- and RanGAP2-dependent plant cell death. *PLoS Path.* 5(8):1000564.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Lluch, Y., Gosalbes, M. J., Zacarias, L., Granell, A., Lafuente, M. T. (2003). A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta.* 218:65-70.
- Sarris, P. F., Duxbury, Z., Huh, S. U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S. B., Wirthmueller, L., Menke, F. L. H., Sohn, K. H., y Jones, J. D. G. (2015). A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell.* 161(5):1089-1100.
- Saucet, S. B., Esmenjaud, D., y Van Ghelder, C. (2021). Integrity of the post-LRR domain is required for TIR-NB-LRR function. *Mol. Plant Microbe Interact.* 34(3):286-296.
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., Bruggmann, R. y Consortium TG (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature.* 485(7400):635-641.
- Scarpeci, T. E., Zanol, M. I., y Valle, E. M. (2017). Estimation of stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana* using silicone rubber imprints. *Bio Protocol.* 7(12):2347-2347.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Meth.* 9(7):671-675.
- Schön, M., Töller, A., Diezel, C., Roth, C., Westphal, L., Wiermer, M., y Somssich, I. E. (2013). Analyses of *wrky18 wrky40* plants reveal critical roles of SA/EDS1 signaling and indole-glucosinolate biosynthesis for *Golovinomyces orontii* resistance and a loss-of resistance towards *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRPS4. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26(7):758-767.
- Schultink, A., Qi, T., Lee, A., Steinbrenner, A. D., y Staskawicz, B. (2017). Roq1 mediates recognition of the *Xanthomonas* and *Pseudomonas* effector proteins XopQ and HopQ1. *Plant J.* 92(5):787-795.
- Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. (2018). Cadena del tomate para la industria. Ministerio de Agroindustria.

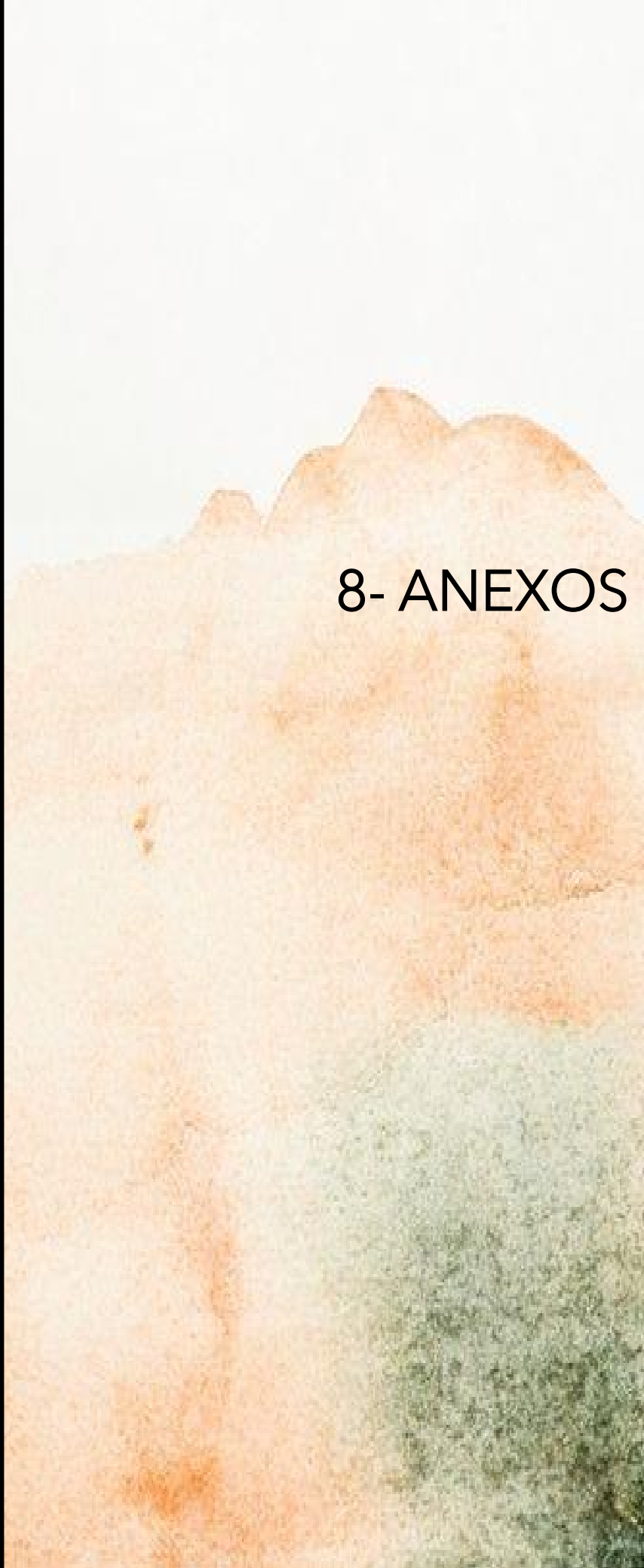
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., y Gao, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnol.* 31(8):686-688.
- Shao, Z. Q., Xue, J. Y., Wu, P., Zhang, Y. M., Wu, Y., Hang, Y. Y., y Chen, J. Q. (2016). Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns. *Plant Physiol.* 170(4):2095-2109.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., y Ben-Nissan, G. (2010). Jasmonate perception by inositolphosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature.* 468:400-5
- Shen, Q. H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., y Schulze-Lefert, P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science.* 315(5815):1098-1103.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., y Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Sys. Biol.* 7(1):539.
- Singh, K. B., Foley, R. C., y Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(5):430-436.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., y Raab, T. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science.* 306:2206-2211.
- Stock J., Bräutigam A., Melzer M., Bienert G. P., Bunk B., Nagel M., y Mock H. P. (2020). The transcription factor WRKY22 is required during cryo-stress acclimation in *Arabidopsis* shoot tips. *J. Exp. Bot.* 71(16):4993-5009.
- Strader, L., Weijers, D., y Wagner, D. (2022). Plant transcription factors: being in the right place with the right company. *Curr. Opin. Plant Biol.* 65:102-136.
- Sun, Y. y Yu, D. (2015). Activated expression of AtWRKY53 negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement. *Plant Cell Rep.* 34(8):1295-1306.
- Sun, X. C., Gao, Y. F., Li, H. R., Yang, S. Z. y Liu, Y. S. (2015). Over-expression of SIWRKY39 leads to enhanced resistance to multiple stress factors in tomato. *J. Plant Biol.* 58(1):52-60.
- Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y., y Martin, G. B. (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science.* 274(5295):2060-2063.
- Takken, F. L., Albrecht, M., y Tameling, W. I. (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(4):383-390.
- Tena, G., Boudsocq, M., y Sheen, J. (2011). Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(5):519-529.
- Tian, H., Wu, Z., Chen, S., Ao, K., Huang, W., Yaghmaiean, H., y Zhang, Y. (2021). Activation of TIR signalling boosts pattern-triggered immunity. *Nature.* 598(7881):500-503.

- Tierens, K. F. J., Thomma, B. P., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., y Broekaert, W. F. (2001). Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiol.* 125(4):1688-1699.
- Thilmony, R. L., Chen, Z., Bressan, R. A., y Martin, G. B. (1995). Expression of the tomato Pto gene in *tobacco* enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing avrPto. *Plant Cell.* 7(10):1529-1536.
- Tsuda K., y Somssich I. E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol.* 206(3):932-947.
- Todesco, M., y de Felippes, F. F. (2016). Why *benthamiana* went viral. *Trends Plant Sci.* 21(1):4-6.
- Ülker, B., y Somssich, I. E. (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(5):491-498.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., y Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40(15):115-115.
- Van Der Vossen, E. A., Van Der Voort, J. N. R., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D. C., y Klein-Lankhorst, R. M. (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J.* 23(5):567-576.
- van Verk, M. C., Pappaioannou, D., Neeleman, L., Bol, J. F., y Linthorst, H. J. (2008). A novel WRKY transcription factor is required for induction of *PR-1a* gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors. *Plant Physiol.* 146(4):1983-1995.
- Velásquez, A. C., Chakravarthy, S., y Martin, G. B. (2009). Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *JoVE.* 28:1292.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., y Baulcombe, D. (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33(5):949-956.
- Wan, J., Zhang, S., y Stacey, G. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Mol. Plant Pathol.* 5(2):125-135.
- Wan, J., Zhang, X. C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S. Y., Stacey, M. G., y Stacey, G. (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 20:471-481.
- Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.M., Kang, L., y Mysore, K.S. (2012). Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol.* 158:1789-1802.
- Wang, W. M., Liu, P. Q., Xu, Y. J., y Xiao, S. (2016). Protein trafficking during plant innate immunity. *J. Int. Plant Biol.* 58(4):284-298.
- Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., y Chai, J. (2019a). Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science.* 364(6435):5870.

- Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., y Chai, J. (2019b). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*. 364(6435):5868.
- Wani, S. H., Anand, S., Singh, B., Bohra, A., y Joshi, R. (2021). WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. *Plant Cell Rep.* 40:1071-1085.
- Waterhouse P. M., y Fusaro A. F. (2006). Viruses face a double defense by plant small RNAs. *Plant Sci.* 313(5783):54-55
- Wei, C. F., Kvitko, B. H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J. R., Lin, N. C., y Collmer, A. (2007). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 51(1):32-46.
- Wei, H. L., Chakravarthy, S., Worley, J. N., y Collmer, A. (2013). Consequences of flagellin export through the type III secretion system of *Pseudomonas syringae* reveal a major difference in the innate immune systems of mammals and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Cell. Microbiol.* 15(4):601-618.
- Wei, H. L., Chakravarthy, S., Mathieu, J., Helmann, T. C., Stodghill, P., Swingle, B., Martin, G. B. y Collmer, A. (2015). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector polymutants reveal an interplay between HopAD1 and AvrPtoB. *Cell Host Microbe.* 17(6):752-762.
- Wei, H. L., Zhang, W., y Collmer, A. (2018). Modular study of the type III effector repertoire in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reveals a matrix of effector interplay in pathogenesis. *Cell Rep.* 23:1630-1638.
- Wiermer, M., Feys, B.J. y Parker, J.E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:383-389.
- Wroblewski, T., Tomczak, A., y Michelmore, R. (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* 3(2):259-273.
- Wong, J. H., Spartz, A. K., Park, M. Y., Du, M., y Gray, W. M. (2019). Mutation of a conserved motif of PP2C. D phosphatases confers SAUR immunity and constitutive activity. *Plant Physiol.* 181(1):353-366.
- Wu, S., Lu, D., Kabbage, M., Wei, H.L., Swingle, B., Records, A.R., Dickman, M., He, P., y Shan, L. (2011). Bacterial effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* innate immunity at the plasma membrane. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:585-593.
- Wu, C. H., y Kamoun, S. (2019). Tomato Prf requires NLR helpers NRC2 and NRC3 to confer resistance against the bacterial speck pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. In VI International Symposium on Tomato Diseases: Managing Tomato Diseases in the Face of Globalization and Climate Change 1316 (pp. 61-66).
- Xiao, J., Cheng, H., Li, X., Xiao, J., Xu, C., y Wang, S. (2013). Rice WRKY13 regulates cross talk between abiotic and biotic stress signaling pathways by selective binding to different cis-elements. *Plant Physiol.* 163(4):1868-1882.

- Xie, Z., Zhang, Z. L., Zou, X., Huang, J., Ruas, P., Thompson, D., y Shen, Q. J. (2005). Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol.* 137(1):176-189.
- Xin, X. F., y He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 51:473-498.
- Xu, X., Chen, C., Fan, B., y Chen, Z. (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell.* 18(5):1310-1326.
- Xu, Y. P., Xu, H., Wang, B., y Su, X. D. (2020). Crystal structures of N-terminal WRKY transcription factors and DNA complexes. *Protein Cell.* 11(3):208-213.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Watanabe, S., Inoue, M., Yamasaki, T., Seki, M., y Yokoyama, S. (2012). Structural basis for sequence-specific DNA recognition by an *Arabidopsis* WRKY transcription factor. *J. Biol. Chem.* 287(10):7683-7691.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Seki, M., Shinozaki, K., y Yokoyama, S. (2013). DNA binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends Plant Sci.* 18(5):267-276.
- Yan, J., Chen, Q., Cui, X., Zhao, P., Gao, S., Yang, B., y Jiang, Y. Q. (2021). Ectopic overexpression of a membrane-tethered transcription factor gene *NAC60* from oilseed rape positively modulates programmed cell death and age-triggered leaf senescence. *Plant J.* 105(3):600-618.
- Yang, H., Li, Y., y Hua, J. (2006). The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 48(2):238-248.
- Yang, L., Li, L., Hai-Yang, L., Sen, L., Feng, X. y Ling-Ling, C. (2014). CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol. Plant.* 7(9):1494-1496.
- Yeam, I., Nguyen, H. P., y Martin, G. B. (2010). Phosphorylation of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto is required for FLS2/BAK1-independent virulence activity and recognition by *tobacco*. *Plant J.* 61(1), 16-24.
- Yeats, T. H., y Rose, J. K. (2013). The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* 163(1):5-20.
- Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., Cai, B., Zhou, J. M., He, S. Y. y Xin, X. F. (2021). Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature.* 592(7852):105-109.
- Zeng, W., Melotto, M., y He, S. Y. (2010). Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21(5), 599-603.
- Zeng, W., y He, S. Y. (2010). A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 153(3):1188-1198.

- Zeng, L., Velásquez, A. C., Munkvold, K. R., Zhang, J., y Martin, G. B. (2012). A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB. *Plant J.* 69(1):92-103.
- Zhang, S., y Klessig, D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6(11):520-527.
- Zhang, Y. y Wang, L. (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol. Biol.* 5:1-12.
- Zhang, W., He, S. Y., y Assmann, S. M. (2008). The plant innate immunity response in stomatal guard cells invokes G-protein-dependent ion channel regulation. *Plant J.* 56(6):984-996.
- Zhang, J. P. Y., y Guo, Z. (2008). Constitutive expression of pathogen inducible *OsWRKY31* enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants. *Cell Res.* 18(4):508-521.
- Zhang, N., Pombo, M. A., Rosli, H. G., y Martin, G. B. (2020). Tomato wall-associated kinase SIWak1 depends on Fls2/Fls3 to promote apoplastic immune responses to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.* 183(4):1869-1882.
- Zhang, F., Fang, H., Wang, M., He, F., Tao, H., Wang, R., y Ning, Y. (2022). APIP5 functions as a transcription factor and an RNA-binding protein to modulate cell death and immunity in rice. *Nucleic Acids Res.* 50(9):5064-5079.
- Zheng, Z., Qamar, S. A., Chen, Z. y Mengiste, T. (2006). *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J.* 48(4):592-605.
- Zheng, Y., Jiao, C., Sun, H., Rosli, H. G., Pombo, M. A., Zhang, P., Banf, M., Dai, X., Martin, G. B., Giovannoni, J. J., Zhao, P. X., Rhee, S. Y., y Fei, Z. (2016). iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Mol. Plant.* 9:1667-1670.
- Zhong, Y., y Cheng, Z. M. (2016). A unique RPW8-encoding class of genes that originated in early land plants and evolved through domain fission, fusion, and duplication. *Sci. Rep.* 6(1):32923.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., y Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell.* 125(4):749-760.



8- ANEXOS



WRKY22 and WRKY25 transcription factors are positive regulators of defense responses in *Nicotiana benthamiana*

Romina N. Ramos^{1,2} · Gregory B. Martin^{3,4} · Marina A. Pombo¹ · Hernan G. Rosli¹

Received: 20 December 2019 / Accepted: 2 September 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Key message NbWRKY22 and NbWRKY25 are required for full activation of bacteria-associated pattern- and effector-triggered immunity as well as for the response to other non-bacterial defense elicitors.

Abstract Plants defend themselves against pathogens using a two-layered immune system. Pattern-triggered immunity (PTI) can be activated upon recognition of epitopes from flagellin including flg22. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) delivers effector proteins into the plant cell to promote host susceptibility. However, some plants express resistance (R) proteins that recognize specific effectors leading to the activation of effector-triggered immunity (ETI). Resistant tomato lines such as Rio Grande-PtoR (RG-PtoR) recognize two *Pst* effectors, AvrPto and AvrPtoB, and activate ETI through the Pto/Prf protein complex. Using RNA-seq, we identified two tomato WRKY transcription factor genes, *SIWRKY22* and *SIWRKY25*, whose expression is increased during *Pst*-induced ETI. Silencing of the *WRKY25/22* orthologous genes in *Nicotiana benthamiana* led to a delay in programmed cell death normally associated with AvrPto recognition or several non-bacterial effector/R protein pairs. An increase in disease symptoms was observed in silenced plants infiltrated with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* expressing AvrPto or HopQ1-1. Expression of both tomato *WRKY* genes is also induced upon treatment with flg22 and callose deposition and cell death suppression assays in *WRKY25/22*-silenced *N. benthamiana* plants supported their involvement in PTI. Our results reveal an important role for two WRKYs as positive regulators of plant immunity against bacterial and potentially non-bacterial pathogens.

Keywords Bacterial speck disease · Plant immunity · *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* · WRKY transcription factors

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11103-020-01069-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marina A. Pombo
mpombo@agro.unlp.edu.ar

- ¹ INFIVE, Instituto de Fisiología Vegetal, Universidad Nacional de La Plata, CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina
- ² Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina
- ³ Boyce Thompson Institute for Plant Research, 533 Tower Road, Ithaca, NY 14853, USA
- ⁴ Section of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

Introduction

Plants have evolved elaborate mechanisms to defend themselves against pathogens. A first defense layer involves the detection of epitopes from conserved molecules that are of key importance to pathogens. These molecules are referred to as microbe-associated molecular patterns (MAMPs) (Dodds and Rathjen 2010; Schwessinger and Ronald 2012). MAMPs are recognized by extracellular domains of pattern recognition receptors (PRR), resulting in the activation of pattern-triggered immunity (PTI) (Segonzac and Zipfel 2011; Boutrot and Zipfel 2017). During this response, several host cellular events are activated to prevent pathogen invasion and multiplication. These include rapid generation of reactive oxygen species (ROS), callose deposition at the cell wall, calcium flux, stomata closure, activation of MAPK cascades and transcriptional reprogramming (Nguyen et al. 2010; Monaghan and Zipfel 2012; Rosli et al. 2013; Li et al. 2016). Bacterial pathogens such as *Pseudomonas syringae*

pv. tomato (Pst) use a type III secretion system to deliver virulence proteins (effectors) into the plant cell. Effectors have the ability to undermine PTI and manipulate other host metabolic processes facilitating pathogen proliferation in the apoplast (Dodds and Rathjen 2010; Feng and Zhou 2012; Macho 2016; Toruño et al. 2016).

Resistant plants have acquired intracellular nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing (NLR) proteins that can detect directly or indirectly the presence of specific bacterial effectors. This recognition triggers the second layer of defense referred to as effector-triggered immunity (ETI) (Moffet 2009; Maekawa et al. 2011). The ETI response is prolonged in time and more robust compared with PTI (Tsuda and Katagiri 2010) and leads to cellular changes that include ROS production, MAPK cascade activation, leakage of electrolytes from dying cells into the apoplast and transcriptional reprogramming (Chandra et al. 1996; Jia and Martin 1999; Jones and Dangl 2006; Tsuda et al. 2009). This immune response is often associated with a hypersensitive response (HR) that culminates in a localized programmed cell death (PCD) that is thought to restrict pathogen spread (Jones and Dangl 2006; Dodds and Rathjen 2010). Some effectors are involved in the suppression of this immune response (Abramovitch and Martin 2005; Wei et al. 2018).

The interaction of tomato (*Solanum lycopersicum*) with *Pst* is a model system to investigate the molecular basis of bacterial pathogenesis and plant immunity (Pedley and Martin 2003; Oh and Martin 2011a). *Pst*, the causative agent of tomato bacterial speck disease, can also be manipulated to infect other model plants such as *Nicotiana benthamiana* (Wei et al. 2007). The detection of bacterial flagellin by tomato relies on the perception of either of two epitopes: a 22-amino acid region (flg22) recognized by flagellin sensing 2 (Fls2) (Gomez-Gomez et al. 2000; Chinchilla et al. 2006) and flgII-28 recognized by flagellin sensing 3 (Fls3) (Hind et al. 2016). *Pst* strain DC3000 is a well-studied pathogen that is able to translocate nearly 30 effectors into plant cells (Xin and He 2013). Two of these effectors, AvrPto and AvrPtoB, interfere with PRR functions and thereby diminish the host PTI response promoting bacterial virulence (Cunnac et al. 2011; Rosli et al. 2013). In resistant tomato plants, AvrPto and AvrPtoB recognition and activation of ETI involve members of the Pto and Fen kinase family (Kraus et al. 2016), along with the NB-LRR protein Prf (Martin et al. 1993; Tang et al. 1996; Pedley and Martin 2003; Oh and Martin 2011a). The genes that encode for Pto/Fen and Prf lie within a 40-kb region on chromosome 5 derived from *Solanum pimpinellifolium* and they have been introgressed into many tomato varieties to confer resistance to bacterial speck disease (Pilowsky 1982; Pilowsky et al. 1986). Previous works demonstrate that signaling events downstream of diverse pathogens' recognition are conserved between tomato

and *N. benthamiana* (Ekegren et al. 2003; del Pozo et al. 2004). Two protein kinases, MAPKKK alpha (M3K α) and MAPKK (MKK2), participate in PCD activation associated to ETI, due to Pto/Prf recognition of AvrPto effector in both species (Ekegren et al. 2003; del Pozo et al. 2004; Pedley and Martin 2004; Pedley and Martin 2005). Other players in this signaling cascade were then identified among proteins interacting with these MAP kinases (Oh et al. 2010; Oh and Martin 2011b; Roberts et al. 2019).

PTI- and ETI-immune responses induce transcriptional changes of a large number of genes, including many that encode for protein kinases and transcription factors, which could be involved in the regulation of the immune responses (Navarro et al. 2004; Rosli et al. 2013; Pombo et al. 2014). Transcription factors are among the most largely expanded gene families in plants (Lehti-Shiu et al. 2017) and are important components of the molecular networks that regulate plant disease resistance (Yu and Chen 2001; Dang et al. 2013; Dong et al. 2015). In particular, WRKYs play important roles in the regulation of various physiological programs, including abiotic stress, such as wounding, drought, cold adaptation and heat-induced chilling tolerance (Huang et al. 2002; Rizhsky et al. 2002; Sanchez-Ballesta et al. 2003), senescence (Robatzek and Somssich 2001), trichome development (Johnson et al. 2002) and biotic stress (Pandey and Somssich 2009; Hsu et al. 2013; Li et al. 2015).

WRKYs belong to a large family of transcriptional regulators with two highly conserved domains, the WRKY domain that includes the amino acid sequence WRKYGQK at the N-terminal region and a zinc-finger motif at the C-terminal end (Eulgem et al. 2000; Rushton et al. 2010; Cheng et al. 2017). These transcription factors are categorized into four groups (I, II, III, IV) according to the number of WRKY domains and features of their zinc-finger motif (Ishihama et al. 2012; Rinerson et al. 2015). WRKYs primarily bind W-boxes [TTGAC(C/T)] present in the promoter region of genes to modulate their expression (Eulgem et al. 2000; Rushton et al. 2010).

The role of WRKYs as regulators of plant defense against pathogens has been intensively studied (Pandey and Somssich 2009; Liu et al. 2017; Birkenbihl et al. 2018; Luan et al. 2019). In particular, studies of *Arabidopsis thaliana* demonstrate that different WRKYs are implicated in responses to different pathogens. *AtWRKY22* and *AtWRKY29* have been identified as important downstream components of a MAPK pathway that confers resistance to bacterial and fungal pathogens (Asai et al. 2002; Hsu et al. 2013). Also, *AtWRKY18* can positively modulate defense-related gene expression and disease resistance (Chen and Chen 2002). Similarly *AtWRKY33* (Birkenbihl et al. 2012), *AtWRKY41* (Higashi et al. 2008), *AtWRKY52* (Lahaye 2002), *AtWRKY70* (Knoth et al. 2007), *AtWRKY38* and *AtWRKY62* (Kim et al. 2008) are implicated in the host response to pathogens.

Tomato has 83 predicted *SIWRKY* genes (Huang et al. 2012; Karkute et al. 2018), many of which function as positive regulators of plant responses to biotic stress. *SIWRKY31* and *SIWRKY33*, orthologs of *AtWRKY33*, were able to complement the compromised response to *Botrytis cinerea* of *Arabidopsis atwrky33* mutants (Zheng et al. 2006). Over-expression of *SIWRKY45*, the ortholog of *AtWRKY40*, enhanced tomato susceptibility to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* (Chinnapandi et al. 2017). *SIWRKY39* gene expression was significantly upregulated in tomato upon challenge with *Pst* (Huang et al. 2012; Sun et al. 2015), while *SIWRKY72a* and *SIWRKY72b* contributed positively to PTI against both root-knot nematode (*M. javanica*) and potato aphid (*Macrosiphum euphorviae*) (Bhattarai et al. 2010).

Using an RNA-seq approach we previously identified a set of genes whose expression was altered upon PTI and/or ETI induction (Rosli et al. 2013; Pombo et al. 2014). In particular, two previously uncharacterized tomato WRKY genes, *SIWRKY22* and *SIWRKY25*, were induced 6 h after Pto/Prf-mediated ETI was activated by *Pst* inoculation. In the present study, we analyzed the participation of these transcription factors in plant immunity through virus-induced gene silencing in *N. benthamiana*. We found that silencing the *N. benthamiana* orthologs of *WRKY22* and *WRKY25* led to plants with compromised PTI and ETI responses to *Pst*. We additionally observed compromised ETI activation in response to several non-bacterial pathogen elicitors, indicating these transcription factors have broadly important roles as positive regulators of plant immunity.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Pseudomonas spp. strains were grown on solid King's B medium (KBM) at 30 °C. *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli* were grown on Luria–Bertani (LB) medium at 28 °C and 37 °C, respectively. Antibiotics used were: ampicillin (50 µg/mL), kanamycin (50 µg/mL), rifampicin (10 µg/mL), gentamycin (50 µg/mL) and spectinomycin (50 µg/mL). Details of the bacterial strains are provided in Supplementary Table S1.

Plant growth and infiltrations

Nicotiana benthamiana wild type (Nb-1; Bombarely et al. 2012) and *N. benthamiana*-35S:*Pto* were grown at 22 °C with 16 h day length. Plants were syringe-infiltrated with different strains and kept in the same conditions until the end of the experiments.

Phylogenetic analysis

Arabidopsis thaliana, tomato and *N. benthamiana* WRKY amino acid sequences belonging to group II-e were obtained from TAIR (Huala et al. 2001), Sol Genomics Network (SGN) (Fernandez-Pozo et al. 2015a) and iTAK (Zheng et al. 2016), respectively. SeaView program (Gouy et al. 2010) was used to perform the phylogenetic analysis (PhyML) with default parameters for JTT method with 100 bootstraps. The tree figure was created using FigTree (<https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Promoter analysis

SIWRKY22, *SIWRKY25*, *NbWRKY22a* and *b* and *NbWRKY25a* and *b* DNA sequences were obtained from SGN (Fernandez-Pozo et al. 2015a). For the analysis a 1500-pb region upstream of the annotated transcription start site was used. The W-box *cis*-element (TTGAC/T) identification was performed using Plant.PAN 2.0 (Chow et al. 2015).

Virus-induced gene silencing (VIGS)

N. benthamiana genes Niben101Scf09512g02006.1 and Niben101Scf03239g00001.1 (orthologs of *SIWRKY22*), and Niben101Scf09057g01009.1 and Niben101Scf04871g19004.1 (orthologs of *SIWRKY25*), were selected for designing VIGS constructs (Bombarely et al. 2012). Fragments of around 350 bp were chosen using the SGN VIGS tool (Fernandez-Pozo et al. 2015b) and were introduced in Primer3 (Untergasser et al. 2012) for primer design. In Supplementary Table S2, VIGS primer sequences and fragment sizes obtained are shown. PCR amplification was performed using cDNA obtained from *N. benthamiana* leaf tissue. *NbWRKY22* and *NbWRKY25* fragments were combined by PCR to create a concatenated construct named *NbWRKY25/22*. PCR products were cloned into pCRTM8/GW/TOPOTM Cloning kit (Life Technologies, USA) and recombined into a Gateway compatible TRV2 vector (pQ11) (Liu et al. 2002). After confirmation by sequencing, plasmids were transformed into chemically competent *A. tumefaciens* GV2260. VIGS was performed as described earlier (Velasquez et al. 2009). A TRV2 construct containing an *E. coli* gene-based fragment (*EcI*, which contains a 56% GC and not a single > 17 bp-long 100% identical stretch in *N. benthamiana*) was used as a negative control (Rosli et al. 2013) while fragments based on *NbM3Kα* (Niben101Scf01795g10003.1), *SIPrf* (Solyc05g013280), *SIFls2* (Solyc02g070890), *NbSAG101* (Niben101Scf01300g01009.1) (Pombo et al. 2014; Gantner et al. 2019) were used as a positive controls depending on the type of experiment. The nucleotide sequence of each fragment used for silencing is provided in Supplementary

Table S3. Silenced plants were used to perform the experiments described below, in at least three independent assays in which we observed similar results.

Programmed cell death (PCD) assays

A. tumefaciens GV2260 strains carrying pBTEX:*Pto* or pBTEX:*avrPto* were grown overnight on solid LB medium (rifampicin and kanamycin). The following day the strains were incubated 5 h in 10 mM MES, 10 mM MgCl₂ with 200 μM acetosyringone. Induced cultures were washed twice with 10 mM MES, 10 mM MgCl₂ and combined in a 1:1 ratio with a final OD⁶⁰⁰ = 0.10 and 200 μM acetosyringone. The resulting suspensions were syringe-infiltrated into leaves of six-week old silenced plants. Scoring was performed visually during several days as follows: PCD, more than 80% of the infiltrated area (within a marked circle) with macroscopic cell death; partial PCD, between 80 to 25% of the infiltrated area with macroscopic cell death; No PCD, less than 25% of the infiltrated area with macroscopic cell death. The number of infiltrated areas in each category was then used to calculate the PCD percentage.

Disease assays using *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

N. benthamiana or *N. benthamiana*-35S::*Pto* VIGS-silenced plants were syringe-infiltrated with 10⁵ colony-forming units (cfu)/mL *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*P. s.* pv. *tabaci*) expressing HopQ1-1, AvrPto or carrying an empty vector. The scoring was performed as described above (PCD assay), but considering the presence of disease-associated cell death.

Bacterial population assays

Six-week-old silenced plants were syringe-infiltrated with a suspension of 8 × 10⁴ cfu/mL *P. s.* pv. *tabaci* expressing AvrPto. To measure the bacterial population, three 0.38 cm² disks were taken from the infiltrated area and processed with 0.25 mL of 10 mM MgCl₂. The volume was adjusted to 1 mL and serial dilutions were plated on solid LB medium with antibiotics. The plates were incubated over-night at 28 °C and then the cfu number was determined. Four biological replicates per construct were used.

Agrobacterium-mediated transient assays

Elicitors were transiently expressed in VIGS *N. benthamiana* plants to induce PCD. Pto/AvrPto, potato (*Solanum tuberosum*) Rx2/coat protein of PVX (Van Der Vossen et al. 2000), *Arabidopsis thaliana* RPP13/ART13^{Emco5}-Δ41aa from the oomycete *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Rentel et al.

2008), potato Gpa2/RBP-1 from the potato cyst nematode (Sacco et al. 2009) and Pto alone were expressed under the 35S promoter (pBTEX). SIM3Kα full length (FL) and lacking the kinase domain (KD⁻) and MKK2 wild type (WT) and auto-activated (D^D) were expressed using an estradiol-inducible system (pER8). Expression was induced 48 h after infiltration (hai) with 2 μM estradiol along with 0.02% Tween 20.

Callose deposition assays

Determination of callose deposition was performed as previously described (Nguyen et al. 2010) with minor modifications. Leaves of four-week old silenced *N. benthamiana* plants were syringe-infiltrated with a suspension of 1 × 10⁸ cfu/mL *Pseudomonas fluorescens* 55. Leaf disks of 10 mm in diameter were excised from the infiltrated area at 24 and 48 hai. After that, disks were incubated at room temperature in 6-well plates containing 2 mL 96% ethanol until complete removal of chlorophyll (24 h). The cleared leaf disks were washed twice with 70% ethanol and three times with bi-distilled water (ddH₂O). The leaf disks were submerged in 1% aniline blue in 150 mM K₂HPO₄ (pH 9.5/KOH) and incubated in the dark for 1 h. The stained leaf disks were mounted with ddH₂O on glass slides and observed from the adaxial surface with a fluorescence microscope (Olympus BX51) using ultraviolet light and a 20× objective lens. Images of 0.4 mm² microscopy fields were captured using an Olympus digital camera, avoiding areas close to wounds generated by inoculation or by sample excision. The number and total area of callose depositions were quantified in complete fields using ImageJ-win64 analysis software.

Ion leakage measurements

Quantification of cellular electrolyte loss was performed as previously described (del Pozo et al. 2004) with slight changes. Leaves of silenced *N. benthamiana* plants were syringe-infiltrated with a suspension of 10⁵ cfu/mL *P. s.* pv. *tabaci* expressing AvrPto or HopQ1-1. Five disks (1 cm diameter) were taken from the infiltrated areas and floated on 5 mL ddH₂O for 4 h at room temperature with gentle shaking. Conductivity was then measured using a conductivity meter (Digicond IV, Luftman Co.).

NbWRKY22-, *NbWRKY25*- and *NbWRKY25/22*-silencing efficiency and *NbWRKYs* expression during Pto/Prf ETI-activation

For estimating silencing efficiency, 4 *N. benthamiana* silenced plants per construct (*Ec1*, *NbWRKY22*, *NbWRKY25* and *NbWRKY25/22*) were syringae-infiltrated with *P.*

fluorescens 55 as described above and samples taken at 5, 6, 7 h later (pooled for each plant and labeled as 6 hpi). *N. benthamiana*-35S:*Pto* leaves were syringae-infiltrated with *Pst* DC3000 Δ *HopQ1-1* Δ *fliC* and the quadruple mutant (*Pst* DC3000 Δ *HopQ1-1* Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* Δ *fliC*) and samples were taken at 6, 7, 8 hpi (pooled for each plant and labeled as 7 hpi) and 12 hpi. Total RNA was isolated using Tri-Reagent (Sigma Aldrich, USA) following the manufacturer's instructions. RNA integrity was assayed by 1% agarose gel electrophoresis. Total RNA (8 μ g) was processed with RQ1 RNase-free DNase (Promega, USA) for 60 min at 37 °C to eliminate potential DNA contamination and then purified using a chloroform:octanol mix (24:1). RNA concentration and purity was determined using a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech). Purified RNA (1 μ g) was used to prepare cDNA using M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) with random primers according to manufacturer's instructions. Due to high nucleotide sequence similarity (94.67% between *NbWRKY22a* and *NbWRKY22b*; 92% between *NbWRKY25a* and *NbWRKY25b*), one primer pair which annealed to both orthologs of each *SIWRKY* was designed with the bioinformatic tool available at <https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>. In addition, due to high sequence similarity (93%) a single primer pair was used to amplify both selected off-targets. Primer sequences are shown in Supplementary Table S2. RT-qPCR was performed in 96-well plates (Thermo Fisher Scientific) on a StepOnePlus system (Applied Biosystems). The reaction mix was composed of: 5 μ L of 2X SYBR Green/ROX Master Mix (PB-L, Bio-Logic Products), 2 μ L of 2 μ M primer mix, 0.2 μ L of 50X ROX, 2 μ L of a diluted 1:10 cDNA and miliQ water to complete 10 μ L final volume. Cycling conditions were 94 °C for 5 min and 45 cycles of 92 °C for 15 s, 60 °C for 20 s and 72 °C for 15 s. Three technical replicates were used. Data were normalized using *NbUbe35* and *NbNQO* (Pombo et al. 2019).

Cell death suppression assay

VIGS plants were tested for compromised PTI as described previously (Chakravarthy et al. 2010), with slight modifications. Leaves were induced by syringe infiltration with *P. fluorescens* 55 at $OD^{600}=0.5$ and 6 h later challenged, in a partially overlapping region, with DC3000 Δ *hopQ1-1* at $OD^{600}=0.01$. The appearance of disease-associated cell death in the overlapping area was scored at day three, using the categories: PTI breakdown (>80% of overlapping area with cell death), partial PTI breakdown (between 80 and 25% of overlapping area with cell death) and no PTI breakdown (<25% of overlapping area with cell death). Four plants per construct were used with four overlapping infiltration areas each.

Statistical analysis

In PCD-, disease-, and cell death suppression-assays we performed a non-parametric analysis using Fisher's exact test with a significance level of 5.0% (* $P < 0.05$) or 1.0% (** $P < 0.01$), using *Ec1*-silenced plants as control. For the analysis we computed infiltration sites with >80% (PCD, disease, CDSA) along with those with 80–25%.

Analysis of variance (ANOVA) with a significance level of 5.0% (* $P < 0.05$) or 1.0% (** $P < 0.01$) followed by Dunnett's test was selected for comparison of the means of ion leakage measurements, callose deposition quantification, bacterial population and RT-qPCR determinations. Control used was *Ec1*-silenced plants. Prior to every parametric analysis, the assumptions of normality (QQ-plot and Shapiro Wilks test) and homogeneity of variance (Levene test) were checked.

All experiments were carried out with a minimum of three independent replicates and performed at least three times.

Results

Identification of *SIWRKY22* and *SIWRKY25* as contributors to plant immunity

We previously used an RNA-seq approach to study the transcriptomic changes in tomato during its interaction with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 (Pombo et al. 2014). Infiltration of Río Grande (RG)-PtoR tomato plants, which express the Pto/Prf protein complex, with different *Pst* DC3000 strains allowed the dissection of PTI and ETI responses. In particular, the comparison between tomato plants inoculated with DC3000 Δ *avrPto* Δ *avrPtoB* Δ *fliC* (triple mutant) or DC3000 Δ *fliC* reflected transcriptional changes due to Pto/Prf-mediated ETI activation. Also, the comparison of plants inoculated with DC3000 triple and double mutant (DC3000 Δ *avrPto* Δ *avrPtoB*) assessed transcriptome changes due to flagellin-based PTI activation. From this analysis we identified two genes encoding WRKY transcription factors, *SIWRKY22* (Solyc01g095100) and *SIWRKY25* (Solyc10g011910), whose expression is induced specifically by Pto/Prf-mediated ETI 6 h after inoculation (hai) (Supplementary Fig. S1a).

We performed a phylogenetic analysis including *Arabidopsis thaliana*, tomato and *Nicotiana benthamiana* amino acid sequences of WRKY group II-e members (Supplementary Fig. S2 and Fig. 1). This revealed that *SIWRKY22* has two orthologous proteins in *N. benthamiana*, Niben101Scf09512g02006.1 (*NbWRKY22a*) and Niben101Scf03239g00001.1 (*NbWRKY22b*). Niben101Scf09057g01009.1 (*NbWRKY25a*) and

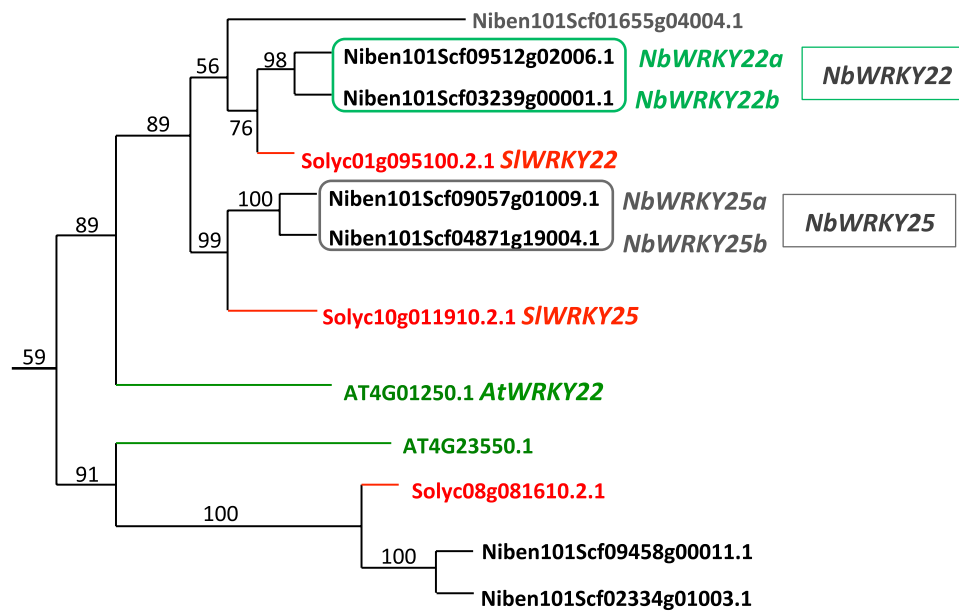


Fig. 1 Phylogenetic analysis of WRKY22 and WRKY25. Phylogenetic analysis including *Arabidopsis thaliana* (green), tomato (red) and *N. benthamiana* (black) II-e group of WRKY proteins closest to SIWRKY22 and SIWRKY25. Tomato and *N. benthamiana* WRKY22 and WRKY25 are labeled next to the corresponding accession number. The predicted targets of *N. benthamiana* constructs

(*NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab*) and the closest *A. thaliana* protein (*AtWRKY22*) are highlighted. A closely related *N. benthamiana* gene that is not expressed in leaves (based on *N. benthamiana* RNA-seq data) is shown in grey font. PhyML with a bootstrap of 100 replicates was used for the analysis

Niben101Scf04871g19004.1 (*NbWRKY25b*) are the corresponding orthologs of SIWRKY25. Both tomato and *N. benthamiana* WRKY25/22 transcription factors have a close protein in *A. thaliana* (*AtWRKY22*). Another *N. benthamiana* WRKY (Niben101Scf01655g04004.1) is grouped in the same small clade, but was not considered for future experiments because it was not expressed in *N. benthamiana* leaves, based on previous RNA-seq data (Pombo et al. 2019). To analyze if *N. benthamiana* WRKY genes are ETI-induced as their closest tomato orthologs, we infiltrated *N. benthamiana*-35S:*Pto* plants with *Pst* DC3000 Δ *HopQ1-1* Δ *fliC* and *Pst* DC3000 Δ *HopQ1-1* Δ *avrPto* Δ *avrPto* Δ *fliC* (quadruple mutant) and evaluated gene expression at 7 and 12 hai. The comparison between these two mutants accounts for AvrPto/Pto-associated ETI. In agreement with what we observed in tomato, *NbWRKY25a/b* and *NbWRKY22a/b* genes possess higher expression in the double compared with the quadruple mutant (Supplementary Fig. S1b). At a later time-point (12 hai) only *NbWRKY25a/b* transcriptional activation persists. Based on the iTAK database (Zheng et al. 2016) SIWRKY22 and SIWRKY25 are more similar to each other than to any other tomato WRKY transcription factor. In spite of this, their amino acid identity is only 55%. With this information in mind we could not exclude the possibility that SIWRKY22 and SIWRKY25 have non-redundant functions and we therefore chose to analyze their contribution to the immune response separately and together.

WRKY proteins are involved in diverse processes and regulate the expression of their target genes either as positive or negative regulators. In response to internal or external stimuli, WRKYs trigger the expression of the target genes by binding to W-box *cis*-elements in the promoter region. W-box elements are also present in the promoters of the majority of the WRKY genes, suggesting that they are auto-regulated or cross-regulated by other WRKYs (Eulgem et al. 2007; Rushton et al. 2010). We performed a bioinformatic analysis of *cis*-elements present in the upstream regions (–1500 bp) of the *SIWRKYs* and *NbWRKYs* to search for W-box motifs (Chow et al. 2015). Multiple W-box motifs (between one and four) could be identified in the promoters of the tomato and *N. benthamiana* genes (Supplementary Fig. S3a and S3b). These results suggest the possibility of auto-regulation and/or cross-regulation by other WRKYs.

Silencing of *SIWRKY25* and *SIWRKY22* orthologous genes in *N. benthamiana* compromises *Pto*/AvrPto-associated PCD

To test the possible role of these transcription factors in ETI, we performed virus-induced gene silencing (VIGS) in *N. benthamiana* plants, since VIGS is more effective in this species than in tomato. We initially were able to identify a fragment from the tomato *SIWRKY25* gene (*SIWRKY25* construct) which, based on the SGN VIGS

Tool (Fernandez-Pozo et al. 2015b), would potentially silence all four *N. benthamiana* *WRKY22ab* and *WRKY25ab* orthologous genes (Supplementary Fig. S4a; Supplementary Table S3). Fragments derived from *SIPrf* and from an *E. coli* gene (*Ec1*) were used as positive and negative controls, respectively (Supplementary Table S3). Leaves of the silenced plants were infiltrated with a mix of *Agrobacterium tumefaciens* strains carrying CaMV 35S:*Pto* and 35S:*avrPto* transgenes which induce strong PCD. Plants silenced with the *SIWRKY25* construct showed a delay in the development of PCD compared to *Ec1* control plants and no cell death was observed in *SIPrf*-silenced plants (Supplementary Fig. S5a). Next, *N. benthamiana* plants which stably express a 35S:*Pto* transgene were silenced with the same constructs and syringe-infiltrated with *P. s. pv. tabaci* strains carrying AvrPto or an empty vector as a control. Plants silenced with *SIWRKY25* or *SIPrf* developed more disease symptoms compared with *Ec1* control plants when infiltrated with *P. s. pv. tabaci* expressing AvrPto (Supplementary Fig. S5b). Together these experiments suggested that one or more of the *WRKY25/22* genes play a role in Pto/Prf-mediated ETI in *N. benthamiana*.

To test the role of the individual WRKYs we designed two constructs to silence their *N. benthamiana* orthologs, *NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab*, separately (Figs. 1, and 2a and Supplementary Fig. S4b; Supplementary Table S3). Due to high nucleotide sequence similarity it was not possible to silence orthologs *a* and *b* individually. Fragments based on *NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* were also joined by PCR to create an additional concatenated construct for silencing the four orthologous genes simultaneously (*NbWRKY25/22*) (Fig. 2a; Supplementary Table S3). Using each of these constructs, we observed a significant decrease in Pto/AvrPto elicited PCD compared with the *Ec1* control (Fig. 2b), confirming the phenotype observed with the tomato-based VIGS fragment. These results indicated that one or both of the *NbWRKY22ab* and one or both of the *NbWRKY25ab* genes contribute to ETI-associated PCD. Plants silenced using *NbWRKY22*, *NbWRKY25* and *NbWRKY25/22* constructs show no unusual morphological changes compared to the *Ec1* control (Supplementary Fig. S6).

The similar decrease in PCD when using the *NbWRKY25*, *NbWRKY22*, or *NbWRKY25/22* fragments could be explained if these VIGS constructs were not as specific as predicted and all four *N. benthamiana* orthologous genes were silenced regardless of the construct used. To test this possibility and to assess silencing efficiency we investigated their transcript abundance with RT-qPCR. Due to high sequence similarity between pairs of *N. benthamiana* orthologous genes, we designed primers to amplify simultaneously *NbWRKY22ab* or *NbWRKY25ab* (Supplementary Table S2). In agreement with the prediction of the SGN

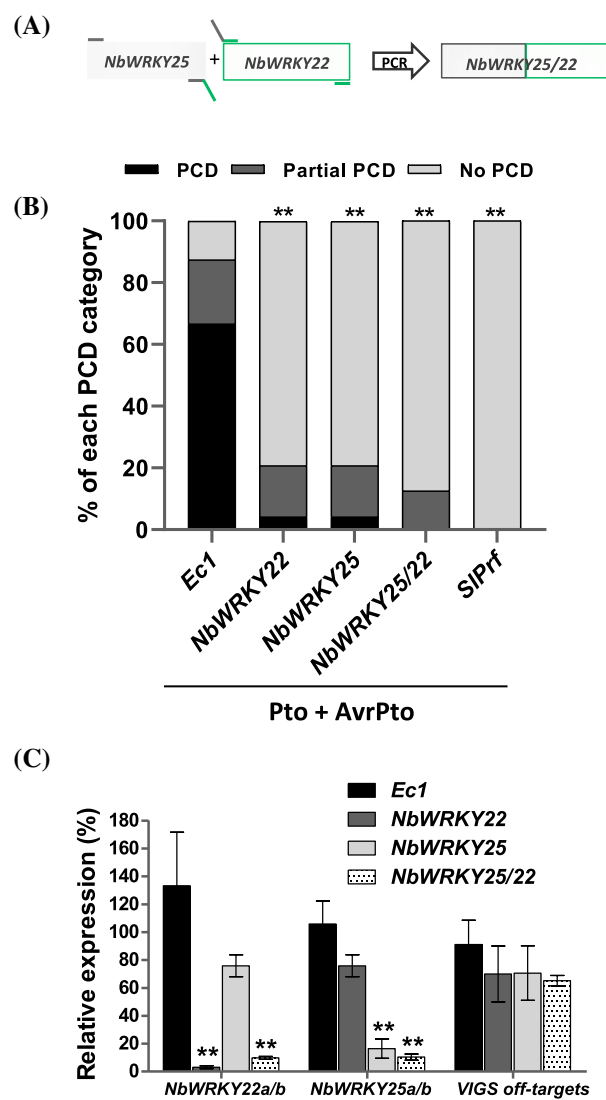


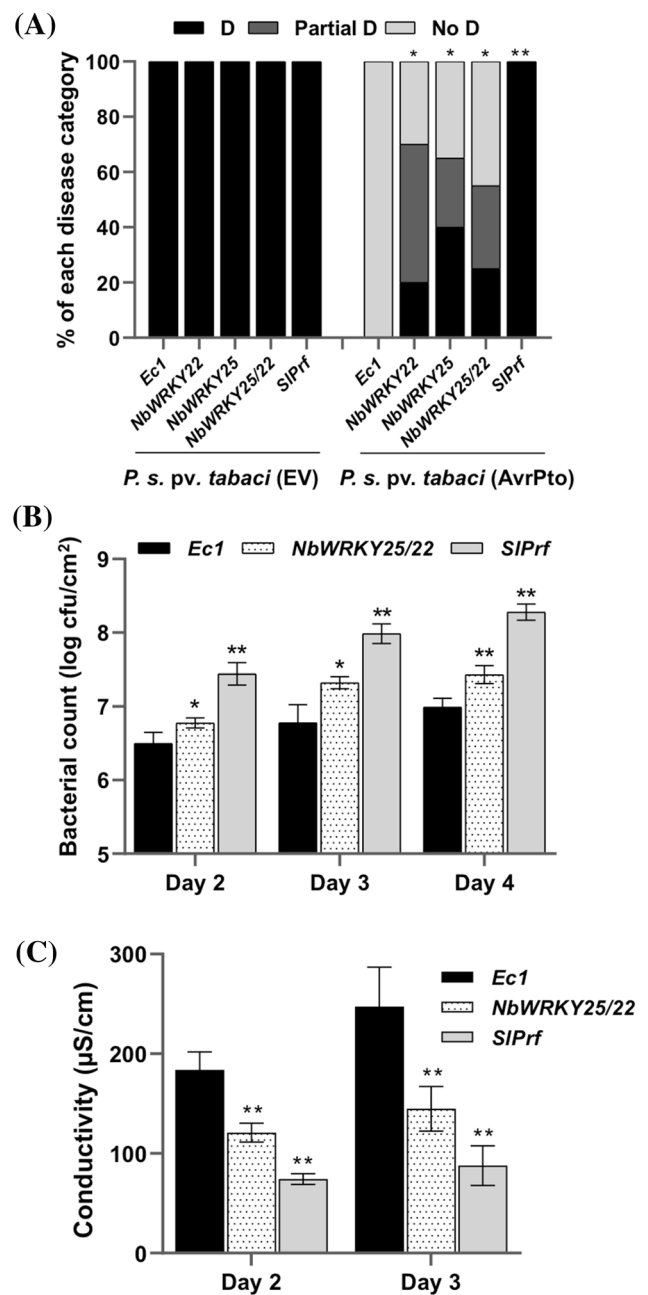
Fig. 2 Pto/AvrPto programmed cell death (PCD) is delayed in *N. benthamiana* silenced plants. **a** Strategy used for the generation of a concatenated construct. *NbWRKY25* (grey box) and *NbWRKY22* (green box) fragments were joined by PCR to create a construct that allows silencing four *N. benthamiana* WRKY genes simultaneously (*NbWRKY25/22*). Grey and green lines indicate the annealing position of each primer (Supplementary Table S2). **b** *N. benthamiana* silenced plants were syringe-infiltrated with *A. tumefaciens* strains expressing Pto and AvrPto proteins to elicit PCD. The degree of PCD was monitored visually using the three categories shown (see Materials and Methods). Four biological replicates per VIGS construct were analyzed. Double asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Fisher's exact test ($P < 0.01$). **c** *NbWRKY22* and *NbWRKY25* gene expression in *Ec1*, *NbWRKY22*, *NbWRKY25* and *NbWRKY25/22* silenced plants using RT-qPCR. *NbUbe35* and *NbNQO* were used as reference genes. The expression of genes shown in Supplementary Fig. S7 that were selected as possible VIGS off-targets was measured in all the silenced plants. Double asterisks indicate significant differences with *Ec1*-silenced plants using Dunnett's method ($P < 0.01$)

Fig. 3 Silencing of *N. benthamiana* WRKY genes compromises resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (AvrPto). **a** *N. benthamiana* plants expressing a stably-integrated 35S::Pto transgene were silenced for the genes shown and subsequently syringe-infiltrated with 1×10^5 cfu/mL *P. s. pv. tabaci* expressing AvrPto or carrying an empty vector (EV). The degree of disease was monitored visually. Percentage of the infiltrated leaf circles that developed disease is shown. Four plants were used for each VIGS construct. Double and single asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Fisher's exact test (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). **b** *P. s. pv. tabaci* (AvrPto) population sizes in leaves. Leaves of silenced plants were syringe-infiltrated with 5×10^4 cfu/mL *P. s. pv. tabaci* (AvrPto) and sampled to measure bacterial populations. Bars represent the mean of four plants per construct with their corresponding standard deviation. Double and single asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Dunnett's method (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). **c** Electrolyte leakage in silenced plants as a quantitative measure of PCD. Leaves of silenced plants were syringe-infiltrated with 1×10^5 cfu/mL *P. s. pv. tabaci* (AvrPto). Tissue disks were collected to measure electrolyte leakage at different time points. Data represents the mean of four plants per construct with their corresponding standard deviation. Double asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Dunnett's method ($P < 0.01$)

VIGS Tool shown in Supplementary Fig. S4b, in plants silenced with *NbWRKY22* or *NbWRKY25/22* constructs the transcript abundance of *NbWRKY22ab* was reduced by more than 90% compared with the *Ec1* control (Fig. 2c). A similar pattern was observed for *NbWRKY25ab*, showing a specific reduction of around 80% and 90% (compared with *Ec1*-silenced plants) in plants silenced with *NbWRKY25* and *NbWRKY25/22* constructs, respectively (Fig. 2c). To further analyze silencing specificity we made a phylogenetic analysis at the nucleotide level of the *N. benthamiana* genes *NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* (Supplementary Fig. S7). We designed primers to amplify simultaneously two closely-related genes (Niben101Scf02531g02001.1 and Niben101Scf00581g01013.1) that we referred to as potential VIGS off-targets. We found no difference in transcript abundance of these putative off-targets when comparing *Ec1*-, *NbWRKY22*-, *NbWRKY25*- and *NbWRKY25/22*-silenced plants (Fig. 2c). These results indicate that the three constructs possess both silencing efficiency and high specificity.

***NbWRKY25ab* and *NbWRKY22ab* contribute to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (AvrPto)**

To investigate the role of these transcription factors in Pto/Prf-mediated disease resistance, we silenced *N. benthamiana* 35S::Pto plants with *NbWRKY22*, *NbWRKY25*, *NbWRKY25/22* constructs and included *Ec1* and *SIPrf* as controls. Leaves were syringe-infiltrated with *P. s. pv. tabaci* strains expressing AvrPto or carrying an empty vector (EV). All of the plants infiltrated with *P. s. pv. tabaci* (EV) developed disease (Fig. 3a), suggesting that silencing



these WRKYs does not affect normal disease symptom development. As expected, *Ec1* plants infiltrated with *P. s. pv. tabaci* carrying AvrPto did not develop disease due to the recognition of AvrPto by Pto/Prf and subsequent activation of ETI. Plants silenced for the *NbWRKY* genes or *SIPrf* developed disease upon infiltration with *P. s. pv. tabaci* expressing AvrPto (Fig. 3a). Based on the fact that we observed a similar phenotype regardless of the construct used (*NbWRKY25*, *NbWRKY22* or *NbWRKY25/22*), we continued our experiments using only the concatenated construct, *NbWRKY25/22*.

Using the *N. benthamiana* 35S:*Pto* line, we measured bacterial populations in silenced leaves that had been syringe-infiltrated with *P. s. pv. tabaci* (AvrPto). Bacteria reached higher numbers in plants silenced for *NbWRKY25/22* and the *SlPrf* control compared with *Ec1* (Fig. 3b), indicating a compromised ETI response. As another approach to characterize ETI functionality in silenced plants, we used an electrolyte leakage assay. The PCD of the hypersensitive response is associated with loss of electrolytes of dying cells (Baker et al 1991; Mackey et al. 2002). We measured electrolyte release in plants infiltrated with *P. s. pv. tabaci* (AvrPto) and observed lower conductivity in *NbWRKY25/22*- and *SlPrf*-silenced plants compared to the *Ec1* control (Fig. 3c). These results further support that *NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* contribute to Pto/Prf-mediated ETI in *N. benthamiana*.

NbWRKY25/22*-silenced plants are compromised in resistance elicited by Roq1-mediated recognition of HopQ1-1 in *N. benthamiana

N. benthamiana expresses Roq1, a Toll-interleukin receptor (TIR)-NLR resistance protein that recognizes the presence of the HopQ1-1 effector (Wei et al. 2007; Schultink et al. 2017). To investigate if *NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* play a broader role in ETI, we therefore infiltrated *N. benthamiana* silenced plants with *P. s. pv. tabaci* expressing HopQ1-1 or an empty vector (EV) and assessed disease severity and conductivity. Plants silenced with *NbWRKY25/22* or *SAG101* as positive control for Roq1 recognition (Pombo et al. 2014; Gantner et al. 2019) developed more disease symptoms than *Ec1* plants when inoculated with *P. s. pv. tabaci* (HopQ1-1) (Fig. 4a). All plants inoculated with *P. s. pv. tabaci* (EV) developed similar disease symptoms. Consistent with the enhanced disease, electrolyte leakage was higher in *Ec1*-silenced plants compared with plants silenced for the *NbWRKY* genes or *SAG101* (Fig. 4b). *NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* therefore contribute to ETI activated in response to both coiled-coil (CC)-NLR and TIR-NLR R proteins.

***NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* contribute to programmed cell death associated with other R protein/effector pairs**

There is evidence that ETI pathways that are activated in response to different pathogens may share certain signaling factors (del Pozo et al. 2004; Oh et al. 2010). We therefore tested the effect of silencing *NbWRKY22ab* and/or *NbWRKY25ab* on the development of PCD, triggered by various R protein/effector pairs. *N. benthamiana* plants were silenced using the *NbWRKY25*, *NbWRKY22*, *NbWRKY25/22* and *Ec1* constructs and a *MAP3Kα* VIGS

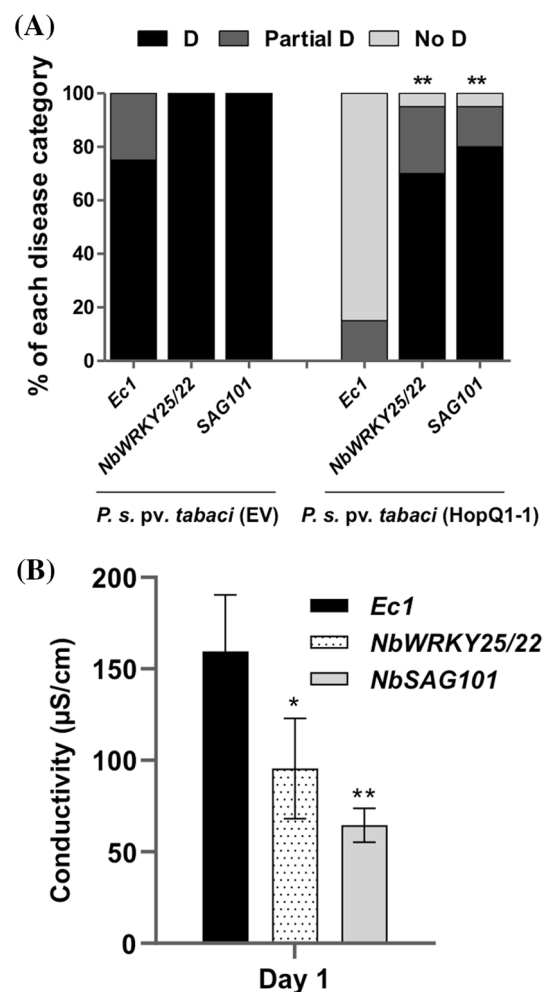


Fig. 4 *NbWRKY25/22*-silenced plants are compromised for resistance elicited by HopQ1-1 recognition in *N. benthamiana*. **a** Leaves of *N. benthamiana* silenced plants were syringe-infiltrated with 1×10^5 cfu/mL *P. s. pv. tabaci* expressing HopQ1-1 or carrying an empty vector (EV). The degree of disease was monitored visually. Percentage of the infiltrated leaf circles that developed disease is shown, where D=disease. Four plants were used for each VIGS construct. Double asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Fisher's exact test (** $P < 0.01$). **b** Electrolyte leakage determination in silenced plants. Plants were infiltrated as described above. Leaf tissue disks were sampled at 24 h and electrolyte leakage was estimated. Bars represent the mean of four plants per construct with their corresponding standard deviation. Double and single asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Dunnett's method (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$)

construct was included as a control since silencing of this gene had been shown previously to compromise PCD elicited by multiple R/effector pairs (del Pozo et al. 2004). Leaves from the plants were syringe-infiltrated with a mix of *A. tumefaciens* strains for expression of a plant R protein jointly with its corresponding effector (avirulence) protein: (a) potato (*Solanum tuberosum*) Rx2/PVX coat protein (Bendahmane et al. 2000); (b) Arabidopsis RPP13/

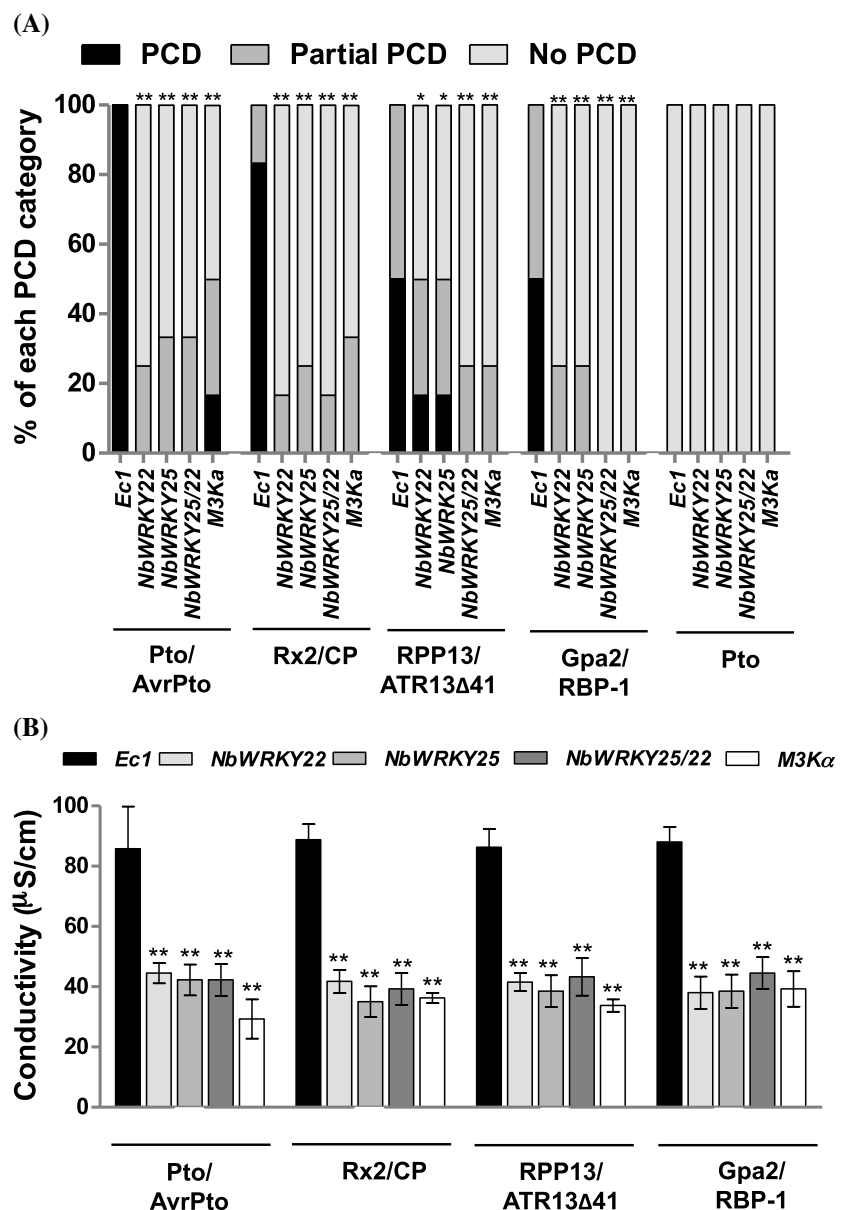
ATR13^{Emco5}- Δ 41aa from the oomycete *Hyalosporonopsis arabidopsidis* (Rentel et al. 2008); and (c) potato Gpa2/RBP-1 from the potato cyst nematode (Sacco et al. 2009). Infiltration of Pto/AvrPto was included as a positive control and Pto without AvrPto as a negative control. PCD associated with each of these R/effector pairs was significantly decreased in *NbWRKY25*, *NbWRKY22* and *NbWRKY25/22*-silenced plants as it was in the *M3K α* positive control plants (Fig. 5a). We also measured electrolyte release in these plants after infiltration with the different PCD elicitors and observed lower conductivity in *NbWRKY25*-, *NbWRKY22*-, *NbWRKY25/22*- and *M3K α* -silenced plants compared to the *Ec1* control (Fig. 5b). These observations indicate that both *NbWRKY22*ab and

*NbWRKY25*ab play a role in the ETI response activated by multiple R proteins in *N. benthamiana*.

***NbWRKY22*ab and *NbWRKY25*ab do not act downstream of the *M3K α* signaling cascade**

Transient expression of *M3K α* or *MKK2* in *N. benthamiana* leaves, leads to the development of a strong PCD (del Pozo et al. 2004). This phenotype was previously exploited for the identification of other proteins that act downstream of AvrPto/Pto recognition (Oh et al. 2010; Oh and Martin 2011a, b; Roberts et al. 2019). We performed an epistasis experiment to investigate where *NbWRKY22*ab and *NbWRKY25*ab act in relation to the *M3K α* and *MKK2*

Fig. 5 *NbWRKY22* and *25* contribute to programmed cell death (PCD) associated with non-bacterial elicitors. **a** *N. benthamiana* silenced plants were syringe-infiltrated with *A. tumefaciens* strains expressing the indicated R and effector proteins to elicit PCD. PCD percentage was calculated as described in Materials and Methods using four plants per construct. Double and single asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Fisher's exact test (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$). **b** Electrolyte leakage determination in *Ec1*-, *NbWRKY25*-, *NbWRKY22*-, *NbWRKY25/22*- and *M3K α* -silenced plants. Plants were infiltrated as described above. Leaf tissue disks were sampled at 24 h ai and electrolyte leakage was estimated. Bars represent the mean of four plants per construct with their corresponding standard deviation. Double and single asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Dunnett's method (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$)



signaling pathway. This assay involves silencing and transiently expressing genes known to be involved in Pto/Prf-mediated PCD (del Pozo et al. 2004). *N. benthamiana* plants were silenced for *NbWRKY22ab*, *NbWRKY25ab*, *SLM3K α* , *MKK2*, *SIPrf* and *Ec1*. If one or both of the NbWRKY proteins participated downstream of M3K α or MKK2 cascade, we expect to see a reduced PCD when silencing the transcription factors. As expected, overexpression of M3K α or MKK2^{DD} in *Ec1*-silenced plants resulted in full PCD (Fig. 6). PCD induced by M3K α overexpression was delayed in M3K α -silenced plants and was abolished by silencing of the downstream gene, *MKK2*. Unexpectedly, silencing *NbWRKY22ab* or *NbWRKY25ab* had no effect on the PCD induced by M3K α or MKK2^{DD} overexpression, indicating that it is possible that NbWRKYs act independently of this cascade (Fig. 6). Further experiments will help elucidate if these transcription factors participate upstream of this MAPK cascade.

***NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* genes participate in the activation of PTI response**

Using previously generated tomato transcriptomic data (Pombo et al. 2017) available for *SIWRKY22* and *SIWRKY25* (<https://ted.bti.cornell.edu>) we found that both genes are induced when PTI is activated 30 min after treatment with flg22 (Supplementary Fig. S1c). To investigate the possible contribution of NbWRKY25ab and NbWRKY22ab to PTI, we performed a callose deposition assay in *N.*

benthamiana. Deposition of callose at the cell wall is a plant response to microbes that has been widely used as a marker for PTI (Hann et al. 2007; Nguyen et al. 2010). Leaves of *NbWRKY22*-, *NbWRKY25*-, *NbWRKY25/22*-, *FLS2*- and *Ec1*-silenced plants were syringe-infiltrated with a high titer of *Pseudomonas fluorescens* 55 to induce PTI. Plants silenced using any of the *NbWRKY* constructs developed fewer callose deposits compared with the control *Ec1* plants (Fig. 7a and b). At 24 hai the reduction in the number of deposits was 94% and at 48 hai it was 84% in *NbWRKY*-silenced plants compared with *Ec1* plants, suggesting a compromise in PTI activation.

We also performed a cell death suppression assay (Chakravarthy et al. 2010) as another test of the role of the NbWRKYs in PTI. Leaves of plants silenced for *NbWRKY22*, *NbWRKY25* or *NbWRKY25/22* were initially infiltrated with *P. fluorescens* 55 to induce a strong PTI. After 6 h, the same plants were infiltrated with *Pst* DC3000 Δ *HopQ1-1* in a partially overlapping way with the first infiltration. The degree of disease development suppression inside the overlapping area was evaluated as an indication of the functionality of PTI. Silencing of *FLS2* was used as control. We observed that plants silenced using any of the three *NbWRKY* constructs or *FLS2* developed higher levels of disease-associated cell death in the overlapping area compared to *Ec1* control plants (Fig. 7c). Together the callose deposition experiments and the cell death suppression assays indicate that the NbWRKYs also contribute to the PTI responses.

Fig. 6 *NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* act upstream or independently of MAP3K α signaling pathway. Leaves of *N. benthamiana* plants silenced for *Ec1*, *NbWRKY22ab*, *NbWRKY25ab*, *MAP3K α* , *MKK2* or *SIPrf* were syringe-infiltrated with *A. tumefaciens* carrying full-length (FL) MAP3K α , the inactive kinase domain only (KD-) of MAP3K α , MKK2^{DD} or MKK2 WT. PCD percentage was monitored as described in Materials and Methods using four plants per construct. Asterisk indicates significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Fisher's exact test (* P < 0.05)

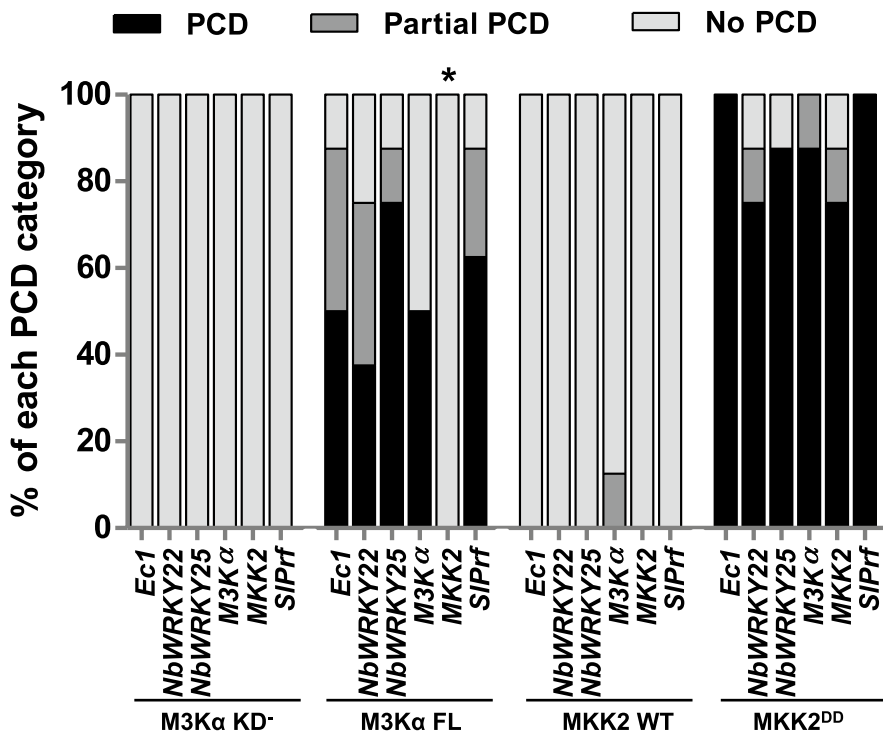
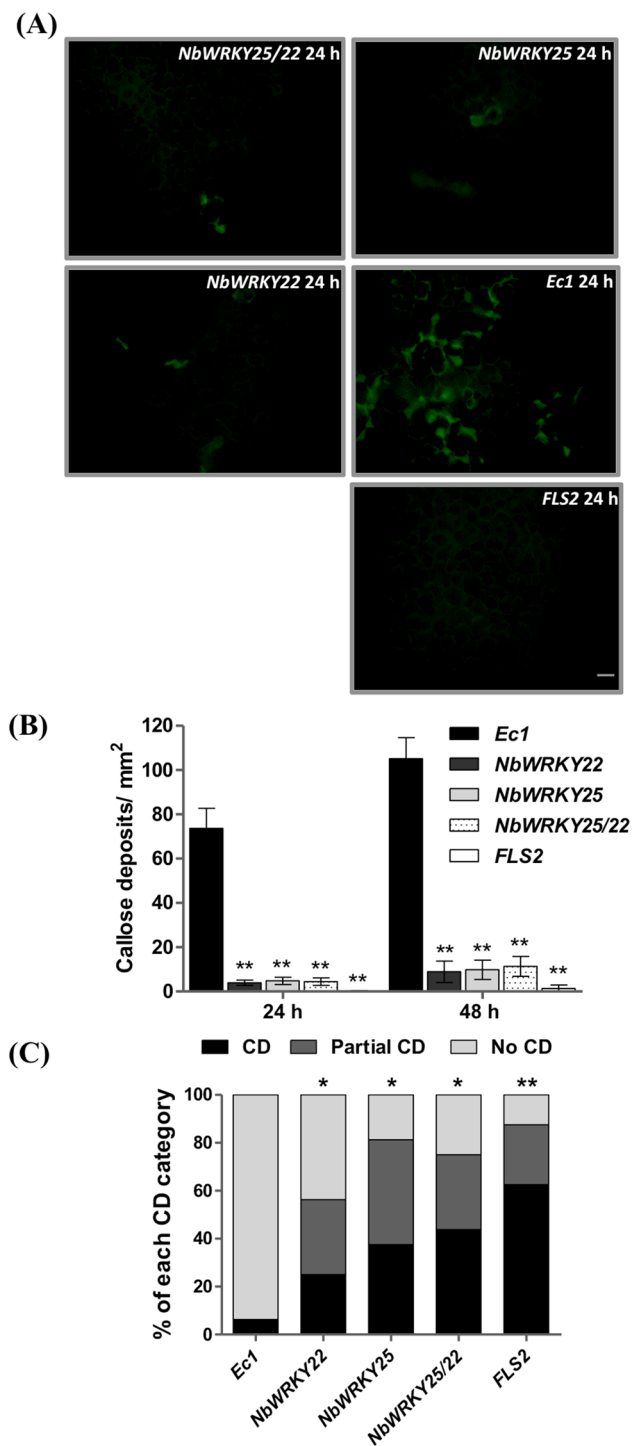


Fig. 7 NbWRKY22ab and NbWRKY25ab contribute to the activation of PTI. Leaves of silenced *N. benthamiana* plants were syringe-infiltrated with 1×10^8 cfu/mL *Pseudomonas fluorescens* 55. Tissue was sampled at 24 and 48 hai for visualization of callose deposition using aniline blue. **a** Representative callose deposition observations for each VIGS plant at 24 hai. Scale bar is 50 μ m and is the same for all photographs. Fluorescence of callose deposits was pseudocoloured green. **b** Number of callose deposits. The number of deposits ranging from 8.5 to 85 μ m in diameter was measured and expressed per square millimeter of leaf tissue. Thirty microscope fields from four plants per silencing construct were used for the analysis. Double asterisks indicate significant differences compared with *Ec1*-silenced plants using Dunnett's method (** $P < 0.01$). **c** Cell death suppression assay. Silenced plants were syringe-infiltrated with $OD^{600} = 0.5$ of *P. fluorescens* 55 and 6 h later with $OD^{600} = 0.01$ of *Pst* DC3000 Δ hopQ1-1 in an overlapping way. Cell death symptoms were scored in the overlapping area, on four independently silenced plants per VIGS-construct with four infiltration sites on one leaf. Results shown are from day 3 after infiltration. Double asterisks indicate significant differences based on Fisher's exact test, using *Ec1* as a control (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$)

Discussion

WRKY transcription factors play important roles as both positive and negative regulators of plant responses to various biotic stresses with members of each of the eight WRKY subfamilies having been reported to impact PTI or ETI in Arabidopsis and rice (Pandey and Somssich 2009). Subfamily IIe, to which SIWRKY22 and SIWRKY25 belong, has 17 members in tomato, 8 in Arabidopsis and 10 in rice (Huang et al. 2012). However, only a few of subfamily IIe family members have been implicated or demonstrated to have a role in plant immunity. In rice, OsWRKY13 and OsWRKY31 act as positive regulators of plant defenses. Rice plants overexpressing *OsWRKY13* have enhanced resistance against both bacterial (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) and fungal (*Magnaportha grisea*) pathogens (Qiu et al. 2007), while those overexpressing *OsWRKY31* are more resistant to *M. grisea* (Zhang and Guo 2008). In Arabidopsis, a mutation in *AtWRKY27* resulted in delayed disease symptom development in response to *R. solanacearum*, possibly by affecting nitric oxide signaling and vascular trafficking (Mukhtar et al. 2008). Arabidopsis *AtWRKY22* mutants were less susceptible to aphid attack through the modulation of salicylic acid and jasmonic acid signaling (Kloth et al. 2016). In tomato, the transcript abundance of one subfamily IIe member, *SIWRKY3*, increased 24 h after plants were treated with the biocontrol agent *Trichoderma erinaceum* although a definitive role in defense has not yet been reported for this gene (Aamir et al. 2019). Here we report the identification and characterization of two members of subfamily IIe from tomato and provide loss-of-function evidence using *N. benthamiana* that each of them plays an important role in ETI and PTI.



The two WRKY genes, *SIWRKY22* and *SIWRKY25*, were identified in a previous RNA-seq analysis of ETI and PTI responses in tomato after inoculation with various strains of *Pst*. Transcript abundance of both genes was significantly increased 6 h after *Pst* inoculation only during an ETI response (Pombo et al. 2014). Subsequent analysis of additional RNA-seq data from an earlier time point (30 min), revealed that both genes also have enhanced expression in

response to treatment with the MAMP flg22 (Pombo et al. 2017). As reported previously, our phylogenetic analysis confirmed that the closest gene in Arabidopsis to both tomato WRKYs is AtWRKY22 (Huang et al. 2012). As in tomato, AtWRKY22 transcript abundance increased upon treatment with flg22 or chitin 30 min after infiltration (Navarro et al. 2004; Wan et al. 2004; Libault et al. 2007) and for this reason the gene was used as a reporter for chitin-associated PTI (Wan et al. 2008).

Functional studies of Arabidopsis WRKY22 have demonstrated its contribution to PTI. Upon perception of flg22 by FLS2, a MAPK cascade is activated leading to, as one response, AtWRKY22 increasing the expression of a closely related gene, AtWRKY29 (Asai et al. 2002). Additionally, AtWRKY22 is necessary for PTI activation after submergence, which confers higher resistance to *Pst* DC3000 (Hsu et al. 2013). In accordance with these previous results, silencing of *NbWRKY22ab* and *NbWRKY25ab* resulted in less callose deposition in the apoplast and reduced PTI in response to *P. fluorescens*. These results therefore demonstrate a conserved role of NbWRKY25/22 and AtWRKY22 in PTI activation in two different plant species.

Virus-induced gene silencing of either *NbWRKY22ab* or *NbWRKY25ab*, or both, decreased PCD development due to co-expression of the R protein complex Pto/Prf and the effector AvrPto. This reduced PCD was associated with stronger disease symptoms, higher bacterial populations and less electrolyte release into the apoplast. ETI in response to Roq1 recognition of HopQ1-1 was also compromised as shown by stronger disease symptoms and reduced electrolyte leakage. Since Prf is a CC-NLR and Roq1 is a TIR-NLR, these observations indicate that NbWRKY22ab and NbWRKY25ab play a role in two R protein pathways that otherwise use some different signaling components (Prf relies on NRC2/3 whereas Roq1 relies on EDS1/SAG101 and NRG1) (Pombo et al. 2014; Staskawicz et al. 2017; Gantner et al. 2019; Wu Chih-Hang et al. 2019). Collectively, our experiments show that NbWRKY22ab and NbWRKY25ab contribute as positive regulators to both PTI and ETI. Until now, there is only one report of a WRKY22 being implicated in pepper ETI immune response against *Ralstonia solanacearum* (Hussain et al. 2018). In a previous work, silencing of other tomato WRKYs (*SIWRKY14*, *SIWRKY1* and *SIWRKY71*), did not affect Pto/Prf-mediated ETI (Ekegren et al. 2003). None of them are members of WRKY family IIe, to which WRKY22 and WRKY25 belong (Huang et al. 2012).

Certain WRKYs have been reported to regulate defense responses against different types of pathogens. For example, AtWRKY70 was first described as positive regulator of basal resistance against two virulent bacteria (Li et al. 2004) and then later was found to promote susceptibility to the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* and resistance to the biotroph *Erysiphe cichoracearum* (Li et al. 2006). Similarly,

Arabidopsis WRKY53 positively regulates plant defense during *Pst* infection, while an Arabidopsis *wrky53* mutant showed delayed symptom development after inoculation with *Ralstonia solanacearum* (Murray et al. 2007; Hu et al. 2008). In addition, loss of function mutants of WRKY18, 40 and 60 produced plants with greater resistance to *Pst* DC3000, but heightened susceptibility to *Botrytis cinerea* (Xu et al. 2006). All these studies involved compatible plant-pathogen interactions. In contrast, our experiments using five pairs of R proteins with their corresponding effectors indicate that the WRKY25/22 proteins regulate common pathways in ETI activation against very different kind of pathogens including bacteria, oomycetes, nematodes and viruses. Similar participation as positive regulators of ETI was described previously for two Arabidopsis WRKYs (AtWRKY8 and AtWRKY48) but in this case the role of the transcription factors was analyzed only with respect to recognition of two bacterial effectors (Gao et al. 2013).

Our transcript abundance analysis to investigate WRKY22 and WRKY25 silencing degree in *N. benthamiana* demonstrated that the VIGS constructs were very efficient (80–90% silencing compared with the *Ec1* control) and specific for silencing of the target gene. The fact that we observed a similar phenotype silencing these genes individually or together indicates they are not functionally redundant in plant defense regulation. It is possible that the two proteins physically interact in order to modulate expression of other genes. Alternatively, it is possible that one of the WRKYs regulates the gene expression of the other WRKY as is known to occur with AtWRKY22 and AtWRKY29 (Asai et al. 2002). The presence of at least one W-box in the promoter region of each of the WRKY genes supports this model. Examples of both of these possible mechanisms have been reported previously (Chi et al. 2013; Llorca et al. 2014).

Several WRKY proteins have been identified as substrates of MAPK phosphorylation (Ishihama et al. 2011; Mao et al. 2011; Adachi et al. 2015) and are known to physically interact with some R proteins after effector recognition (Shen et al. 2007; Inoue et al. 2013). Furthermore, some R proteins have a WRKY domain integrated into their structure (Deslandes et al. 2003; Sarris et al. 2015). To begin to study the functional mechanism of WRKY25/22, we investigated where they might act in the Pto/Prf pathway using an epistasis experiment (del Pozo et al. 2004). Several members of the Pto/Prf-mediated PCD in tomato and *N. benthamiana* have been previously characterized (Ekegren et al. 2003; del Pozo et al. 2004; Pedley and Martin 2004; Oh et al. 2010; Oh and Martin 2011b; Hwang et al. 2017; Roberts et al. 2019). NtMEK2 (ortholog of tomato MKK2) was shown to participate in Pto/Prf-ETI activation in tomato (Ekegren et al. 2003). M3K α was identified in *N. benthamiana* as acting upstream of and phosphorylating MKK2 (del Pozo et al. 2004; Pedley and Martin 2004). Both MAP kinases

are able to produce PCD when transiently expressed in *N. benthamiana* and for this reason are widely used for epistasis experiments in order to further understand this pathway (del Pozo et al. 2004; Pedley and Martin 2004; Oh et al. 2010; Oh and Martin 2011b; Hwang et al. 2017; Roberts et al. 2019). Unexpectedly, silencing of our WRKY transcription factors did not produce a delay in the development of PCD after overexpression of M3K α or MKK2^{DD}. In fact, these silenced plants behaved similarly to *SIPrf*-silenced control plants suggesting these WRKYs either act upstream of M3K α or possibly in a distinct signaling pathway.

Further experiments are needed to understand the role of these transcription factors in tomato immunity. It will be important, for example, to determine if SIWRKY22 and SIWRKY25 physically interact with each other or with R or MAPK proteins and, if so, how the interaction might affect their activity. Interestingly, WRKYs move from the cytoplasm to the nucleus where they subsequently exert their transcription regulation activities (Shang et al. 2010). Therefore it will be interesting to determine the subcellular localization of WRKY25/22 before and after activation of ETI and PTI. Finally, identifying genes that are directly and indirectly regulated by these WRKY proteins should help clarify how they participate in the tomato immune response.

Using available RNA-seq data we identified two tomato WRKY genes whose expression is induced during PTI and ETI involving Pto/Prf. Our characterization of silencing the orthologous genes in *N. benthamiana* indicated they contribute to ETI activated by effectors from diverse pathogens including bacteria, viruses, oomycetes and nematodes. In light of this wide activity, these transcription factors could be useful for genetic engineering of broad-spectrum plant resistance.

Acknowledgements We thank Diane Dunham for helping with some of the plant inoculation experiments, Samantha Mainiero for technical advice and assistance and Diana Lauff for her assistance with microscopy. Mauro Bartolozzi and Santiago Martínez Alonso for plant care and Maria Gabriela Cano for helping with statistical analysis. This research was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica—Argentina (PICT2014-1589, HGR and PICT2017-0916, MAP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas—Argentina (PIP2014-0314, MAP and PUE INFIVE 2016-0110), and by National Science Foundation grant IOS-1546625 (GBM).

Author contributions RNR, GBM, MAP, and HGR designed the research. RNR and MAP performed the research. RNR, GBM, MAP., and HGR wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

References

- Aamir M, Kashyap SP, Zehra A, Dubey MK, Singh VK, Ansari WA, Upadhyay RS, Singh S (2019) *Trichoderma erinaceum* bio-priming modulates the WRKYs defense programming in tomato against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) challenged condition. *Front Plant Sci* 10:911. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00911>
- Abramovitch RB, Martin GB (2005) AvrPtoB: a bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS Microbiol Lett* 245:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.025>
- Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Yoshioka M, Katou Y, Yaeno T, Shirasu K, Yoshioka H (2015) WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 27(9):2645–2663. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00213>
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977–983. <https://doi.org/10.1038/415977a415977a>
- Baker CJ, O'Neill NR, Keppler LD, Orlandi EW (1991) Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell suspensions. *Phytopathol* 81:1504–1507. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-1504>
- Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC (2000) *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. *Plant J* 21:73–81. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00654.x>
- Bhattarai KK, Atamian HS, Kaloshian I, Eulgem T (2010) WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato *R* gene *Mi-1*. *Plant J* 63:229–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04232.x>
- Birkenbihl RP, Diezel C, Somssich IE (2012) *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol* 159(1):266–285. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192641>
- Birkenbihl RP, Kracher B, Ross A, Kramer K, Finkemeier I, Somssich IE (2018) Principles and characteristics of the *Arabidopsis* WRKY regulatory network during early MAMP-triggered immunity. *Plant J* 96:487–502. <https://doi.org/10.1111/tbj.14043>
- Bombarely A, Rosli HG, Vrebalov J, Moffett P, Mueller LA, Martin GB (2012) A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1523–1530. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-12-0148-TA>
- Boutrot F, Zipfel C (2017) Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 55:257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>
- Chakravarthy S, Velasquez AC, Ekengren SK, Collmer A, Martin GB (2010) Identification of *Nicotiana benthamiana* genes involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Mol Plant Microbe Interact* 23:715–726. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-6-0715>
- Chandra S, Martin GB, Low PS (1996) The Pto kinase mediates a signaling pathway leading to the oxidative burst in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13393–13397. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13393>
- Chen C, Chen Z (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol* 129:706–716. <https://doi.org/10.1104/pp.001057>
- Cheng MN, Huang ZJ, Hua QZ, Shan W, Kuang JF, Lu WJ, Qin YH, Chen JY (2017) The WRKY transcription factor HpWRKY44 regulates *CytP450-like1* expression in red pitaya fruit (*Hylococcus polyrhizus*). *Hortic Res* 4:17039. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.39>

- Chi Y, Yang Y, Zhou Y, Zhou J, Fan B, Yu JQ, Chen Z (2013) Protein–protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. *Mol Plant* 6(2):287–300. <https://doi.org/10.1093/mp/sst026>
- 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. *Plant Cell* 18:465–476. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036574>
- Chinnapandi B, Bucki P, Braun Miyara S (2017) *SIWRKY45*, nematode-responsive tomato WRKY gene, enhances susceptibility to the root knot nematode, *M javanica* infection. *Plant Signal Behav.* <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1356530>
- Chow CN, Zheng HQ, Wu NY, Chien CH, Huang HD, Lee TY, Chiang-Hsieh YF, Hou PF, Yang TY, Chang WC (2015) PlantPAN 20: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic Acids Res* 44(D1):D1154–1160. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1035>
- Cunnac S, Chakravarthy S, Kvitko BH, Russell AB, Martin GB, Collmer A (2011) Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2975–2980. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013031108>
- Dang FF, Wang YN, Yu L, Eulgem T, Lai Y, Liu ZQ, Wang X, Qiu AL, Zhang TX, Lin J, Chen YS, Guan DY, Cai HY, Mou SL, He SL (2013) CaWRKY40, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Cell Environ* 36(4):757–774. <https://doi.org/10.1111/pce.12011>
- del Pozo O, Pedley KF, Martin GB (2004) MAPKKKalpha is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *EMBO J* 23:3072–3082. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.76002837600283>
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounloham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8024–8029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1230660100>
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11:539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dong L, Cheng Y, Wu J, Cheng Q, Li W, Fan S, Jiang L, Xu Z, Kong F, Zhang D, Xu P, Zhang S (2015) Overexpression of GmERF5, a new member of the soybean EAR motif-containing ERF transcription factor, enhances resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *J Exp Bot* 66(9):2635–2647. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv078>
- Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP, Martin GB (2003) Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J* 36:905–917. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01944.x>
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5:199–206. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01600-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01600-9)
- Eulgem T, Tsuchiya T, Wang XJ, Beasley B, Cuzick A, Tör M, Zhu T, McDowell JM, Holub E, Dangl JL (2007) EDM2 is required for RPP7-dependent disease resistance in *Arabidopsis* and affects RPP7 transcript levels. *Plant J* 49:829–839. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02999.x>
- Feng F, Zhou JM (2012) Plant–bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr Opin Plant Biol* 15:469–476. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.004>
- Fernandez-Pozo N, Menda N, Edwards JD, Saha S, Teclé IY, Strickler SR, Bombarely A, Fisher-York T, Pujar A, Foerster H, Yan A, Mueller LA (2015a) The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Res* 43:D1036–1041. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>
- Fernandez-Pozo N, Rosli HG, Martin GB, Mueller LA (2015b) The SGN VIGS tool: user-friendly software to design virus-induced gene silencing (VIGS) constructs for functional genomics. *Mol Plant* 8:486–488. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.024>
- Gantner J, Ordon J, Kretschmer C, Guerois R, Stuttmann J (2019) An EDS1-SAG101 complex is essential for TNL-mediated immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 31(10):2456–2474. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00099>
- Gao X, Chen X, Lin W, Chen S, Lu D, Niu Y, Li L, Cheng C, McCormack M, Sheen J, Shan L, He P (2013) Bifurcation of *Arabidopsis* NLR immune signaling via Ca²⁺-dependent protein kinases. *PLOS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003127>
- Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5:1003–1011. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80265-8)
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Hann DR, Rathjen JP (2007) Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 49:607–618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02981.x>
- Higashi K, Ishiga Y, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y (2008) Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genom* 279(3):303–312. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0315-0>
- Hind S, Strickler SR, Boyle PC, Dunham DM, Bao Z, O’Doherty IM, Baccile JA, Hoki JS, Viox EG, Clarke CR, Vinatzer BA, Schroeder FC, Martin GB (2016) Tomato receptor FLAGEL-LIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nat Plants* 2:16128. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.128>
- Hsu FC, Chou MY, Chou SJ, Li YR, Peng HP, Shih MC (2013) Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:2699–2713. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114447>
- Hu JBX, Deslandes L, Hirsch J, Feng DX, Somssich I, Marco Y (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One* 3:e2589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002589>
- Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller LA, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral BW, Beavis W, Meinke DW, Town CD, Somerville C, Rhee SY (2001) The *Arabidopsis* information resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res* 29(1):102–105. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.102>
- Huang S, Gao Y, Liu J, Peng X, Niu X, Fei Z, Cao S, Liu Y (2012) Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Mol Genet Genomics* 287:495–513. <https://doi.org/10.1007/s00438-012-0696-6>
- Huang T, Duman JG (2002) Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol* 48:339–350. <https://doi.org/10.1023/a:1014062714786>
- Hussain A, Li X, Weng Y, Liu Z, Ashraf MF, Noman A, Yang S, Ifnan M, Qiu S, Yang Y (2018) CaWRKY22 acts as a positive regulator in pepper response to *Ralstonia Solanacearum* by constituting networks with CaWRKY6, CaWRKY27, CaWRKY40, and CaWRKY58. *Int J Mol Sci* 19(5):1426. <https://doi.org/10.3390/ijms19051426>

- Hwang IS, Brady JJ, Martin GB, Oh C-S (2017) Ser360 and Ser364 in the kinase domain of tomato SIMAPKKK α are critical for programmed cell death associated with plant immunity. *Plant Path J* 33(2):163–169. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2016.0249>
- Inoue H, Matsushita A, Xinqiong L, Nakayama A, Sugano S, Jiang C, Takatsuji H (2013) Blast resistance of CC-NB-LRR protein Pbl1 is mediated by WRKY45 through protein–protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(23):9577–9582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222155110>
- Ishihama N, Yamada R, Yoshioka M, Katou S, Yoshioka H (2011) Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *Plant Cell* 23(3):1153–1170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081794>
- Ishihama N, Yoshioka H (2012) Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 15:431–437. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.02.003>
- Jia Y, Martin GB (1999) Rapid transcript accumulation of pathogenesis-related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease-resistant tomato plants. *Plant Mol Biol* 40:455–465. <https://doi.org/10.1023/a:1006213324555>
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR (2002) TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14:1359–1375. <https://doi.org/10.1105/tpc.001404>
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Karkute SG, Gujjar RS, Rai A, Akhtar M, Singh M (2018) Genome wide expression analysis of WRKY genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) under drought stress. *Plant Gene* 13:8–17. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.11.002>
- Kim KC, Lai Z, Fan B, Chen Z (2008) *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell* 20(9):2357–2371. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055566>
- Kloth KJ, Wieggers GL, Busscher-Lange J, van Haarst JC, Kruijer W, Bouwmeester HJ, Dicke M, Jongsma MA (2016) AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling. *J Exp Bot* 67(11):3383–3396. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw159>
- Knoth C, Ringler J, Dangl JL, Eulgem T (2007) *Arabidopsis* WRKY70 is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:120–128. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0120>
- Kraus CM, Munkvold KR, Martin GB (2016) Natural variation in tomato reveals differences in the recognition of AvrPto and AvrPtoB effectors from *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant* 9:639–649. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.03.001>
- Lahaye T (2002) The *Arabidopsis* RRS1-R disease resistance gene—uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense? *Trends Plant Sci* 7:425–427. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02334-8](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02334-8)
- Lehti-Shiu MD, Panchy N, Wang P, Uygun S, Shiu SH (2017) Diversity, expansion, and evolutionary novelty of plant DNA-binding transcription factor families. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1:3–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.08.005>
- Li B, Meng X, Shan L, He P (2016) Transcriptional regulation of pattern-triggered immunity in plants. *Cell Host Microbe* 19:641–650. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.011>
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* 46(3):477–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02712.x>
- Li J, Wang J, Wang NX, Guo XQ, Gao Z (2015) GhWRKY44, a WRKY transcription factor of cotton, mediates defense responses to pathogen infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 121(1):127–140. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0885-3>
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA (2004) The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16:126–143. <https://doi.org/10.1105/tpc.017954>
- Libault M, Wan J, Czechowski T, Udvardi M, Stacey G (2007) Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:900–911. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-8-0900>
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* 31(6):777–786
- Liu Q, Liu Y, Tang Y, Chen J, Ding W (2017) Overexpression of NtWRKY50 increases resistance to *Ralstonia solanacearum* and alters salicylic acid and jasmonic acid production in tobacco. *Front Plant Sci* 8:1710. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01710>
- Llorca CM, Potschin M, Zentgraf U (2014) bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Front Plant Sci* 5:169. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00169>
- Luan Q, Chen C, Liu M, Li Q, Wang L, Ren Z (2019) CsWRKY50 mediates defense responses to *Pseudoperonospora cubensis* infection in *Cucumis sativus*. *Plant Sci* 279:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.002>
- Mackey D, Holt BF 3rd, Wiig A, Dangl JL (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743–754. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00661-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00661-x)
- Macho AP (2016) Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytol* 210:51–57. <https://doi.org/10.1111/nph.13605>
- Maekawa T, Kufer TA, Schulze-Lefert P (2011) NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nat Immunol* 12:817–826. <https://doi.org/10.1038/ni.2083>
- Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S (2011) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:1639–1653. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084996>
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganal MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432–1436. <https://doi.org/10.1126/science.7902614>
- Moffett P (2009) Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Adv Virus Res* 75:1–33. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)07501-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07501-0)
- Monaghan J, Zipfel C (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* 15:349–357. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>
- Mukhtar MS, Deslandes L, Auriac MC, Marco Y, Somssich IE (2008) The *Arabidopsis* transcription factor WRKY27 influences wilt disease symptom development caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant J* 56:935–947. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03651>
- Murray SL, Ingle RA, Petersen LN, Denby KJ (2007) Basal resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* involves WRKY53 and a protein with homology to a nematode resistance protein. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:1431–1438. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-11-1431>
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD (2004) The transcriptional innate immune response to flg22.

- Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* 135:1113–1128. <https://doi.org/10.1104/pp.103.036749>
- Nguyen HP, Chakravarthy S, Velásquez AC, McLane HL, Zeng L, Nakayashiki H, Park DH, Collmer A, Martin GB (2010) Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* 23:991–999. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-8-0991>
- Oh CS, Martin GB (2011a) Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends Plant Sci* 16:132–140. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.11.001>
- Oh CS, Martin GB (2011b) Tomato 14–3-3 protein TFT7 interacts with a MAP kinase kinase to regulate immunity-associated programmed cell death mediated by diverse disease resistance proteins. *J Biol Chem* 286:14129–14136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225086>
- Oh CS, Pedley KF, Martin GB (2010) Tomato 14–3-3 protein 7 positively regulates immunity-associated programmed cell death by enhancing protein abundance and signaling ability of MAP-KKK alpha. *Plant Cell* 22:260–272. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070664>
- Pandey SP, Somssich IE (2009) The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol* 150:1648–1655. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138990>
- Pedley KF, Martin GB (2003) Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu Rev Phytopathol* 41:215–243. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.121602.143032>
- Pedley KF, Martin GB (2004) Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *J Biol Chem* 279:49229–49235. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410323200>
- Pedley KF, Martin GB (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 8:541–547. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.006>
- Pilowsky M (1982) Screening wild tomatoes for resistance to bacterial speck pathogen (*Pseudomonas tomato*). *Plant Dis* 66(1):46–47. <https://doi.org/10.1094/PD-66-46>
- Pilowsky M, Zutra D (1986) Reaction of different tomato genotypes to the bacterial speck pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). *Phytoparasitica* 14:39–42. <https://doi.org/10.1007/BF0298047>
- Pombo MA, Ramos RN, Zheng Y, Fei Z, Martin GB, Rosli HG (2019) Transcriptome-based identification and validation of reference genes for plant-bacteria interaction studies using *Nicotiana benthamiana*. *Sci Rep* 9:1632. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38247-2>
- Pombo MA, Zheng Y, Fei Z, Martin GB, Rosli HG (2017) Use of RNA-seq data to identify and validate RT-qPCR reference genes for studying the tomato-*Pseudomonas* pathosystem. *Sci Rep* 7:44905. <https://doi.org/10.1038/srep44905>
- Pombo MA, Zheng Y, Fernandez-Pozo N, Dunham DM, Fei Z, Martin GB (2014) Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins. *Genome Biol* 15:R492. <https://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1479195265134573>
- Qiu DXJ, Ding X, Xiong M, Cai M, Cao Y, Li X, Xu C, Wang S (2007) OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Mol Plant-Microbe Interact* 20(5):492–499. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-5-0492>
- Rentel MC, Leonelli L, Dahlbeck D, Zhao B, Staskawicz BJ (2008) Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1091–1096. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711215105>
- Rinerson CI, Rabara RC, Tripathi P, Shen QJ, Rushton PJ (2015) The evolution of WRKY transcription factors. *BMC Plant Biol* 15:66. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0456-y>
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130:1143–2115. <https://doi.org/10.1104/pp.006858>
- Robatzek S, Somssich IE (2001) A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defense-related processes. *Plant J* 28(2):123–133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01131.x>
- Roberts R, Hind SR, Pedley KF, Diner BA, Szarzanowicz MJ, Luciano-Rosario D, Majhi BB, Popov G, Sessa G, Oh CS, Martin GB (2019) Mai1 protein acts between host recognition of pathogen effectors and mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Plant Microbe Interact* 32:1496–1507. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-19-0121-R>
- Rosli HG, Zheng Y, Pombo MA, Zhong S, Bombarely A, Fei Z, Collmer A, Martin GB (2013) Transcriptomics-based screen for genes induced by flagellin and repressed by pathogen effectors identifies a cell wall-associated kinase involved in plant immunity. *Genome Biol* 14:R139. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-12-r139>
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 15:247–258. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.006>
- Sacco MA, Koropacka K, Grenier E, Jaubert MJ, Blanchard A, Govere A, Smant G, Moffett P (2009) The cyst nematode SPRYSEC protein RBP-1 elicits Gpa2- and RanGAP2-dependent plant cell death. *PLoS Pathog* 5:e1000564. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000564>
- Sanchez-Ballesta MT, Lluch Y, Gosalbes MJ, Zacarias L, Granell A, Lafuente MT (2003) A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta* 218:65–70. <https://doi.org/10.2307/23388288>
- Sarris PF, Duxbury Z, Huh SU, Ma Y, Segonzac C, Sklenar J, Derbyshire P, Cevik V, Rallapalli G, Saucet SB, Wirthmueller L, Menke FLH, Sohn KH, Jones JDG (2015) A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell* 161(5):1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.048>
- Schwessinger B, Ronald PC (2012) Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annu Rev Plant Biol* 63:451–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105518>
- Segonzac C, Zipfel C (2011) Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr Opin Microbiol* 14:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.12.005>
- Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu FQ, Wang XF, Du SY, Jiang T, Zhang XF, Zhao R, Sun HL, Liu R, Yu YT, Zhang DP (2010) The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell* 22(6):1909–1935. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.073874>
- Shen QH, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ulker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315:1098–1103. <https://doi.org/10.1126/science.1136372>
- Schultink A, Qi T, Lee A, Steinbrenner AD, Staskawicz B (2017) Roq1 mediates recognition of the *Xanthomonas* and *Pseudomonas* effector proteins XopQ and HopQ1. *Plant J* 92(5):787–795. <https://doi.org/10.1111/tpj.13715>
- Sun XC, Gao YF, Li HR, Yang SZ, Liu YS (2015) Over-expression of SIWRKY39 leads to enhanced resistance to multiple

- stress factors in tomato. *J Plant Biol* 58(1):52–60. <https://doi.org/10.1007/s12374-014-0407-4>
- Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y, Martin GB (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 274:2060–2063. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2060>
- Toruño TY, Stergiopoulos I, Coaker G (2016) Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annu Rev Phytopathol* 54:419–441. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100204>
- Tsuda K, Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 13:459–465. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>
- Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J, Katagiri F (2009) Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet* 5:e1000772. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40(15):e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- van der Vossen EA, van der Voort JN, Kanyuka K, Bendahmane A, Sandbrink H, Baulcombe DC, Bakker J, Stiekema WJ, Klein-Lankhorst RM (2000) Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J* 23:567–576. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00814.x>
- Velasquez AC, Chakravarthy S, Martin GB (2009) Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J Vis Exp* 28:1292. <https://doi.org/10.3791/1292>
- Wan J, Shuqun Z, Stacey G (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Mol Plant Pathol* 5:125–135. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00215.x>
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim SY, Stacey MG, Stacey G (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:471–481. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056754>
- Wei CF, Kvitko BH, Shimizu R, Crabill E, Alfano JR, Lin NC, Martin GB, Huang HC, Collmer A (2007) A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 51:32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03126.x>
- Wei HL, Zhang W, Collmer A (2018) Modular study of the type III effector repertoire in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reveals a matrix of effector interplay in pathogenesis. *Cell Rep* 23:1630–1638. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.037>
- Wu Chih-Hang, Kamoun S (2019) Tomato Prf requires NLR helpers NRC2 and NRC3 to confer resistance against the bacterial speck pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *BioRxiv* 595744. <https://doi.org/10.1101/595744>
- Xin XF, He SY (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol* 51:473–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102321>
- Xu X, Chen C, Fan B, Chen Z (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18:1310–1326. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037523>
- Yu D, Chen Z (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* 13:1527–1540. <https://doi.org/10.1105/tpc.010115>
- Zhang JPY, Guo Z (2008) Constitutive expression of pathogen-inducible OsWRKY31 enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants. *Cell Res* 18(4):508–521. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.104>
- Zheng Y, Jiao C, Sun H, Rosli HG, Pombo MA, Zhang P, Banf M, Dai X, Martin GB, Giovannoni JJ, Zhao PX, Rhee SY, Fei Z (2016) iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Mol Plant* 9:1667–1670. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.09.014>
- Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T (2006) *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* 48(4):592–605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02901.x>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Loss-of-function mutations in *WRKY22* and *WRKY25* impair stomatal-mediated immunity and PTI and ETI responses against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Romina N. Ramos¹ · Ning Zhang² · Diana B. Lauff¹ · Felipe Valenzuela-Riffo^{3,4} · Carlos R. Figueroa^{3,4} · Gregory B. Martin^{2,5} · Marina A. Pombo¹ · Hernan G. Rosli¹

Received: 15 December 2022 / Accepted: 27 April 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2023

Abstract

Plants defend themselves against pathogens using a two-layered immune system. The first response, pattern-triggered immunity (PTI), is activated upon recognition of microbe-associated molecular patterns (MAMPs). Virulent bacteria such as *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), deliver effector proteins into the plant cell to promote susceptibility. However, some plants possess resistance (R) proteins that recognize specific effectors leading to the activation of the second response, effector-triggered immunity (ETI). Resistant tomatoes such as Río Grande-PtoR recognize two *Pst* effectors (AvrPto and AvrPtoB) through the host Pto/Prf complex and activate ETI. We previously showed that the transcription factors (TF) WRKY22 and WRKY25 are positive regulators of plant immunity against bacterial and potentially non-bacterial pathogens in *Nicotiana benthamiana*. Here, the CRISPR-Cas9 technique was used to develop three knockout tomato lines for either one or both TFs. The single and double mutants were all compromised in Pto/Prf-mediated ETI and had a weaker PTI response. The stomata apertures in all of the mutant lines did not respond to darkness or challenge with *Pst* DC3000. The WRKY22 and WRKY25 proteins both localize in the nucleus, but we found no evidence of a physical interaction between them. The WRKY22 TF was found to be involved in the transcriptional regulation of *WRKY25*, supporting the idea that they are not functionally redundant. Together, our results indicate that both WRKY TFs play a role in modulating stomata and are positive regulators of plant immunity in tomato.

Key message

WRKY22 and WRKY25 are required for full activation of PTI and ETI in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

✉ Marina A. Pombo
mpombo@agro.unlp.edu.ar

¹ Instituto de Fisiología Vegetal, INFIVE, Universidad Nacional de La Plata, CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina

² Boyce Thompson Institute for Plant Research, 533 Tower Road, Ithaca, NY 14853, USA

³ Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Biological Sciences, Campus Talca, Universidad de Talca, Talca, Chile

⁴ Millenium Nucleus for the Development of Super Adaptable Plants (MN-SAP), Santiago, Chile

⁵ Section of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

Keywords WRKY transcription factors · Stomatal-mediated immunity · *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* · *Solanum lycopersicum* · CRISPR-Cas9

Introduction

Plants have evolved sophisticated mechanisms to protect themselves against pathogens. A first defense response involves the recognition of microbe/pathogen-associated molecular patterns (M/PAMPs) through pattern-recognition receptors (PRR) which activate pattern-triggered immunity (PTI), during which, several host cellular events are induced to prevent pathogen invasion and multiplication (Zipfel 2014; Bigeard et al. 2015). In tomato (*Solanum lycopersicum*), the detection of bacterial flagellin from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 relies on the perception of two flagellin epitopes: flg22 recognized by flagellin sensing 2 (FLS2) (Gomez-Gomez and Boller 2000; Chinchilla et al. 2006) and flgII-28 recognized by flagellin sensing 3 (FLS3) (Hind et al. 2016). The resulting PTI responses include the production of reactive oxygen species (ROS), activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades, callose deposition at the cell wall, calcium flux, stomata closure and transcriptional reprogramming of immunity-associated genes (Monaghan and Zipfel 2012; Rosli and Martin 2015; Li et al. 2016).

To facilitate invasion and proliferation, many pathogens, including bacteria, fungi, oomycete and nematodes, deliver virulence-associated molecules (Haegeman et al. 2012; Xin et al. 2018; Rocafort et al. 2020). Some bacterial pathogens such as *Pst* translocate via a type III secretion system (T3SS) virulence proteins (i.e., effectors), into plant cells to facilitate pathogenesis (Toruño et al. 2016; Xin et al. 2018; Wei et al. 2018). Plants have evolved genes encoding nucleotide-binding, leucine-rich repeat receptors (NLRs), which recognize directly or indirectly specific effectors and activate a second and generally stronger immune defense response, effector-triggered immunity (ETI) (Maekawa et al. 2011; Moffet 2009). In tomato, the Pto kinase protein interacts with AvrPto or AvrPtoB and forms a complex with the NLR protein Prf resulting in the induction of ETI and inhibition of pathogen growth (Martin et al. 1993; Salmeron et al. 1996; Pedley and Martin 2003).

Stomata are microscopic surface openings on the epidermis of plants that control gas exchange and they can serve as natural entry points for pathogens (Zeng et al. 2010). Studies have shown that stomata are not a passive path for bacterial invasion because they close upon detection of MAMPs to prevent pathogen entry (Melotto et al. 2006). As a counter-defense, plant pathogens have evolved specific virulence factors to suppress stomatal defense. *Pst* DC3000 produces a polyketide toxin, coronatine, to actively open stomata and promote infection (Xin and He 2013). Coronatine is a key

virulence factor for *Pst* DC3000 infection in *Arabidopsis thaliana* and tomato (Ma et al. 1991; Mittal and Davis 1995; Brooks et al. 2004; Cui et al. 2005). It has been recently shown that *Pst* additionally uses the AvrE1 and HopM1 effectors to manipulate stomata at later stages of infection, inducing stomata closure by affecting ABA accumulation and consequently leading to a higher humidity in the leaf apoplast which facilitates pathogen proliferation (Hu et al. 2022; Roussin-Léveillé et al. 2022). Although PTI and ETI are activated by recognition of different ligands by different classes of receptors, increasing evidence suggests that these two defense responses are functionally interconnected. PTI is required for a full functional ETI and bacterial resistance, while ETI stabilizes and induces important PTI signaling components (Ngou et al. 2021; Yuan et al. 2021).

PTI- and ETI-immune responses lead to transcriptional reprogramming of many genes, including those that encode transcription factors (TFs), which potentially regulate both immune responses (Navarro et al. 2004; Rosli et al. 2013; Pombo et al. 2014). TFs are important components of the molecular networks that regulate plant disease resistance (Singh et al. 2002). The WRKY family proteins are plant-specific TFs that contain a well-conserved WRKY (WRKYGQK) domain and a C2H2 or C2HC zinc-finger motif. WRKY TFs participate in the regulation of plant development, several metabolic pathways, and different responses to abiotic and biotic stresses (Ülker and Somssich 2004; Rushton et al. 2010).

WRKY proteins regulate the expression of their target genes either as positive or negative regulators (Chi et al. 2013). In response to internal or external stimuli, WRKYs trigger the expression of target genes by binding to W-box *cis*-elements in their promoter region. W-box elements are also present in promoters of the majority of the WRKY genes, suggesting that these genes can be auto-regulated or cross-regulated by other WRKYs (Eulgem and Somssich 2007; Rushton et al. 2010). Many WRKY-regulated genes, particularly defense-related genes, are enriched in W-box elements in their promoter regions (Dong et al. 2003).

The role of WRKY TFs as modulators of plant defense against pathogens has been extensively studied. For example, several studies in different plant species have shown that expression of *WRKY22* is activated or repressed by bacterial pathogens and, in addition, contributes to plant resistance or susceptibility (Hsu et al. 2013; Hussain et al. 2018). In tomato, there are 83 predicted WRKY genes (Huang et al. 2012; Karkute et al. 2018). Some of them have been implicated as positive or negative regulators of plant responses to biotic stresses. Overexpression of

SIWRKY45, homolog of *AtWRKY40*, enhanced tomato susceptibility to the nematode *Meloidogyne javanica* (Chinnapandi et al. 2017). *SIWRKY72* is required for both basal and *Mi-1*-mediated resistance against a root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and potato *Mi-1* avirulent aphids (Bhattarai et al. 2010). Overexpression of the *Solanum pimpinellifolium WRKY33* in tomato resulted in increased resistance to the oomycete *Phytophthora infestans* (Li et al. 2015).

Previously, we reported that virus-induced gene silencing of *SIWRKY22* and *SIWRKY25* (*WRKY22* and *WRKY25* hereafter) orthologs in *N. benthamiana* led to enhanced susceptibility to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* strains expressing *AvrPto* or *HopQ1-1* (Ramos et al. 2021). A reduction in apoplastic callose deposition and a weaker protection mediated by *Pseudomonas fluorescens* in silenced plants supported their involvement in PTI (Ramos et al. 2021). To deepen our knowledge about the role of these TFs in tomato, we generated single and double knockout lines using CRISPR-Cas9 technique. These plants showed a compromise in *Pto/Prf* mediated ETI and a weaker PTI response. Knocking out *WRKY22* and/or *WRKY25* resulted in an altered modulation of the stomata response to darkness or *Pst* DC3000 challenge. We found no evidence of these TFs interacting in vivo or in vitro, but we discovered that *WRKY22* is involved in transcriptional regulation of *WRKY25*. Both TFs therefore play non-redundant roles in the tomato immune response.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Pseudomonas spp. strains were grown on King's B medium (KBM) at 28 °C. *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli* were grown on Luria–Bertani (LB) medium at 28 °C and 37 °C, respectively. Antibiotics used were kanamycin (50 µg/mL), rifampicin (10 µg/mL), gentamycin (50 µg/mL) and spectinomycin (50 µg/mL). Bacterial strains are listed in Supplementary Table S1.

Plant growth and infiltrations

Tomato and *Nicotiana benthamiana* were grown at 22 °C with 16 h day length. Plants were infiltrated with bacterial suspensions in 10 mM MgCl₂ using a needleless syringe. Alternatively, infiltration was performed by dipping plants in bacterial suspensions containing 10 mM MgCl₂ and 0.002% v/v Silwet L-77. After infiltration, plants were kept in the same conditions until the end of the experiments.

Generation of *WRKY22* and *WRKY25* tomato mutants using CRISPR/Cas9

To create loss-of-function mutations in the tomato *WRKY* genes (*WRKY22*, Solyc01g095100; *WRKY25*, Solyc10g011910), we designed guide RNAs (gRNA) targeting the first exon of each gene (*WRKY22*-gRNA: GATCTACATGCGGTGGTCAG and *WRKY25*-gRNA: GGTAAACTGATGTCGCCGG) using Geneious R11 software (Kearse et al. 2012). Each gRNA cassette was cloned separately or together into a Cas9-expressing binary vector (p201N:Cas9) by Gibson assembly (Jacobs et al. 2017). Plasmids were introduced into *A. tumefaciens* LBA4404 and used to transform tomato Rio Grande (RG)-*PtoR* explants, which carry the *Pto* and *Prf* genes. To characterize possible mutations, genomic DNA was isolated from cotyledons or young leaves of each transgenic plant using a modified CTAB method (Murray and Thompson 1980). Genomic regions spanning the target site of each *WRKY* gene were amplified with specific primers (Supplemental Table S2) and sequenced. The web-based tool named Tracking of Indels by Decomposition (TIDE; <https://tide.deskgen.com>; Brinkman et al. 2014) was used to determine the mutation type and frequency with the sequencing files (.ab1 format) as described in Brinkman et al. (2014).

Off-target prediction and evaluation

To investigate possible off-target mutations caused by gRNAs in the $\Delta wrky$ lines, *WRKY22*-gRNA and *WRKY25*-gRNA were used as queries to search possible off-target sites in the tomato genome using CRISPR-P 2.0 (Liu et al. 2017). The tool revealed only 3 potential off-target sites for *WRKY22*-gRNA and one of them was *WRKY25*. For *WRKY25*-gRNA several potential off-target sites were predicted and five with the highest off-score (>0.000) were chosen for evaluation. Genomic regions spanning the putative off-target sites were amplified with specific primers (Supplementary Table S2) and PCR amplicons were sequenced to determine if mutations were introduced at those sites using TIDE (Brinkman et al. 2014).

Bacterial population assays

To evaluate PTI activation, $\Delta wrky22$, $\Delta wrky25$, $\Delta wrky22/25$ and wild-type RG-*PtoR* tomato plants were syringe- or dip-infiltrated with 5×10^4 or 1×10^5 cfu/mL *Pst* DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$ respectively. For dipping assays, plants were kept in high humidity before and after inoculation to ensure optimal stomata opening. Photographs of disease symptoms were taken three days after inoculation (dai), after completely removing chlorophyll using 96% ethanol. The same tomato lines and RG-*prf3* plants were

syringe-infiltrated with 5×10^4 cfu/mL *Pst* DC3000 or *Pst* DC3000 Δ *fliC* to determine ETI functionality.

Bacterial populations were measured in these plants using three 0.38 cm² leaf disks from the infiltrated area. Leaf tissue was processed with 0.25 mL of 10 mM MgCl₂ and then, the volume was adjusted to 1 mL. Serial dilutions were plated on solid LB medium with rifampicin and grown at 28 °C over-night. Four biological replicates per line were used. Significant differences were determined with one-way ANOVA followed by Tukey's Honest Significant Difference post hoc test ($p < 0.05$).

Measurement of stomata conductance and stomata number

Stomatal conductance was measured at 2 pm (Basal, 8 h after lights went on in the growth chamber), using a leaf porometer (SC1 Decagon Devices, Inc.) on both sides of two leaflets of the third leaf. Four biological replicates per line were analyzed. Photographs from the adaxial and abaxial epidermis of leaves were taken using a fluorescence microscope (Olympus BX51) and the number of cells and both closed and open stomata were counted manually using ImageJ-win64 analysis software. Stomata were counted and expressed as number per mm².

Imprints for estimation of stomatal aperture was performed using a low viscosity silicone-base material (Speedex Coltene™). Low viscosity silicone and catalyst were mixed with a spatula for about 30 s and then applied to the abaxial surface of leaves. After hardening, the material was peeled off longitudinally. Then, the silicone imprints were covered with a thin layer of a clear nail polish, which was then peeled off and used for taking photographs with a fluorescence microscope (Olympus BX51). Stomatal aperture was determined manually using ImageJ-win64 analysis software.

Callose deposition assay

Determination of callose deposition was performed as previously described in Nguyen et al. (2010) with minor modifications. Leaves of 4-week-old tomato plants were syringe-infiltrated with a suspension of 1×10^8 cfu/mL *Pseudomonas fluorescens* 55. Ten-millimeter diameter leaf disks were excised from the infiltrated area at 24 and 48 h after infiltration (hpi). After that, disks were incubated at room temperature in 6-well plates containing 2 mL 96% ethanol until complete removal of chlorophyll (24 h). Cleared leaf disks were washed twice with 70% ethanol and three times with bi-distilled water (ddH₂O). Leaf disks were submerged in 1% aniline blue in 150 mM K₂HPO₄ (pH 9.5/KOH) and incubated in the dark for 1 h. Stained leaf disks were mounted with ddH₂O on glass slides and observed from the

adaxial surface with a fluorescence microscope (Olympus BX51) using ultraviolet light and 20x objective. Images of 0.4 mm² microscopy fields were captured using an Olympus digital camera, avoiding areas close to wounds generated by inoculation or by sample excision. Number and total area of callose deposits were quantified in complete fields using ImageJ-win64 analysis software. Thirty microscope fields from four plants per line were used for the analysis. The experiment was performed two times with similar results. Significant differences were determined with a one-way ANOVA followed by Tukey's Honest Significant Difference post hoc test ($p < 0.05$).

Ion leakage measurements

Quantification of cellular electrolyte loss was performed as previously described del Pozo et al. (2004) with minor modifications. Leaves of tomato plants were syringe-infiltrated with a suspension of 1×10^5 cfu/mL *Pst* DC3000. Five disks (10 mm diameter) were taken from the infiltrated areas and floated on 5 mL ddH₂O for 4 h at room temperature with gentle shaking. Conductivity was measured using a LUFT-MAN conductivity meter (Digicon IV, Luftman Co.). Significant differences were estimated against wild type plants with one-way ANOVA followed by Tukey's Honest Significant Difference post hoc test ($p < 0.05$).

Subcellular localization

WRKY22 and *WRKY25* full length sequences without stop codon were cloned in pENTR™/D-TOPO (ThermoFisher Scientific). The resulting entry plasmids were recombined with pK7RWG2 (C-terminal mRFP tag) and pB7FWG2 (C-terminal eGFP tag) (Karimi et al. 2002), using LR Clonase II Enzyme Mix Kit (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Correct cloning was confirmed by DNA sequencing. Verified recombinant plasmids, control vectors (35S:eGFP and 35S:mRFP) and p19 (suppressor of post transcriptional silencing) (Voinnet et al. 2003), were introduced into *A. tumefaciens* GV3101 by chemical transformation. Four-week old *N. benthamiana* plants were agroinfiltrated for transient expression. Leaves samples were observed at 2 dpi from the abaxial surface with a fluorescence microscope (Olympus BX51). The expression of the fusion proteins was confirmed by Western blot.

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

To carry out the BiFC assay, pAS059 and pAS054 vectors containing the N- and C-terminal fragments of the reporter protein citrine (YFP variant) were used. The coding sequences corresponding to the *WRKY22* and *WRKY25* proteins were cloned on these vectors. As positive control,

the interaction of 24 k viral protein with HYL1 was used. *A. tumefaciens* culture mixtures containing the different vectors to be tested ($OD^{600nm} = 0.2, 0.3, 0.4$ and 0.5) were co-infiltrated with agrobacterium carrying the suppressor protein p19 ($OD^{600nm} = 0.2$) (Voinnet et al. 2003) in 4-week old *N. benthamiana* plants. Discs were observed under a fluorescence microscope (Olympus BX51) at 2, 3, 4 and 5 dpi to evaluate the reconstitution of the reporter protein citrine.

Co-immunoprecipitation

A. tumefaciens strain carrying a binary vector (pGWB417) with *WRKY25* or *YFP* were co-infiltrated with the same strain expressing *WRKY22*-GFP (pB7FWG2) into leaves of 4-week old *N. benthamiana*. Total protein was extracted from 500 mg leaves in 300 μ L lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) sodium deoxycholate; supplemented with 2.5 mM $MgCl_2$ and 1 mM PMSF) and incubated for 1 h at 4 °C. Total soluble proteins (input) were incubated with 25 μ L of GFP-Trap_A (ChromoTek) per sample overnight at 4 °C. Samples were centrifuged at $2500\times g$ for 5 min at 4 °C and an aliquot of the supernatant was saved (output). Beads were washed three times with cold dilution buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF) by centrifugation using the same conditions. Proteins were eluted with 60 μ L of sample buffer 4 \times and incubated at 100 °C for 15 min (IP). For input and output samples, 20 μ L soluble proteins mixed with sample buffer 4 \times were loaded for gel electrophoresis. Proteins were loaded on 10% (w/v) SDS-PAGE gel, blotted on PVDF membrane (Roti-PVDF, Carl Roth GmbH + Co. KG) and incubated with appropriate antibodies for their detection.

Protein analysis

Plant tissue were ground and homogenized in protein extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% (v/v) glycerol, 5% (v/v) β -mercaptoethanol, 20% (w/v) SDS and 0.01% (w/v) bromophenol blue), boiled for 10 min, and clarified by centrifugation for 5 min at 13,000 rpm. Clarified supernatants were separated on 10% (w/v) SDS-PAGE. Proteins were transferred to PVDF membranes (Roti-PVDF, Carl Roth GmbH + Co. KG) and blocked with 5% (w/v) nonfat milk powder in Tris-buffered saline containing 0.05% (v/v) Tween-20. eGFP, mRFP and c-myc fusion proteins were detected with anti-GFP (JL-8) monoclonal antibody (Roche, USA), anti-mRFP (RF5R) monoclonal antibody (Invitrogen) and anti-c-myc (9E10) monoclonal antibody (Covance Inc.), respectively. Pierce Goat Anti-Mouse IgG, (H + L) Peroxidase conjugated (ThermoFisher Scientific) was used as secondary antibody. Protein sizes were estimated using

a pre-stained protein marker (Multicolor Broad Range, 11–245 kDa, PB-L).

Yeast two-hybrid (Y2H) assay

Yeast two-hybrid assays were performed using the GAL4 Gateway system according to the manufacturer's instructions (Clontech). Full length *WRKY22* and *WRKY25* were cloned into the Gateway expression vector pGADT7 (activation domain, AD) and pGBKT7 (DNA binding domain, BD). These constructs were then co-transformed into *Saccharomyces cerevisiae* strain AH109 to assess interactions. Transformants were selected on SD/-Leu-Trp (-2) medium. Interactions were tested on SD/-Leu-Trp (-2) and SD/-Leu-Trp-Ade-His (-4) media. Plates were incubated at 28 °C for 5 days. The AtJAZ9 homodimer was co-transformed as a positive control (Chini et al. 2021). Empty pGADT7 and pGBKT7 vectors were co-transformed as negative control.

Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated using Tri-Reagent (Sigma Aldrich, USA) following the manufacturer's instructions. RNA integrity was assayed by 1% (w/v) agarose gel electrophoresis. Total RNA (8 μ g) was processed with RQ1 RNase-free DNase (Promega, USA) for 60 min at 37 °C to eliminate potential DNA contamination and then purified using a chloroform:octanol mix (24:1) and precipitated with isopropanol. RNA concentration and purity was determined using a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech). Purified RNA (1 μ g) was used to prepare cDNA using M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) with random primers according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed in 96-well plates (Thermo Fisher Scientific) on a StepOnePlus system (Applied Biosystems). The reaction mix was composed of: 5 μ L of 2 \times SYBR Green Master Mix (PB-L, Bio-Logic Products), 2 μ L of 2 μ M primer mix, 0.2 μ L of 50 \times ROX, 2 μ L of a diluted 1:10 cDNA and miliQ water to complete 10 μ L final volume. Cycling conditions were 94 °C for 5 min and 45 cycles of 92 °C for 15 s, 60 °C for 20 s and 72 °C for 15 s. Three technical replicates were used per sample. Data were normalized using *VIN3* and *ARD2* reference genes as described previously (Pombo et al. 2017). Primer sequences are shown in Supplementary Table S2. Significant differences were determined with Dunnett's method ($p < 0.05$) by comparison to wild type plants.

GUS assay

WRKY22 and *WRKY25* promoter regions (1500-bp region upstream of the annotated translation start site) were cloned into pKGWFS7 (prom-*WRKY25*:*Gus* and

prom-*WRKY22:Gus*). *A. tumefaciens* culture mixtures containing the different vectors to be tested ($OD^{600nm} = 0.3$) were co-infiltrated with the full length of each WRKY (WRKY22-Myc, WRKY22(-3 bp)-Myc and WRKY25-Myc) and the negative control YFP-Myc ($OD^{600nm} = 0.2$).

Plant tissue was infiltrated with the mentioned strains and 2 dpi tissue samples were taken to perform the colorimetric assay. The activity of β -glucuronidase was determined (expression of the *uidA* gene, GUS) using a solution of the dye reagent (100 mM Tris-HCl pH 7.0, 2 mM X-Gluc [5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid cycloheximide salt], 0.01% v/v Triton-X100, 50 mM NaCl, 2 mM potassium ferricyanide) with incubation overnight at 37 °C. Discs were cleared from chlorophyll by incubating for 5 min in increasing series of solutions containing ethanol 30, 50, 70, 90 and 100% v/v. The tissue was rehydrated by reversing the ethanol series washes and then kept in 100 mM Tris-HCl pH 7.0.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) with a significance level of 5% ($p < 0.05$) followed by Tukey's Honest Significant Difference post hoc test was selected for comparison of the means of all experiments. Prior to every parametric analysis, the assumptions of normality (QQ-plot and Shapiro Wilk test) and homogeneity of variance (Levene test) were checked. All experiments were carried out with a minimum of 3 independent replicates and performed at least 3 times, unless stated otherwise.

Results

Generation of CRISPR/Cas9 tomato mutant plants

Transcription factors WRKY22 and WRKY25 were previously found to be positive regulators of plant immunity against bacterial and potentially non-bacterial pathogens in *Nicotiana benthamiana* (Ramos et al. 2021). To study the possible role of WRKY22 and WRKY25 in tomato immunity, we used CRISPR-Cas9 to develop plants with mutations in each of these genes in the tomato cultivar Rio Grande-PtoR. By employing two different guide RNAs (gRNAs), *WRKY22*-gRNA and *WRKY25*-gRNA, we generated one homozygous single mutant line for each target transcription factor ($\Delta wrky22$ and $\Delta wrky25$) and a homozygous double mutant line ($\Delta wrky22/25$). $\Delta wrky22$ and $\Delta wrky22/25$ plants possess a T insertion in *WRKY22* gene, resulting in a sequence frame shift that generates a premature stop codon after the 11th amino acid residue (Supplementary Fig. S1a). On the other hand, $\Delta wrky25$ and $\Delta wrky22/25$ lines have a G insertion in *WRKY25* gene, also leading to a frame shift with

a premature stop codon after the 34th amino acid residue (Supplementary Fig. S1a). Additionally, $\Delta wrky25$ possess a 3 bp deletion in position +28 to +30 in the sequence of *WRKY22* gene. This mutation only causes the deletion of one amino acid (valine) in a region outside of the WRKY DNA binding domain (position 517 to 687 of the nucleotide sequence). To corroborate that *WRKY22*(-3 bp) is not affected in its function, we performed some assays that are explained in detail in the following sections. Taking all these into account, these plants were considered as single *WRKY25* mutant. Growth, development, and overall morphology of $\Delta wrky22$, $\Delta wrky25$ and $\Delta wrky22/25$ plants used for the following experiments were indistinguishable from wild-type RG-PtoR plants (Supplementary Fig. S1b).

To evaluate if the designed gRNAs could have targeted other genomic regions, we used the CRISPR-P 2.0 tool (Yang et al. 2014) that revealed three potential off-target sites for *WRKY22*-gRNA, one of which was *WRKY25* (Solyc10g011910). In the case of *WRKY25*-gRNA the tool predicted five off-targets with off-score > 0.000 . Of the eight potential off-targets sites, four are in intergenic regions, two are in the intron of other genes (Solyc05g009240, Solyc02g022830), and two are in the coding region of a gene (Solyc10g011910, Solyc08g068470) (Supplementary Table S3). Using primers flanking these putative off-target sites, we amplified seven of them from wild type and mutant plants and analyzed each chromatogram with TIDE (<https://tide.deskgen.com>; Brinkman et al. 2014). The genomic region involving Solyc08g068470 (off-target of *WRKY25*-gRNA, with off-score 0.006), could not be amplified in spite of having used two pairs of primers (Supplementary Tables S2, S3). None of the amplified regions possess any modifications suggesting that the observed phenotype is most likely due to the mutation on the target transcription factor genes (Supplementary Table S3).

Tomato *WRKY* mutant plants are affected in Pto/Prf mediated ETI

To test whether *WRKY22* and *WRKY25* contribute to ETI activation, we syringe-infiltrated *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) strain DC3000 into leaves of $\Delta wrky22$, $\Delta wrky25$, $\Delta wrky22/25$, Rio Grande-*prf3* plants (RG-*prf3*, which contains a deletion in *Prf* gene that makes plants susceptible to *Pst* DC3000) and wild-type (WT) plants. RG-*prf3* and $\Delta wrky$ ($\Delta wrky22$, $\Delta wrky25$ and $\Delta wrky22/25$) mutant plants showed higher bacterial populations compared with WT plants two days after infiltration (dai) (Fig. 1a). However, no differences in bacterial populations were observed between $\Delta wrky22$, $\Delta wrky25$ and $\Delta wrky22/25$ and WT plants when they were infiltrated with *Pst* DC3000 $\Delta fliC$ (Supplementary Fig. S2), a strain lacking flagellin, the main contributor to PTI elicitation in tomato (Rosli et al. 2013). As

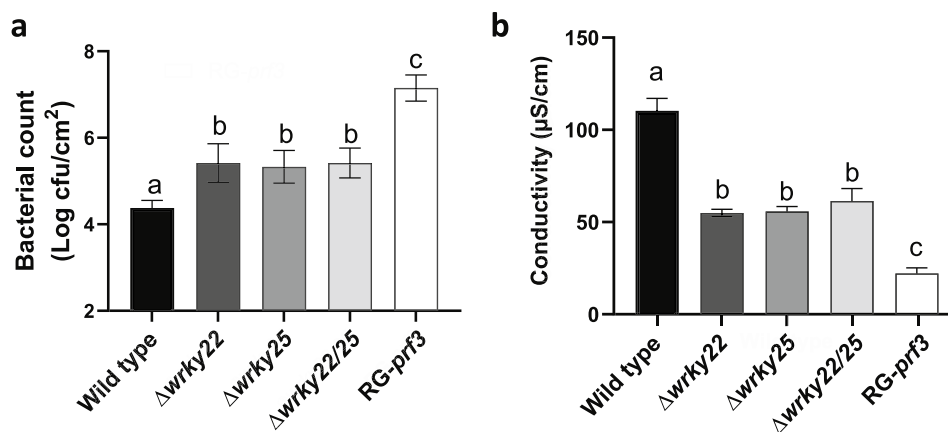


Fig. 1 Tomato *WRKY* mutant plants are affected in *Pto/Prf* mediated ETI. Four-week-old plants were syringe-infiltrated with 5×10^4 cfu/mL *Pst* DC3000. **a** Bacterial population was measured at day 2 after infiltration. Bars represent the mean of four biological replicates \pm standard deviation (SD). **b** Electrolyte leakage at day 1 after infiltration as a quantitative measure of programmed cell death

another approach to characterize ETI in the mutant plants, we measured electrolyte leakage which is associated with the hypersensitive response that accompanies ETI (Baker et al. 1991). Lower electrolyte leakage was observed in $\Delta wrky$ plants compared with the WT control, when challenged with *Pst* DC3000 (Fig. 1b). These results further support that *WRKY22* and *WRKY25* contribute to ETI in tomato in a manner that is not dissociated from the PTI response.

Tomato *WRKY* single and double mutants are compromised in pattern-triggered immunity

To investigate if the *WRKY*s play a role in PTI we measured callose deposition which is associated with PTI (Nguyen et al. 2010). For this purpose, plants were syringe-infiltrated with a high titer of *Pseudomonas fluorescens* 55 to induce a strong PTI. The $\Delta wrky22$, $\Delta wrky25$, $\Delta wrky22/25$ plants developed fewer callose deposits compared with the WT control (Fig. 2a, b) suggesting a compromised PTI activation. To confirm this result, we syringe-infiltrated all lines with *Pst* DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$ in which *avrPto* and *avrPtoB* have been deleted and therefore cannot activate ETI in RG-*PtoR* line. No differences in bacterial count were observed in $\Delta wrky$ plants compared with WT plants at 0 days after infiltration (dai), but the titer was higher in all of the mutant lines at 1 and 2 dai (Fig. 2c).

To test if *WRKY*-mediated immunity plays a role in PTI on the leaf surface, we used the same strain but performing a dip-inoculation. This inoculation method requires the pathogen to enter into the apoplastic space through stomata or natural openings. Interestingly, in plants with a *WRKY22* mutation ($\Delta wrky22$ and $\Delta wrky22/25$ plants) the bacterial

titer is higher compared with WT plants at day 0 (2 h after inoculation, hai) (Fig. 2d), suggesting that when this transcription factor is not present *Pst* is able to enter more easily into the apoplast. For $\Delta wrky25$ plants, though the bacterial counts were slightly larger than that observed for WT, they were not statistically significant. At 1 and 2 dai, *Pst* count was higher in all mutant lines, including $\Delta wrky25$, compared with WT plants (Fig. 2d) and this result correlated with more bacterial specks observed in these plants (Fig. 2e). Collectively, these experiments demonstrate that *WRKY22* and *WRKY25* play an important role in the activation of PTI.

Tomato mutant lines have impaired stomatal-mediated immunity

Leaf conductance is an indicator of stomata activity as it is a measure of the degree of stomatal opening. Having found that at 0 dai we could detect a difference in bacterial count between the mutant lines and WT, we measured stomatal conductance, to test whether *WRKY22* and *WRKY25* play a role in stomatal aperture modulation. Higher levels of conductance on the abaxial epidermis were observed in $\Delta wrky22$, $\Delta wrky25$ and $\Delta wrky22/25$ compared with WT plants, while no difference could be detected on the adaxial side (Fig. 3a). One explanation of these results could be that $\Delta wrky$ lines have more stomata per surface unit than WT plants. To test this possibility, we counted the stomata number per mm². No differences were observed between WT and mutant plants on the abaxial epidermis (Fig. 3b). However, the adaxial epidermis from mutant lines showed slightly higher number per mm² (Fig. 3b). Due to a considerably lower number of stomata on the

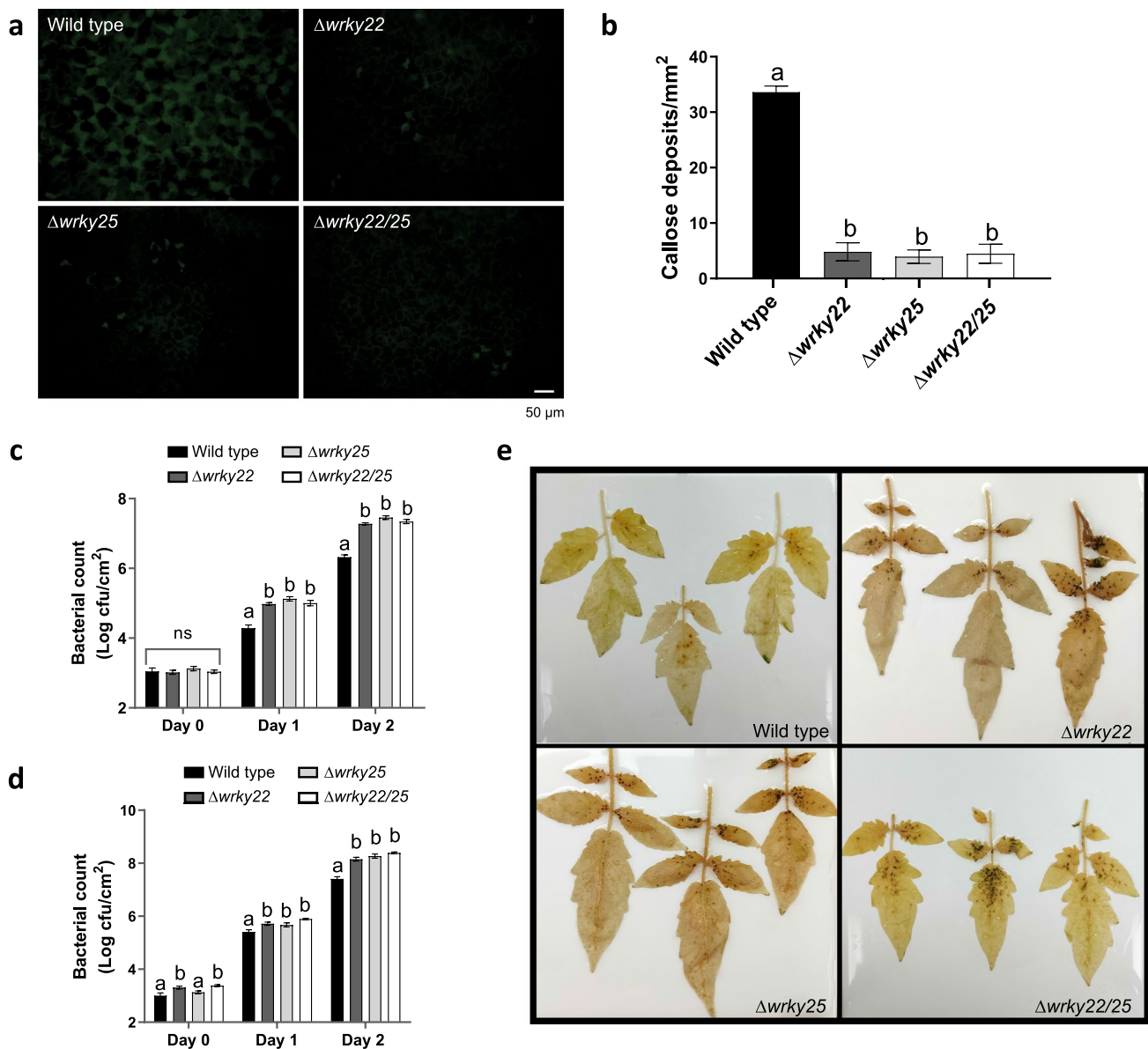


Fig. 2 Tomato *WRKY* single and double mutants are compromised in pattern-triggered immunity (PTI). **a** Leaves of tomato mutant and wild type plants were syringe-infiltrated with 1×10^8 cfu/mL *Pseudomonas fluorescens* 55. Tissue was sampled at 1 day after infiltration (dai) for visualization of callose deposition. Representative observations for each line plant are shown. Fluorescence of callose deposits was pseudo-colored green. **b** Callose deposits at 1 dai ranging from 8.5 to 85 μm in diameter were quantified and expressed per mm^2 of leaf tissue. **c** Leaflets were syringe-infiltrated with 1×10^4 cfu/mL

DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$. Bars show means of four biological replicates \pm standard deviation (SD). **d** $\Delta wrky22$, $\Delta wrky25$, $\Delta wrky22/25$ and wild-type RG-PtoR plants were dip-inoculated with 1×10^5 cfu/mL DC3000 $\Delta avrPto\Delta avrPtoB$. Four plants for each genotype were tested per experiment. **e** Photographs of disease symptoms taken 3 days after dipping inoculation. In all bar graphs, different letters indicate significant differences based on a one-way ANOVA followed by Tukey's Honest Significant Difference post hoc test ($p < 0.05$)

adaxial compared to the abaxial side and the small differences observed between WT and $\Delta wrky$ lines only on this side, we speculated that these differences would not explain the higher leaf conductance observed in $\Delta wrky$ plants (Fig. 3a). For this reason, we further studied a potential role of *WRKY22* and *WRKY25* in stomatal

aperture, focusing on the abaxial side. Under basal conditions (8 h after lights were on; 2 PM), $\Delta wrky$ plants exhibited stomatal pore width:length ratio nearly three times higher than WT (Fig. 3c, d), which is in agreement with the observed leaf conductance measurements (Fig. 3a). In addition, stomata from mutant plants did not respond

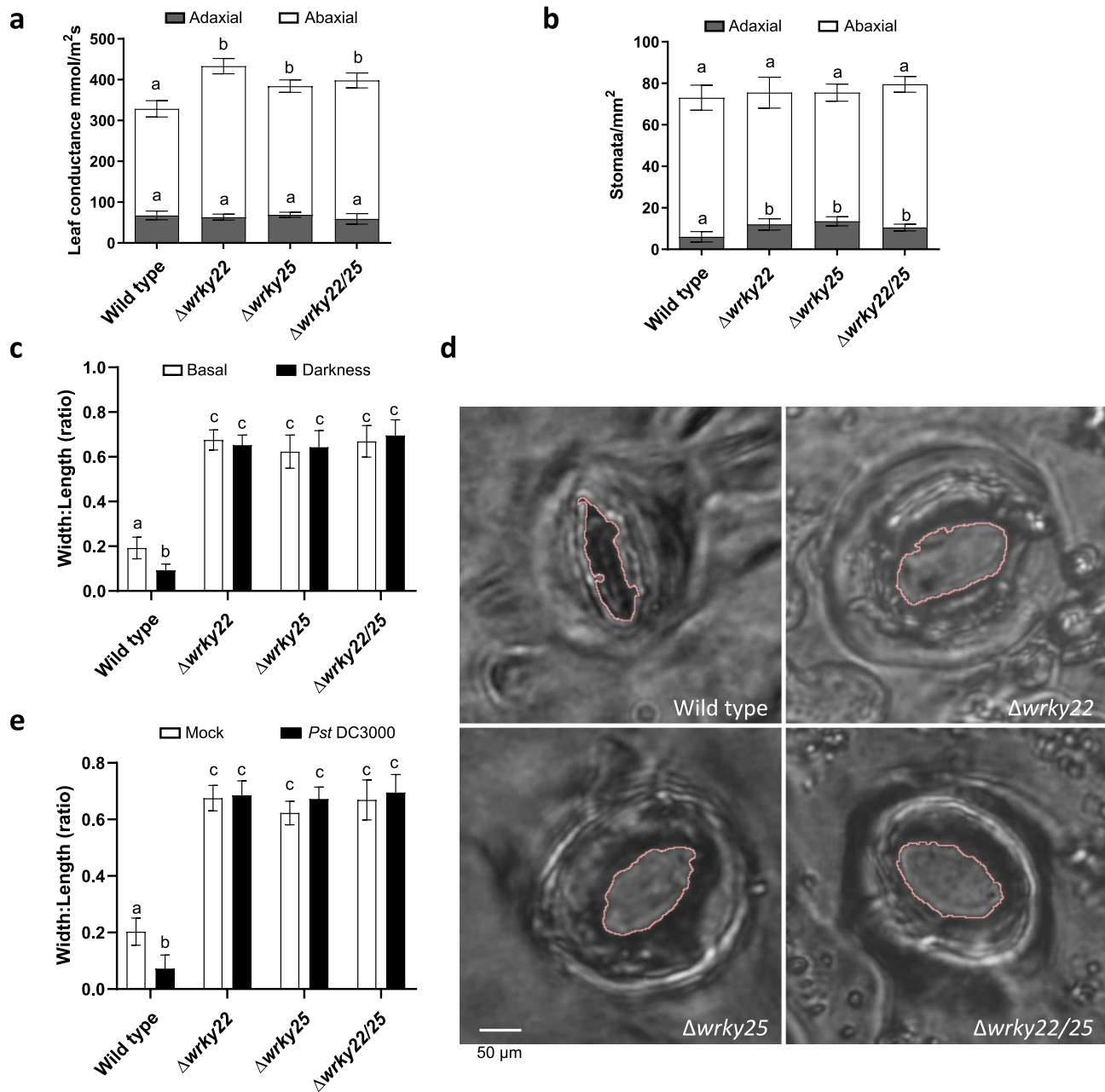


Fig. 3 Tomato mutant lines are compromised in stomatal-mediated immunity. **a** Stomatal conductance ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was measured on the abaxial and adaxial side of leaflets from the third leaf. Data correspond to the average of three leaflets from at least 4 biological replicates per line. **b** Stomata quantification of tomato wild type. Photographs from the adaxial and abaxial leaf epidermis were taken using an epifluorescence microscope. Epidermal cells and total stomata (open and closed) were counted manually and used to estimate stomata number per leaf surface (mm^2). Five photographs per biological replicate were analyzed. Bars represent the mean of 4 biological

replicates with their corresponding SD. **c** Stomatal aperture in basal conditions (Basal, 8 h after lights went on in the growth chamber) and after 8 h darkness (Darkness). Sixty stomata from four biological replicates were measured for the calculation. **d** Microscopic photographs of stomata on abaxial epidermis. Scale bar applies to all photographs. **e** Stomatal aperture in mock and *Pst* DC3000 infiltrated leaves. Sixty stomata from four biological replicates were measured for the calculation. In all bar graphs, different letters indicate significant differences based on a one-way ANOVA followed by Tukeys Honest Significant Difference post hoc test ($p < 0.05$)

to darkness stimulus through a reduction of width:length ratio, while WT showed the expected closure (Fig. 3c). We found no difference in stomata length between mutant and WT plants (Supplementary Fig. S3), so it is reasonable to use width:length ratio as an estimation of stomata opening.

We then investigated if $\Delta wrky$ plants are able to respond to *Pst* challenge by triggering the stomatal closure associated with the PTI response (Melotto et al. 2006). In line with the finding that a higher bacterial titer was observed in $\Delta wrky$ plants immediately after dip-inoculation (Fig. 2d), stomata of these mutants did not respond to *Pst* challenge (Fig. 3e). Together these results suggest that

WRKY22 and WRKY25 are required for correct stomata functionality.

WRKY22 and WRKY25 are localized in the nucleus but do not physically interact

To study the subcellular localization of these transcription factors, we fused the coding sequences of WRKY22 and WRKY25 to GFP and RFP, respectively, under the control of the CaMV 35S promoter (Karimi et al. 2002). Then, we co-agroinfiltrated leaves of *N. benthamiana* with each construct, with the corresponding controls (free eGFP and mRFP) and

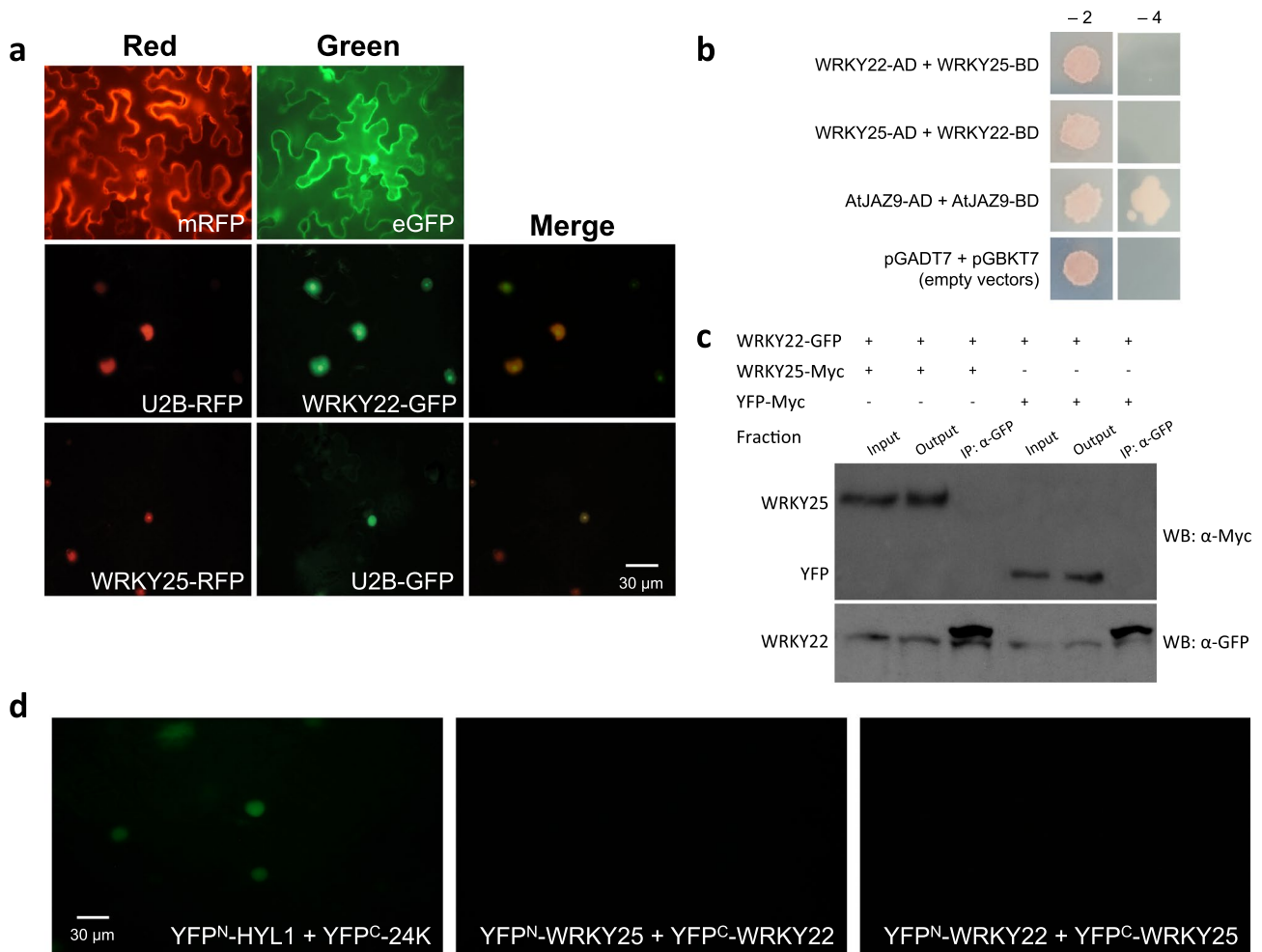


Fig. 4 WRKY22 and WRKY25 are localized in the nucleus but they do not physically interact. **a** Subcellular localization of WRKY22 and WRKY25. WRKY25-RFP and WRKY22-GFP were transiently expressed in *N. benthamiana* under CaMV 35S promoter. Free RFP and GFP were used as nucleus-cytoplasmic markers and U2B-GFP, U2B-RFP as nucleus markers. Photographs were taken at 2 dai. Scale bar applies to all photographs. **b** Yeast two-hybrid (Y2H) assays for WRKY22 and WRKY25 interactions. AD, activation domain in pGADT7 vector; BD, DNA binding domain in pGBKT7 vector; AtJAZ9, *Arabidopsis thaliana* JASMONATE ZIM DOMAIN

9; -2, SD - Leu - Trp; -4, SD - Leu - Trp - His - Ade. **c** Coimmunoprecipitation of WRKY22-GFP and WRKY25-Myc. Proteins were extracted from *N. benthamiana* leaves expressing WRKY22-GFP in combination with WRKY25-Myc or YFP-Myc and used for immunoprecipitation using anti-GFP agarose beads. WRKY22, WRKY25 and YFP were detected by immunoblotting with α -GFP or α -Myc antibodies. **d** In vivo analysis for testing WRKY22 and WRKY25 interaction by bimolecular fluorescence complementation (BiFC). YFP^N-HYL1 + YFP^C-24K interaction was used as a positive control. Scale bar applies to all photographs

the nucleus marker U2B" (U2 small nuclear ribonucleoprotein B") (Kim et al. 2007). eGFP and mRFP signals were detected in both nucleus and cytoplasm (Fig. 4a). Both WRKYs localized in the nucleus with the corresponding subcellular marker U2B" (Fig. 4a). We next investigated their subcellular location upon immune response activation by *Pst* DC3000. We observed that both transcription factors maintained their nuclear location at 6 h post-*Pst* DC3000 challenge (Supplementary Fig. S4). WRKY22 and WRKY25 protein expression was confirmed by immunoblotting with tag-specific antibodies (Supplementary Fig. S5a).

Our present (Figs. 1, 2 and 3) and previous data (Ramos et al. 2021) suggest that WRKY22 and WRKY25 are not functionally redundant (i.e., the two single mutants are both susceptible). One possible explanation for this observation is that WRKY22 and WRKY25 physically interact in the nucleus in order to modulate target gene transcription. Therefore, we investigate this possibility using a yeast two-hybrid Y2H assay. We observed no interaction between the combination of WRKY22-AD + WRKY25-BD and WRKY25-AD + WRKY22-BD under restrictive conditions (-4, Fig. 4b). Positive interaction was only observed in the positive control AtJAZ9 homodimer in -4 condition (Fig. 4b). Also, we transiently expressed WRKY proteins in *N. benthamiana* leaves and performed a co-immunoprecipitation assay (Co-IP) to investigate if they physically associate in planta. Yellow fluorescent protein (YFP) was used as a negative control for these experiments. No interaction was observed between WRKY22-GFP and WRKY25-Myc (Fig. 4c). We also analyzed a possible interaction in vivo between them by bimolecular fluorescence complementation (BiFC). WRKY22 and WRKY25 coding sequences were introduced in pAS054 and pAS059, vectors that contain the N- and C- terminal fragments of the reporter protein citrine (Manavella et al. 2012; Cambiagno et al. 2021). The interaction between YFP^N-HYL1 + YFP^C-24 K was used as a positive control. No evidence of interaction was observed using the combination of YFP^N-WRKY25 + YFP^C-WRKY22 or YFP^N-WRKY22 + YFP^C-WRKY25 (Fig. 4d).

WRKY22 is required for WRKY25 gene expression

In response to internal or external stimuli, WRKYs modulate the expression of their target genes by binding to the W-box in their promoter regions. W-box elements are also present in the promoters of the majority of the WRKY genes, suggesting an auto- and/or a cross-regulation among them (Eulgem and Somssich 2007; Rushton et al. 2010). Previously, through a bioinformatic analysis of *cis*-elements present in the promoter regions of tomato WRKY22 and WRKY25 we found multiple W-boxes suggesting this possible cross-regulation (Ramos et al. 2021). We speculated

that this could in part be the reason why these transcription factors do not appear to function redundantly (i.e., one may transcriptionally regulate the other). We were aware that both WRKY22 and WRKY25 are induced by ETI at 6 hai (Ramos et al. 2021), but we wondered if their transcriptional behavior differed at other time-points. We syringe-infiltrated WT plants with a *Pst* DC3000Δ*fliC*, a strain in which the flagellin-encoding gene has been deleted and therefore is not able to activate the associated PTI response and with *Pst* DC3000 Δ*fliC*Δ*avrPto*Δ*avrPtoB* strain with *avrPto*, *avrPtoB* and *fliC* genes deleted and therefore additionally not able to activate ETI. The comparison between these two challenges accounts for the AvrPto/AvrPtoB ETI-associated response. We confirmed that both transcription factors are induced by ETI at 6 hai, but that WRKY22 is induced earlier (4 hai) than WRKY25 (Fig. 5a). No significant induction could be observed for either of them at a later time-point (8 hai). These results supported the hypothesis that WRKY22 could be involved in the transcriptional regulation of WRKY25.

To test this hypothesis, we employed an assay in which we overexpressed WRKY22-Myc in Δ*wrky22* plants and measured by RT-qPCR the relative expression of WRKY25 (Fig. 5b). In this case we could detect a clear increase in WRKY25 expression compared to the YFP-Myc control. In contrast, when we overexpressed WRKY25-Myc in Δ*wrky25* plants we did not observe WRKY22 transcript abundance difference with YFP-Myc control (Fig. 5b).

To corroborate these results, we used the β-Glucuronidase (*Gus*) reporter system in *N. benthamiana* plants to investigate if overexpression of WRKY22 led to the activation of WRKY25 promoter. We cloned the promoter regions of WRKY22 (prom-WRKY22:*Gus*) and WRKY25 (prom-WRKY25:*Gus*) in pKWGFS7 vector (Karimi et al. 2002) upstream of *Gus* gene. We observed blue staining associated to WRKY25 promoter activation in the presence of WRKY22-Myc, but not vice versa (Fig. 5c). Neither of these transcription factors appear to participate in their own transcriptional auto-activation. Expected protein expression was confirmed by immunoblotting with specific antibodies (Supplementary Fig. S5b).

Taking advantage of our results that suggest that WRKY22 is required for WRKY25 gene expression, we tested if the 3 bp mutation in the WRKY22 (WRKY22(-3 bp)) gene from Δ*wrky25* plants affects its functionality. As previously, we overexpressed WRKY22-Myc, WRKY22(-3 bp)-Myc and YFP-Myc in Δ*wrky22* tomato plants and measured WRKY25 gene expression. RT-qPCR results showed that the mutated version of WRKY22, WRKY22(-3 bp), is able to induce WRKY25 expression in the same extent than WRKY22 WT. In both cases, the increased in WRKY25 expression was significantly different compared with the control YFP-Myc (Supplementary Fig. S6a). Also,

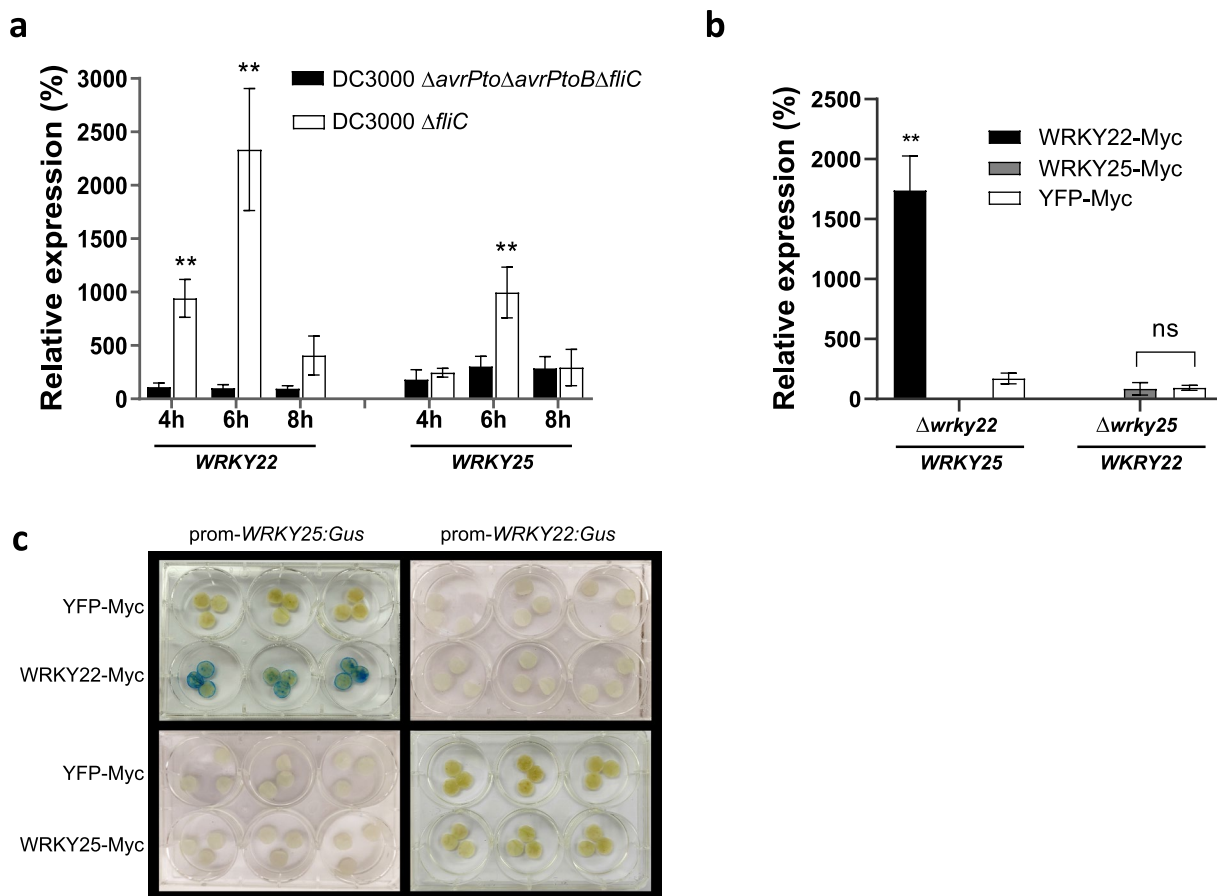


Fig. 5 WRKY22 is required for *WRKY25* gene expression. **a** Temporal expression of *WRKY22* and *WRKY25*. Leaves of 4 week-old RG-PtoR tomato plants were syringe-infiltrated with 5×10^6 cfu/mL DC3000 Δ avrPto Δ avrPtoB Δ fliC and DC3000 Δ fliC. Samples were taken 4, 6 and 8 h after infiltration. **b** Gene expression of *WRKY25* in Δ wrky22 plants when WRKY22-Myc was transiently over-expressed (OE) and gene expression of *WRKY22* in Δ wrky25 plants when

WRKY25-Myc was transiently OE. YFP-Myc was used as a negative control. For both graphs, *ARD2* and *VIN3* were used as reference genes and double asterisks indicate significant differences using Dunnett's method (** $p < 0.01$). **c** Histochemical β -glucuronidase (GUS) assay of prom-*WRKY22:Gus* and prom-*WRKY25:Gus* co-infiltrated with WRKY25-Myc or WRKY22-Myc. Co-infiltrations with YFP-Myc were used as negative controls

coinfiltration of prom-*WRKY25:Gus* with WRKY22(-3 bp)-Myc and WRKY22-Myc in *N. benthamiana* leaves developed blue staining associated with the activation of this promoter. As expected, YFP-Myc negative control was not able to induce blue color when co-expressed with *WRKY25:Gus* promoter (Supplementary Fig. S6b). These results support the idea that Δ wrky25 plants can be considered simple mutants.

Discussion

Transcription factors modulate the expression of their target genes, controlling many cellular functions and consequently are considered key players in processes such as growth, development, abiotic and biotic responses (Tsuda and Somssich 2015; Strader et al. 2022). The WRKY

transcription factor family is highly diversified in plants (Chen et al. 2017) and particularly in tomato where there are 81 members predicted (Huang et al. 2012; Zheng et al. 2016). However, only a few of them have been implicated in the tomato defense response (Liu et al. 2014; Li et al. 2015; Cui et al. 2018; Bhattarai et al. 2010; Huang et al. 2016) and only one WRKY in this species (SIWRKY39) is known to be involved in *Pseudomonas syringae* resistance (Sun et al. 2015). In different plant species WRKY22 TFs have been implicated in ETI (Hussain et al. 2018) and in PTI immune responses (Asai et al. 2002; Hsu et al. 2013). In *Arabidopsis*, WRKY22 is a susceptibility factor that favors aphid performance (Kloth et al. 2016). In tomato, there are two orthologous genes of *AtWRKY22*, *SIWRKY22* and *SIWRKY25* (Huang et al. 2012).

Using RNA-Seq data we had previously identified tomato WRKY22 and WRKY25 as transcriptionally induced during

early PTI and ETI activation (Pombo et al. 2014, 2017). By silencing the *Nicotiana benthamiana* orthologous genes we showed their contribution to these defense responses and against *Pst* and probably other non-bacterial pathogens (Ramos et al. 2021). To start with the characterization in tomato, using single and double loss-of-function mutants, we first investigated their possible involvement in ETI by infiltrating plants with the wild type strain *Pst* DC3000 and mutant strain that doesn't express flagellin (*Pst* DC3000 Δ *flhC*), the main inducer of PTI in tomato (Rosli et al. 2013). *WRKY22* and *WRKY25* mutant plants had higher bacterial populations when challenged with *Pst* DC3000, but not with the flagellin-defective strain. The fact that flagellin-mediated PTI activation is required for observing this phenotype, aligns with recent findings that PTI and ETI potentiate each other and are both required for a strong plant defense (Yuan et al. 2021; Ngou et al. 2021; Pruitt et al. 2021; Tian et al. 2021) and raises the possibility that *WRKY22* and *WRKY25* could be part of the cross-talk between these two immune response layers.

By using syringe infiltration and dip inoculation, we investigated if apoplastic and stomatal-mediated PTI are affected by mutation of *WRKY22* and/or *WRKY25*. Bacterial populations at day 0 (2 hai) after dipping inoculation indicated that more bacteria were able to enter into the leaves in Δ *wrky22* and Δ *wrky22/25* plants. Though a similar trend could be observed in Δ *wrky25* plants, this increase in bacterial population was not statistically significant. If there is no tissue damage, the natural entrance for *Pst* into the plant tissue is through stomata (Xin and He 2013). We were able to rule out the possibility of a higher number of stomata on the epidermis of mutant plants, and we concluded that these two TFs modulate stomata closure, because mutant plants do not have the ability to close them in darkness or even after *Pst* DC3000 challenge. In agreement with our results, *Arabidopsis wrky22* mutant plants were unable to close the stomata with ABA and PVS2 cryo-protectant treatments, leading to shoot tips more susceptible to osmotic stress as consequence of tissue cryo-preservation (Stock et al. 2020). This constitutive open stomata phenotype could be related with altered salicylic acid responses, mediated by other WRKY TFs (*WRKY53* and *WRKY70*) that act as negative regulators of stomata closure and are upregulated in *Arabidopsis* Δ *wrky22* plants (Stock et al. 2020; Li et al. 2013; Sun and Yu 2015). In tomato, silencing another WRKY named *SlWRKY81* led to an increase in stomata closure and better plant performance under drought stress (Ahammed et al. 2020). To understand the mechanism of regulation of stomatal closure by *WRKY22* and *WRKY25* in immunity, it will be interesting to determine if hormones such as SA and ABA are implicated in this process and investigate which genes are transcriptionally modulated (in)directly by *WRKY22* and *WRKY25*.

Although it is known that TFs exert their function in the nucleus by binding to specific DNA elements in the promoters of target genes (Strader et al. 2022), there are several reports indicating that their localization can shift between the nucleus and other cellular compartments and that this relocalization has consequences for their activity. One example is the basic leucine zipper bZIP10 from *Arabidopsis* (positive regulator of basal defense and hypersensitive responses), which is recruited in the cytoplasm by LESIONS SIMULATING DISEASE 1 (LSD1) protein to inhibit its function in the nucleus (Kaminaka et al. 2006). Also, a *Phytophthora infestans* effector prevents the translocation of two NAC TFs from the endoplasmic reticulum (ER) to the nucleus promoting disease progression in potato plants (McLellan et al. 2013). In oilseed rape, NAC60 is associated with the ER membrane and translocated to the nucleus by certain stimulus such as oxidative stresses (Yan et al. 2021). Interestingly, a rice bZIP TF, APIP5, was recently reported to possess a dual localization and different functions depending if this TF is in the nucleus or the cytoplasm. This study also revealed a novel mechanism of action of TFs at a post-transcriptional level (Zhang et al. 2022). This range of possibilities made us explore the subcellular localization of our WRKY TFs as a first approach to infer their mode of action. We observed that both localized in the nucleus and that this location did not change in the presence of the pathogen. This observation suggests that their main actions may occur in this subcellular compartment.

Interestingly, mutation of either *WRKY22* or *WRKY25* or both genes led to a similar pathogen susceptibility phenotype indicating that there is no functional redundancy between them in plant defense activation. One possibility is that the two TFs physically interact in order to modulate the expression of their target genes. Homo and hetero-dimerization was previously described for other WRKY TFs (Chi et al. 2013; Llorca et al. 2014; Chen et al. 2019). Although both co-localized in the nucleus, our Y2H, co-IP and BiFC experiments indicated that they do not physically interact. It could be possible that they bind different W-box elements present in tandem in the same promoters for gene expression modulation, as was demonstrated for *Arabidopsis* *WRKY18*, *WRKY40* and *WRKY60* (Liu et al. 2012). Although it was not experimentally confirmed, some of the W-boxes are far apart suggesting the possibility of DNA loop formation for the regulation of the target genes (Liu et al. 2012; Chi et al. 2013). WRKY TF activity can be activated by MAP kinase phosphorylation (Guan et al. 2014; Hou et al. 2019; Adachi et al. 2015; Mao et al. 2011) or through Ca⁺⁺ signaling mediated by their interaction with calmodulins (CaM) (Park et al. 2005). Therefore, analyzing possible interaction of *WRKY22* and *WRKY25* with such proteins, upon activation of plant immunity, could be useful to understand the mechanism of action of these TFs.

Another explanation for the non-functional redundancy in plant defense could be that one of the WRKYs regulates gene expression of the other. This possibility is supported by the fact that most WRKY TFs possess W-boxes in their promoters (Llorca et al. 2014) and this is the case for the *WRKY22* and *WRKY25* genes (Ramos et al. 2021). Temporal differences in gene expression with *WRKY22* transcript being detected two hours earlier than *WRKY25*, also supported this possible mechanism. Although we do not have evidence of direct binding of *WRKY22* to the *WRKY25* promoter, we confirmed that *WRKY22* facilitates *WRKY25* gene expression using two different experimental methods. However, *WRKY25* was not found to activate *WRKY22* gene expression nor was auto-regulation observed for either of the TFs. A similar mechanism was reported previously in rice and Arabidopsis. OsWRKY80 binds to the promoter region of *OsWRKY4* and both enhance disease resistance to *Rhizoctonia solani* (Peng et al. 2016). Also, downstream of *flg22* perception, AtWRKY22 is able to activate the expression of another member of the II-e WRKY family, *AtWRKY29*, and both activate the PTI-molecular marker FRK1 (Asai et al. 2002). In tomato, there is one orthologous gene of *Arabidopsis WRKY29* (Huang et al. 2012). Concordantly with tomato *WRKY22* and *WRKY25*, *SlWRKY29* is also induced by ETI at 6 hpi. However, PTI gene expression induction is observed at 6 hpi and not at early time points (30 min after *flg22* treatment) as was shown for *WRKY22* and *WRKY25* (Pombo et al. 2014, 2017). This raises the possibility of a partially divergent mechanism of action between Arabidopsis and tomato. In line with this idea is the fact that AtWRKY22 is orthologous to both tomato *WRKY22* and *WRKY25* (Huang et al. 2012) and that according to our results, these are not functionally redundant.

Future experiments will help to clarify how these two TFs regulate defense responses in tomato. Exploring if these proteins interact with other important players of plant immunity such as MAPKs, CaM, VQ-proteins or R-proteins might give clues as to how *WRKY22* is activated to then regulate *WRKY25* transcription. Also, studying which genes are regulated indirectly and directly by these TFs would help us to understand the different tomato defense pathways controlled by *WRKY22* and *WRKY25*.

CRISPR-Cas9 technology allowed us to generate three mutant tomato lines, single and double mutants for our WRKYs of interest. Using these, we were able to determine that both proteins are positive regulators of PTI and ETI. Also, they participate in apoplastic and stomatal-mediated defense activation, in the latter case regulating stomata closure. Both TFs are localized in the nucleus, but in our conditions, they do not appear to physically interact. Finally, our experiments revealed a mechanism of action whereby *WRKY22* regulates the expression of the *WRKY25* gene

which provides an explanation for the lack of functional redundancy between these two TFs in tomato immunity.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11103-023-01358-0>.

Acknowledgements We thank PhD Facundo Marmisolle for providing us with the plasmids and the positive control used for subcellular localization and BiFC and for his assistance in the western blot and CoIP. Mauro Bartolozzi and Santiago Martínez-Alonso for their assistance in plant growth and maintenance. R.N.R. performed this research as part her PhD at Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. This research was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica—Argentina (PICT2019-1328, H.G.R. and PICT2017-0916, M.A.P.); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas—Argentina (PUE2016, Carlos G. Bartoli), and the U.S. National Science Foundation (IOS-1546625, G.B.M.); and the National Research and Development Agency (ANID)—Chile (FONDECYT/Regular 1210941 and Millenium Science Initiative Program-NCN2021_010, F.V.R. and C.R.F.).

Author contributions CFL, NZ, GBM, MAP and HGR designed the research. RNR, NZ, DBL and FVR performed the research. RNR, MAP and HGR wrote the paper. All authors read, edited and approved the manuscript.

Funding Funding was provided by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Grant Nos. PICT2019-1328, PICT2017-0916), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Grant No. PUE2016-0110), National Science Foundation (Grant No. IOS-1546625), Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (Grant Nos. FONDECYT/Regular 1210941, Millenium Science Initiative Program-NCN2021_010).

Data availability Enquiries about data availability should be directed to the authors.

Declarations

Competing interests The authors have not disclosed any competing interests.

References

- Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, Ishihama N, Yoshioka M, Katou Y, Yoshioka H (2015) WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 27(9):2645–2663
- Ahmed GJ, Li X, Yang Y, Liu C, Zhou G, Wan H, Cheng Y (2020) Tomato WRKY81 acts as a negative regulator for drought tolerance by modulating guard cell H₂O₂-mediated stomatal closure. *Environ Exp Bot* 171:103960
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977–983
- Baker CJ, O'Neill NR, Keppler LD, Orlandi EW (1991) Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell suspensions. *Phytopathology* 81:1504–1507
- Bhattarai KK, Atamian HS, Kaloshian I, Eulgem T (2010) WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato *R* gene *Mi-1*. *Plant J* 63:229–240

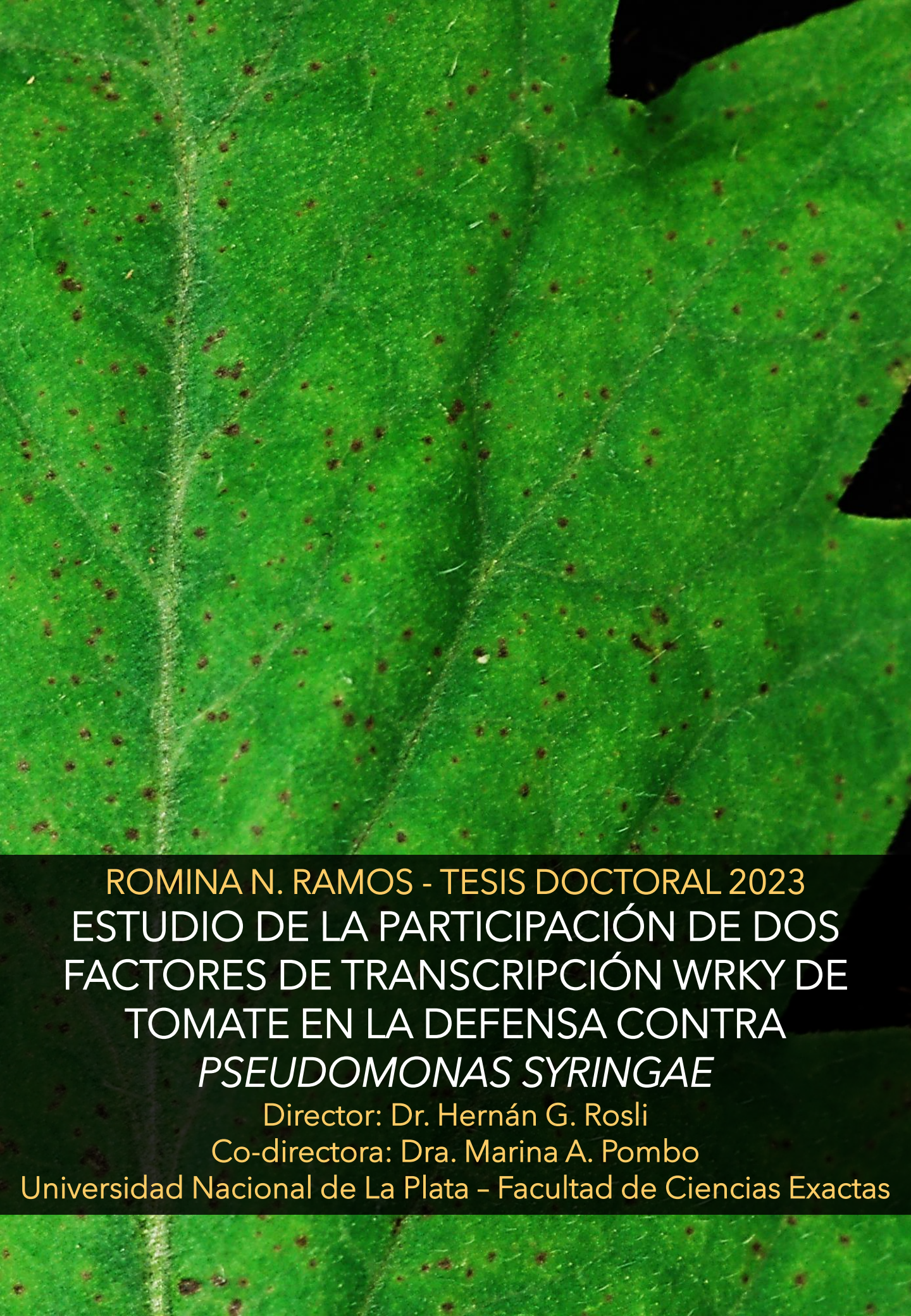
- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant* 8:521
- Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* 42:e168
- Brooks DM, Hernandez-Guzman G, Kloek AP, Alarcon-Chidez F, Sreedharan A, Rangaswamy V, Penaloza-Vazquez A, Bender CL, Kunkel BN (2004) Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 17:162–174
- Burke R, Schwarze J, Sherwood OL, Jnaid Y, McCabe PF, Kacprzyk J (2020) Stressed to death: the role of transcription factors in plant programmed cell death induced by abiotic and biotic stimuli. *Front Plant Sci* 11:1235
- Cambiagno DA, Giudicatti AJ, Arce AL, Gagliardi D, Li L, Yuan W, Lundberg DS, Weigel D, Manavella PA (2021) HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Mol Plant* 14(3):426–439
- Chen F, Hu Y, Vannozzi A, Wu K, Cai H, Qin Y, Zhang L (2017) The WRKY transcription factor family in model plants and crops. *Crit Rev Plant Sci* 36(5–6):311–335
- Chen X, Li C, Wang H, Guo Z (2019) WRKY transcription factors: evolution, binding, and action. *Phytopathol Res* 1(1):1–15
- Chi Y, Yang Y, Zhou Y, Zhou J, Fan B, Yu JQ, Chen Z (2013) Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. *Mol Plant* 2:287–300
- 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. *Plant Cell* 18:465–476
- Chini A, Monte I, Fernández-Barbero G, Boter M, Hicks G, Raikhel N, Solano R (2021) A small molecule antagonizes jasmonic acid perception and auxin responses in vascular and nonvascular plants. *Plant Physiol* 187(3):1399–1413
- Chinnapandi B, Bucki P, Braun Miyara S (2017) SIWRKY45, nematode-responsive tomato WRKY gene, enhances susceptibility to the root knot nematode *M. javanica* infection. *Plant Signal Behav* 12(12):e1356530
- Cui J, Bahrami AK, Pringle EG, Hernandez-Guzman G, Bender CL, Pierce NE, Ausubel FM (2005) *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1791–1796
- Cui J, Xu P, Meng J, Li J, Jiang N, Luan Y (2018) Transcriptome signatures of tomato leaf induced by *Phytophthora infestans* and functional identification of transcription factor SpWRKY3. *Theor Appl Genet* 131:787–800
- del Pozo O, Pedley KF, Martin GB (2004) MAPKKKalpha is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *EMBO J* 23:3072–3082
- Dong J, Chen C, Chen Z (2003) Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51:21–37
- Eulgem T, Somssich IE (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10:366–371
- Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5:1003–1011
- Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S (2014) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 10(5):e1004384
- Haegeman A, Mantelin S, Jones JT, Gheysen G (2012) Functional roles of effectors of plant–parasitic nematodes. *Gene* 492(1):19–31
- Hind SR, Strickler SR, Boyle PC, Dunham DM, Bao Z, O’Doherty IM, Baccile JA, Hoki JS, Viox EG, Clarke CR, Vinatzer BA, Schroeder FC, Martin GB (2016) Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nat Plants* 2:16128
- Hou Y, Wang Y, Tang L, Tong X, Wang L, Liu L, Zhang J (2019) SAPK10-mediated phosphorylation on WRKY72 releases its suppression on jasmonic acid biosynthesis and bacterial blight resistance. *iScience* 16:499–510
- Hsu FC, Chou MY, Chou SJ, Li YR, Peng HP, Shih MC (2013) Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:2699–2713
- Hu Y, Ding Y, Cai B, Qin X, Wu J, Yuan M, Wan S, Zhao Y, Xin XF (2022) Bacterial effectors manipulate plant abscisic acid signaling for creation of an aqueous apoplast. *Cell Host Microbe* 30(4):518–529
- Huang S, Gao Y, Liu J, Peng X, Niu X, Fei Z, Cao S, Liu Y (2012) Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Mol Genet Genomics* 287:495–513
- Huang Y, Li MY, Wu P, Xu ZS, Que F, Wang F, Xiong AS (2016) Members of WRKY Group III transcription factors are important in TYLCV defense signaling pathway in tomato (*Solanum lycopersicum*). *BMC Genom* 17:788
- Hussain A, Li X, Weng Y, Liu Z, Ashraf MF, Noman A, He S (2018) CaWRKY22 acts as a positive regulator in pepper response to *Ralstonia solanacearum* by constituting networks with CaWRKY6, CaWRKY27, CaWRKY40, and CaWRKY58. *Int J Mol Sci* 19(5):1426
- Jacobs TB, Zhang N, Patel D, Martin GB (2017) Generation of a collection of mutant tomato lines using pooled CRISPR libraries. *Plant Physiol* 174:2023–2037
- Kaminaka H, Näke C, Epple P, Dittgen J, Schütze K, Chaban C, Dangl JL (2006) bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J* 25(18):4400–4411
- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7(5):193–195
- Karkute SG, Gujjar RS, Rai A, Akhtar M, Singh M (2018) Genome wide expression analysis of WRKY genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) under drought stress. *Plant Gene* 13:8–17
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C (2012) Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649
- Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, Rakitina DV, Gillespie T, MacFarlane S, Haupt S, Brown JW, Taliansky M (2007) Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* 26:2169–2179
- Kloth KJ, Wieggers GL, Busscher-Lange J, van Haarst JC, Kruijer W, Bouwmeester HJ, Jongsma MA (2016) AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling. *J Exp Bot* 67(11):3383–3396
- Li J, Besseau S, Törönen P, Sipari N, Kollist H, Holm L, Palva ET (2013) Defense-related transcription factors WRKY 70 and WRKY 54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis*. *New Phytol* 200(2):457–472
- Li JB, Luan YS, Liu Z (2015) SpWRKY1 mediates resistance to *Phytophthora infestans* and tolerance to salt and drought stress by modulating reactive oxygen species homeostasis and expression of defense-related genes in tomato. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 123:67–81
- Li B, Meng X, Shan L, He P (2016) Transcriptional regulation of pattern-triggered immunity in plants. *Cell Host Microbe* 19(5):641–650
- Liu ZQ, Yan L, Wu Z, Mei C, Lu K, Yu YT, Zhang DP (2012) Cooperation of three WRKY-domain transcription factors

- WRKY18, WRKY40, and WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes ABI4 and ABI5 in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 63(18):6371–6392
- Liu B, Hong Y, Zhang Y, Li X, Huang L, Zhang H (2014) Tomato WRKY transcriptional factor SIDRW1 is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to oxidative stress. *Plant Sci* 227:145–156
- Liu H, Ding Y, Zhou Y, Jin W, Xie K, Chen LL (2017) CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR/Cas9 tool for genome editing in plants. *Mol Plant* 10(3):530–532
- Llorca CM, Potschin M, Zentgraf U (2014) bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Front Plant Sci* 5:169
- Ma SW, Morris VL, Cuppels DA (1991) Characterization of a DNA region required for production of the phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol Plant Microbe Interact* 4:69–77
- Maekawa T, Kufer TA, Schulze-Lefert P (2011) NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nat Immunol* 12:817–826
- Manavella PA, Hagmann J, Ott F, Laubinger S, Franz M, Mace B, Weigel D (2012) Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell* 151:859–870
- Mao G, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S (2011) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(4):1639–1653
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432–1436
- McLellan H, Boevink PC, Armstrong MR, Pritchard L, Gomez S, Morales J, Whisson SC, Beynon JL, Birch PR (2013) An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription factors from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *PLoS Pathog* 9:e1003670
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126:969–980
- Mittal S, Davis KR (1995) Role of COR in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol Plant Microbe Interact* 8:165–171
- Moffett P (2009) Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Adv Virus Res* 822(75):1–33
- Monaghan J, Zipfel C (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* 15:349–357
- Murray MG, Thompson W (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8(19):4321–4326
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with *Avr* gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* 135:1113–1128
- Ngou BPM, Ahn HK, Ding P et al (2021) Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592:110–115
- Nguyen HP, Chakravarthy S, Velasquez AC, McLane HL, Zeng L, Nakayashiki H, Park DH, Collmer A, Martin GB (2010) Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* 23:991–999
- Park CY, Lee JH, Yoo JH, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Cho MJ (2005) WRKY group IIId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett* 579(6):1545–1550
- Pedley KF, Martin GB (2003) Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu Rev Phytopathol* 41:215–243
- Peng X, Wang H, Jang JC, Xiao T, He H, Jiang D, Tang X (2016) OsWRKY80-OsWRKY4 module as a positive regulatory circuit in rice resistance against *Rhizoctonia solani*. *Rice* 9(1):1–14
- Pombo MA, Zheng Y, Fernandez-Pozo N, Dunham DM, Fei Z, Martin GB (2014) Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins. *Genome Biol* 15:R492
- Pombo MA, Zheng Y, Fei Z, Martin GB, Rosli HG (2017) Use of RNA-seq data to identify and validate RT-qPCR reference genes for studying the tomato-*Pseudomonas* pathosystem. *Sci Rep* 7:44905
- Pruitt RN, Locci F, Wanke F, Zhang L, Saile SC, Joe A, Nürnberger T (2021) The EDS1–PAD4–ADR1 node mediates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Nature* 598(7881):495–499
- Ramos RN, Martin GB, Pombo MA, Rosli HG (2021) WRKY22 and WRKY25 transcription factors are positive regulators of defense responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol* 105(1):65–82
- Rocafort M, Fudal I, Mesarich CH (2020) Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Curr Opin Plant Biol* 56:9–19
- Rosli HG, Martin GB (2015) Functional genomics of tomato for the study of plant immunity. *Brief Funct Genomics* 14(4):291–301
- Rosli HG, Zheng Y, Pombo MA, Zhong S, Bombarely A, Fei Z, Collmer A, Martin GB (2013) Transcriptomics-based screen for genes induced by flagellin and repressed by pathogen effectors identifies a cell wall-associated kinase involved in plant immunity. *Genome Biol* 14:R139
- Roussin-Léveillé C, Lajeunesse G, St-Amand M, Veerapen VP, Silva-Martins G, Nomura K, Brassard S, Bolaji A, He SY, Moffett P (2022) Evolutionarily conserved bacterial effectors hijack abscisic acid signaling to induce an aqueous environment in the apoplast. *Cell Host Microbe* 30(4):489–501
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 15:247–258
- Salmeron JM, Oldroyd GED, Rommens CMT, Scofield SR, Kim HS, Lavelle DT, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (1996) Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster. *Cell* 86:123–133
- Singh K, Foley RC, Oñate-Sánchez L (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 5(5):430–436
- Stock J, Bräutigam A, Melzer M, Bienert GP, Bunk B, Nagel M, Mock HP (2020) The transcription factor WRKY22 is required during cryo-stress acclimation in *Arabidopsis* shoot tips. *J Exp Bot* 71(16):4993–5009
- Strader L, Weijers D, Wagner D (2022) Plant transcription factors: being in the right place with the right company. *Curr Opin Plant Biol* 65:102136
- Sun Y, Yu D (2015) Activated expression of AtWRKY53 negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement. *Plant Cell Rep* 34(8):1295–1306
- Sun X, Gao Y, Li H, Yang S, Liu Y (2015) Over-expression of SlWRKY39 leads to enhanced resistance to multiple stress factors in tomato. *J Plant Biol* 58:52–60
- Tian H, Wu Z, Chen S, Ao K, Huang W, Yaghmaiean H, Zhang Y (2021) Activation of TIR signalling boosts pattern-triggered immunity. *Nature* 598(7881):500–503
- Toruño TY, Stergiopoulos I, Coaker G (2016) Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annu Rev Phytopathol* 54:419–441
- Tsuda K, Somssich IE (2015) Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol* 206(3):932–947

- Ülker B, Somssich IE (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* 7(5):491–498
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *tomato bushy stunt virus*. *Plant J* 33:949–956
- Wei HL, Zhang W, Collmer A (2018) Modular study of the type III effector repertoire in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals a matrix of effector interplay in pathogenesis. *Cell Rep* 23:1630–1638
- Xin XF, He SY (2013) *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol* 51:473–498
- Xin XF, Kvitko B, He S (2018) *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol* 16:316–328
- Yan J, Chen Q, Cui X, Zhao P, Gao S, Yang B, Jiang YQ (2021) Ectopic overexpression of a membrane-tethered transcription factor gene *NAC60* from oilseed rape positively modulates programmed cell death and age-triggered leaf senescence. *Plant J* 105(3):600–618
- Yang L, Li L, Li H-Y, Sen L, Feng X, Chen LL (2014) CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant* 7(9):1494–1496
- Yuan M, Ngou BPM, Ding P, Xin XF (2021) PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 62:102030
- Zeng W, Melotto M, He SY (2010) Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr Opin Biotechnol* 21(5):599–603
- Zhang F, Fang H, Wang M, He F, Tao H, Wang R, Ning Y (2022) APIP5 functions as a transcription factor and an RNA-binding protein to modulate cell death and immunity in rice. *Nucleic Acids Res* 50(9):5064–5079
- Zheng Y, Jiao C, Sun H, Rosli HG, Pombo MA, Zhang P, Banf M, Dai X, Martin GB, Giovannoni JJ, Zhao PX, Rhee SY, Fei Z (2016) iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Mol Plant* 9:1667–1670
- Zipfel C (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol* 35(7):345–351

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



ROMINA N. RAMOS - TESIS DOCTORAL 2023
ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE DOS
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY DE
TOMATE EN LA DEFENSA CONTRA
PSEUDOMONAS SYRINGAE

Director: Dr. Hernán G. Rosli

Co-directora: Dra. Marina A. Pombo

Universidad Nacional de La Plata - Facultad de Ciencias Exactas