



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Análisis funcional del gen *PBC1* involucrado en  
la defensa contra el cáncer bacteriano en tomates  
silvestres mediante VIGS y CRISPR/Cas9**

Tesis que presenta

**Fabiola Guadalupe Ramírez Torres**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

San Luis Potosí, S.L.P. Noviembre de 2017



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*Análisis funcional del gen PBC1 involucrado en la defensa contra el cáncer bacteriano en tomates silvestres mediante VIGS y CRISPR/Cas 9*" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Fabiola Guadalupe Ramírez Torres** y aprobada el diez de noviembre del dos mil diecisiete por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**  
Director de la tesis

**Dr. Guillermo Pastor Palacios**  
Miembro del Comité Tutorial

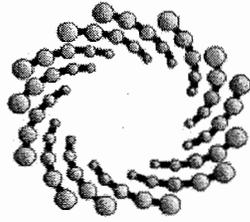
**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas perteneciente a la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-590471) y apoyo del FOMIX 209337 y la Fundación Produce SLP



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 173 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de noviembre del año 2017, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Guillermo Pastor Palacios</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Fabiola Guadalupe Ramírez Torres**

sobre la Tesis intitulada:

*Análisis funcional del gen PBC1 involucrado en la defensa contra el cáncer bacteriano en tomates silvestres mediante VIGS y CRISPR/Cas 9*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 11:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de noviembre de 2017.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico



## DEDICATORIAS

A mis padres Ma. del Carmen Torres Camacho y Juan Manuel Ramírez Tovar, por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento en momentos difíciles y por sus muestras de cariño siempre, ya que sin ellos no hubiera podido lograr lo que he logrado.

A mis hermanos Emmanuel y Christian por su apoyo y por siempre estar presentes.

A José Luis, porque con todo su amor y cariño me ha dado fortaleza, aprendizaje y apoyo, por su comprensión y palabras de aliento, por acompañarme en esta difícil y bonita etapa pero sobre todo por demostrarme lo que es amor y admiración.

A mis amigos del IPICyT por siempre ayudar y por tan bonita amistad.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por su incondicional apoyo y confianza.

A Ana Luz Romero por su ayuda, amistad y consejos para poder sobrellevar esta etapa.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACyT por la beca No. 590471 otorgada para la realización de la presente maestría.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por su confianza y apoyo en la realización de este trabajo y permitirme trabajar en su laboratorio “Biología Molecular de Plantas”

A los Doctores Gerardo Rafael Argüello Astorga y Guillermo Pastor Palacios por sus consejos para la realización de este trabajo.

A Rosalba Castillo y Salvador Ambriz por su apoyo técnico en la elaboración de experimentos.

A Ana Luz Romero por todo el apoyo técnico en los experimentos de este trabajo.

Al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiental (LANBAMA) por las facilidades otorgadas.

A la Universidad del Estado de Washington, al Dr. Amit Dhingra y a los miembros de Dhingra's Lab por el apoyo, consejos y supervisión, así como las facilidades para la realización de la estancia que fue parte de este trabajo y la confianza por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b>ii</b>
<b>Créditos Institucionales</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIAS</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>x</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>xi</b>
<b>Resumen</b>	<b>xii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Importancia del tomate y daños causados por <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>.</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Proteasoma en plantas</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Proteasoma 20S</b>	<b>3</b>
1.3.1 Subunidad beta	3
<b>1.4 Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS)</b>	<b>4</b>
1.4.1 Silenciamiento de genes en plantas	5
1.4.2 Mecanismo de silenciamiento de ARN de doble cadena	6
<b>1.5 Sistema CRISPR/Cas9</b>	<b>7</b>
1.5.1 Funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9	8
1.5.2 Corte por Cas9 y reparación	9
1.5.3 Blancos no deseados (off-targets) en la edición	10
1.5.4 CRISPR/Cas9 en plantas	10

<b>II. RESULTADOS</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS)</b>	<b>13</b>
2.1.1 Identificación, amplificación y obtención de la secuencia a silenciar	13
2.1.2 Clonación del fragmento del gen <i>PBC1</i> en pGEM-T Easy	13
2.1.3 Ligación del fragmento del gen <i>PBC1</i> a ToMoV	13
2.1.4 Bombardeo de plantas con proyectiles de tungsteno	14
2.1.5 Análisis del avance de la enfermedad y del silenciamiento	14
<b>2.2 CRISPR/Cas9</b>	<b>16</b>
2.2.1 Determinación de la secuencia guía	16
2.2.2 Primera estrategia para el diseño de guías	16
2.2.3 Segunda estrategia para el diseño de guías	17
2.2.4 CRISPR/Cas9 Multiplex	17
2.2.5 Transformación de Plantas	18
<b>III. DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Silenciamiento Génico Inducido por Virus</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Proteasoma y su papel en el estrés biótico</b>	<b>20</b>
<b>3.3 CRISPR/Cas9</b>	<b>22</b>
<b>IV. Materiales y Métodos</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Material biológico</b>	<b>23</b>
<b>4.2 VIGS</b>	<b>23</b>
4.2.1 Diseño del vector ToMoV_ <i>PBC1</i>	24
4.2.2 Preparación de proyectiles de tungsteno	24

4.2.3 Bombardeo de plantas con micropartículas	24
4.2.4 Infección de plantas con <i>Cmm</i>	25
4.2.5 Toma de muestra de tejido, extracción de ácidos nucleicos y síntesis de cDNA	25
4.2.6 Medición del avance de la enfermedad mediante carga bacteriana	27
4.2.7 Cuantificación de la expresión del gen mediante qRT-PCR tiempo real	28
<b>4.3 CRISPR/Cas9</b>	<b>28</b>
4.3.1 Diseño de guías: Estrategia 1	28
4.3.2 Diseño de guías: estrategia 2	30
4.3.3 Diseño de multiplex	31
4.3.4 Transformación de plantas de tomate	32
<b>V. Conclusiones</b>	<b>34</b>
<b>Tablas</b>	<b>35</b>
<b>Figuras</b>	<b>38</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>49</b>

## Lista de tablas

<i>Tabla 1. Algunas herramientas bioinformáticas disponibles para la selección de sitios blanco y predicción de “off-targets” con la estrategia CRISPR/Cas9</i>	35
<i>Tabla 2. Especificaciones de los oligos diseñados para obtener el fragmento del gen PBC1 de Solanum.</i>	36
<i>Tabla 3. Especificaciones de las guías a utilizar en la segunda estrategia</i>	36
<i>Tabla 4. Secuencias de oligos diseñados para MULTIPLEX</i>	37
<i>Tabla 5. Oligos utilizados para MULTIPLEX</i>	37

## Lista de figuras

<i>Figura 1. Región seleccionada para silenciamiento del gen PBC1 por VIGS</i>	38
<i>Figura 2. Amplificación del fragmento del gen PBC1 a silenciar</i>	38
<i>Figura 3. Digestión del vector pGEM-T Easy para liberar el fragmento de PBC1</i>	39
<i>Figura 4. Reacciones de digestión en el vector ToMoV_PBC1</i>	39
<i>Figura 5. Avance de la enfermedad en plantas S. peruvianum 2172 con y sin bombardeo y retadas con Cmm</i>	40
<i>Figura 6. Carga bacteriana de Cmm y nivel de expresión del gen PBC1 en S. peruvianum 2172 con y sin silenciamiento.</i>	41
<i>Figura 7. Avance de la enfermedad en plantas Solanum arcanum 2157 con y sin bombardeo y retadas con Cmm</i>	42
<i>Figura 8. Carga bacteriana y nivel de expresión del gen PBC1 en S. arcanum 2157.</i>	43
<i>Figura 9. Esquema de secuencias guía y del vector CRISPR/Cas9</i>	44
<i>Figura 10. Digestiones para construcción de la guía.</i>	45
<i>Figura 11. Vector pHSE401_CRISPR</i>	45
<i>Figura 12. Diseño de guías en la segunda estrategia para el Sistema CRISPR/Cas9.</i>	46
<i>Figura 13. Digestión del vector pHSE con guía.</i>	46
<i>Figura 14. Producto de PCR de amplificación de guías</i>	47
<i>Figura 15. Digestión del vector que contiene las guías multiplex.</i>	47
<i>Figura 16. Proceso de transformación de plantas.</i>	48

## Resumen

### **Análisis funcional del gen *PBC1* involucrado en la defensa contra el cáncer bacteriano en tomates silvestres mediante VIGS y CRISPR/Cas9**

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los productos hortícolas más importantes a nivel mundial, con una producción anual valorada en \$88 miles de millones de dólares. México ocupa el 10<sup>mo</sup> lugar de los mayores productores a nivel mundial, sin embargo, su producción se ha visto mermada por organismos fitopatógenos, siendo la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) una de los responsables de mayores pérdidas en la producción. Las estrategias de control de *Cmm* no son efectivas una vez que la enfermedad es detectada, sin embargo, se sabe que especies silvestres como *Solanum peruvianum* acc. 2172 y *Solanum arcanum* acc. 2157, presentan resistencia natural a *Cmm*. Existen reportes de un análisis transcripcional diferencial en plantas resistentes a *Cmm* al comparar plantas no infectadas y después de infectar, donde se detectaron genes sobreexpresados posterior a la infección, entre ellos el gen de la subunidad beta del proteasoma tipo 3 (*PBC1*), y con base en esto se decidió hacer un análisis funcional de *PBC1*, mediante Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS) y con el sistema CRISPR/Cas9. El objetivo de este trabajo fue determinar si el gen juega un papel importante en la defensa de la planta contra *Cmm*. El análisis funcional del gen *PBC1* por VIGS se realizó en plantas silvestres: *Solanum peruvianum* 2172 y *Solanum arcanum* 2157, utilizando el vector del Virus Moteado del Tomate (ToMoV) y por métodos de biobalística. Después de la infección con *Cmm* se realizó una comparación del fenotipo de las plantas sanas sin infectar con plantas enfermas. Además de evaluó la carga bacteriana y la expresión del gen *PBC1* mediante qRT-PCR. Para el knock out de *PBC1* se utilizó el sistema CRISPR/Cas9. El diseño de las secuencias guías se realizó con dos estrategias, 1) utilizando una secuencia ARN guía y 2) utilizando un sistema multiplex que contiene tres guías individuales. En plantas silvestres *S. peruvianum* 2172, con silenciamiento de *PBC1* mediante VIGS, la expresión del gen disminuyó ~80%, y la carga bacteriana de *Cmm* incrementó, demostrando susceptibilidad a *Cmm* comparado con plantas sin silenciamiento. Esto sugiere que *PBC1* puede estar involucrado en la resistencia de plantas silvestres contra *Cmm* y pudiera usarse como un elemento central de una estrategia para generar tomates resistentes. Sin embargo, en *S. arcanum* 2157 la carga bacteriana no mostró un cambio considerable comparada con el control, además de que en algunas plantas no hubo cambio en la expresión de *PBC1* a pesar del silenciamiento con VIGS tal vez debido a complicaciones técnicas de biobalística o asociadas a algunas características de la especie en particular.

**Palabras clave:** Silenciamiento génico, bacteriosis en tomate, *PBC1*.

## Abstract

### Functional analysis of *PBC1* gene involve on defense against bacterial canker in wild species of tomato using VIGS and CRISPR/Cas9

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important crops in the world, valued at \$88 billion USD annually. Mexico is the 10<sup>th</sup> largest producer globally, however its production has been diminished due to pathogens among which stands out *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) that is responsible of great losses. The control strategies against this bacterium are not effective once the disease is detected; however it is known that some wild species such as *Solanum peruvianum* acc. 2172 and *Solanum arcanum* acc. 2157 are resistant to *Cmm*. Some works on tomato wild species resistant to *Cmm* showed differential expressed genes when uninfected and *Cmm* infected plants were compared. Some genes were overexpressed after the challenge, among these, the proteasome beta subunit type 3 (*PBC1*), based on this, we decided to perform a functional analysis of *PBC1*, through Virus Induced Gene Silencing (VIGS) and CRISPR/Cas9 system. The aim of this work was assessing the role of that gene in plant defense against *Cmm*. Functional analysis of *PBC1* with VIGS was performed in the wild tomato species *Solanum peruvianum* acc. 2172 and *Solanum arcanum* acc. 2157 using the Tomato Mottle Virus (ToMoV) vector and delivery was done by biolistic methods. After inoculation with *Cmm* the phenotype of the healthy and infected plants was compared and correlated to bacterial load and qRT-PCR of *PBC1*. Knockout of the *PBC1* gene was accomplished with the CRISPR/Cas9 system. Guides specific to the *PBC1* gene were designed with two strategies, 1) using single RNA guides and 2) using a multiplex system containing three individual guides. In plants *S. peruvianum* 2172 silenced by VIGS, *PBC1* expression decreased ~80% in some plants and, the *Cmm* bacterial titer increased, demonstrating an increase in *Cmm* susceptibility on plants compared with the wild species without silencing. This observation suggests that *PBC1* could be involved in resistance against *Cmm* in wild species and overexpression approaches could help with engineering or breeding for resistance in commercial tomatoes. Nevertheless, in *S. arcanum* 2157 the bacterial titer was not significantly different in comparison to the control and in some plants the gene expression of *PBC1* was unchanged despite VIGS, perhaps due to biolistic technical complications or because of particular characteristics of this plant species.

**Key words:** Gene silencing, tomato bacteriosis, *PBC1*.

1

## I. INTRODUCCIÓN

### 2 1.1 Importancia del tomate y daños causados por *Clavibacter* 3 *michiganensis* subsp. *michiganensis*.

4 El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los cultivos agrícolas con mayor  
5 producción y valor comercial a nivel mundial y México ocupa el décimo lugar entre  
6 los países productores (FAO 2014). Sin embargo, la producción se ve mermada  
7 por enfermedades causadas por agentes fitopatógenos; el principal patógeno que  
8 afecta al tomate es la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*  
9 (*Cmm*), que causa la enfermedad llamada cáncer bacteriano o chancro bacteriano  
10 del tomate, ocasionando daño a la planta y al fruto; este patógeno se propaga por  
11 medio de semillas o trasplantes contaminados (Dreier et al. 1997). *Cmm* entra a la  
12 planta por heridas o aberturas naturales y se disemina por toda a través del xilema  
13 (Jahr et al. 2000) y de esta manera desarrolla la infección sistémica. Los síntomas  
14 incluyen marchitez unilateral de las hojas, necrosis foliar y desarrollo de chancros  
15 en el tallo (Balaji et al. 2008). Actualmente no existen métodos efectivos de control  
16 de las infecciones causadas por este fitopatógeno, por lo que se han buscado  
17 métodos alternativos para su control. Se ha reportado que algunas plantas silvestres  
18 como *Solanum peruvianum* 2157 (reclasificado recientemente como *Solanum*  
19 *arcanum*) presenta tres Quantitative Trait Loci (QTL) para resistencia contra *Cmm*  
20 (Van Heusden et al. 1999). Algunas especies silvestres de tomate, tales como  
21 *Solanum peruvianum* 2172 y en *Solanum arcanum* 2157, tienen genes como el gen  
22 de la peroxidasa, *SCE1*, gen de la endoquitinasa 30 kDa, *PBC1* y *MRP1*, que se  
23 sobreexpresan a las 8 horas post infección con *Cmm*. Mientras que en la especie

24 comercial susceptible *Solanum lycopersicum* no lo hacen; lo que sugiere que estos  
25 genes podrían estar implicados en la resistencia de plantas silvestres contra *Cmm*.  
26 Dentro del grupo de los genes antes mencionados se encuentra el gen *PBC1*, que  
27 codifica la subunidad beta tipo 3 del proteasoma. Este gen se expresa 8 veces más  
28 en *Solanum peruvianum* 2172 comparada con *Solanum lycopersicum* a las 8 horas  
29 post infección con *Cmm* (Lara-Ávila et al. 2012).

## 30 **1.2 Proteasoma en plantas**

31 El proteasoma consiste de dos subunidades, la subunidad 20S, la cual  
32 produce los cortes proteolíticos y la subunidad 19S que regula la identificación de  
33 las proteínas, en conjunto forman la estructura 26S del proteasoma (Vierstra, 2003),  
34 dentro de la subunidad 20S se encuentran cuatro anillos, dos lo forman 7  
35 subunidades  $\alpha$  y dos anillos formados por 7 subunidades  $\beta$ . Una de las principales  
36 funciones del proteasoma es la degradación de proteínas marcadas con ubiquitina.  
37 Se ha reportado que en *Arabidopsis thaliana* existen más de 1500 enzimas  
38 involucradas en la ubiquitinación de proteínas (Rocha-Sosa, 2013), lo que sugiere  
39 que las plantas pueden tener muchos procesos regulados a través de la  
40 ubiquitinación, y por lo tanto a través del proteasoma. Asimismo, se ha demostrado  
41 la relación evolutivamente equivalente entre la organización conservada del  
42 proteasoma entre eucariotes siendo un complejo responsable de la degradación de  
43 proteínas intracelulares anormales (Vierstra, 2003).

44 Entre las diversas funciones del proteasoma se encuentra la regulación del  
45 crecimiento en plantas; por ejemplo, la pérdida de la función de la subunidad 26S  
46 provoca una disminución en el crecimiento de raíces en las plantas. Por lo tanto, el

47 proteasoma es importante tanto para el crecimiento como para la respuesta a estrés  
48 de la planta (Han et al. 2012).

### 49 **1.3 Proteasoma 20S**

50 Se cree que la organización del proteasoma en plantas es similar a  
51 mamíferos y levaduras debido a la estructura reportada. Un estudio en *Arabidopsis*  
52 *thaliana* demostró que 23 genes codifican para las 14 subunidades del proteasoma  
53 20S ( $7\alpha$  y  $7\beta$ ); las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  y  $\alpha 7$  solo son codificadas por un gen,  
54 mientras que las subunidades  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  son codificadas  
55 por dos genes independientes, siendo similares a excepción de la subunidad  $\beta 3$   
56 (*PBC2*). Las regiones más conservadas son cercanas al extremo N-terminal. Las  
57 subunidades  $\beta 3$  (*PBC1* y *PBC2*),  $\beta 4$  (*PBD1* y *PBD2*) y  $\beta 6$  (*PBF1*) carecen del  
58 residuo terminal de treonina, mientras que la subunidad  $\beta 7$  (*PBG1*) tienen el residuo  
59 conservado de treonina pero carece del residuo de lisina, sugiriendo que estas  
60 subunidades tanto como en humanos y levaduras, no son proteolíticamente activas  
61 (Fu et al. 1998). En las levaduras *T. acidophilum*, las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  tienen  
62 un residuo de treonina en su dominio N-terminal y a su vez forma parte de la  
63 organización del sitio activo, el cual consta de una tétrada conformada por serina,  
64 aspartato, serina y treonina, donde el residuo de glutamina y el amino del grupo  
65 lisina mantienen una orientación correcta del residuo treonina (Seemüller et al.  
66 1995).

#### 67 **1.3.1 Subunidad beta**

68 A diferencia a *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* contiene solo un  
69 gen que codifica para cada una de las subunidades beta, a excepción de la  
70 subunidad  $\beta 2$  la cual tiene dos genes parálogos que codifican para esta proteína y

71 que son más cercanos uno a otro (Kovács et al. 2017a). Se ha propuesto la  
72 existencia de un inmuno-proteasoma en tabaco donde se demostró que existe una  
73 acumulación de transcritos que codifican a las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 1$  cuando la  
74 planta es sometida a estrés (Suty et al. 2003a). Las modificaciones en el perfil del  
75 proteasoma son causadas por modificaciones covalentes en las subunidades  
76 catalíticas  $\beta$  (Kovács et al. 2017a).

77 Existe una amplia cantidad de reportes acerca del papel del proteasoma en  
78 las plantas, principalmente como parte de ciertos mecanismos de defensa.  
79 *Phytophthora cryptogea* es un fitopatógeno que induce la respuesta de defensa en  
80 tabaco, provocando la acumulación de subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 1$  del proteasoma  
81 (Suty et al. 2003b). Un péptido llamado siringolina A, secretado por *P. syringae* pv  
82 *syringae* es capaz de inhibir irreversiblemente la actividad proteolítica del  
83 proteasoma y permitir la infección (Rocha-Sosa, 2013).

#### 84 **1.4 Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS)**

85 Se pueden utilizar vectores virales para realizar un análisis funcional de  
86 genes en plantas, mediante el uso de ARN o ADN del vector viral, a este proceso  
87 se le conoce como Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS por sus siglas  
88 en inglés *Virus-Induced Gene Silencing*) (Kumagai et al. 1995). Este sistema se ha  
89 utilizado para realizar estudios de procesos importantes de las plantas, como las  
90 interacciones planta-patógeno. Mediante VIGS es posible analizar si algún gen está  
91 involucrado en la resistencia de la planta a enfermedades causadas por algún  
92 fitopatógeno (Sharma et al. 2003) ya que al silenciar un gen podemos determinar si  
93 hay alguna pérdida de función y relacionarla de este modo con la actividad del gen.  
94 Dentro de los virus de ADN más utilizados se encuentran los geminivirus, los cuales

95 son virus circulares de cadena sencilla, se replican por el mecanismo de círculo  
96 rodante mediante intermediarios de doble cadena y utilizan la maquinaria de  
97 replicación del hospedero. Los miembros de la familia *Geminiviridae* se clasifican  
98 en nueve géneros, de los cuales el de los *Begomovirus* es el más extenso y  
99 agrícolamente más importante (Hanley-Bowdoin et al. 1999a). El genoma de los  
100 begomovirus puede ser mono o bipartita, de acuerdo a la cantidad de componentes  
101 genómicos (1 o 2); en los virus bipartitas ambos componentes son necesarios para  
102 la infección, el componente A codifica los genes necesarios para la replicación y  
103 encapsidación; mientras que el componente B provee las funciones necesarias para  
104 movimiento local y sistémico (Villanueva-Alonzo et al. 2013). La transcripción de los  
105 geminivirus se caracteriza por ser bidireccional, de manera que producen mARNs  
106 que corresponden a viriones y al sentido complementario de los marcos de lectura  
107 abiertos presentes en la cadena de ssDNA del virión, o en la cadena  
108 complementaria (Hanley-Bowdoin et al. 1999b). Debido a esto, el uso de geminivirus  
109 puede generar ARN de cadena doble y ser blanco de enzimas como DICER y RISC  
110 para silenciar genes blanco a través de siRNA (Tuttle et al. 2008). En vectores  
111 derivados de geminivirus solo son necesarias secuencias de 90 o más pares de  
112 bases insertadas como parte de algún gen viral para estudiar su silenciamiento  
113 (Peele et al. 2001).

#### 114 **1.4.1 Silenciamiento de genes en plantas**

115 Uno de los virus utilizados para VIGS en plantas es el Virus del Moteado del  
116 Tomate (ToMoV por sus siglas en inglés *Tomato Mottle Virus*), el cual es transmitido  
117 por la mosquita blanca *Bemisia tabaci*. ToMoV pertenece al género de los  
118 begomovirus y consta de dos componentes genómicos. Cada componente es de

119 aproximadamente 2.6 Kb y contiene genes en ambas cadenas de ADN y un origen  
120 de replicación. En el componente A se encuentran los genes *Rep*, *TrAP*, *REn*, *CP* y  
121 *C4*; y en el componente B los genes *BC1* y *BV1* (Univ. Florida, Gulf Coast res.  
122 education cent, et al. 1993). Existen cuatro tipos de silenciamiento de genes  
123 conocidos en plantas: 1) Silenciamiento de ARN citoplasmático, que está asociado  
124 a la producción de siARN, funciona mayormente en transgénicos y plantas  
125 infectadas con virus. 2) Silenciamiento endógeno de mRNA asociado con dobles  
126 cadenas de ARN cortas microARN (miARN). En este tipo de silenciamiento la  
127 traducción del mRNA de la célula es suprimido por la complementación de pares de  
128 bases con los miARN, incluye la degradación del mRNA blanco. 3) Metilación del  
129 ADN y supresión transcripcional. La evidencia de este mecanismo, fue  
130 primeramente obtenida con plantas transgénicas permitiendo la transcripción del  
131 cADN viral; una elevada transcripción desencadena metilación del cADN viroide. 4)  
132 El silenciamiento del ARN a nivel de cromatina, protege al genoma de la célula  
133 contra transposones (Dorokhov, 2007).

#### 134 **1.4.2 Mecanismo de silenciamiento de ARN de doble cadena**

135 Las dobles cadenas de ARN proveen un substrato para la ARNsa III, Drosha  
136 y la proteína Dicer contienen un sitio catalítico de ARNsa III y dominios de unión de  
137 ARN de doble cadena. Drosha es requerida para el procesamiento de precursores  
138 de miARN, cuando Drosha corta el precursor de miARN, este se exporta al  
139 citoplasma mediante exportinas. En el citoplasma, el precursor de miARN (pre  
140 miARN) es procesado por Dicer, la cual realiza cortes de ARNs de doble cadena  
141 produciendo cadenas de 21 nucleótidos. Ambos ARN de silenciamiento (miARN y  
142 siARN) se unen a una proteína Argonauta la cual forma parte del complejo de

143 silenciamiento inducido por ARN (RISC por sus siglas en inglés *RNA-induced*  
144 *silencing complex*); esta endonucleasa se encarga de degradar el mRNA blanco,  
145 buscando la complementariedad del siARN con el blanco. En plantas, se ha  
146 reportado la generación de copias de ARN de doble cadena mediante replicación  
147 con una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdPR, por sus siglas en inglés *RNA-*  
148 *dependent RNA polymerase*), que pueden generar un silenciamiento extendido más  
149 allá de la secuencia blanco (Meister and Tuschl 2004; Pattanayak et al. 2013).

## 150 **1.5 Sistema CRISPR/Cas9**

151 En años recientes la biología molecular ha experimentado una gran  
152 revolución con el descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9, que recibe su nombre  
153 de la abreviación de “Repetidos palindrómicos cortos agrupados y regularmente  
154 interespaciados” (CRISPR por sus siglas en inglés *Clustered Regularly Interspaced*  
155 *Short Palindromic Repeats*). Este sistema fue descubierto en algunas bacterias y  
156 arqueas; inicialmente se consideró que su principal función era la reparación o  
157 regulación de genes. En 2005, se describieron los siguientes datos clave del  
158 sistema: las secuencias intercaladas entre los repetidos palindrómicos de CRISPR  
159 derivaban de fragmentos de origen viral; también se encontró que los loci de  
160 CRISPR se transcribían, y se observó que la proteína Cas9 poseía un dominio  
161 putativo de nucleasa y helicasa (Mojica et al. 2005). Todos estos descubrimientos  
162 llevaron a la noción de que CRISPR-Cas9 podría ser un sistema de defensa  
163 antiviral, que utiliza ARN antisentido como memoria de anteriores invasiones de  
164 patógenos (Makarova et al. 2006). El sistema CRISPR/Cas9 consta de secuencias  
165 repetidas intercaladas con el ADN blanco, las cuales codifican un crARN, además  
166 de un operón que codifica y regula la expresión de la proteína Cas9. En 2011 se

167 reportó un crARN transactivador (tracrARN), un pequeño ARN que es codificado río  
168 arriba del locus de CRISPR/Cas9 tipo II en *Streptococcus pyogenes*, el cual parece  
169 ser esencial para la maduración del crARN. El crARN dirige el corte de ácidos  
170 nucleicos foráneos mediante el uso de la enzima Cas9. Un elemento importante es  
171 el motivo protoespaciador adyacente (PAM), el cual es una secuencia corta (NGG)  
172 que se encuentra adyacente al crARN-secuencia blanco (Doudna y Charpentier,  
173 2014); todos estos elementos condujeron al descubrimiento de una inmunidad  
174 secuencia-específica contra genomas parásitos. Algunas estrategias  
175 biotecnológicas han permitido realizar construcciones que incluyen el crARN y el  
176 tracrARN en una sola secuencia de ARN, la cual se denomina sgARN (single-guide  
177 ARN), que consta de la secuencia de ADN blanco en el extremo 5' y una secuencia  
178 que formará una estructura dúplex de unión a la endonucleasa Cas9 (Doudna y  
179 Charpentier, 2014).

### 180 1.5.1 Funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9

181 Cas9 es una endonucleasa que se mantiene en una conformación auto-  
182 inhibida en la ausencia de ligandos de ácidos nucleicos, y se activa cuando un ARN  
183 guía es cargado. Esto desencadena un rearrreglo conformacional de REC y NUC  
184 (lóbulos de la nucleasa) para formar un canal central donde se posicionará el  
185 heterodúplex de ARN y ADN formado por complementación de bases. El ARN guía  
186 interactúa con el lóbulo REC para formar un complejo binario Cas9-sgARN, el  
187 complejo busca en la doble cadena de ADN los motivos PAM.  
188 Como Cas9 no tiene actividad de helicasa dependiente de energía, se ha sugerido  
189 que el reconocimiento de PAM desestabiliza la secuencia adyacente, induciendo la  
190 formación de una asa ("loop") (Jinek et al. 2014). Dos residuos de Arginina, R1333

191 y R1335, interactúan con el dinucleótido GG del motivo PAM en la cadena no  
192 complementaria a la secuencia guía, mientras que los residuos K1107 y S1109,  
193 crean un dúplex con la secuencia complementaria a PAM en el nucleótido de  
194 posición +1 (la interacción de cargas del grupo fosfato del nucleótido N del PAM con  
195 los residuos K1107 y S1109 forman un “loop” denominado fosfato cerrado); esto  
196 permite la hibridación con el ARN guía y la separación de las cadenas de ADN. La  
197 unión de pares de bases a la región 8-12 pb de la secuencia guía da paso a la  
198 desestabilización del ADN blanco y la formación del heterodúplex ARN-ADN. Los  
199 lóbulos NUC y REC forman un puente rico en Argininas, así ambos dominios de la  
200 nucleasa del lóbulo NUC están listos para el corte. El dominio móvil HNH corta la  
201 cadena complementaria de ADN, mientras el dominio RuvC corta la cadena no  
202 complementaria (Belhaj et al. 2015).

### 203 **1.5.2 Corte por Cas9 y reparación**

204 La nucleasa Cas9 ocasiona cortes en el ADN de doble cadena (DSBs), en  
205 sitios específicos del genoma. Los DSBs son reparados por mecanismos  
206 endógenos celulares, como los que unen extremos no homólogos (NHEJ) y los que  
207 recomponen extremos homólogos (HEJ). El mecanismo NHEJ utiliza la ligasa de  
208 ADN IV para reunir terminales separadas; si las bases han sido eliminadas o los  
209 extremos han sido procesados por exonucleasas la reparación es imperfecta.

210 El sistema CRISPR-Cas9 puede producir “*knock outs*” que inactivan completamente  
211 a un gen, a diferencia de los miARN o siARN que pueden reducir de modo  
212 significativo la expresión del gen sin inactivarlo permanentemente (es decir, solo  
213 produce un “*knock down*”). Por otro lado, la reparación de extremos homólogos usa  
214 una cadena molde y este tipo de reparación suele ser perfecto (Belhaj et al. 2015).

215 En el caso de plantas, el mecanismo para la reparación de cortes en la doble cadena  
216 de ADN es por recombinación de extremos no homólogos (Tang and Tang 2016).

### 217 **1.5.3 Blancos no deseados (off-targets) en la edición**

218 Un blanco no deseado (*“off-target”*), es una secuencia con cierta similitud a  
219 la secuencia guía, en la que existe una alta probabilidad de que Cas9 corte en un  
220 sitio distinto al deseado. Esto es una de las debilidades de esta estrategia de edición  
221 génica. Sin embargo, existen soluciones para el problema de blancos no deseados,  
222 como es el uso de fusión de sistemas para incrementar la especificidad o el uso de  
223 dos sgARN con sitios de unión diferente, uno río arriba y otro río abajo de la  
224 secuencia blanco (Schaeffer and Nakata, 2015). La fusión de sistemas comprende  
225 estrategias de corte de ADN utilizando la nucleasa Cas9 con un dominio de la  
226 enzima de restricción Fok I (Vanamee et al. 2001); dicho dominio aumenta la  
227 especificidad del corte, ya que necesita dos sitios de identificación para realizar el  
228 corte por la nucleasa. Adicionalmente, existen herramientas bioinformáticas (Tabla  
229 1) que nos ayudan a identificar secuencias guías recomendadas y los posibles  
230 blancos erróneos que se puedan presentar. El procedimiento de estas herramientas  
231 se basa en la revisión o exploración de las secuencias de un genoma y mediante  
232 algoritmos matemáticos se identifica la secuencia guía más viable y con menor  
233 número de posibles cortes ilegítimos.

### 234 **1.5.4 CRISPR/Cas9 en plantas**

235 CRISPR/Cas9 es un sistema eficiente para realizar análisis funcional de  
236 genes en plantas, debido a que se han diseñado vectores que incluyen al gen de la  
237 Cas9 con codones optimizados para su expresión en plantas. Con este método es  
238 posible trabajar con especies haploides, diploides, tetraploides, etc. (Wang et al.

239 2015). El sistema CRISPR/ Cas9 ha sido utilizado exitosamente para realizar  
240 edición genómica en *Arabidopsis*, el organismo vegetal más estudiado. Se ha  
241 reportado que la eficiencia de regeneración de plantas de *A. thaliana* modificadas  
242 genéticamente es superior al 46%, con líneas germinales que contienen pequeñas  
243 inserciones o deleciones (Woo et al. 2015). Otro trabajo publicado sobre el uso del  
244 sistema CRISPR/Cas9 en *A. thaliana* fue acerca de la edición de un gen reportero  
245 (*GFP*, que codifica a la proteína verde fluorescente) con mutaciones que afectaron  
246 su funcionalidad. El gen *GFP* no funcional fue integrado al genoma de la planta, y  
247 posteriormente, se realizó la edición correspondiente con CRISPR/Cas9 para  
248 restaurar la función del gen, cortando el fragmento génico que provocaba la falta de  
249 funcionalidad de la proteína GFP, demostraron la herencia de modificaciones de la  
250 línea T1 a la línea T2, por lo que los autores concluyeron que el sistema es  
251 prometedor para facilitar la edición de plantas (Jiang et al. 2014). En otro trabajo,  
252 reportado por Hyun y colaboradores en 2015, realizaron mutagénesis sitio dirigida  
253 del genoma nuclear de *Arabidopsis* utilizando el sistema CRISPR/Cas9, con la  
254 finalidad de inducir la proliferación tisular durante la embriogénesis de la planta. Las  
255 secuencias guías que utilizaron pertenecen al locus T de floración (FT) y a la  
256 proteína de unión al promotor squamosa. El knock out realizado por CRISPR/Cas9  
257 fue observado en la generación T1 de las plantas, mostrando una floración tardía e  
258 indicando que el gen Ft había sido mutado. La secuenciación de alelos mutantes  
259 del gen en las generaciones T1, T2 y T3, reveló la deleción o inserción de  
260 nucleótidos en la secuencia (Hyun et al. 2015).

261 Otra planta estudiada ampliamente con el uso de CRISPR/Cas9 es el tabaco  
262 (*Nicotiana tabacum*). Mercx y colaboradores en el 2016, obtuvieron una planta

263 transgénica de tabaco que expresaba una proteína rojo fluorescente (mCherry). Con  
264 un vector que contenía a la Cas9 y tres guías que flanqueaban al gen mCherry,  
265 intentaron producir una deleción en ese gen reportero y, con ello, suprimir su  
266 expresión. Analizaron la secuencia del gen mCherry por PCR punto final y PCR  
267 tiempo real, así como por la pérdida de sitios de restricción, observaron que 7 de  
268 las 20 líneas transformadas contenían un fragmento más corto al inicial; por  
269 secuenciación confirmaron la deleción del gen, demostrando que CRISPR/Cas9  
270 puede ser utilizado eficientemente en *N. tabacum*. Existe otro reporte en  
271 protoplastos de *Nicotiana tabacum*, donde la edición genómica con el sistema  
272 CRISPR/Cas9 fue muy efectiva, y se obtuvieron frecuencias de mutación de 16.2 -  
273 20.3%. En este mismo trabajo se estudiaron dos genes utilizando dos guías en el  
274 locus NtPDS, y se obtuvieron plantas de tabaco transgénico con mutaciones  
275 inactivantes en NtPDS (que codifica la fitoeno desaturasa, enzima involucrada en la  
276 síntesis de carotenoides, responsables de la pigmentación de las plantas) y NtPDR6  
277 (Transportador ABC involucrado en el transporte de estrigolactonas, moléculas  
278 implicadas en la inhibición de la ramificación de los brotes y derivadas de  
279 carotenoides). El porcentaje de mutación fue de 81.8% para NtPDS y 87.5% para  
280 NtPDR6; el fenotipo de las mutantes *NtPDS* fue de hojas etioladas, y en el caso de  
281 las mutantes en NtPDR6 el blanqueamiento de hojas y pecíolos, lo que puso de  
282 manifiesto la alta eficiencia del sistema para realizar ediciones genómicas en *N.*  
283 *tabacum* (Gao et al. 2015).

284 De los trabajos hechos en plantas, los autores concluyen que CRISPR/Cas9 es una  
285 herramienta eficiente para generar modificaciones estables y hereditarias en plantas  
286 (Pan et al. 2016)

287

## II. RESULTADOS

288

### 2.1 Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS)

289

#### 2.1.1 Identificación, amplificación y obtención de la secuencia a

290

#### silenciar

291

Basados en el portal del Sol Genomics Network (SGN, <http://solgenomics.net>),

292

se seleccionaron 300 pares de bases de la región codificante 5' del gen *PBC1*

293

(Figura 1). Se realizó un PCR con gradiente de temperatura y se eligió a 58°C como

294

la temperatura de alineamiento más adecuada para la amplificación del fragmento

295

(Figura 2).

296

#### 2.1.2 Clonación del fragmento del gen *PBC1* en pGEM-T Easy

297

El fragmento del gen *PBC1* se clonó en el vector pGEM-T Easy para

298

transferirlo posteriormente al vector ToMoV. Se amplificó el fragmento del gen, se

299

realizó la ligación al vector pGEM-T Easy y se comprobó la presencia del fragmento

300

en el vector por digestión con la enzima *EcoRI*. Posteriormente, la construcción fue

301

secuenciada, y los datos obtenidos se analizaron por alineamiento de secuencias y

302

análisis BlastN. Una vez verificada la identidad del fragmento del gen *PBC1*,

303

procedimos a subclonarlo en el vector derivado de ToMoV.

304

#### 2.1.3 Ligación del fragmento del gen *PBC1* a ToMoV

305

El fragmento *PBC1* clonado en el vector pGEM-T Easy, y el vector

306

ToMoV\_Δcp (generado por Esparza-Araiza), se digirieron con *EcoRI* y *HindIII*, y la

307

digestión completa de estos ADNs se verificaron por electroforesis en un gel de

308

agarosa (Figura 3). Las bandas apropiadas se purificaron utilizando columnas

309

PROMEGA. Posteriormente, se ligó el fragmento del gen *PBC1* al vector

310 ToMoV\_ΔCp, obteniéndose de este modo un nuevo vector para silenciamiento, que  
311 denominamos ToMoV\_PBC1.

#### 312 **2.1.4 Bombardeo de plantas con proyectiles de tungsteno**

313 Una vez obtenido el vector ToMoV\_PBC1 se realizó una reacción de  
314 digestión con *EcoR* I y *Hind* III para verificar la presencia del fragmento *PBC1*  
315 (Figura 4A), y mediante digestión con *Apa* I se liberó el vector ToMoV\_PBC1 del  
316 vector pBlueScript II SK+/- . A la vez, se digirió con la misma enzima el vector que  
317 contiene el componente B de ToMoV, que contiene los genes de movilidad del virus  
318 (Figura 4B). Las plantas que fueron utilizadas como huéspedes del vector de  
319 silenciamiento, incluyen dos especies silvestres resistentes a *Cmm*, *Solanum*  
320 *arcanum* 2157 y *Solanum peruvianum* 2172; en en cada caso se utilizaron los  
321 siguientes tratamientos: ToMoV\_PBC1 (gen de interés); ToMoV-*Chl* (quelatasa,  
322 como control de la eficiencia del silenciamiento); ToMoV\_Δcp (control negativo); y  
323 plantas de *Solanum lycopersicum* como control positivo del desarrollo de la  
324 infección.

325 Las plantas fueron inoculadas por biobalística a los 21 días post-germinación, e  
326 inoculadas 60 días posteriores a ese evento, con *Clavibacter michiganensis* subsp.  
327 *michiganensis* (*Cmm*); el avance de la infección bacteriana se monitoreo  
328 cuidadosamente.

#### 329 **2.1.5 Análisis del avance de la enfermedad y del silenciamiento**

330 Se realizó un seguimiento atento de los cambios fenotípicos de las plantas  
331 para determinar el inicio y severidad de la enfermedad después del silenciamiento  
332 y reto con *Cmm*; se realizó PCR tiempo real para cuantificación absoluta de la carga  
333 bacteriana en tallo de plantas bombardeadas con el vector ToMoV\_PBC1 y retadas

334 con la bacteria, y en plantas no inoculadas con el vector de silenciamiento; se  
335 realizó además PCR tiempo real para la cuantificación relativa de la expresión del  
336 gen *PBC1*. En *Solanum peruvianum* 2172 se observó que el fenotipo de algunas  
337 plantas bombardeadas con ToMoV\_*PBC1* y retadas luego con *Cmm*, fue de  
338 susceptibilidad (Figura 5B) comparadas con las plantas no inoculadas con el vector  
339 viral y retadas con la bacteria (Figura 5A) que se mantuvieron sanas. Mediante  
340 análisis de qRT-PCR se determinó la existencia de una mayor carga bacteriana en  
341 plantas inoculadas por balística con el vector ToMoV\_*PBC1* (Figura 6A) y los  
342 resultados de cuantificación relativa para el nivel de expresión del gen *PBC1*,  
343 demuestran que la expresión del mismo en las plantas tratadas con el vector  
344 ToMoV\_*PBC1* disminuyó en comparación con el control, lo que indica que la  
345 aparición de síntomas de enfermedad correlaciona con un descenso de los niveles  
346 de expresión del gen *PBC1* y, por ende, que éste podría estar efectivamente  
347 implicado en la defensa de la planta contra *Cmm* (Figura 6B). En el caso de *S.*  
348 *arcanum* 2157 el fenotipo de las plantas bombardeadas con el vector de  
349 silenciamiento no mostró cambio alguno comparado con los controles sin infectar y  
350 sin bombardear (Figura 7A y B). No sabemos si esta ausencia de efecto se debió  
351 a un problema técnico del bombardeo o a que esta especie vegetal no sustenta la  
352 replicación del vector viral. . La carga bacteriana fue cuantitativamente, muy similar  
353 en las muestras de plantas infectadas bombardeadas y no bombardeadas, a  
354 excepción de una de ellas (*S. arcanum* 2, Figura 8A), la cual muestra solo un ligero  
355 incremento en la carga bacteriana. El análisis de expresión génica mostró que la  
356 planta con mayor carga bacteriana presentó una ligera disminución en la expresión  
357 del gen *PBC1*; sin embargo, en el resto de las plantas de *S. arcanum* bombardeadas

358 con ToMoV\_*PBC1* la expresión del gen incluso aumentó comparada con el control  
359 (Figura 8B).

## 360 **2.2 CRISPR/Cas9**

### 361 **2.2.1 Determinación de la secuencia guía**

362 Para determinar la secuencia guía complementaria al gen que se pretende  
363 inactivar, se utilizaron varios programas en línea (CRISPR PLANT, 2016; Tefor,  
364 2016), los cuales reducen los blancos no deseados (los llamados “off targets”).

### 365 **2.2.2 Primera estrategia para el diseño de guías**

366 Las secuencias guía diseñadas por esta estrategia están hechas para que la  
367 endonucleasa Cas-9 corte en el mismo sitio donde se realizó el silenciamiento por  
368 VIGS, que es una parte codificante del gen *PBC1*; adicionalmente, nos aseguramos  
369 de que la secuencia guía contenga 20 nucleótidos e incluya a la secuencia PAM.  
370 Se mandaron sintetizar a la empresa GeneScript (Figura 9A) con una sola guía, es  
371 decir para hacer un corte en el gen, y con dos guías, es decir para realizar dos cortes  
372 en el gen *PBC1*; además se realizó una construcción de una sola guía para el gen  
373 que codifica a la quelatasa, que será utilizado como control siguiendo el fenotipo de  
374 blanqueamiento. El vector que utilizamos fue el vector pFGC-pcoCas9, optimizado  
375 para expresión en plantas, el cual tiene un sitio de clonación múltiple donde se  
376 insertarán las guías (Mercx et al. 2016a) (Figura 9B). Una vez obtenido el vector  
377 Cas9 se hizo una maxiprep del mismo. Las construcciones sintetizadas por el  
378 proveedor se encontraban en el vector pUC57, se transformaron células calcio-  
379 competentes y se realizaron minipreps; mediante reacciones de digestión con *Xba*  
380 I y *EcoRI* de una sola guía para el gen *PBC1* y para el gen de quelatasa, y con *Xba*  
381 I y *SbfI* para la construcción con dos guías (Figura 10A); se purificó la construcción

382 por columnas PROMEGA, se ligaron al vector de Cas9 y se realizaron minipreps.  
383 Se confirmó la presencia de las secuencias guías por reacciones de digestión con  
384 las enzimas *Xba* I y *Eco*RI para una sola guía y con *Xba* I y *Sbf* I para la construcción  
385 con dos guías (Figura 10B).

### 386 **2.2.3 Segunda estrategia para el diseño de guías**

387 Se utilizó una segunda estrategia para el diseño de secuencias guías que  
388 corten al gen *PBC1*. Esta estrategia se realizó durante una estancia en la  
389 Universidad del Estado de Washington, e implicó el uso del vector  
390 “pHSE401\_CRISPR” (Figura 11). Se diseñaron oligonucleótidos complementarios  
391 al vector, para utilizar tres secuencias guías complementarias al gen *PBC1*, y dos  
392 guías para el gen de Quelatasa. Las secuencias de los oligonucleótidos sintéticos  
393 se describen en la Tabla 3, donde se marcan en rojo las secuencias  
394 complementarias al vector (secuencia resultante del corte con *Bsa* I); en la Figura  
395 12 se muestra el esquema del diseño de guías. Se realizaron minipreps de las  
396 construcciones y se verificó la presencia de la secuencia guía por digestión con *Hind*  
397 III (Figura 13), ya que el vector tiene esos sitios de corte flanqueando a la secuencia  
398 guía. Una vez obtenidas todas las construcciones se mandaron secuenciar para  
399 verificar la presencia de la secuencia guía sin cambios que pudiesen afectar el corte  
400 preciso en la secuencia blanco por la nucleasa Cas-9.

### 401 **2.2.4 CRISPR/Cas9 Multiplex**

402 Se utilizó una segunda estrategia para el diseño de secuencias guías que  
403 corten al gen *PBC1*. Esta estrategia se realizó durante una estancia en la  
404 Universidad del Estado de Washington, e implicó el uso del vector  
405 “pHSE401\_CRISPR” (Figura 11). Se diseñaron oligonucleótidos complementarios

406 al vector, para utilizar tres secuencias guías complementarias al gen *PBC1*, y dos  
407 guías para el gen de Quelatasa. Las secuencias de los oligonucleótidos sintéticos  
408 se describen en la Tabla 3, donde se marcan en rojo las secuencias  
409 complementarias al vector (secuencia resultante del corte con *Bsa I*); en la Figura  
410 12 se muestra el esquema del diseño de guías. Se realizaron minipreps de las  
411 construcciones y se verificó la presencia de la secuencia guía por digestión con *Hind*  
412 III (Figura 13), ya que el vector tiene esos sitios de corte flanqueando a la secuencia  
413 guía. Una vez obtenidas todas las construcciones se mandaron secuenciar para  
414 verificar la presencia de la secuencia guía sin cambios que pudiesen afectar el corte  
415 preciso en la secuencia blanco por la nucleasa Cas9.

#### 416 **2.2.5 Transformación de Plantas**

417 Se realizó la transformación de plantas mediante agroinfiltración con la cepa  
418 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101; se utilizaron tres especies de tomate: *Solanum*  
419 *arcanum* 2157, *Solanum arcanum* 2172 y *Solanum lycopersicum* cv. *microtom*. Se  
420 utilizaron seis construcciones: **1.** Vector sólo con la nucleasa Cas9 como control, **2.**  
421 Multiplex de quelatasa, **3.** Multiplex de *PBC1*, **4.** Una guía de *PBC1*, **5.** Dos guías  
422 de *PBC1* y **6.** Una guía de quelatasa. De estas construcciones se transformaron  
423 aproximadamente 60 partes de hoja de la planta, 10 hipocotilos y 10 cotiledones de  
424 cada especie; de estas transformaciones se lograron obtener callos, en su mayoría  
425 de *S. lycopersicum* cv. *microtom*.; de *S. arcanum* 2157 y *S. arcanum* 2172 solo se  
426 observaron callos en algunos hipocotilos y cotiledones, sin embargo, en la mayoría  
427 de los casos el crecimiento de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* invadió el callo  
428 y esto no permitió el crecimiento de los explantes. Estos explantes se continúan

429 observando y cambiando de medio para su posterior crecimiento y análisis del knock  
430 out del gen *PBC1* o quelatasa, según la construcción que se insertó en la planta.

### 431 III. DISCUSIÓN

#### 432 3.1 Silenciamiento Génico Inducido por Virus

433 Uno de los métodos más utilizados para realizar análisis funcional de genes  
434 en plantas es el uso de Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS). Se han  
435 utilizado con éxito vectores derivados de diversos begomovirus, entre ellos a  
436 *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), cuyos vectores funcionaron eficientemente para el  
437 silenciamiento de los genes *ChlI* y *NPRI* en *Nicotiana bentamiana* (Villanueva-  
438 Alonzo et al. 2013). El sistema de VIGS se ha utilizado también en plantas de  
439 algodón, usando el virus del arrugamiento de la hoja de algodón (CLCrV por sus  
440 siglas en inglés "*Cotton leaf crumple virus*"). Por ejemplo, Tuttle y colaboradores  
441 silenciaron el gen de la subunidad I de la Magnesio quelatasa (*ChlI*) y en otro  
442 experimento el gen *de* fitoeno desaturasa, en ambos casos el fenotipo esperado  
443 debería ser un blanqueamiento de las hojas. En este experimento inocularon  
444 vectores virales por biobalística; los investigadores observaron que la eficiencia del  
445 silenciamiento aumentó a temperaturas relativamente altas (26-30°C) en las que la  
446 replicación del virus fue óptima, y con esto lograron aproximadamente 70% de  
447 eficiencia en el blanqueamiento de las hojas en ambos casos (Tuttle et al. 2008).  
448 Por otro lado, uno de los vectores utilizados para silenciamiento en tomate que ha  
449 resultado efectivo es el virus moteado del tomate (ToMoV), con el cual se logró  
450 silenciamiento de aproximadamente 61% del gen *SCEI*, lo que hizo factible

451 establecer que este gen está involucrado en la defensa de algunas plantas silvestres  
452 de *Solanum* resistentes a *Cmm* (Esparza-Araiza et al. 2015).

453 En mi trabajo de maestría encontré que el silenciamiento del gen *PBC1* con un  
454 vector derivado de ToMoV, aumenta la susceptibilidad de plantas de una especie  
455 de tomate silvestre (*Solanum peruvianum* 2172) al ser infectada con *Cmm*, como se  
456 muestra en las Figuras 5 y 7. Asimismo, se observó una disminución de la expresión  
457 del gen diana, al analizarse por qRT\_PCR.

### 458 **3.2 Proteasoma y su papel en el estrés biótico**

459 Una de las explicaciones del porque el gen *PBC1* confiere susceptibilidad a  
460 las especies es que como reporta Han et al. (2012), el proteasoma es responsable  
461 de la actividad caspasa 3 durante el desarrollo del xilema, el cual es un proceso de  
462 diferenciación celular terminal que incluye una división celular inicial, expansión  
463 celular, formación de la pared celular secundaria y programación de la muerte  
464 celular, por lo tanto, al no expresarse afecta en el desarrollo de la planta  
465 provocándole susceptibilidad.

466 Otra de las explicaciones del papel del gen *PBC1* implicado en la defensa de la  
467 planta es como se ha reportado que un aumento en el proteasoma 20S  
468 (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ) involucra un aumento en la defensa de la planta interviniendo  
469 en la degradación de proteínas oxidadas producidas en la respuesta de la planta  
470 frente a patógenos (Kurepa et al. 2009), observándose acumulación de las  
471 subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 1$  (Suty et al. 2003b). Existe una mayor tolerancia al estrés  
472 oxidante, debido a que éste incrementa la capacidad de remover proteínas  
473 oxidativas que son potencialmente citotóxicas cuando se acumulan (Kurepa et al.  
474 2009).

475 Por otro lado, para poder inferir una explicación al papel que tiene la Subunidad  $\beta$   
476 tipo 3 en plantas frente a la defensa contra Cmm, no existen trabajos donde se  
477 reporte la función de esta proteína en específico solo que en *Arabidopsis thaliana* la  
478 actividad de la subunidad  $\beta$  tipo 3, en el complejo 20S, no actúa realizando cortes  
479 proteolíticos (Fu et al. 1998); sin embargo, se ha reportado que estas subunidades  
480 pueden reemplazar a sus ortólogos en levaduras, presentando una estructura en  
481 plantas similar a levaduras, en su trabajo Fu et al. (1998), reemplazaron los genes  
482  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 3$  de *Arabidopsis thaliana* en *Saccharomyces cerevisiae* y demostraron que  
483 pueden reemplazar funcionalmente a sus ortólogos en levaduras. Con el trabajo de  
484 Fu et al. 1998, se puede concluir que esta subunidad  $\beta$  es capaz de reemplazar  
485 funcionalmente a sus ortólogos, por lo tanto, buscando la función del gen en  
486 levaduras, se encontró que existe un trabajo, que reporta que este gen tiene una  
487 importante interacción con una de las subunidades que se consideran  
488 proteolíticamente activas, según lo reportado por Arendt and Hochstrasser (1997),  
489 las subunidades  $\beta$  tienen interacciones entre sí para realizar la degradación de  
490 proteínas, dichas interacciones son puntos clave para el efectivo funcionamiento del  
491 proteasoma, las subunidades  $\beta$  del proteasoma en *Saccharomyces cerevisiae* son  
492 conocidas como Pup, por lo que *Pup3* es ortólogo a *PBC1*; *Pup1* tiene el aminoácido  
493 Thr en el N-terminal, lo cual le da la característica de tener actividad tipo tripsina  
494 proteasomal, sin embargo, la actividad de *Pup1* depende de la interacción con *Pup3*,  
495 esto lo comprobaron realizando delecciones en *Pup3* lo cual modificaba la actividad  
496 tipo tripsina de *Pup1*.

497 Por lo tanto, podemos deducir que la subunidad  $\beta$  tipo 3 en *Solanum* putativamente  
498 puede intervenir en la actividad proteolítica del proteasoma frente a las respuesta

499 de defensa de planta, como parte de una primera respuesta de defensa conocida  
500 como “inmunidad inducida por PAMPs” (IIP) o también como resistencia basal,  
501 controlando la producción de especies de oxígeno reactivas (EORs) y controlando  
502 la muerte celular provocada por la respuesta de la planta (Rocha-Sosa, 2013).

### 503 **3.3 CRISPR/Cas9**

504 En el caso de *Solanum* Brooks y colaboradores en 2014, realizaron un “knock  
505 out” del gen SIAGO 7 con este sistema. El silenciamiento de este gen causa el  
506 adelgazamiento extremo de las hojas, dándoles apariencia de aguja. Por medio de  
507 PCR y secuenciación los autores confirmaron el silenciamiento del gen, indicado ya  
508 por el fenotipo de las plantas (Brooks et al. 2014). Otro reporte en *Solanum* fue el  
509 uso de CRISPR/Cas9 para el silenciamiento de dos genes: SIPDS que codifica la  
510 fitoeno desaturasa y SIPIF4 que codifica al factor de interacción fitocromo PIF4. Los  
511 autores del estudio observaron una alta tasa de mutación en las plantas T0 (83.56%)  
512 y un evidente fenotipo de albinismo; la mayoría de las mutaciones detectadas fueron  
513 delecciones de 1 a 3 nucleótidos (Pan et al. 2016).

514 Con estos antecedentes diseñé construcciones para un knock out del gen *PBC1* en  
515 plantas silvestres de *Solanum peruvianum* 2172 y *Solanum arcanum* 2157, las  
516 construcciones utilizadas contenían las secuencias optimizadas para el uso en  
517 plantas como en las construcciones que se utilizaron en los trabajos mencionados.  
518 Además en mi trabajo de maestría obtuve formación de callo en generación T0  
519 como lo menciona Pan et al. 2016, tanto para mi gen blanco como para el gen  
520 reporter de quelatasa; con esto queda de trabajo a futuro realizar un análisis de los  
521 brotes obtenidos y verificar la tasa de obtención de plantas de generaciones

522 posteriores, así como un análisis genómico por PCR de las plantas para verificar el  
523 knock out del gen.

524

## IV. Materiales y Métodos

### 525 4.1 Material biológico

526 Se utilizaron plantas *S. arcanum* 2172, *S. peruvianum* 2157 y *S.*  
527 *lycopersicum*. Se utilizó como cepa patogénica *Cmm* 1387, proporcionada por Ana  
528 Luz Romero García del laboratorio de Biología Molecular de plantas del IPICY. El  
529 vector viral para silenciamiento ToMoV\_ΔCp y ToMoV\_CH fue proporcionado por la  
530 Dra. Mayra Esparza Araiza del mismo laboratorio.

### 531 4.2 VIGS

532 Para elegir la secuencia que se utilizaría para silenciar el gen *PBC1* mediante  
533 VIGS se utilizó la herramienta VIGS del servidor en línea Solgenomics  
534 (<https://solgenomics.net>), se seleccionó la mejor región a silenciar del gen *PBC1*.  
535 Se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos que flanquean la región de 300 pares de  
536 bases del gen *PBC1*; uno amplifica 273 pb y el otro 247 pb, ambos tienen sitios de  
537 corte a los extremos para *Eco* RI y *Hind* III para insertar el gen al vector VIGS de  
538 ToMoV. Los oligos que se diseñaron se muestran en la Tabla 2. Para identificar la  
539 temperatura de alineamiento más adecuada, se utilizó un PCR de gradiente de  
540 temperatura de 56° C a 65°C. Las condiciones de la PCR utilizadas para  
541 amplificación del fragmento fueron: 5 min a 94°C para desnaturalización, 30 ciclos  
542 a 94°C (Ti) por 50 s, 56 a 65°C (Tm) por 40 s, 72°C (Te) por 50 s y 72°C por 3 min  
543 para la extensión final.

#### 544 **4.2.1 Diseño del vector ToMoV\_PBC1**

545 Una vez obtenido y amplificado el fragmento del gen *PBC1*, se ligó al vector  
546 pGEM-T Easy y se realizó la digestión del vector pGEM-T Easy+*PBC1* y del vector  
547 ToMoV\_ΔCp con enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, una vez obtenido el  
548 fragmento de 300 pb y linearizado el vector ToMoV\_ΔCp, se visualizaron en gel de  
549 agarosa 1X en buffer TAE, se cortó y purificó la banda por columnas (PROMEGA).  
550 Los fragmentos purificados de 300 pb del gen *PBC1*, se ligaron al vector ToMoV  
551 con la ligasa T4 ADN (Roche). Se realizó clonación en *E. coli* top 10 mediante  
552 Choque térmico y se realizó miniprep de las clonas positivas, posteriormente se  
553 digirieron los plásmidos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Se verificó  
554 la presencia del fragmento en el vector mediante secuenciación.

#### 555 **4.2.2 Preparación de proyectiles de tungsteno**

556 Se realizó una reacción de digestión con *ApaI* (New England Biolabs)  
557 durante 18 horas a 25 °C, para liberar el vector ToMoV\_PBC1 del vector pBluescript  
558 II SK+/- y a la vez se realizó la reacción de digestión del vector B (este vector  
559 contiene los genes de movilidad del virus). Se prepararon proyectiles de tungsteno  
560 con el componente A y el componente B agregando una mezcla 1:1 de cada  
561 componente (1 μg de ToMoV\_PBC1 y 1 μg de Componente B), se fijaron los  
562 vectores a Tungsteno 15 μg/mL, utilizando CaCl<sub>2</sub> 2.5M y Espermidina 0.1 M.

#### 563 **4.2.3 Bombardeo de plantas con micropartículas**

564 Se utilizaron 12 plantas por cada tratamiento, estas fueron: Plantas no  
565 bombardeadas, plantas bombardeadas con ToMoV\_ΔCp, plantas bombardeadas  
566 con ToMoV\_Ch (quelatasa como control visual de silenciamiento) y plantas  
567 bombardeadas con ToMoV\_PBC1, como control se utilizó la planta susceptible S.

568 *lycopersicum*. De estas 12 plantas de cada tratamiento, se dividieron en dos, 8 para  
569 infectar *Cmm* y 4 como control sin infectar. Las plantas se dispararon a los 21 días  
570 de edad, se utilizó una cámara de biobalística (PDS-1000 – He BioRad, Hercules,  
571 CA, USA), con discos de ruptura de 600 psi para la presión del disparo; las plantas  
572 se dejaron en condiciones controladas de temperatura a 25°C durante 60 días y  
573 posteriormente se infectaron con *Cmm*.

#### 574 **4.2.4 Infección de plantas con *Cmm***

575 Se preparó un inóculo de *Cmm* 1387 en medio 702 (extracto de levadura 2g/L,  
576 polipeptona 1g/L, sulfato de magnesio 0.92g/L), se creció durante 18 horas a 28°C,  
577 se midió absorbancia a 620 nm para cuantificar la cantidad de UFC/mL y se realizó  
578 una dilución con el medio hasta tener 10<sup>5</sup> UFC/mL. Se inyectó 50 µL de *Cmm* en el  
579 primer internodo del tallo de las plantas.

#### 580 **4.2.5 Toma de muestra de tejido, extracción de ácidos nucleicos y** 581 **síntesis de cDNA**

582 Se tomó muestras de hojas cercanas al sitio de infección a las 8 horas post-  
583 infección y se colocaron en nitrógeno líquido para extracción de ARN. Para la  
584 extracción de ADN se cortaron tallos 2 cm arriba del sitio infección una semana post-  
585 infección. Se realizó extracción de ADN, se utilizó el protocolo de Green y Thompson  
586 (1999) modificado por Monreal-Vargas (2005); El protocolo consta de pesar 0.5 g  
587 de tejido vegetal, triturar y moler en mortero con 500 µL de buffer de extracción,  
588 incubar a 65°C por 40 min (agitando cada 10 min), se agrega un volumen de  
589 fenol/cloroformo/alcohol Isoamílico (25:24:1), mezclar con vórtex y centrifugar 10  
590 min a 12,000 rpm, posteriormente separar la fase acuosa y pasar a un tubo nuevo  
591 de 1.5 mL, agregar un volumen de fenol/cloroformo alcohol Isoamílico (25:24:1),

592 mezclar con vórtex y centrifugar 10 min a 12,000 rpm. Separar la fase acuosa y  
593 pasar a un tubo nuevo de 1.5 mL, precipitar el ADN con un volumen igual de  
594 isopropanol frío y mezclar por inversión, dejar la muestra en hielo por 5 min y  
595 centrifugar por 5-10 minutos a 12,000 rpm y eliminar el sobrenadante. Se lava la  
596 pastilla con etanol 70% y centrifugar 5 min y eliminar el etanol con pipeta, secar al  
597 aire y suspender con 100  $\mu$ L de agua Milli "Q", agregar 2 $\mu$ L de RNAsa 25  $\mu$ g/mL,  
598 incubar 30 minutos a 37°C y precipitar el ADN con un volumen de isopropanol frío y  
599 mezclar por inversión, dejar la muestra en hielo por 5 minutos centrifugar por 5-10  
600 min a 12,000 rpm y eliminar el sobrenadante, lavar la pastilla con etanol 70% y  
601 centrifugar 5 min y eliminar el etanol con pipeta, secar al aire y suspender con 100  
602  $\mu$ L de agua Milli "Q" y se almacena a -20°C.

603 Se realizó extracción de ARN por TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), el  
604 protocolo consta de triturar la muestra con nitrógeno líquido en un mortero, pasarlo  
605 a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y agregar 1 mL de trizol, homogenizar mezclando  
606 con vórtex, incubar 5 minutos a 4°C, añadir 200  $\mu$ L de cloroformo y se mezcla  
607 vigorosamente por 15 segundos, incubar 2 minutos en hielo, centrifugar a 13,000  
608 rpm durante 15 minutos a 4°C, transferir la fase acuosa a un tubo nuevo Eppendorf  
609 de 1.5 mL, adicionar 0.5 mL de isopropanol frío y mezclar por inversión, dejar  
610 reposar por 15 minutos en hielo, centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.  
611 Lavar la pastilla con 1 mL de etanol-DEPC 75%, centrifugar a 7,000 rpm durante 5  
612 minutos a 4°C. Dejar secar la pastilla en hielo y resuspender en 30  $\mu$ L de agua libre  
613 de nucleasa DEPC. El ARN se trata con DNAsa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1  
614 U de DNAsa por cada microgramo de ADN en la muestra y 1x de buffer, se incuban

615 10 minutos a 37 °C y se inactiva a 65°C. Se verificó la integridad del ARN con un  
616 gel de agarosa al 1.2%. Posteriormente se sintetizó cDNA.

617 En tubos Eppendorf de 0.5 mL, agregar 1 µL (500 µg/mL) de oligo DT (Invitrogen,  
618 Carlsbad, CA, USA), 300 ng de ARN, 1 µL de dNTPs (10 mM) y cantidad necesaria  
619 de agua DEPC para un volumen de 12 µL, se incubó a 65°C durante 5 minutos, se  
620 coloca en hielo y se agrega buffer 5x de la SuperScript (Invitrogen, Carlsbad, CA,  
621 USA) y 2 µL (0.1M) de DTT, se incubó a 42 °C por 2 minutos y se agrega 1 µL (200  
622 unidades) de SuperScript (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), se incubó a 42°C por 50  
623 minutos y se inactiva la reacción a 70 °C por 15 minutos.

#### 624 **4.2.6 Medición del avance de la enfermedad mediante carga** 625 **bacteriana**

626 Para realizar la cuantificación de la carga bacteriana se realizó un análisis de  
627 PCR en tiempo real cuantificación absoluta se utilizaron las extracciones ADN y la  
628 curva estándar se realizó con los oligos que amplifican el genoma de *Cmm* Oligo  
629 forward: 5'-GAGCCAAGCCACTGATCTTC-3', Reverse: 5'-  
630 CGTTCTCGTAGAGGCGGTAG- 3'. Las condiciones de la reacción de RT-PCR  
631 fueron 95°C durante 20 s, 40 ciclos de: 95°C por 50 s y 60°C durante 40 s y a 72°C  
632 por 50 s y finalmente a 72° por 5 minutos para la extensión final; la curva de  
633 disociación se realizó por 80 ciclos a 95°C durante 15 s, 60°C por 1 min e  
634 incrementos de 0.5°C hasta llegar a 95°C, luego 95°C durante 30 s. La RT-PCR se  
635 realizó en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time, versión 2.0. La curva  
636 estándar se realizó con concentraciones de  $2.86 \times 10^2$  a  $2.86 \times 10^8$  copias/ng del  
637 fragmento de 219 pb de tomA clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega,

638 Madison, WI, USA). El coeficiente de correlación entre el valor del ciclo umbral y la  
639 concentración de tomA clonado en pGEM-T Easy fue de 0.999.

#### 640 **4.2.7 Cuantificación de la expresión del gen mediante qRT-PCR tiempo** 641 **real**

642 Para realizar la cuantificación de expresión del gen se realizó un PCR tiempo  
643 real cuantificación relativa, se utilizó el cADN sintetizado, los oligonucleótidos  
644 utilizados para amplificar el gen *PBC1* fueron: forward  
645 5'ATGGAAGTGCTTTGGTTGCGATGGT3' y la secuencia Reversa  
646 5'AGCCAGAAAGTCCAATAAAAAGCTTGCAAT 3', como gen de expresión de  
647 referencia (house keeping) se utilizó el gen de actina, el cual amplifica un fragmento  
648 de 160 pb, la secuencia correspondiente de los oligonucleótidos es: Forward:  
649 5'CCACCATGTTCCCTGGTATC 3' y reverso 5' GTGCTGAGGGATGCAAGAAT 3',  
650 este gen tiene una expresión basal, por lo que se utiliza como gen de referencia.  
651 Las condiciones de la reacción de RT-PCR fueron 95°C durante 20 s, 40 ciclos de:  
652 95°C por 50 s y 60°C durante 40 s y a 72°C por 50 s y finalmente a 72° por 5 minutos  
653 para la extensión final; la curva de disociación se realizó por 80 ciclos a 95°C durante  
654 15 s, 60°C por 1 min con incrementos de 0.5° C hasta llegar a 95°C, luego 95°C  
655 durante 30 s. La RT-PCR se realizó en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast  
656 Real-Time, versión 2.0.

### 657 **4.3 CRISPR/Cas9**

#### 658 **4.3.1 Diseño de guías: Estrategia 1**

659 Se utilizaron algunos programas como Tefor 2016 y CRISPR Plant, se  
660 eligieron por las características que presentan, como incluir genomas de plantas y  
661 mostrar los sitios de cortes no deseados con mayor puntos críticos en el genoma de

662 la especie (características mencionadas en la Tabla 1), en los cuales se introdujo la  
 663 secuencia de 300 pb utilizada para silenciar por VIGS, es decir en la región  
 664 codificante 5', de estos 300 pb se seleccionaron como secuencias guía las que  
 665 presentaban la menor cantidad de blancos no deseados y que fueran los menos  
 666 riesgosos, es decir con un mismatch en la zona semilla (12 nucleótidos después de  
 667 la secuencia PAM). Las guías diseñadas fueron para quelatasa una guía o un corte,  
 668 gen *PBC1* una guía y dos guías (uno y dos cortes respectivamente), las secuencia  
 669 de genes sintéticos de cada elemento son las siguientes; Para quelatasa, promotor  
 670 U6:

671 5'AGAAATCTCAAATTCCGGCAGAACAAATTTGAATCTCGATCCGTAGAAACGAGAC  
 672 GGTCATTGTTTTAGTTCCACCACGATTATATTTGAAATTTACGTGAGTGTGAGTGAGA  
 673 CTTGCATAAGAAAATAAAATCTTTAGTTGGGAAAAAATCAATAATATAAATGGGCTT  
 674 GAGAAGGAAGCGAGGGATAGGCCTTTTTCTAAAATAGGCCCATTTAAGCTATTAACA  
 675 ATCTTCAAAGTACCACAGCGCTTAGGTAAAGAAAGCAGCTGAGTTTATATATGGTTA  
 676 GAGACGAAGTAGTGATT 3' Secuencia guía: 5'TGATCTTCGAGTTAAAATC  
 677 TCTAAGGTCTGT 3' ARN andamio (scaffold) 5' GTTTTAGAGCTAG  
 678 AAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC  
 679 GAGTCGGTGCTTTTTTTGTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATT 3' y  
 680 terminador: 5'TTTTTTT3'

681 Para las otras dos construcciones se utilizó la misma secuencia de promotor, ARN  
 682 andamio y terminador, los cambios fueron las secuencias guías.

683 Las secuencias guías para el gen *PBC1* fueron: 5' TGTAGACCGTG  
684 ACTGTTTAAGTGGTTGGGGA 3' y el segundo corte fue con la secuencia guía 5'  
685 GCAAAGATTTTGTGTTTCTGGCACTGCA 3'. Estas secuencias guías se  
686 clonaron en el vector pFGC-pcoCas9, mediante la adición de secuencias con sitios  
687 de corte a *Sbf* I (5' CCTGCAGG 3') y *Xba* I (5' TCTAGA3') para dos guías y *EcoR* I  
688 (5' GAATTC 3') y *Xba* I (5' TCTAGA3') para una sola guía. Además estas secuencias  
689 guías contienen la secuencia PAM dentro de la secuencia guía. Estas  
690 construcciones se mandaron sintetizar con GeneScript para posteriormente  
691 clonaras y digerirlas con sus enzimas correspondientes e insertarlas en el vector  
692 pFGC-pcoCas9.

#### 693 **4.3.2 Diseño de guías: estrategia 2**

694 Utilizando los mismos programas mencionados en la estrategia uno, se  
695 eligieron secuencias guías pero en esta ocasión en toda la secuencia del gen *PBC1*.  
696 El vector PHSE\_401 contiene a la región de la secuencia guía flanqueada por sitios  
697 de restricción de la enzima *Bsa* I, la cual es una enzima de restricción del tipo II,  
698 estas enzimas se caracterizan porque cortan fuera del sitio de reconocimiento, por  
699 lo tanto, al hacerse el corte, estos sitios no son cohesivos entre sí, es por esto que  
700 las secuencias guías se diseñan de manera que el oligo 5' tenga la secuencia  
701 ATTG' y el 3' la complementaria de 'GTTT en los extremos y que ambas cadenas  
702 sean complementarias de la parte central, estas guías no contienen la secuencia  
703 PAM pero están diseñadas tomando en cuenta nucleótidos adyacentes a una  
704 secuencia PAM del genoma. Se mezclaron 10 µL de oligo forward 100 mM y 10 µL  
705 de oligo reverso 10 mM, se alinearon los oligos comenzando con una temperatura  
706 de 94°C 20 minutos y posteriormente bajando la temperatura lentamente 1°C por

707 minuto hasta llegar a los 10 °C. Se ligó la secuencia guía al vector  
708 pHSE401\_CRISPR con ligasa T4 (New England Biolabs). Se transformaron células  
709 calcio-competentes con la ligación y se verificó la presencia de las secuencias guías  
710 con PCR, utilizando de oligos que tengan secuencia 5'  
711 AAGCTTCGACTTGCCTTCCGC 3' y reverso 5' GAAGCTTATTGG  
712 TTTATCTCATCGG 3', las condiciones del PCR fueron 35 ciclos a 94°C (Ti) por 50  
713 s, 55°C (Tm) por 40 s, 72°C (Te) por 50 s y 72°C por 1:30 min para la extensión  
714 final.

### 715 **4.3.3 Diseño de multiplex**

716 Teniendo el vector pHSE con la secuencia guía, se procedió a amplificar los  
717 nucleótidos correspondientes al complejo de la guía y el ARN scaffold, con un oligo  
718 que se alinea al promotor y otro que se alinea al terminador, estos oligos tienen  
719 sitios de corte en los extremos. Las condiciones del PCR fueron 35 ciclos a 94°C  
720 (Ti) por 50 s, 55°C (Tm) por 40 s, 72°C (Te) por 50 s y 72°C por 1:30 min para la  
721 extensión final. En la Tabla 4 se muestra la secuencia del oligo y los sitios de corte  
722 (en color rojo); para poder elegir que oligos utilizar, se seleccionó un oligonucleótido  
723 con sitio de corte que se amplifique en el terminador de una guía y que sea el mismo  
724 sitio corte para el promotor de la siguiente guía, así se puedan ligar las guías en el  
725 mismo vector. En esta estrategia se utilizó una construcción MULTIPLEX de tres  
726 guías para el gen *PBC1*, así como una construcción MULTIPLEX con dos guías  
727 para el gen de Quelatasa. Los oligos a utilizar se muestran en la Tabla 5. Se realizó  
728 el PCR y se purificó de banda por columna (Qiagen) el fragmento amplificado de  
729 cada guía para posteriormente digerir con las enzimas correspondientes y proceder  
730 a la ligación a un vector pAD20 que es más pequeño (~1Kb) que pHSE y que tiene

731 los sitios *Hind* III esperando la ligación sea más sencilla con las tres guías al vector.  
732 Una vez ligado al vector pAD120 se cortaron las guías juntas con *Hind* III, se  
733 purificaron por columna (QiaGen) y se ligaron con ligasa T4DNA (New England  
734 Biolabs) al vector pHSE401 para formar el multiplex. Se transformaron células  
735 calcio-competentes con la ligación y se verificó la presencia de las secuencias guías  
736 con PCR, utilizando como primers Forward: secuencia guía 1 y reverso secuencia  
737 guía 2. Las condiciones de PCR fueron 35 ciclos a 94°C (Ti) por 50 s, 55°C (Tm)  
738 por 40 s, 72°C (Te) por 50 s y 72°C por 1:30 min para la extensión final.  
739 Posteriormente se realizó miniprep del vector multiplex con Miniprep KIT QiaGen.

#### 740 **4.3.4 Transformación de plantas de tomate**

741 Teniendo las construcciones de CRISPR/Cas9 listas se procedió a  
742 transformar *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 con seis de las construcciones  
743 disponibles por medio de electroporación, las construcciones utilizadas fueron: **1.**  
744 Vector sólo con la nucleasa Cas9 como control, **2.** Multiplex de quelatasa, **3.**  
745 Multiplex de *PBC1*, **4.** Una guía de *PBC1*, **5.** Dos guías de *PBC1* y **6.** Una guía de  
746 quelatasa (las pruebas con una guía y dos para *PBC1* son las construcciones  
747 sintetizadas con GeneScript y los multiplex fueron los generados en WSU). La  
748 transformación se creció en medio YEP Agar con kanamicina 100 mg/L y  
749 gentamicina 50 mg/L.

750 Una vez que se tenía *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones se  
751 identificaron por PCR de colonia, se procedió a crecer el cultivo de *Agrobacterium*  
752 *tumefaciens* en medio YEP líquido con kanamicina 100 mg/L y gentamicina 100  
753 mg/L durante 48 horas a 25 °C. Cuando se obtuvo el preinóculo de *Agrobacterium*  
754 se tomó una dilución 1:100 en medio YEP líquido con kanamicina 100 mg/L y

755 gentamicina 100 mg/L y se dejó crecer 16 horas para tener una OD menor de 1. Se  
756 centrifugó y las células se resuspendieron en medio 2MS (20 g/L sacarosa) a una  
757 DO= 1.0. Se contaron los explantes de las plantas *Solanum arcanum* 2157,  
758 *Solanum arcanum* 2172 y *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom (60 porciones de  
759 hojas, 10 cotiledones y 10 hipocotilos de cada especie) y se repartieron en seis  
760 grupos correspondientes a cada construcción. Se colocaron en *Agrobacterium*  
761 (previamente preparado en medio 2MS DO<1) se dejaron en agitación a 25 °C por  
762 20 minutos y se colocaron en medio co-cultivo el cual contiene sales MS, BAP, 1.5  
763 mg/L y NAA 0.05 mg/L, se dejaron en oscuridad a 22°C por 48 horas para co-cultivo,  
764 posteriormente se lavaron los explantes con agua destilada estéril y finalmente se  
765 lavaron con agua con cefatoxima 200 mg/L. Los explantes se secaron y se  
766 colocaron en medio de inducción de brotes el cual contiene: sales MS, zeatina 2  
767 mg/L, IAA 0.1 mg/L, cefatoxima 200 mg/L, timentina 100 mg/L, kanamicina 100 mg/L  
768 y Vitaminas MS 1x (Figura 16).

769 Se dejaron los explantes durante el tiempo necesario para ver la formación de  
770 callos.

771

772

## V. Conclusiones

- 773 1. El silenciamiento del gen *PBC1* no afecta el desarrollo de la planta silvestre sin  
774 el reto con *Cmm*.
- 775 2. El silenciamiento con el vector ToMoV\_ΔCp no afecta la resistencia a *Cmm* de  
776 la planta silvestre.
- 777 3. El silenciamiento del gen *PBC1* genera en algunas plantas fenotipos de  
778 susceptibilidad y mayores cargas bacterianas al ser retadas con *Cmm*, esto  
779 sugiere que el gen *PBC1* puede estar implicado en la defensa de planta contra  
780 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- 781 4. Es posible subclonar diferentes guías de ARN en los vectores pFGC-coCas9 y  
782 pHSE401\_CRISPR.
- 783 5. Es posible generar callos de explantes de las especies de tomate (*Solanum*  
784 *arcanum* 2157, *Solanum arcanum* 2172 y *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom)  
785 co-cultivados con *Agrobacterium* conteniendo vectores con guías para silenciar  
786 genes mediante el sistema CRISPR/Cas9.
- 787

788

## Tablas

789

790

791

**Tabla 1. Algunas herramientas bioinformáticas disponibles para la selección de sitios blanco y predicción de “off-targets” con la estrategia CRISPR/Cas9**

Sitio	Propósito
<a href="http://www.genome-engineering.org">http://www.genome-engineering.org</a>	Herramienta para encontrar sitios blanco introduciendo una secuencia (disponible para <i>A. thaliana</i> ).
<a href="http://crispr.mit.edu/">http://crispr.mit.edu/</a> <a href="http://eendb.zfgenetics.org/casot">http://eendb.zfgenetics.org/casot</a> <a href="http://plants.ensembl.org/info/website/ftp/index.html">http://plants.ensembl.org/info/website/ftp/index.html</a>	Recurso abierto utilizado para identificar posibles off-targets en cualquier especie de genoma. Cuenta con genoma de 38 plantas.
<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html</a>	Web diseñada para diseñar sgARN de una librería de genomas o secuencias individuales, evalúa sitios con blancos homólogos y predice off-targets. Cuenta con 5 genomas de plantas.
<a href="http://www.genome.arizona.edu/crispr">www.genome.arizona.edu/crispr</a> (CRISPR PLANT)	Predice sgARN y posibles off-target. Disponible para 8 genomas representativos de plantas
<a href="https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/">https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/</a>	Herramienta efectiva de secuencias blanco y predicción de off target. Incluye el diseño de oligos específicos al blanco para genotipificación por PCR. El único genoma de planta disponible es <i>A. thaliana</i>
<a href="http://broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design">.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design</a>	Herramienta en línea para diseño de sgARNs altamente activos.
<a href="http://crispor.tefor.net/">http://crispor.tefor.net/</a>	Describe claramente las zonas con secuencias para guías con menos off-targets y muestra los posibles off-targets con sitios críticos de posibles cortes.

792

(Modificado de Belhaj et al. 2015)

793

794 **Tabla 2. Especificaciones de los oligos diseñados para obtener el**  
 795 **fragmento del gen *PBC1* de *Solanum*.**

	<b>FORWARD</b>	<b>REVERSO</b>	<b>Tamaño del fragmento amplificado</b>	<b>Temperatura de alineamiento</b>
<b>Par 1</b>	5'GCCATGATATCGAATTCAAG GTTTGGTCCATACTTGT3'	5'CGGTAAGCTTACAACATAA ACATGTCCTCCCC 3'	273	60°C
<b>Par 2</b>	5'GCCATGATATCGAATTCCCA TACTTGTGCCAACCTGTAA3	5'CGGTAAGCTTCTCCCCAA CCACTTAAACAGTC3'	247	60°C

796

797 **Tabla 3. Especificaciones de las guías a utilizar en la segunda estrategia**

<b>Nombre</b>	<b>Corta en</b>	<b>Secuenci a PAM</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
Guide_1_ <i>PBC1</i>	PROMOTO R Secuencia Forward	TGG	5' <b>ATTG</b> TCTTCATT AGCAAAAGCATT 3'	5' <b>AAAC</b> AATGCTTTTG CTAATGAAGA 3'
Guide_2_ <i>PBC1</i>	5'UTR y ORF Secuencia Forward	TGG	5' <b>ATTG</b> ATGTCGAT CTTTGAGTATAA 3'	5' <b>AAAC</b> TTATACTCAA AGATCGACAT 3'
Guide_3_ <i>PBC1</i>	INTRON 2 Secuencia reversa	GGG	5' <b>ATTG</b> ACATGGGA CCGGAAGAATT 3'	5' <b>AAAC</b> AATTCTTCCG GTCCCATGTC 3'
GUIDE_1 _CHELA TASE	INTRON 1 Secuencia Reverse	TGG	5' <b>ATTG</b> GAGACCG GTGTATCCATTTC 3'	5' <b>AAAC</b> GAAATGGAT ACACCGGTCTC 3'
GUIDE_2 _CHELA TASE	INTRON 2 Secuencia Forward	TGG	5' <b>ATTG</b> GCTACTGA GGACAGGGTGTG 3'	5' <b>AAAC</b> CACACCCTG TCCTCAGTAGC 3'

798

799

800

**Tabla 4. Secuencias de oligos diseñados para MULTIPLEX**

801

Nombre	Secuencia	Forward / Reverso	Enzima que se cortará
407	atatatAAGCTTCGACTTGCCTTCCGC	Forward	<i>Hind</i> III
408	atatatGAAGCTTATTGGTTTATCTCATCGG	Reverso	<i>Hind</i> III
415	atatatCCATGGCGACTTGCCTTCCGC	Forward	<i>Nco</i> I
416	atatatGCCATGGATTGGTTTATCTCATCGG	Reverso	<i>Nco</i> I
417	atatatTCTAGACGACTTGCCTTCCGC	Forward	<i>Xba</i> I
418	atatatGTCTAGAATTGGTTTATCTCATCGG	Reverso	<i>Xba</i> I

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

**Tabla 5. Oligos utilizados para MULTIPLEX**

Guía a amplificar	Oligo a utilizar	Enzimas que cortan
<i>PBC1</i> guía 1	407 Forward + 416 reverso	<i>Hind</i> III + <i>Nco</i> I
<i>PBC1</i> guía 2	415 forward + 418 reverso	<i>Nco</i> I + <i>Xba</i> I
<i>PBC1</i> guía 3	417 Forward + 408 Reverso	<i>Xba</i> I + <i>Hind</i> III
Quelatasa guía 1	407 forward + 418 reverso	<i>Hind</i> III + <i>Xba</i> I
Quelatasa guía 2	417 forward + 408 reverso	<i>Xba</i> I + <i>Hind</i> III

814

815

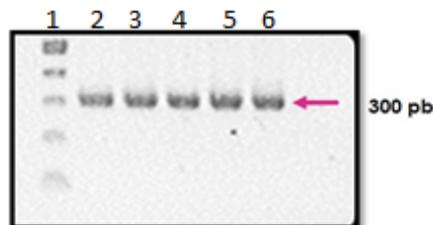
816

## Figuras



817  
818  
819  
820  
821  
822

**Figura 1. Región seleccionada para silenciamiento del gen *PBC1* por VIGS.** En la Figura se muestra en amarillo la región del gen seleccionada y en la parte inferior se observa la secuencia de 300 pb. Los cuadros azules representan la cantidad de ARNs de interferencia que se pueden formar en esta región.



823

**Figura 2. Amplificación del fragmento del gen *PBC1* a silenciar.** Producto de PCR del fragmento de 300 pb del gen *PBC1* con gradiente de temperatura. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb; Carril 2: 57°C; Carril 3: 58°C; Carril 4: 60°C; Carril 5: 63°C; Carril 6: 65°C.

828  
829

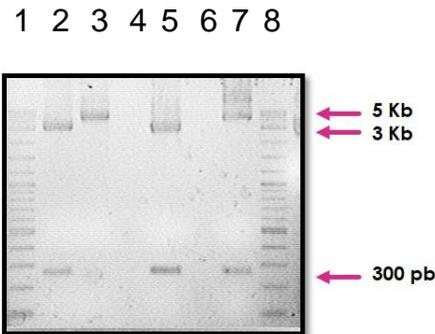
830

831

832

833

834

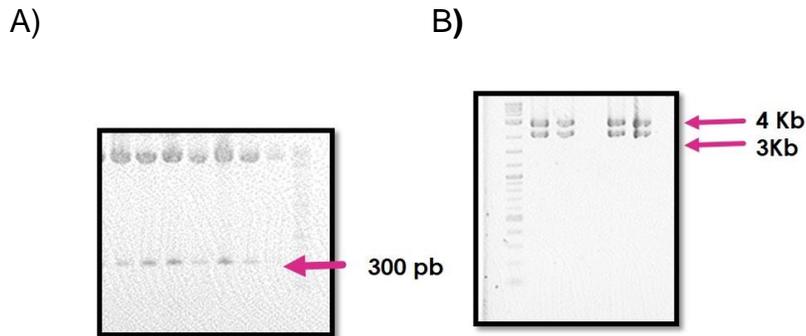


835

836 **Figura 3. Digestión del vector pGEM-T Easy para liberar el fragmento de**  
 837 ***PBC1*.** Se observa la liberación del fragmento esperado de 300 pb. Carril 1: Marcador de  
 838 peso molecular 100 pb; Carril 2: vector pGEM digerido con *EcoR*I y *Hind* III y el fragmento  
 839 del gen *PBC1*; Carril 3: vector ToMoV\_ΔCp; Carril 5: vector pGEM digerido con *EcoR*I y  
 840 *Hind* III y fragmento del gen *PBC1* y Carril 7: ToMoV\_ChI (Quelatasasa) digerido con *EcoR*I  
 841 y *Hind* III.  
 842

843

844



845

846 **Figura 4. Reacciones de digestión en el vector ToMoV\_*****PBC1*.** A) Digestión  
 847 con *EcoR*I y *Hind* III. Se observa el fragmento del gen *PBC1* de 300 pares de bases liberado  
 848 del vector ToMoV. B) Digestión con *Apa* I. Se observa la banda de 4 kb que corresponde al  
 849 vector ToMoV\_ *PBC1* y de 3 kb que corresponde a la parte del vector pBluescript KSII +/-.  
 850

851

852

853

854

855

856 **A) No infectadas con *Cmm***



857

858 **B) Infectadas con *Cmm***

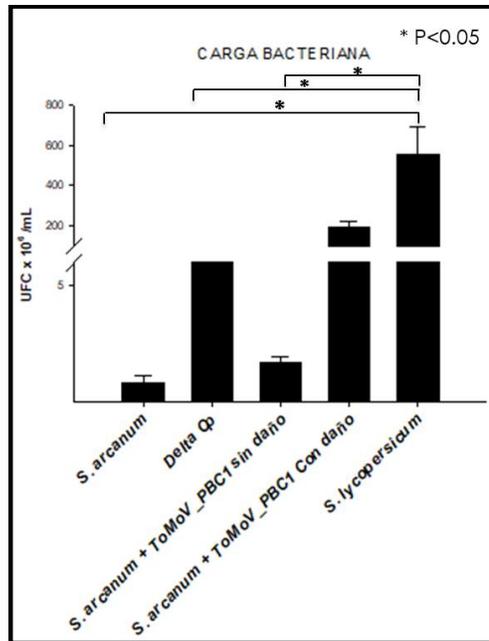


859

860 **Figura 5. Avance de la enfermedad en plantas *S. peruvianum* 2172 con y**  
 861 **sin bombardeo y retadas con *Cmm*.** A) Plantas control no infectadas con *Cmm*. La  
 862 parte izquierda muestra a plantas bombardeadas con ToMoV\_*PBC1*, lo cual sugiere que el  
 863 gen *PBC1* no es esencial ya que el silenciamiento del gen no afecta el crecimiento normal  
 864 de la planta. La parte derecha muestra a *S. peruvianum* 2172 sin infectar y sin bombardear,  
 865 para comparar cómo es el crecimiento natural de la planta silvestre. B) Plantas infectadas  
 866 con *Cmm*. Plantas no bombardeadas muestran un fenotipo de resistencia a *Cmm* donde

867 solo existe caída de las hojas en el sitio de infección, plantas bombardeadas con ToMoV\_  
 868  $\Delta$ Cp muestran un fenotipo similar a una planta resistente nativa, esto demuestra  
 869 que el vector modificado de ToMoV no silencia ningún gen de la planta; plantas  
 870 susceptibles de *S. lycopersicum* muestra marchitamiento al ser retada con *Cmm*. Plantas  
 871 bombardeadas con ToMoV\_PBC1 y retadas, algunas muestran marchitamiento,  
 872 necrosamiento en el tallo y la aparición de algunos chancros.  
 873

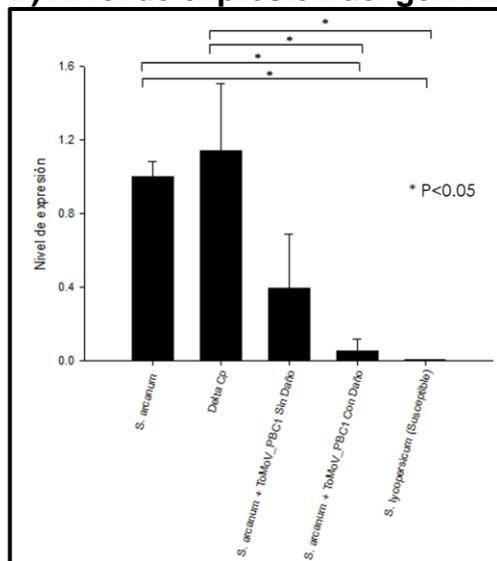
874 **A) Carga bacteriana**



Muestra	Carga bacteriana UFC/mL
<i>Solanum arcanum</i> (control)	8.11E+05
Delta Cp	9.17E+06
<i>Solanum arcanum</i> +ToMoV_PBC1 sin daño	1.68E+06
<i>Solanum arcanum</i> +ToMoV_PBC1 con daño	1.90E+08
<i>Solanum lycopersicum</i> (Susceptible)	5.55E+08

875  
876

**B) Nivel de expresión del gen PBC1**



Muestra	Nivel de expresión (Fold Change)
<i>S. arcanum</i>	1.0000
Delta Cp	1.1419
<i>S. arcanum</i> + ToMoV_PBC1 Sin Daño	0.3922
<i>S. arcanum</i> + ToMoV_PBC1 Con Daño	0.0507
<i>S. lycopersicum</i> (Susceptible)	3.3014e-3

877  
878  
879  
880

**Figura 6. Carga bacteriana de *Cmm* y nivel de expresión del gen *PBC1* en *S. peruvianum* 2172 con y sin silenciamiento. A) Carga bacteriana de plantas *S. peruvianum* 2172. Se observa que la planta silenciada y retada que muestra con daño (1\*)**

881 tiene una carga bacteriana similar a la planta susceptible (*Solanum lycopersicum*), sin  
 882 embargo, *S. peruvianum*\*2 fue una planta que no presentó daño y muestra una carga  
 883 bacteriana muy similar al control *S. peruvianum*. B) Expresión relativa del gen *PBC1* en *S.*  
 884 *peruvianum* 2172. Se observa que en todos los casos de plantas de *S. peruvianum* 2172  
 885 bombardeadas con ToMoV\_*PBC1* y retadas, el gen se expresa en menor cantidad,  
 886 comparadas con el control. *S. peruvianum* 1 y 2 no mostraban daño, pero la planta *S.*  
 887 *peruvianum* 3 y 4 son plantas descritas como plantas con daño, en las cuales se observó  
 888 mayor susceptibilidad a *Cmm*.  
 889

890

**A) No infectadas con *Cmm***



891

892

**B) Infectadas con *Cmm***

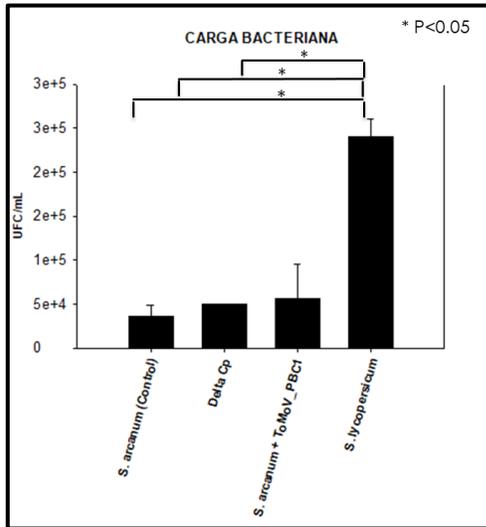


893

894 **Figura 7. Avance de la enfermedad en plantas *Solanum arcanum* 2157**  
 895 **con y sin bombardeo y retadas con *Cmm*.** A) Plantas no infectadas con *Cmm*. La  
 896 parte izquierda muestra a plantas bombardeadas con ToMoV\_*PBC1*, lo cual sugiere que el  
 897 gen *PBC1* no es esencial ya que el silenciamiento del gen no afecta el crecimiento normal  
 898 de la planta. La parte derecha muestra a *S. arcanum* 2157 sin infectar y sin bombardear  
 899 para comparar cómo es el crecimiento natural de la planta. B) Plantas infectadas con *Cmm*.  
 900 Plantas no bombardeadas muestran un fenotipo de resistencia a *Cmm* donde solo existe

901 caída de las hojas en el sitio de infección; Plantas bombardeadas con ToMoV\_ΔCp  
 902 muestran un fenotipo similar a una planta resistente nativa, es decir el vector ToMoV sin el  
 903 fragmento del gen *PBC1* no ocasiona daño a la planta; Planta susceptible muestra  
 904 marchitamiento al ser retada; Plantas bombardeadas con ToMoV\_*PBC1* y retadas, las  
 905 plantas no se observan que manifiesten la enfermedad sólo algunas plantas tienen  
 906 aparición de pequeños chancros y con caída de las hojas cercanas al punto de infección.  
 907

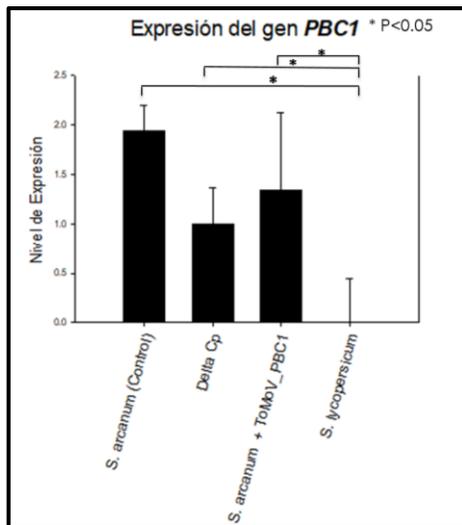
908 **A) Carga Bacteriana**



Muestra	Carga bacteriana UFC/mL
<i>S. arcanum</i> + ToMoV_ <i>PBC1</i>	6.07 E+04
<i>S. arcanum</i> (control)	3.55E+04
ΔCp	4.94E+04
<i>S. Lycopersicum</i> (Susceptible)	2.40E+05

909

910 **B) Expresión del gen *PBC1***



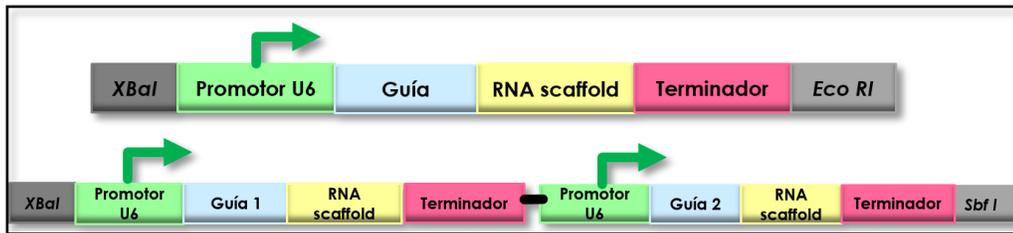
Muestra	Nivel de expresión (Fold Change)
<i>S. arcanum</i> (control)	1.94
Delta Cp	1.00
<i>S. arcanum</i> + ToMoV_ <i>PBC1</i>	1.30
<i>S. Lycopersicum</i> (Susceptible)	0.074

911

912 **Figura 8. Carga bacteriana y nivel de expresión del gen *PBC1* en *S.***  
 913 ***arcanum* 2157.** A) Carga bacteriana de plantas *S. arcanum* 2157. Se observa que de las  
 914 plantas putativamente silenciadas, solo una presenta incremento en la carga bacteriana (*S.*  
 915 *arcanum* 2). Las plantas no bombardeadas muestran una baja carga bacteriana similar a la

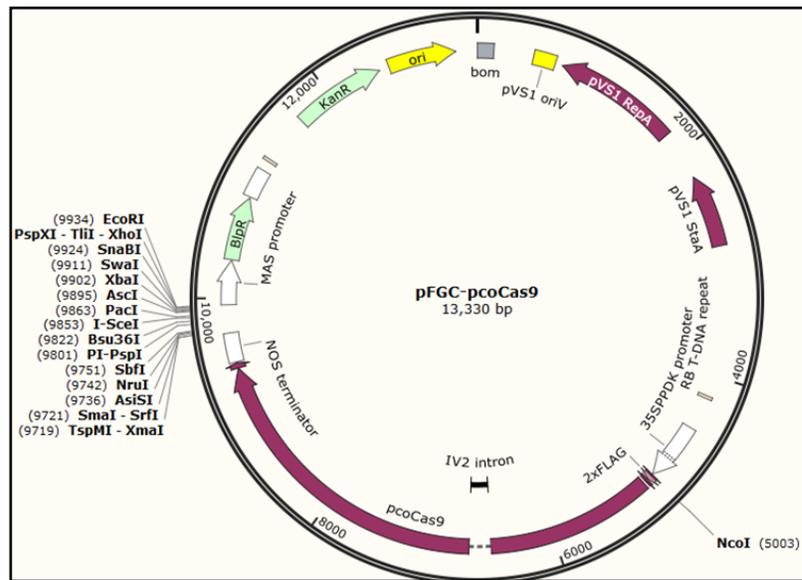
916 carga bacteriana en la planta no bombardeada y a la bombardeada con el vector ToMoV  
 917 vacío. La planta susceptible (*Solanum lycopersicum*) es la que muestra la mayor carga  
 918 bacteriana. B) Expresión relativa del gen *PBC1* en *S. arcanum* 2157. En el gráfico se puede  
 919 observar que la expresión del gen *PBC1* no disminuyó en plantas 2157, a excepción de una  
 920 muestra (*S. arcanum* 2) donde la expresión del gen disminuyó pero no significativamente,  
 921 en otras plantas como *S. arcanum* 1 y *S. arcanum* 3 la expresión del gen se observa un  
 922 aumento en la expresión comparada con el control.  
 923

924 A)



925

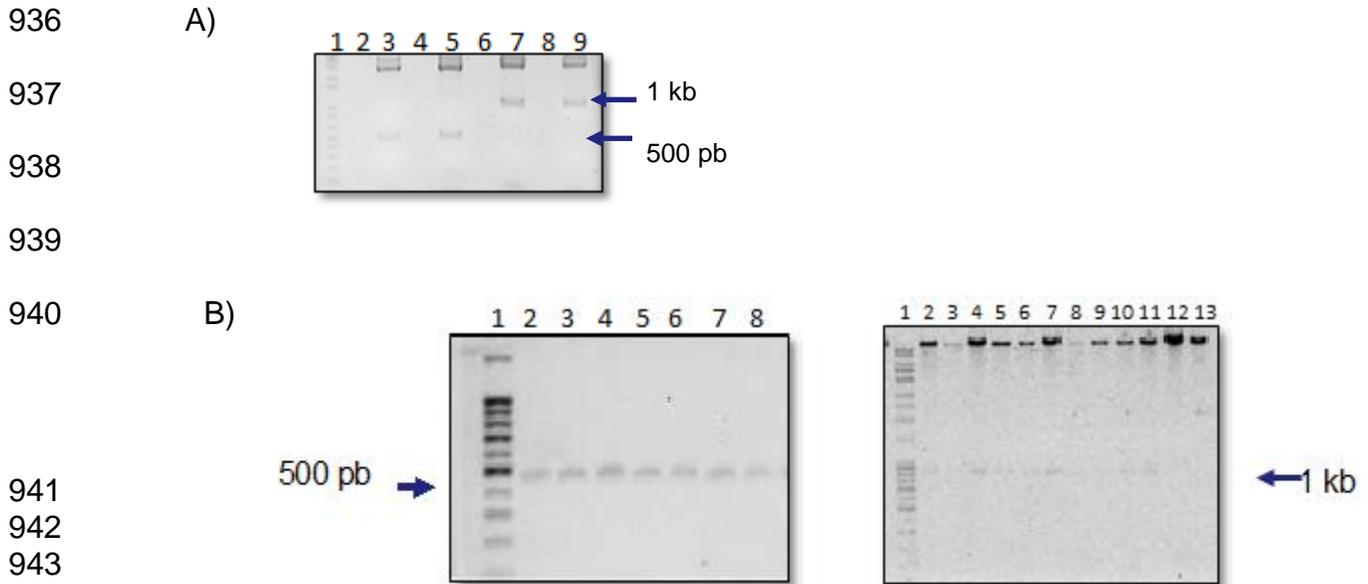
926 B)



927

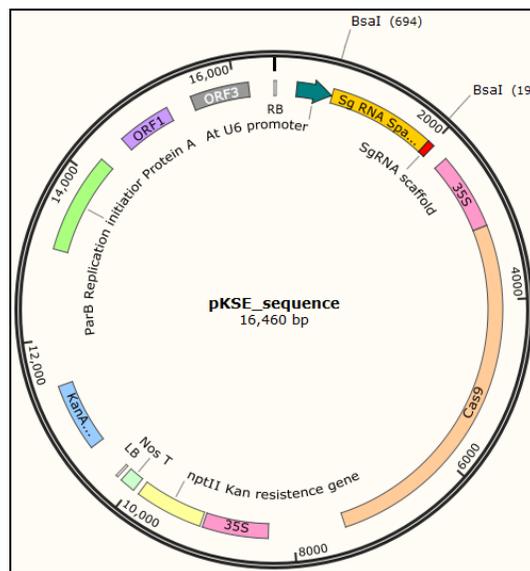
928

929 **Figura 9. Esquema de secuencias guía y del vector CRISPR/Cas9.** A)  
 930 Componentes de las guías diseñadas para el silenciamiento. Una sola guía, es decir que  
 931 generará un solo corte en el gen *PBC1* y con dos guías, es decir que generará dos cortes  
 932 en el gen *PBC1*. B) Vector de pFGC-pcoCas9. El vector cuenta con el gen para la nucleasa  
 933 Cas9 optimizado para plantas, un sitio de clonación múltiple, bordes izquierdo y derecho  
 934 para agro-infiltración y el gen de resistencia a kanamicina.  
 935



945 **Figura 10. Digestiones para construcción de la guía.** A) Construcciones en  
 946 pUC 57. Se observa la banda de 500 pb aproximadamente para la construcción de una guía  
 947 para el gen *PBC1* (carril 3) y de una guía para Quelatasa (carril 5) y de 1 kb para la  
 948 construcción de dos guías. B) Digestión del vector Cas9 con la inserción de las secuencias  
 949 guía. Para la construcción de una guía se espera una banda de 500 pb y para la  
 950 construcción de dos guías se espera una banda de 1 kb. MPM 1Kb plus.

951 A)

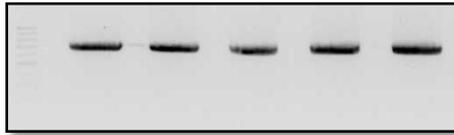


952

953 **Figura 11. Vector pHSE401\_CRISPR.** El vector contiene al gen de la nucleasa  
 954 Cas9 optimizado para plantas, el promotor U6, una secuencia flanqueada por la enzima  
 955 *Bsa I*, denominado “space holder”, donde se insertará la secuencia guía. El vector tiene  
 956 borde derecho e izquierdo para agroinfiltración y gen de resistencia a kanamicina.  
 957



981

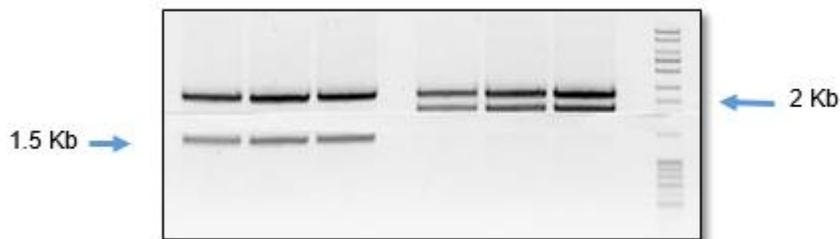


982

983 **Figura 14. Producto de PCR de amplificación de guías.** Se observa la banda  
 984 de 700 pb correspondiente a las guías con su promotor y scaffold, estos fragmentos tienen  
 985 en los extremos los sitios de corte especificados en la Tabla 4. Las bandas son de izquierda  
 986 a derecha guía 1 *PBC1*, guía 2 *PBC1*, guía 3 *PBC1*, guía 1 Quelatasa, guía 2 Quelatasa.  
 987

988

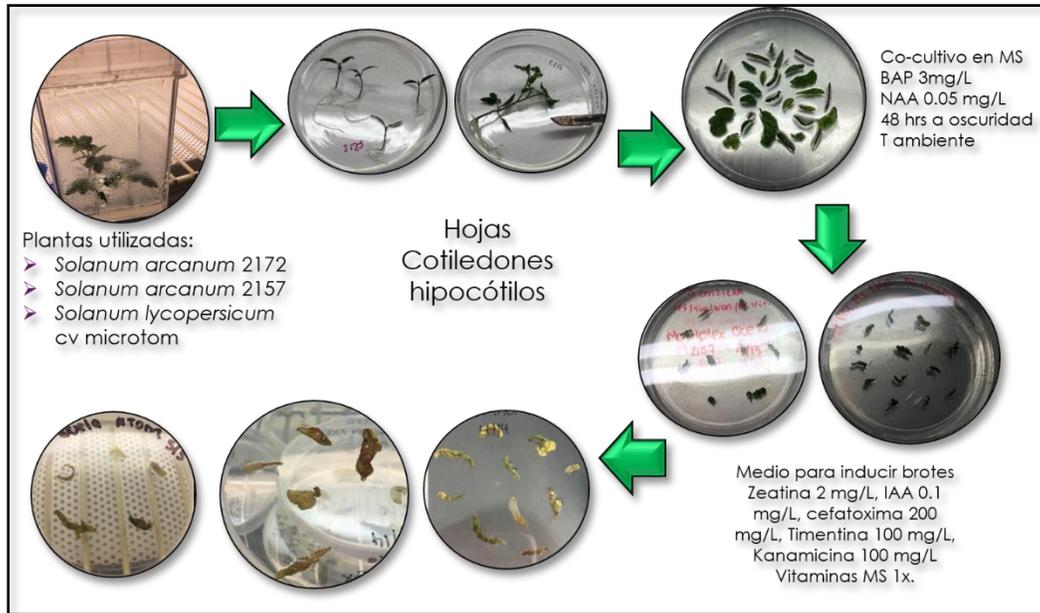
989



990

991 **Figura 15. Digestión del vector que contiene las guías multiplex.** Se  
 992 observa banda de 1.4 Kb para dos guías y de 2 Kb para 3 guías, la construcción de dos  
 993 guías es para el multiplex de quelatasa y la construcción de tres guías es para el multiplex  
 994 para el gen *PBC1*.  
 995

996



997

998  
 999  
 1000  
 1001  
 1002

**Figura 16. Proceso de transformación de plantas.** En la figura se observa las especies de plantas de tomate que se utilizaron, los tejidos que se utilizaron, así como las condiciones del medio para co-cultivo y para crecimiento de explantes, la imagen final muestra la formación de algunos callos de los explantes con los que se contaba.

1003

**Bibliografía**

- 1004 Arendt, C.S. and Hochstrasser, M. 1997. Identification of the yeast 20S proteasome  
1005 catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation.  
1006 Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 7156–7161.
- 1007 Balaji, V. Mayrose, M. Sherf, O. Jacob-Hirsch, J. Eichenlaub, R. Iraki, N. Manulis-  
1008 Sasson, S. Rechavi, G. Barash, I. and Sessa, G. 2008. Tomato  
1009 Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp.  
1010 *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene in Disease Development. PLANT  
1011 Physiol. 146, 1797–1809. doi:10.1104/pp.107.115188
- 1012 Belhaj, K. Chaparro-Garcia, A. Kamoun, S. Patron, N.J. and Nekrasov, V. 2015.  
1013 Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. Curr. Opin. Biotechnol. 32, 76–  
1014 84. doi:10.1016/j.copbio.2014.11.007
- 1015 Brooks, C. Nekrasov, V. Lippman, Z.B. and Van Eck, J. 2014. Efficient Gene Editing  
1016 in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly  
1017 Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System.  
1018 PLANT Physiol. 166, 1292–1297. doi:10.1104/pp.114.247577
- 1019 CRISPR PLANT, A portal of CRISPR/Cas9 mediated Genome editing, 2016,  
1020 <http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>
- 1021 Dorokhov, Y.L. 2007. Gene silencing in plants. Mol. Biol. 41, 519–530.  
1022 doi:10.1134/S0026893307040012
- 1023 Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering  
1024 with CRISPR-Cas9. Science 346, 1258096–1258096.  
1025 doi:10.1126/science.1258096
- 1026 Dreier, J. Meletzus, D. and Eichenlaub, R. 1997. Characterization of the plasmid  
1027 encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter*  
1028 *michiganensis* subsp. *michiganensis*. Mol. Plant. Microbe Interact. 10, 195–  
1029 206.
- 1030 Esparza-Araiza, M.J. Bañuelos-Hernández, B. Argüello-Astorga, G.R. Lara-Ávila,  
1031 J.P. Goodwin, P.H. Isordia-Jasso, M.I. Castillo-Collazo, R. Rougon-Cardoso,  
1032 and A. Alpuche-Solís, Á.G. 2015. Evaluation of a SUMO E2 Conjugating  
1033 Enzyme Involved in Resistance to *Clavibacter michiganensis* Subsp.  
1034 *michiganensis* in *Solanum peruvianum*, Through a Tomato Mottle Virus VIGS  
1035 Assay. Front. Plant Sci. 6. doi:10.3389/fpls.2015.01019
- 1036 Fu, H. Doelling, J.H. Arendt, C.S. Hochstrasser, and M. Vierstra, R.D. 1998.  
1037 Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis*  
1038 *thaliana*. Genetics 149, 677–692.
- 1039 Gao, J. Wang, G. Ma, S. Xie, X. Wu, X. Zhang, X. Wu, Y. Zhao, P. and Xia, Q. 2015.  
1040 CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. Plant  
1041 Mol. Biol. 87, 99–110. doi:10.1007/s11103-014-0263-0
- 1042 Green, M. J. and D. A. Thompson. 1999. Easy and efficient DNA extraction from  
1043 woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction.  
1044 Plant Disease 83:482-485.  
1045

- 1046 Han, J.-J. Lin, W. Oda, Y. Cui, K.-M. Fukuda, H. He, and X.-Q. 2012. The  
 1047 proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem  
 1048 development: *Proteasome for caspase-3-like activity in xylem cells*. Plant J.  
 1049 72, 129–141. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05070.x
- 1050 Hanley-Bowdoin, L. Settlage, S.B. Orozco, B.M. Nagar, S. and Robertson, D. 1999a.  
 1051 Geminiviruses: Models for Plant DNA Replication, Transcription, and Cell  
 1052 Cycle Regulation. Crit. Rev. Plant Sci. 18, 71–106.  
 1053 doi:10.1080/07352689991309162
- 1054 Hanley-Bowdoin, L. Settlage, S.B. Orozco, B.M. Nagar, S. and Robertson, D. 1999b.  
 1055 Geminiviruses: Models for Plant DNA Replication, Transcription, and Cell  
 1056 Cycle Regulation. Crit. Rev. Plant Sci. 18, 71–106.  
 1057 doi:10.1080/07352689991309162
- 1058 Hyun, Y. Kim, J. Cho, S.W. Choi, Y. Kim, J.-S. and Coupland, G. 2015. Site-directed  
 1059 mutagenesis in Arabidopsis thaliana using dividing tissue-targeted RGEN of  
 1060 the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. Planta 241, 271–  
 1061 284. doi:10.1007/s00425-014-2180-5
- 1062 Jahr, H. Dreier, J. Meletzus, D. Bahro, R. and Eichenlaub, R. 2000. The endo- $\beta$ -1,  
 1063 4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a  
 1064 pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato.  
 1065 Mol. Plant. Microbe Interact. 13, 703–714.
- 1066 Jiang, W. Yang, B. and Weeks, D.P. 2014. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene  
 1067 Editing in Arabidopsis thaliana and Inheritance of Modified Genes in the T2  
 1068 and T3 Generations. PLoS ONE 9, e99225.  
 1069 doi:10.1371/journal.pone.0099225
- 1070 Jinek, M. Jiang, F. Taylor, D.W. Sternberg, S.H. Kaya, E. Ma, E. Anders, C. Hauer,  
 1071 M. Zhou, K. Lin, and S. others, 2014. Structures of Cas9 endonucleases  
 1072 reveal RNA-mediated conformational activation. Science 343, 1247997.
- 1073 Kovács, J. Poór, P. Kaschani, F. Chandrasekar, B. Hong, T.N. Misas-Villamil, J.C.  
 1074 Xin, B.T. Kaiser, M. Overkleeft, H.S. Tari, I. and van der Hoorn, R.A.L. 2017a.  
 1075 Proteasome Activity Profiling Uncovers Alteration of Catalytic  $\beta$ 2 and  $\beta$ 5  
 1076 Subunits of the Stress-Induced Proteasome during Salinity Stress in Tomato  
 1077 Roots. Front. Plant Sci. 8. doi:10.3389/fpls.2017.00107
- 1078 Kovács, J. Poór, P. Kaschani, F. Chandrasekar, B. Hong, T.N. Misas-Villamil, J.C.  
 1079 Xin, B.T. Kaiser, M. Overkleeft, H.S. Tari, I. and van der Hoorn, R.A.L. 2017b.  
 1080 Proteasome Activity Profiling Uncovers Alteration of Catalytic  $\beta$ 2 and  $\beta$ 5  
 1081 Subunits of the Stress-Induced Proteasome during Salinity Stress in Tomato  
 1082 Roots. Front. Plant Sci. 8. doi:10.3389/fpls.2017.00107
- 1083 Kumagai, M.H. Donson, J. Della-Cioppa, G. Harvey, D. Hanley, K. and Grill, L.K.  
 1084 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived  
 1085 RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 1679–1683.
- 1086 Kurepa, J. Wang, S. Li, Y. and Smalle, J. 2009. Proteasome regulation, plant growth  
 1087 and stress tolerance. Plant Signal. Behav. 4, 924–927.
- 1088 La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Fao)  
 1089 2017, www.fao.org
- 1090 Lara-Ávila, J.P. Isordia-Jasso, M.I. Castillo-Collazo, R. Simpson, J. and Alpuche-  
 1091 Solís, Á.G. 2012. Gene Expression Analysis during Interaction of Tomato and

- 1092 Related Wild Species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.  
 1093 Plant Mol. Biol. Report. 30, 498–511. doi:10.1007/s11105-011-0348-8
- 1094 Makarova, K.S. Grishin, N.V. Shabalina, S.A. Wolf, Y.I. and Koonin, E.V. 2006. A  
 1095 putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes:  
 1096 computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional  
 1097 analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol.  
 1098 Direct 1, 1.
- 1099 Meister, G. and Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded  
 1100 RNA. Nature 431, 343–349.
- 1101 Mercx, S. Tollet, J. Magy, B. Navarre, C. and Boutry, M. 2016a. Gene Inactivation  
 1102 by CRISPR-Cas9 in *Nicotiana tabacum* BY-2 Suspension Cells. Front. Plant  
 1103 Sci. 7. doi:10.3389/fpls.2016.00040
- 1104 Mercx, S. Tollet, J. Magy, B. Navarre, C. and Boutry, M. 2016b. Gene Inactivation  
 1105 by CRISPR-Cas9 in *Nicotiana tabacum* BY-2 Suspension Cells. Front. Plant  
 1106 Sci. 7. doi:10.3389/fpls.2016.00040
- 1107 Mojica, F.J.M. Dáez-Villaseñor, C. García-Martínez, J. and Soria, E. 2005.  
 1108 Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from  
 1109 Foreign Genetic Elements. J. Mol. Evol. 60, 174–182. doi:10.1007/s00239-  
 1110 004-0046-3
- 1111 Monreal-Vargas, C.T. 2005. Desarrollo de Métodos de Diagnóstico Molecular de  
 1112 Enfermedades Virales, Bacterianas y Fúngicas en Hortalizas. Tesis de  
 1113 maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
- 1114 Pan, C. Ye, L. Qin, L. Liu, X. He, Y. Wang, J. Chen, L. and Lu, G. 2016.  
 1115 CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in  
 1116 tomato plants in the first and later generations. Sci. Rep. 6, 24765.  
 1117 doi:10.1038/srep24765
- 1118 Pattanayak, D. Solanke, A.U. and Kumar, P.A. 2013. Plant RNA Interference  
 1119 Pathways: Diversity in Function, Similarity in Action. Plant Mol. Biol. Report.  
 1120 31, 493–506. doi:10.1007/s11105-012-0520-9
- 1121 Peele, C. Jordan, C.V. Muangsan, N. Turnage, M. Egelkrout, E. Eagle, P. Hanley-  
 1122 Bowdoin, L. and Robertson, D. 2001. Silencing of a meristematic gene using  
 1123 geminivirus-derived vectors. Plant J. 27, 357–366.
- 1124 Rocha-Sosa, M. 2013. El sistema ubiquitina/proteasoma en la interacción planta-  
 1125 patógeno. TIP 16, 121–131.
- 1126 Schaeffer, S.M. and Nakata, P.A. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing  
 1127 and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. Plant Sci. 240,  
 1128 130–142. doi:10.1016/j.plantsci.2015.09.011
- 1129 Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Löwe, J., Huber, R., and Baumeister, W., 1995.  
 1130 Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. Sci.-N.  
 1131 Y. THEN Wash.- 579–579.
- 1132 Sharma, P.C. Ito, A. Shimizu, T. Terauchi, R. Kamoun, S. and Saitoh, H. 2003. Virus-  
 1133 induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial  
 1134 pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response  
 1135 (HR) in *Nicotiana benthamiana*. Mol. Genet. Genomics 269, 583–591.  
 1136 doi:10.1007/s00438-003-0872-9
- 1137 Suty, L. Lequeu, J. Lançon, A. Etienne, P. Petitot, A.-S. and Blein, J.-P. 2003a.  
 1138 Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant

- 1139 defense reactions: towards the characterization of “plant defense  
1140 proteasomes.” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 637–650. doi:10.1016/S1357-  
1141 2725(02)00386-2
- 1142 Suty, L. Lequeu, J. Lançon, A. Etienne, P. Petitot, A.-S. and Blein, J.-P. 2003b.  
1143 Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant  
1144 defense reactions: towards the characterization of “plant defense  
1145 proteasomes.” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 637–650. doi:10.1016/S1357-  
1146 2725(02)00386-2
- 1147 Tang, W. and Tang, A.Y. 2016. Applications and roles of the CRISPR system in  
1148 genome editing of plants. *J. For. Res.* doi:10.1007/s11676-016-0281-7
- 1149 Tuttle, J.R. Idris, A.M. Brown, J.K. Haigler, C.H. and Robertson, D. 2008.  
1150 Geminivirus-Mediated Gene Silencing from Cotton Leaf Crumple Virus Is  
1151 Enhanced by Low Temperature in Cotton. *PLANT Physiol.* 148, 41–50.  
1152 doi:10.1104/pp.108.123869
- 1153 Tefor, CRISPOR, 2016, <http://crispor.tefor.net/>
- 1154 Univ. Florida, Gulf Coast res. education cent. USA, E, P.J. E, H. J, M.R. A, S.P. and  
1155 J, S.D. 1993. Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting  
1156 tomato in Florida. *Plant Dis.* 77, 1181–1184.
- 1157 Van Heusden, A.W. Koornneef, M. Voorrips, R.E. Brüggemann, W. Pet, G. Vrieling-  
1158 van Ginkel, R. Chen, and X. Lindhout, P. 1999. Three QTLs from  
1159 *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to  
1160 *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor. Appl. Genet.* 99, 1068–  
1161 1074.
- 1162 Vanamee, É.S. Santagata, S. and Aggarwal, A.K. 2001. FokI requires two specific  
1163 DNA sites for cleavage. *J. Mol. Biol.* 309, 69–78. doi:10.1006/jmbi.2001.4635
- 1164 Vierstra, R. 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter  
1165 in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* 8, 135–142.  
1166 doi:10.1016/S1360-1385(03)00014-1
- 1167 Villanueva-Alonzo, H.J. Us-Camas, R.Y. López-Ochoa, L.A. Robertson, D. Guerra-  
1168 Peraza, O. Minero-García, Y. and Moreno-Valenzuela, O.A. 2013. A new  
1169 virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-  
1170 Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and  
1171 *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnol. Lett.* 35, 811–823.  
1172 doi:10.1007/s10529-013-1146-1
- 1173 Wang, S. Zhang, S. Wang, W. Xiong, X. Meng, F. and Cui, X. 2015. Efficient targeted  
1174 mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep.* 34,  
1175 1473–1476. doi:10.1007/s00299-015-1816-7
- 1176 Woo, J.W. Kim, J. Kwon, S.I. Corvalán, C. Cho, S.W. Kim, H. Kim, S.-G. Kim, S.-T.  
1177 Choe, S. and Kim, J.-S. 2015. DNA-free genome editing in plants with  
1178 preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33, 1162–  
1179 1164. doi:10.1038/nbt.3389
- 1180
- 1181