

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Silenciamiento mediante un vector viral del gen que codifica
para una endoquitinasa de 30 kDa en *Solanum spp.*, para
evaluar su papel en la tolerancia al chancro bacteriano del
tomate.**

Tesis que presenta

Leonardo Isaac Pereyra Bistráin

Para obtener el grado de

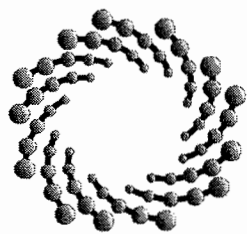
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dra. Dulce Alejandra Rougon Cardoso

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2016



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Silenciamiento mediante un vector viral del gen que codifica para una endoquitinasa de 30 kDa en Solanum spp., para evaluar su papel en la tolerancia al chancro bacteriano del tomate”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Leonardo Isaac Pereyra Bistraín** y aprobada el catorce de julio del dos mil dieciséis 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
Codirector de la tesis

Dra. Dulce Alejandra Rougon Cardoso
Codirectora de la tesis

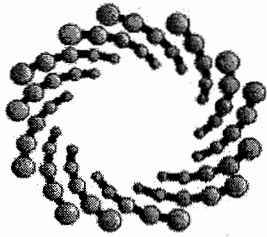
Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 386185) y el apoyo de los proyectos Control del cáncer bacteriano de Fundación Produce SLP, del Fordecyt-CONACYT No. 2012-02-193512 y FOMIX FMSLP-2013-C01-209337.



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 155 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 14 días del mes de julio del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores

Presidente

IPICYT

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Secretario

IPICYT

Dra. Dulce Alejandra Rougon Cardoso

Sinodal externo

UNAM

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Leonardo Isaac Pereyra Bistraín

sobre la Tesis intitulada:

*Silenciamiento mediante un vector viral del gen que codifica para una endoquitinasa de 30 kDa en *Solanum spp.*, para evaluar su papel en la tolerancia al chancro bacteriano del tomate*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dra. Dulce Alejandra Rougon Cardoso (UNAM)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:22 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes de julio de 2016.


Dr. Marcial Borilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Posgrado



Dedicatorias

A mis padres Gabriela y Lorenzo, por siempre creer en mí y apoyar mis decisiones. A mi hermana y mi sobrino Jared.

A mi pequeño Said, siempre me impulsas a seguir adelante.

A Mis amigos de toda la vida. A las personas que se volvieron parte importante de mi vida en esta etapa, especialmente Cintia.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca para estudios de posgrado.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por su confianza, su apoyo y consejos para realizar este trabajo.

A la Dra. Alejandra Rougon Cardoso y el Dr. J. Sergio Casas Flores y al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por sus siempre enriquecedores comentarios.

A todos mis compañeros del laboratorio 1. En especial a la Dra. Mayra J. Esparza Araiza, por contribuir en realizar este trabajo.

A los técnicos: Q.F.B Rosalba Castillo y Biol. Salvador Ambriz por su apoyo en nuestro grupo.

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

Contenido

| | |
|---|------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos institucionales | iii |
| Acta de examen | iv |
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| Lista de tablas | ix |
| Lista de figuras | x |
| Anexos | xi |
| Resumen | xii |
| Abstract | xiii |
| | |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Resultados | 5 |
| 2.1 Evaluación de la virulencia de la cepa de <i>Cmm</i> 1387 en cuatro especies silvestres de tomate y en la variedad comercial <i>S. lycopersicum</i> | 5 |
| 2.2 Expresión relativa del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en <i>S. arcanum</i> LA2157 | 6 |
| 2.3 Construcción del vector silenciamiento ToMoV_ <i>Ech</i> | 7 |
| 2.4 Análisis del silenciamiento del gen de la endoquitinasa de 30kDa con ToMoV_ <i>Ech</i> en <i>S. habrochaites</i> LA2128 y <i>S. arcanum</i> LA2172 | 8 |
| 2.4.1 Inoculación del vector de silenciamiento en <i>S. habrochaites</i> LA2128 y <i>S. arcanum</i> LA2172 | 8 |
| 2.4.2 Determinación del nivel de expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en plantas inoculadas con ToMoV_ <i>Ech</i> | 9 |
| 2.4.3 Seguimiento de síntomas después del Reto con <i>Cmm</i> 1387 en plantas inoculadas con ToMoV_ <i>Ech</i> | 9 |
| 2.4.4 Replicación viral en las plantas inoculadas | 10 |
| 3. Discusión | 11 |
| 4. Materiales y Métodos | 17 |
| 4.1 Material biológico | 17 |
| 4.2 Crecimiento, infección e inoculación de plantas | 18 |
| 4.3 Diseño de oligos y clonación del fragmento en el vector de silenciamiento ToMoV Δ CP | 19 |
| 4.4 Bombardeo de plantas mediante biobalística | 21 |
| 4.5 Obtención de ARN y síntesis de ADNc | 22 |
| 4.6 Cuantificación de la expresión del gen de la endoquitinasa por PCR en tiempo real | 23 |
| 4.7 Verificación de la replicación viral en plantas bombardeadas | 24 |
| 5. Referencias | 25 |

| | |
|---------------------------|----|
| 6. Páginas web utilizadas | 29 |
| 7. Tablas | 30 |
| 8. Figuras | 31 |
| 9. Anexos | 43 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| 1. Características de los vectores tipo VIGS para la inoculación de plantas de <i>S. habrochaites</i> LA2128 y <i>S. arcanum</i> LA2172 | 30 |
|---|----|

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| 1. Marchitamiento lateral de hojas en distintas especies de tomate después de la infección con <i>Cmm</i> 1387 | 31 |
| 2. Lesión al tallo en distintas especies de tomate después de la infección con <i>Cmm</i> 1387 | 32 |
| 3. Progresión de la infección con <i>Cmm</i> 1387 en distintas especies de tomate 40 dpi | 33 |
| 4. Expresión diferencial del gen de la endoquitinasa de 30 kDa por RT-qPCR en <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. arcanum</i> LA2157 8h después del reto con <i>Cmm</i> 1387 | 34 |
| 5. Construcción del vector ToMoV_ <i>Ech</i> | 36 |
| 6. Seguimiento del blanqueamiento en plantas inoculadas con el vector ToMoV_ <i>ChII</i> | 37 |
| 7. Nivel de expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en <i>S. habrochaites</i> LA2128 y <i>S. arcanum</i> LA2172, 40 días post-inoculación con el vector de silenciamiento ToMoV_ <i>Ech</i> | 38 |
| 8. Infección con <i>Cmm</i> 1387 en plantas de <i>S. habrochaites</i> LA2128 en ensayos VIGS | 39 |
| 9. Planta de <i>S. habrochaites</i> LA2128 inoculada con ToMoV_ <i>Ech</i> 60 días después del reto con <i>Cmm</i> 1387 | 40 |
| 10. Infección con <i>Cmm</i> 1387 en plantas de <i>S. arcanum</i> LA2172 en ensayos VIGS | 41 |
| 11. Evaluación de la replicación viral en plantas inoculadas 3 meses después del bombardeo | 42 |

Anexos

| | |
|--|----|
| 1. Detección de los plásmidos pCM1 y pCM2 en la cepa <i>Cmm</i> 1387. | 43 |
| 2. Integridad de ARN de plantas de <i>S. habrochaites</i> LA2128 y <i>S. arcanum</i> LA2172. | 43 |
| 3. Replicación viral de plantas inoculadas 30 días después del bombardeo. | 44 |

Resumen

Silenciamiento mediante un vector viral del gen que codifica para una endoquitinasa de 30 kDa en *Solanum spp.*, para evaluar su papel en la tolerancia al chancro bacteriano del tomate.

El cáncer bacteriano del tomate es una enfermedad importante a nivel mundial. Es causada por el actinomiceto *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). A la fecha no existe un método de control adecuado de esta enfermedad, ni variedades comerciales resistentes, sin embargo, existen especies silvestres de tomate que toleran la enfermedad, por lo tanto, es importante el entendimiento de la interacción planta-patógeno para el desarrollo de nuevas estrategias de control. Resultados previos obtenidos en nuestro grupo con las especies de tomate silvestres *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172 tolerantes a *Cmm*, mostraron que ocho horas después de la infección con la bacteria, el nivel de expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa incrementó más de dos y cuatro veces respectivamente respecto a *S. lycopersicum*. Para demostrar si este gen tiene un papel importante en la defensa al cáncer bacteriano, es importante realizar el análisis funcional del gen de la endoquitinasa de 30 kDa.

Nuestro objetivo fue evaluar el papel de la endoquitinasa de tomate, en la defensa a la infección por *Cmm*, mediante el sistema de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), con el vector de silenciamiento desarrollado en nuestro grupo a partir del geminivirus ToMoV. Obtuvimos una planta de *S. habrochaites* con este gen silenciado aproximadamente en un 60% y mostró un fenotipo con un mayor daño comparado con las plantas control 60 días después de la infección con la cepa *Cmm* 1387, estos resultados sugieren que el silenciamiento de la endoquitinasa de 30 kDa podría afectar la tolerancia de las plantas silvestres de tomate. El siguiente paso es optimizar nuestro sistema de silenciamiento para incrementar la reproducibilidad del método y validar nuestros resultados.

Adicionalmente, obtuvimos resultados que sugieren una interacción cepa-específica entre las plantas de tomate y diferentes cepas de *Cmm*, lo que podría modificar los patrones de tolerancia de las plantas silvestres de tomate.

PALABRAS CLAVE. *Cmm*, endoquitinasa, silenciamiento, tolerancia, VIGS

Abstract

Gene silencing through a viral vector of the gene that encodes a 30 kDa endochitinase in *Solanum spp.*, to evaluate its role in the tolerance of tomato bacterial canker

Bacterial canker is an important disease of tomato worldwide. This disease is caused by the actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). To date there is neither an efficient method of control of this disease nor resistant varieties, however, there are wild relative species of tomato tolerant to this disease; therefore, it is important to understand of the plant-bacteria interaction for the development of new control strategies.

Previous results obtained in our research group in wild relatives species of tomato *S. arcanum* LA2172 and *S. habrochaites* LA2128 resistant to *Cmm*, showed that eight hours after infection with *Cmm*, levels of gene expression of a 30 kDa endochitinase increases up to fourfold with respect to the susceptible commercial variety (*S. lycopersicum*); in order to demonstrate if this gene plays an important role in the bacterial canker defense it is important to perform the functional analysis of the 30 kDa endochitinase. Therefore, our aim was to evaluate the role of endochitinase in tomato defense against *Cmm* infection, using a virus-induced gene silencing system (VIGS) based on a ToMoV geminivirus vector developed in our group. We obtained a *S. habrochaites* plant silenced in approximately 60 percent in this gene, and it showed an enhanced tissue damaged phenotype in comparison to control plants sixty days after the infection with *Cmm* 1387 strain. These data suggest that the gene silencing of the 30 kDa endochitinase gene could be affecting the tolerance of tomato wild species. The next step will be to optimize our silencing system in order to increase the method reproducibility and validate our results.

Additionally, we found a possible strain-specific interaction between tomato plants and *Cmm* strains that may modify the tolerance patters of tomato in wild species

KEY WORDS. *Cmm*, endochitinase, silencing, tolerance, VIGS.

1. Introducción

Desde que el hombre inició el proceso de domesticación de las plantas, ha seleccionado características deseables como el incremento en el rendimiento de los cultivos, la obtención de frutos con mayor tamaño, uniformidad de la maduración, etc. Sin embargo, este proceso de selección artificial también ha contribuido a la pérdida de características importantes como la tolerancia a los patógenos (Bhupendra 2013). Muchos cultivos agrícolas en el proceso de domesticación han perdido algunas características que tenían sus ancestros, entre ellos el tomate (*Solanum lycopersicum*), y ahora las variedades comerciales no son capaces de responder adecuadamente al ataque de algunos microorganismos patógenos, generando la enfermedad, que repercute en pérdidas económicas importantes.

El tomate es la hortaliza más consumida en el mundo después de la papa. Tan solo en 2013 la producción mundial de este fruto fue de 163, 434, 041 toneladas (FAO, 2013). El cáncer o chancro bacteriano causado por el actinomiceto *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) se considera la enfermedad bacteriana más devastadora del tomate (Mansfield et al. 2012). Esta enfermedad se describió hace un poco más de 100 años en Estados Unidos de América (EUA) (Smith 1910), sin embargo, actualmente se le puede encontrar en casi cualquier región productora de tomate del mundo. Las pérdidas económicas que causa son considerables y México no es la excepción; la pérdida más importante que se registró fue en 2006, con una pérdida de 200 hectáreas de cultivos protegidos, equivalentes a una cifra de 40 millones de dólares (Borboa et al. 2006).

La forma más común de propagar esta enfermedad es a través de semillas contaminadas y plantas jóvenes infectadas (Strider 1969); *Cmm* puede ingresar a

la planta mediante heridas y entradas naturales como estomas, hidátodos y tricomas (Kontaxis 1962). Además, esta bacteria es capaz de sobrevivir en el suelo por más de 2 años lo cual puede ser un foco de infección para la siguiente cosecha (Fatmi y Schaad 2002). Los síntomas característicos de esta enfermedad son el marchitamiento unilateral de las hojas, heridas en el tallo conocidas como chancro y la formación de lesiones conocidas como ojo de pájaro en los frutos de plantas adultas (Gleason et al. 1993).

Hasta ahora, no se ha logrado comprender totalmente el mecanismo de infección de *Cmm*. Hay reportes de dos plásmidos, pCM1 y pCM2 cuya carencia compromete la virulencia de la bacteria (Meletzus et al. 1993). Se demostró que en estos plásmidos hay genes asociados a la virulencia, el gen *ce/A* presente en el plásmido pCM1 que codifica una β -1,4 endoglucanasa (Jahr et al. 2000) y el gen *pat-1* del plásmido pCM2 que codifica una serín proteasa (Dreier et al. 1997). Además, en el cromosoma de la bacteria se ha determinado una región de aproximadamente 129 Kilobases (Kb) que está flanqueada por los genes *chp* y *tomA* conocida como isla de patogenicidad, ya que cepas mutantes carentes de esta región son incapaces de colonizar la planta efectivamente (Gartemann et al. 2008). Con base en lo anterior, las distintas cepas de *Cmm*, pueden ser clasificadas como muy virulentas, poco virulentas y no virulentas (Alvarez et al. 2004).

Desafortunadamente no se ha desarrollado un método de control efectivo contra el cáncer bacteriano y la mayoría de los que existen son preventivos. Entre los métodos de control correctivos se usa el químico, en el que por lo general se utilizan distintos compuestos cúpricos y antibióticos (De Leon et al. 2008), pero puede generar resistencias y contaminar el manto freático. Por otro lado, el control sanitario

es otra estrategia preventiva que consiste en adoptar medidas de higiene adecuadas, como la desinfección de las herramientas, el material, las zonas de cultivo y el cuidado de las manos, ropa y calzado de los trabajadores (GSPP 2016; FAO 2016). También hay reportes de organismos benéficos que pueden usarse como estrategias de control preventivo pero no se ha usado ampliamente, por ejemplo, el tratamiento de cultivos de tomate con la bacteria *Bacillus subtilis* reduce la incidencia de chancro bacteriano en condiciones de invernadero (Utkhede y Koch 2004).

Existen especies de tomate silvestres que tienen diferente nivel de tolerancia a *Cmm*. *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites* y *S. arcanum* son algunas de las especies en las que se ha demostrado tolerancia a esta enfermedad, siendo *S. arcanum* LA2157 la descrita como la más tolerante (Van Heusden et al. 1999). En *S. arcanum* LA2157 y *S. habrochaites* LA407 se han encontrado loci de carácter cuantitativo (QTLs, por sus siglas en inglés) asociados a dicha tolerancia (Thyr 1976; Van Heusden et al. 1999; Francis et al 2001; Kabelka et al. 2002). Por ello estas especies representan una oportunidad para identificar elementos potencialmente relacionados con la resistencia a *Cmm*, los cuales podrían ser aprovechados para generar plantas de *S. lycopersicum* comerciales capaces de tolerar esta enfermedad.

En nuestro grupo de investigación se realizó un análisis transcriptómico por polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados de ADN complementario (cDNA-AFLP, por sus siglas en inglés), en las especies silvestres tolerantes a *Cmm*: *S. arcanum* LA2172 y *S. habrochaites* LA2128 y al compararlas con los perfiles de expresión génica del tomate comercial (*S. lycopersicum*) 8 h después del reto con

Cmm, se encontraron 403 genes expresados diferencialmente, entre ellos, la sobreexpresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa, en el cual 8 horas después de la infección con *Cmm* aumentó su expresión más de dos y cuatro veces en *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172 respectivamente (Lara-Ávila et al. 2011). Existen trabajos en los que se probó la importancia de las quitinasas en infecciones causadas por hongos, sin embargo, se sabe poco sobre su participación en la defensa contra bacterias. Se ha sugerido que podrían tener un papel protector a partir de que las quitinasas liberan los oligosacáridos unidos a N-glicoproteínas del apoplasto y de la pared celular, los cuales pueden ser reconocidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) y en consecuencia estimular el sistema de defensa de las plantas (Benhamou y Asselin 1989; Shibuya y Minami 2001; Casarrubias-Castillo et al. 2014).

Baysal et al. (2003), determinaron que al tratar plantas de *S. lycopersicum* con el inductor de la defensa BTH (benzotiadiazol), aumenta la tolerancia a *Cmm* y dicho aumento está asociado con una mayor actividad enzimática de quitinasas. En otro trabajo se reportó la inducción del gen de la endoquitinasa de 26 kDa en plantas de *S. lycopersicum*, pero hasta 8 días después de la infección con *Cmm* (Balaji et al. 2008), lo cual indica que estos genes sí se expresan pero probablemente lo hacen de forma tardía, a diferencia de lo que ocurre en otras especies de tomate silvestre. En otro trabajo, al tratar plantas de amaranto (*Amaranthus cruentus*) con *Pseudomonas syringae* (inductor de la defensa), las plantas adquieren tolerancia a la infección con *Cmm*, lo cual parece estar asociado a un aumento en la actividad enzimática de las quitinasas (Casarrubias-Castillo et al. 2014). Estos resultados

indican que probablemente la endoquitinasa de 30 kDa podría tener un papel importante en la tolerancia al chancro de tomate.

Anteriormente, en nuestro grupo se diseñó un sistema de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) a partir del virus moteado del tomate (ToMoV). Este es un geminivirus de ADN bipartita en el cual el componente A contiene una deleción en una porción del gen que codifica para la proteína de la cápside (CP), con un sitio múltiple de clonación, en el que es posible insertar fragmentos de genes que se pretenden silenciar (Esparza-Araiza et al. 2015).

En este trabajo se realizó el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en las especies de tomate silvestres *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172 para determinar su posible papel en la tolerancia a *Cmm*.

2. Resultados

2.1 Evaluación de la virulencia de la cepa de *Cmm* 1387 en cuatro especies silvestres de tomate y en la variedad comercial *S. lycopersicum*

En este trabajo se usó la cepa de *Cmm* 1387, a la cual se le verificó la presencia de los plásmidos pCM1 y pCM2 (Anexo 1). Se evaluó la virulencia de la cepa, así como la tolerancia y/o susceptibilidad de las especies de tomate silvestres adquiridas de la Universidad de California en Davis: *S. lycopersicum* cv IRAT L3, *S. habrochaites* LA2128, *S. arcanum* LA2172, *S. arcanum* LA2157 y la variedad comercial susceptible *S. lycopersicum* adquirida de la Universidad de Nottingham.

Las cinco especies de tomate mostraron síntomas de la enfermedad aproximadamente 15 días post-infección (dpi). A partir de este tiempo en cada

especie la enfermedad evolucionó de forma diferente. Cerca de 25 dpi las plantas mostraron las lesiones características, como el marchitamiento unilateral de las hojas y chancro en el tallo (Figuras 1 y 2). Las especies que mostraron mayor marchitamiento de las hojas en orden decreciente fueron, *S. lycopersicum* cv IRAT L3, *S. lycopersicum* y *S. arcanum* LA2172 (Figura 1 D, H y P), mientras que en *S. arcanum* LA2157 y *S. habrochaites* LA2128 se observó menos marchitamiento (Figura 1 L y T). Es importante resaltar que se ha reportado que el cultivar IRAT L3 es una planta tolerante a *Cmm* pero no lo fue en nuestro caso (Ysuf Sen et al. 2013). Todas las especies infectadas desarrollaron chancro en el tallo y de estas la especie *S. habrochaites* LA2128 presentó un fenotipo de menor daño (Figura 2 L).

Aproximadamente 40 dpi las plantas de *S. lycopersicum*, *S. lycopersicum* cv. IRAT L3 y *S. arcanum* LA2172 se marchitaron en su totalidad y murieron (Figura 3 B, D y H). Mientras que las plantas de las especies *S. arcanum* LA2157 y *S. habrochaites* LA2128, mostraron una tolerancia clara cuyo fenotipo era similar al de las plantas no infectadas con la cepa *Cmm* 1387 (Figura 3 F y J).

2.2 Expresión relativa del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en *S. arcanum* LA2157

Con el fin de determinar el nivel de expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en *S. arcanum* LA2157, se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de ARN obtenido previamente en nuestro grupo (Lara-Ávila 2012) 8 h después del reto con *Cmm*. Además plantas de *S. lycopersicum* se retaron con la cepa *Cmm* 1387 y a partir de ellas también se obtuvo ADNc 8h dpi.

Los resultados de PCR en tiempo real (RT-qPCR) mostraron que el gen que codifica para la endoquitinasa de 30kDa en *S. lycopersicum* sugieren que este gen se expresó más de 200 veces en la especie de tomate *S. arcanum* LA2157 (Figura 4).

2.3 Construcción del vector silenciamiento ToMoV_ *Ech*

Para evaluar la función del gen de la endoquitinasa, se generó la construcción del vector de silenciamiento a partir del vector ToMoV Δ CP proporcionado por Esparza-Araiza.

Con la herramienta VIGS Tool (ver sección 4.3 de material y métodos) (Fernandez-Pozo et al. 2015). Se determinó en base a la secuencia de *S. lycopersicum* que la mejor región para el silenciamiento del gen corresponde a los primeros 300 nucleótidos (nt) del gen de la endoquitinasa de 30 kDa. En la Figura 5 A, se presenta la región de 300 nt del gen de la endoquitinasa de 30 kDa, así como los posibles fragmentos generados para el silenciamiento específico (líneas azules) y el silenciamiento inespecífico (líneas rojas). Esta región está conservada en *S. lycopersicum*, *S. peruvianum*, *S. penellii* y *S. pimpinellifolium* (Figura 5B). El fragmento de 186 pares de bases (pb) (del nucleótido 42 al 228), se obtuvo a partir de una muestra de ADNc de *S. arcanum* LA2157 (Figura 5 C). Aunque este producto podría obtenerse de otra especie ya que los oligos que se diseñaron alinean en regiones del gen conservadas en otras especies de tomate (Figura 5 B).

Después de integrar el fragmento de 186 pb del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en el vector de clonación pGEM-T Easy, se verificó la presencia del vector con inserto en una de las clonas de *E. coli* Top 10 F' obtenidas de la transformación por

choque térmico (Figura 5 D y E). Con base a los sitios de restricción añadidos al fragmento del gen de la endoquitinasa (*EcoRI* y *HindIII*), se subclonó en el vector ToMoV Δ CP (Figura 5 F). Mediante digestión y secuenciación se corroboró que una de las clonas incorporó el vector de silenciamiento que contiene el fragmento del gen de la endoquitinasa (Figura 5 G) y el vector obtenido se nombró ToMoV_ *Ech*.

2.4 Análisis del silenciamiento del gen de la endoquitinasa de 30kDa con ToMoV_ *Ech* en *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172

2.4.1 Inoculación del vector de silenciamiento en *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172

Para el ensayo de VIGS, las plantas de tomate de *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172 fueron inoculadas por biobalística con los vectores ToMoV Δ CP (vector vacío), ToMoV_ *ChII* (control, gen de la quelatasa), ToMoV_ *Ech* (gen de la endoquitinasa) y en cada especie se incluyeron 3 réplicas biológicas por condición experimental (Tabla 1). El gen de la quelatasa se usa como control debido a que participa en la biosíntesis de la clorofila y al silenciarse se esperaría un fenotipo de blanqueamiento en las hojas. Dos de las tres plantas control de *S. habrochaites* LA2128 inoculadas con el vector ToMoV_ *ChII* mostraron blanqueamiento 10 días después del bombardeo en algunas zonas de las hojas (fenotipo que permite estimar el silenciamiento en toda la planta) (Figura 6 A), e incrementó de forma gradual hasta propagarse por toda la planta, aproximadamente 40 días después del bombardeo (Figura 6 B y C). Por otro lado, no hubo blanqueamiento de las plantas de *S. arcanum* LA2172 probablemente por un problema técnico en el bombardeo,

es decir, no ocurrió silenciamiento del gen de la quelatasa. Aunque no es lo más recomendable, pero para poder continuar con el ensayo, se tomó como referencia el blanqueamiento de las plantas de *S. habrochaites* LA2128 para infectar al resto de las plantas inoculadas de ambas especies con la cepa de *Cmm* 1387.

2.4.2 Determinación del nivel de expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en plantas inoculadas con ToMoV_Ech

Para evaluar la presencia o ausencia de silenciamiento se realizó la cuantificación relativa del gen de la endoquitinasa de 30 kDa por RT-qPCR. Para ello, se obtuvo el ARN de las plantas antes del reto con *Cmm* 1387 (Anexo 2) y se sintetizó ADNc. Se comparó el nivel de expresión del gen de cada planta inoculada con ToMoV_Ech contra las plantas no inoculadas así como de aquellas que se les inoculó el vector vacío (ToMoV Δ CP).

Los niveles de expresión de las plantas de *S. habrochaites* LA2128, indican que en una de las tres plantas inoculadas con ToMoV_Ech disminuyó la expresión del gen en un 60%, mientras que en las otras dos plantas no hubo cambios notables en la expresión respecto al control (Figura 7 A). Por otro lado, los resultados obtenidos para *S. arcanum* LA2172, indican que en dos de las tres plantas inoculadas con ToMoV_Ech disminuyó la expresión del gen en un 30 y un 60% respectivamente, mientras que en la tercera planta la expresión fue 1.8 veces mayor respecto al control (Figura 7 B).

2.4.3 Seguimiento de síntomas después del reto con Cmm 1387 en plantas inoculadas con ToMoV_Ech

Para investigar si el posible silenciamiento del gen de la endoquitinasa afecta la infección de las plantas por *Cmm* 1387, las plantas de *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2157, se infectaron 40 días después de la inoculación con ToMoV Δ CP y ToMoV_*Ech* y se observó el desarrollo de síntomas durante 60 días aproximadamente.

En las plantas de *S. habrochaites* LA2128 no inoculadas como en aquellas que se les inoculó ToMoV Δ CP desarrollaron el mismo fenotipo (Figura 8 A-D), sin embargo, de las plantas inoculadas con ToMoV_*Ech*, dos mostraron el fenotipo de las plantas control y sólo una desarrolló lesiones más severas tanto del chancro en el tallo así como en el marchitamiento de las hojas (Figura 9), por lo tanto, es posible que únicamente una de las tres plantas se haya sido silenciada eficientemente, probablemente por problemas técnicos en el bombardeo (Figura 8 E y F). Por otro lado, en el experimento con *S. arcanum* LA2157, todas las plantas exhibieron un fenotipo sin marchitamiento, tanto las plantas no inoculadas como aquellas inoculadas con ToMoV Δ CP e incluso las plantas inoculadas con ToMoV_*Ech* (Figura 10) a pesar de mostrar una disminución en la expresión del gen.

2.4.4 Replicación viral en las plantas inoculadas

Debido a que el fenotipo de blanqueamiento no fue uniforme era importante investigar si el virus entro a las plantas y se estaba replicando ya que si se detectaba replicación pero no había blanqueamiento, el problema se podía atribuir a que el fragmento no era el más adecuado para el silenciamiento. En experimentos preliminares logramos detectar en un 50% al virus en las plantas un mes después

de haber sido inoculado (Anexo 3). Sin embargo, en algunas de esas plantas que hubo replicación no hubo silenciamiento, es evidente que hay que mejorar el método de bombardeo.

Aunque se sabe que iniciada la replicación viral y generados los pequeños fragmentos de ARN de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés) no se requiere de una replicación continua para el silenciamiento (Palauqui et al. 1997), decidimos analizar la replicación del virus 90 días desde su inoculación. Se observó que en ninguna de las plantas inoculadas había señal de replicación viral, incluso en las plantas control silenciadas en el gen de la quelatasa que mostraron blanqueamiento (Figura 11 A); se trabajó con diferentes concentraciones de ADN sin embargo, no se detectó el virus en ninguna de ellas. En contraste, las plantas que mostraron blanqueamiento hasta ese momento, mantenían un fenotipo todavía más intenso (Figura 11 B), lo que indicó que el silenciamiento sigue ocurriendo a pesar de no poder detectar al virus.

3. Discusión

En este trabajo se buscó determinar la importancia del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en dos especies silvestres de tomate tolerantes al cáncer bacteriano causado por *Cmm*. Para ello, en la infección de las plantas decidimos utilizar la cepa de *Cmm* 1387 aislada de una región cercana al estado de San Luis Potosí, así que se evaluó su virulencia en distintas especies de tomate.

Los resultados demostraron que la cepa de *Cmm* 1387 es virulenta. Todas las especies de tomate infectadas desarrollaron síntomas de marchitez algunas en mayor grado y otras en menor grado (Figuras 1, 2 y 3).

Con base en reportes previos (Van Heusden et al. 1999), se demostró que, la especie *S. arcanum* LA2157 mostró la mayor tolerancia a *Cmm* 1387, ya que esta especie se ha caracterizado como la más tolerante al chancro bacteriano del tomate. Por otro lado, la especie *S. habrochaites* LA2128 mostró mayor tolerancia que *S. arcanum* LA2172 tras el reto con *Cmm* 1387, a diferencia de lo que se había reportado anteriormente en donde *S. arcanum* LA2172 mostró mayor tolerancia que *S. habrochaites* LA2128 a la infección por la cepa *Cmm* 191 (Lara-Ávila et al. 2012). Por otro lado, cabe resaltar que a pesar que *S. lycopersicum* cv. IRAT L3 está reportada como una especie tolerante a *Cmm* (Ysuf Sen et al. 2013), en nuestro trabajo se observó que la susceptibilidad de esta especie es comparable a la de *S. lycopersicum* (variedad comercial susceptible a *Cmm*) cuando es infectada con la cepa de *Cmm* 1387. Nuestros resultados contrastan con datos ya publicados y sugieren que la interacción planta-patógeno podría ser de tipo cepa-específica y que el nivel de tolerancia de las plantas de tomate silvestre puede variar dependiendo de la cepa que las infecta. Por ejemplo, en el lino (*Linum usitatissimum*), se encontró que hay 26 genes que confieren resistencia al patógeno *Melampsora lini* de América del norte (causa la enfermedad de la roya del lino), sin embargo, esta planta no es resistente para cepas de *Melampsora lini* provenientes de países como Australia, Nueva Zelanda y América del Sur (Zimmer y Comstock 1973). Desafortunadamente para el chancro bacteriano del tomate la evidencia aún es escasa (Kleitman et al. 2008), por lo que es necesario profundizar al respecto. Además, esto podría dar la pauta para decidir que estrategias utilizar para el control de la enfermedad de manera eficiente dependiendo de las cepas presentes en la región.

Nuestra hipótesis, sobre la posible participación de la endoquitinasa en la tolerancia a *Cmm* surgió a partir de los resultados obtenidos en el trabajo de Lara-Ávila (2012), y en relación con esto se midió la expresión del gen de la endoquitinasa por RT-qPCR 8h después del reto con *Cmm* en *S. lycopersicum* y *S. arcanum* LA2157, los cuales indicaron que los niveles de expresión del gen se elevan notablemente en *S. arcanum* LA2157. La expresión fue de más de 200 veces en relación con *S. lycopersicum* (figura 4). Esto hace hincapié en que la endoquitinasa de 30 kDa podría ser importante en etapas tempranas de la infección por *Cmm* en especies de tomate tolerantes, ya que como se mencionó anteriormente pueden liberar oligosacáridos del apoplasto y la pared celular que pueden funcionar como DAMPs y activar el sistema de defensa de la planta (Benhamou y Asselin 1989, Shibuya y Minami 2001; Casarrubias-Castillo et al. 2014).

Respecto a la construcción del vector ToMoV_*Ech*, se obtuvo un fragmento del gen de la endoquitinasa que abarcó desde el nucleótido 42 al 228, es decir, se encuentra dentro de la región predicha *in silico* por el software VIGS Tool (Fernandez-Pozo et al. 2015), considerada como la región óptima para el silenciamiento génico debido a que en esa zona se pueden generar siRNA dirigidos únicamente contra el gen de la endoquitinasa de 30 kDa (Figura 5 A). El fragmento está apartado de las porciones del gen de la endoquitinasa que podrían generar silenciamiento en genes que no son de interés para este trabajo. El fragmento seleccionado con base en secuencias de otras especies, en teoría al introducirse al vector viral, debe de ser capaz de silenciar el mismo gen en distintas especies de tomate. No obstante, para saber cuál o cuáles de todos los posibles siRNA son responsables del

silenciamiento en cada especie, es necesario identificarlos por otros protocolos, como secuenciación masiva de los siRNA.

Los ensayos VIGS se realizaron simultáneamente en *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172. Como se mencionó, únicamente dos plantas control de silenciamiento de *S. habrochaites* LA2128 con el gen de la quelatasa, mostraron el fenotipo esperado (Figura 6), ya que al menos el fragmento de la secuencia del gen de la quelatasa es idéntico en *S. lycopersicum*, y en *S. arcanum*, es decir, de las plantas control (ToMoV_*ChII*), se obtuvo aproximadamente un 66% de eficiencia de silenciamiento (blanqueamiento de hojas), en *S. habrochaites* LA2128, mientras que en *S. arcanum* LA2172 fue cero. Esto nos hace pensar que el método de balística debe ser optimizado, ya que pudiera haber problemas en la cobertura del tungsteno con el ADN, la distancia de las plantas al disco de ruptura, etc.

Para el análisis de la replicación viral, realizamos estudios preliminares 30 días post-inoculadas (Anexo 3). Encontramos el virus en aproximadamente un 50% de las plantas, Esto sugiere que nuestro método inoculación por biobalística tiene una eficiencia de aproximadamente 50% de eficiencia y deberá ser mejorado.

La razón de que no se haya logrado detectar el virus casi tres meses después de la inoculación, pudo ser a causa de la respuesta antiviral de las plantas mediada por silenciamiento, en el que se inhibe la síntesis de proteínas virales y ya no puede seguir replicándose (Covery et al. 1997), de tal forma que sólo se queda localizado en hojas adultas. Además, con el paso del tiempo, estas hojas se van perdiendo debido a la senescencia natural de las plantas, lo que vuelve prácticamente imposible detectar al virus. El hecho de que el blanqueamiento de las plantas de *S. habrochaites* siguió a pesar de la ausencia del virus, se debe a que los siRNA que

se generan en la zona de inoculación del virus pueden viajar de forma sistémica por la planta provocando silenciamiento generalizado (Palauqui et al. 1997).

Además de la baja eficiencia de inoculación, se pudo ver que independientemente de que el virus entró, el silenciamiento no ocurrió en algunas plantas, como se esperaría ver por lo menos en las plantas inoculadas con ToMoV_*Chl*. Por lo tanto, aunque no contamos con evidencia, pudo suceder que durante la inoculación de las plantas los componentes virales A y B no ingresaron juntos a las células y no hubo inducción exitosa del VIGS, ya sea porque no se unieron igualmente a los proyectiles de tungsteno o bien durante el bombardeo la dispersión no fue uniforme, lo cual deberá ser demostrado experimentalmente.

En general, estos resultados indican que el sistema de inoculación del virus es poco eficiente y que es necesario implementar un sistema de silenciamiento que asegure una buena reproducibilidad, por ejemplo el uso de hemi-dímeros de ToMoV y agroinfiltración.

A pesar de las limitaciones del método de biobalística para un silenciamiento uniforme, en relación al silenciamiento del gen de la endoquitinasa de 30 kDa, dos de las plantas de *S. arcanum* LA2172 inoculadas con el vector ToMoV_*Ech*, mostraron una disminución del 30 y 60% en la expresión del gen de la endoquitinasa, respectivamente (la planta silenciada en 30% muestra una desviación estándar amplia, lo que la hace similar al control sin inocular), (Figura 7B). Estas diferencias podrían ser debido a cuestiones técnicas del disparo. Ninguna de las plantas silenciadas mostró fenotipo de susceptibilidad esperado, de tal manera que lucían igual que las plantas control a los 60 dpi con *Cmm* 1387 (Figura 10). Por otro lado, al menos para la especie *arcanum* LA2172 este gen

podiera no ser importante para la tolerancia a la infección por *Cmm*, u otro gen de la familia de las endoquitinasas podría compensar esa función y en consecuencia no se esté generando un cambio fenotípico notable al silenciarlo.

En contraste, una de plantas de *S. habrochaites* LA2128 inoculada con el vector ToMoV_*Ech*, 60 dpi con *Cmm* 1387 mostró un fenotipo (mayor grado de lesión) diferente al de las plantas control e incluso del resto de las plantas ToMoV_*Ech* inoculadas (Figuras 8 y 9). Además, este cambio parece estar asociado a una disminución del 60% de la expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa. Estos datos sugieren que la endoquitinasa de 30 kDa podría estar afectando la tolerancia de las plantas de *S. habrochaites* LA2128 cuando es infectada por *Cmm* 1387. Por el momento no es posible concluir que en este gen desempeña un papel importante ante el cáncer del tomate, sin embargo, estos resultados siguen sosteniendo nuestra hipótesis. Para probarlo será necesario obtener un mayor número de plantas silenciadas y ver si el fenotipo que se obtuvo se repite, así podríamos establecer una diferencia significativa que permitiera validar el modelo. Con estos resultados tampoco se puede descartar la posibilidad de que esta enzima solamente sea producto de la activación del sistema de defensa de la planta y que no esté relacionada con la tolerancia directamente (Bishop et al. 2000)

Como perspectivas nos hemos propuesto probar un nuevo vector de silenciamiento que se encuentra en construcción (Realizado por la Dra. Pérez-Segura). El nuevo sistema consiste en la obtención del hemi-dímero de ToMoV flanqueado por borde izquierdo y derecho de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*, para que ya sea solo por infiltración con jeringa o con vacío, se introduzca el fragmento a silenciar sin requerir balística. En estudios preliminares la Dra. Pérez-Segura ha sugerido que la

replicación viral de hemi-dímeros es más eficiente que al disparar los 2 componentes por biobalística. Por otro lado, en nuestro grupo se implementará un nuevo sistema de análisis de función de genes mediante el sistema de edición génica CRISPR/Cas9. El sistema cuenta con varias ventajas respecto a los basados en siRNA, como que es heredable y se obtiene un alto porcentaje de eficiencia silenciando genes. Una de las desventajas principales del sistema es el knock-out del gen, lo cuál podría ser letal si el gen en cuestión es esencial para la planta.

Estos sistemas podrán ser aprovechados para reducir la expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa, tener mayor reproducibilidad y realmente concluir si desempeña un papel importante en la defensa ante *Cmm*.

En resumen, este trabajo ha aportado evidencia del posible papel de la endoquitinasa de 30 kDa en la tolerancia al cáncer bacteriano de tomate, sin embargo, para obtener evidencia más sólida será necesario probarlo con las nuevas estrategias de silenciamiento génico que hemos propuesto así como con un mayor número de muestras.

4. Material y Métodos

4.1 Material biológico

Se obtuvieron semillas de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig de la Universidad de Nottingham, UK. Las semillas de *S. arcanum* LA2172, *S. arcanum* LA2157, *S. habrochaites* LA2128 y *S. lycopersicum* IRAT cv. L3 se solicitaron al TGRC (Tomato Genetics Resource Center, University of California, Davis). La cepa bacteriana *Cmm* 1387 fue obtenida por el Dr. Lara-Ávila en una zona de cultivo de tomate comercial cercana a Querétaro, México. El vector de silenciamiento génico ToMoV Δ CP,

ToMoV_*ChII* y ToMoV_B (clonados en el plásmido Bluescript, “pBS II SK+/-”, Stratagene, La Jolla, CA, USA), fue proporcionado por la Dra. Esparza-Araiza.

4.2 Crecimiento, infección e inoculación de plantas

Los experimentos se realizaron en áreas controladas, los desechos de las plantas infectadas con patógenos fueron esterilizados. Para la germinación de semillas, todas las semillas fueron desinfectadas y germinadas en medio MS para cultivo de plantas *in vitro* (Macronutrientes, micronutrientes, CaCl₂, Fe-EDTA MS, sacarosa y vitaminas; a pH= 5.7). La germinación se llevó a cabo en cámara bioclimática (25°C, periodo de luz/oscuridad de 16/8 h). Las plántulas con las primeras hojas verdaderas fueron colocadas en una mezcla de suelo comercial (sustrato Sunshine Mix #3, Sun Grow Horticulture, Vancouver, BC, CA) y transferidas a invernadero con temperatura controlada (máxima 28°C y mínima de 20°C) y un porcentaje de humedad de 55-60%.

Todas las especies de tomate con aproximadamente 40 días de edad, fueron infectadas con la cepa de *Cmm* 1387. La infección se realizó mediante inyección en tallo en el primer internodo (primera hoja verdadera). La cepa de *Cmm* 1387 se creció en medio de cultivo 702 (extracto de levadura 2g/L, polipeptona 1g/L, sulfato de magnesio 0.92g/L) y se inoculó a una concentración de 5×10^7 UFC; esta concentración se calculó por espectrofotometría a una absorbancia de 0.2 a 620 nm. Posterior a la inoculación, las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero y se monitoreó el desarrollo de síntomas (evaluación de tolerancia y/o susceptibilidad) en un área restringida sólo para ensayos de retos bacterianos. Se verificó la presencia de los plásmidos de virulencia pCM1 y pCM2 mediante la

amplificación de pequeñas regiones de los genes *ce1A* con los oligos Forward 5'-ATCAAGCAGATGGGGTTCAC-3' y Reverse 5'-TCCGGATACTGCGATGTGTA-3' y *pat-1* con los oligos Forward 5'-GGTCATTTGGGAATCGTCAG-3' y Reverse 5'-CTGAAAAGGTCTCCGCTACG-3', las condiciones de reacción fueron: 30 ciclos a 94°C (Ti) por 50 s, 60°C (Tm) por 40 s, 72°C (Te) por 50 s y por último 72°C por 5min para la extensión final.

Las plantas de tomate *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172 de aproximadamente 40 días de edad, destinadas para ensayos de VIGS fueron inoculadas con el vector de silenciamiento ToMoV_*Ch1*, ToMoV_*Ech* y ToMoV Δ CP mediante bombardeo por biobalística. Una vez que las plantas control (inoculadas con ToMoV_*Ch1*) mostraron blanqueamiento generalizado aprox. 40 días post-inoculadas (resultado del silenciamiento del gen de la quelatasa), se asumió que todas las plantas estaban silenciadas y se retaron con *Cmm* 1387. Las plantas infectadas se mantuvieron en invernadero a una temperatura de 18-30°C y se siguió el desarrollo de síntomas durante 60 días aprox.

4.3 Diseño de oligos y clonación del fragmento en el vector de silenciamiento ToMoV Δ CP

Primero se determinó la región más adecuada para el silenciamiento del gen de la endoquitinasa de 30 kDa con base en la herramienta en línea VIGS Tool que ofrece la base de datos de las solanáceas Sol Genomics, la cual indica cuál es la mejor región a partir de un algoritmo que realiza simulaciones *in silico* del proceso de VIGS en la célula vegetal. El software estima las posibles secuencias cortas correspondientes a los siRNA que se podrían originar en la célula y que podrían

silenciar el gen de interés (Fernandez-Pozo et al. 2015). Para realizar VIGS del gen de la endoquitinasa de 30 kDa, se diseñaron oligos específicos capaces de amplificar la región más conveniente en el gen para el silenciamiento génico. A partir de esta predicción se diseñaron los oligos: Forward 5'-AAATGATATCGAATTCAATAACACCGCCTAGGTCCC-3' y Reverse 5'-ATTGTAAGCTTGTGCTTTTGCTGTCTGCCTC-3' que amplifican una región de 186 pb. Además, se agregaron sitios de restricción *EcoRI* y *EcoRV* en el oligo Forward y *HindIII* en el oligo Reverse para poder clonar el fragmento en el vector ToMoV Δ CP.

Las condiciones de la PCR para la obtención del fragmento fueron: para la desnaturalización inicial 5 min a 94°C, posteriormente 34 ciclos a 94°C (Ti) por 50 s, 60°C (Tm) por 40 s, 72°C (Te) por 50 s y por último 72°C por 5 min para la extensión final. El producto de PCR se insertó en el vector pGEM-T Easy (Promega) mediante ligación con la ligasa de ADN T4 (*New England Biolabs Inc.*). Con el producto de ligación se transformaron células de *E. coli* Top 10 F' por choque térmico. Subsecuentemente se propagaron a 37°C en placas con medio LB (NaCl, Extracto de levadura y bacto-triptona) y se seleccionaron las colonias blancas (gen *LacZ* interrumpido) resistentes a carbenicilina (100 mg/L). La presencia del inserto se verificó mediante digestión con *EcoRI* (*New England Biolabs Inc.*) y se comprobó la identidad del fragmento mediante secuenciación.

Para la subclonación del fragmento del gen de la endoquitinasa se liberó el inserto del vector pGEM-T Easy mediante doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (*New England Biolabs Inc.*) a 37° C durante 4 h; al mismo tiempo se linearizó el vector ToMov Δ CP con las mismas enzimas de restricción. El fragmento liberado del

vector pGEM-T se tomó a partir de un gel de agarosa 1% y se purificó por filtración en columna (kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Posteriormente el fragmento purificado y el vector PBS-ToMoV Δ CP abierto se ligaron con la ligasa de ADN T4. Con el producto de ligación se transformaron células de *E. coli* Top 10 F' por choque térmico. Subsecuentemente se propagaron en placas con medio LB a 37°C durante 16h y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina (100 mg/L). La presencia del inserto se verificó mediante PCR de colonia con los oligos específicos para el fragmento de la endoquitinasa, digestión con *EcoRI* y *HindIII* y se comprobó la identidad del fragmento mediante secuenciación.

4.4 Bombardeo de plantas mediante biobalística

Para el bombardeo, como primer paso fue necesario liberar los componentes virales A y B de pBS, usando la enzima *Apal* (*New England Biolabs Inc.*), 16h a 28°C. Los componentes liberados se mezclaron en una relación 1:1, es decir, 1 μ g de ToMoV Δ CP_*Ech* con 1 μ g de ToMoV_*B*, 1 μ g de ToMoV_*ChII* con 1 μ g de ToMoV_*B* y 1 μ g ToMoV Δ CP con 1 μ g de ToMoV_*B*. Cada mezcla de ADN viral se fijó en la preparación con proyectiles para biobalística (Tungsteno 15 μ g/mL, CaCl₂ 2.5M, Espermidina 0.1 M). Plantas de *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172 de aprox. 40 días de edad, se inocularon con las distintas mezclas de ToMoV_VIGS (en plantas independientes), con cámara de biobalística de helio a baja presión (PDS-1000 – He BioRad, Hercules, CA, USA). Se usaron membranas de ruptura de 600 psi (presión del disparo). A cada planta se le inoculó 2 μ g de ADN viral dividido

en dos disparos consecutivos. Una vez inoculadas, las plantas se mantuvieron cámara bioclimática a una temperatura de 23-25°C durante 40 días aprox. (tiempo en el que hay blanqueamiento generalizado de las plantas control).

4.5 Obtención de ARN y síntesis de ADNc

Se realizó extracción de ARN por TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). De las plantas usadas para VIGS (40 días después de la inoculación), se tomaron aprox. 100 mg de hojas (peso fresco). El tejido se trituró en nitrógeno líquido y se pasó a microtubos de 1.5 mL para agregar 1ml de TRIzol, se mezcló suavemente y se dejó a temperatura ambiente por 5 min. Se agregaron 200 µL de cloroformo y después de una agitación vigorosa la mezcla se incubó a 4°C por 2 min. Las mezclas se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C durante 15 min. Después, la fase acuosa se transfirió a nuevos microtubos de 1.5 mL y se agregaron 500µL de isopropanol frío, enseguida se mezcló por inversión y las mezclas permanecieron a 4°C durante 15 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C durante 10 min. Aquí se formaron pastillas al fondo de los microtubos (ARN), el sobrenadante se desechó y las pastillas se lavaron con 1 mL de etanol-DEPC al 75%. Enseguida se centrifugaron a 7,000 rpm a 4°C durante 5 min. Nuevamente, el sobrenadante se desechó y los tubos se dejaron secando en hielo durante 1-2 h aprox. y después cada pastilla se resuspendió en 30-50 µL de agua DEPC. Por último, para eliminar el ADN genómico el ARN se trató con DNAsa I (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y se verificó la integridad del ARN en gel de agarosa al 0.7%. La ausencia de ADN genómico se comprobó mediante una reacción de PCR sin RT usando como molde el ARN ya tratado.

Se cuantificó la concentración de ARN con el equipo NanoDrop ND-1000-UV-Vis-espectrofotómetro (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). Se sintetizó ADNc a partir de aprox. 0.5 µg de ARN con la transcriptasa reversa SuperScriptII RT (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La integridad del ADNc obtenido se verificó con PCR mediante la amplificación de una región del gen de la quelatasa con los oligos: Forward 5'-GCTTTATCCCTTTTCCCATCTTC-3' y Reverse 5'-GGACTTCAGCGCTCATTACTTCT-3'; las condiciones de reacción fueron 34 ciclos a 94°C (Ti) por 50 s, 60°C (Tm) por 40 s, 72°C (Te) por 50 s y por último 72°C por 5 min para la extensión final, el producto de amplificación se observó en un gel de agarosa al 1%.

4.6 Cuantificación de la expresión del gen de la endoquitinasa por PCR en tiempo real

Las muestras de ADNc obtenidas se ajustaron a 100 ng/µL, para la reacción de RT-qPCR (PCR en tiempo real) se usó el kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la RT-qPCR se realizó en el equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time, versión 2.0. Los componentes de la reacción fueron: 10 µL mix SYBR Green, 100 nM de cada oligo específico, 500 ng de ADNc y agua inyectable para un volumen final de 20 µL. Los datos de expresión génica de los genes de interés se normalizaron basados en la expresión gen constitutivo de la actina (valor de CT). Los oligos usados para medir la expresión del gen de la endoquitinasa fueron: Forward 5'-ACTGCCACGACCACATTCTA-3' y Reverse 5'-TTCTGGATGACCCCTCAATC-3'. Estos oligos están dirigidos a la parte final del gen, son distintos a los que se usaron en la construcción para el VIGS, lo cual

permite sólo medir el ARNm y discriminar el fragmento de la construcción. Los oligos de actina fueron: Forward 5'-CCTCACCGAGAGAGGTTACATGT-3' y Reverse 5'-CATGTGCGGACAATTTCC-3'. Las condiciones de reacción fueron: 20 s a 95°C seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 s y 30 s a 60°C, la curva de disociación se realizó por 80 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C, 30 s a 95°C y 15 s a 60°C.

4.7 Verificación de la replicación viral en plantas bombardeadas

Se extrajo ADN total de hojas jóvenes y viejas de las plantas inoculadas con las distintas construcciones virales. Para ello, se tomaron aprox 0.5 g de tejido vegetal y se molieron en mortero con buffer de extracción de ADN (M-sorbitol 0.12 M, Tris-HCl 0.22 M pH=8, EDTA 0.022M pH=8, PVP 1%, SDS 1%, β -mercaptoetanol 0.2%). El fluido obtenido, se colectó en microtubos. Para la separación de fases se usó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La fase acuosa se trató con RNAsa (10 mg/mL). El ADN se precipitó con isopropanol frío y se resuspendió en agua destilada estéril. A partir del ADN obtenido, se realizó PCR para detectar una región del virus ToMoV, misma que abarca la región del gen de la cápside usando los oligos: Forward (M13) 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3' y Reverse (Miv-3) 5'-GGCTAACCTTTGAAGTTCCCGCC-3'. Las condiciones de la reacción fueron: 5 min a 94°C, posteriormente 32 ciclos a 94°C (Ti) por 50 s, 59°C (Tm) por 40 s, 72°C (Te) por 50 s y por último 72°C por 5 min para la extensión final.

5. Referencias

- Alvarez, A. M., Kaneshiro, W. S., y Vine, B. G. 2004. Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in tomato seed: What is the significance. Acta Hortic. (ISHS) 695: 205-214.
- Balaji V., Mayrose M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I., y Sessa, G. 2008. Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. Plant Physiol. 146: 1797–1809.
- Baysal, Ö., Soylu, E. M., y Soylu, S. 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Plant Pathol. 52: 747–753.
- Benhamou, N., y Asselin, A. 1989. Attempted localization of a substrate for chitinases in plant cells reveals abundant N-acetyl-d-glucosamine residues in secondary walls. Biol Cell. 67: 341–50
- Borboa, F. J., Rueda, P. E. O., Acedo, F. E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O., y García, O. A. M. 2006. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* en el tomate del Estado de Sonora, México. Rev Fitotec Mex. 32: 319-32.
- Bhupendra, C. 2013. Plant domestication and resistance to herbivory. Int J Plant Genomics, vol. 2013, 14 pages. doi:10.1155/2013/572784.

- Bishop, J. G., Dean, A. M., y Mitchell-Olds, T. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 5322–5327.
- Casarrubias-Castillo, K., Martínez-Gallardo, N. A., y Délano-Frier, J.P. 2014. Treatment of *Amaranthus cruentus* with chemical and biological inducers of resistance has contrasting effects on fitness and protection against compatible Gram positive and Gram negative bacterial pathogens. *J Plant Physiol.* 171: 927–939.
- Covey, S. N., Al-Kaff, N. S., Langara, A., y Turner, D. S. 1997. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385: 781-782.
- De Leon, L., Siverio, F., Lopez, M. M., y Rodriguez, A. 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Prot.* 27: 1277-1283.
- Dreier, J., Meletus, D., y Eichenlaub, R. 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 195-206.
- Esparza-Araiza, M. J., Bañuelos-Hernández, B., Argüello-Astorga, G. R., Lara-Ávila, J. P., Goodwin, P. H., Isordia-Jasso, M. I., Castillo-Collazo, R., Rougon-Cardoso, A., y Alpuche-Solís, Á. G. 2015. Evaluation of a SUMO E2 conjugating enzyme involved in resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in *Solanum peruvianum*, through a tomato mottle virus VIGS assay. *Front Plant Sci.* 6: 1019.

- Fatmi, M., y Schaad, N. W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* sp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.* 51: 149-154.
- Fernandez-Pozo N., Rosli1 G. H., Gregory B. M., y Mueller L. A. 2015. The SGN VIGS Tool: User-Friendly Software to Design Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) Constructs for Functional Genomics. *Mol Plant.* 8: 486–88.
- Francis, D. M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B., y Clair, D. S. 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis.* 85: 1171-1176.
- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Rückert, C., Schneiker, S., Zeller mann, E.-M., Pühler, A., Eichenlaub, R., Kaiser, O., y Bartels, D. 2008. The genome sequence of the tomatopathogenic Actinomycete *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 190: 2138-2149.
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., y Ricker, M. D. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Dis.* 77: 1069-1076.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., y Eichenlaub, R. 2000. The endo-beta-1,4-glucanase *celA* of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 703-714.

- Kabelka, E., Franchino, B., y Francis, D. M. 2002. Two loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 confer resistance to strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 92: 504-510.
- Kontaxis, D. G. 1962. Leaf trichomes as avenues for infection by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology* 52: 1306-1307.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K.H., Eichenlaub, R., y Manulis-Sasso, S. 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur J Plant Pathol.* 121: 463–475
- Lara-Ávila, P., Isordia-Jasso, I., Castillo-Collazo, R., Simpson, J., y Alpuche-Solís, A. 2011. Gene expression analysis during Interaction of tomato and related wild species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Mol Biol Rep.* 30: 498-511.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., y Foster, G. D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant. Pathol.* 13: 614-629.
- Meletzus, D., Bermphol, A., Dreier, J., y Eichenlaub, R. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J Bacteriol.* 175: 2131–2136.
- Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M., y Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is

- transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16: 4738–4745.
- Shibuya, N., y Minami, E. 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plants. *Physiol Mol Plant Pathol.* 59: 223–33.
- Smith, E. F. 1910. A new tomato disease of economic importance. *Science* 31: 794-796.
- Strider D.L., 1969. Bacterial Canker of Tomato Caused by *Corynebacterium michiganense*, a Literature Review and Bibliography. North Carolina Agricultural Experimental Station, Technical Bulletin 193, 110 pp.
- Thyr, B. D. 1976. Inheritance of resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato. *Phytopathology* 66: 1116-1119.
- Utkhede, R., y Koch, C. 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *Biocontrol* 49: 305-313.
- Van Heusden, A. W., Koornneef, M., Voorrips, R. E., Bruggemann, W., Pet, G., Vrieling van Ginkel, R., Chen, X., and Lindhout, P. 1999. Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 1068-1074.
- Zimmer, D. E., y Comstock, V. E. 1973. New genes for Rust resistance in plants. *Phytopathology* 63: 777-780

Páginas web utilizadas

Base de datos de las solanáceas: <https://solgenomics.net/>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura:
<http://www.fao.org/>

7. Tablas

Tabla 1. Características de los vectores tipo VIGS para la inoculación de plantas de *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172.

| Número de réplicas | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---|
| | <i>S. habrochaites</i> LA2128 | <i>S. arcanum</i> LA2172 | Características |
| ToMoV_<i>ChII</i> | 3 | 3 | Silenciamiento del gen de la quelatasa, para ver blanqueamiento generalizado en las plantas (silenciamiento en la planta completa). |
| ToMoVΔCP | 3 | 3 | Vector de silenciamiento vacío, control negativo para comparar expresión del gen de interés. |
| ToMoV_<i>Ech</i> | 3 | 3 | Vector para silenciar el gen de la endoquitinasa de 30 kDa. |
| Plantas no inoculadas | 3 | 3 | Control negativo, expresión normal de la endoquitinasa de 30kDa. |

En la Tabla se presentan las características de los vectores usados para el VIGS, se indica el número de réplicas biológicas, tipo de vector inoculado y la función de cada uno.

8. Figuras

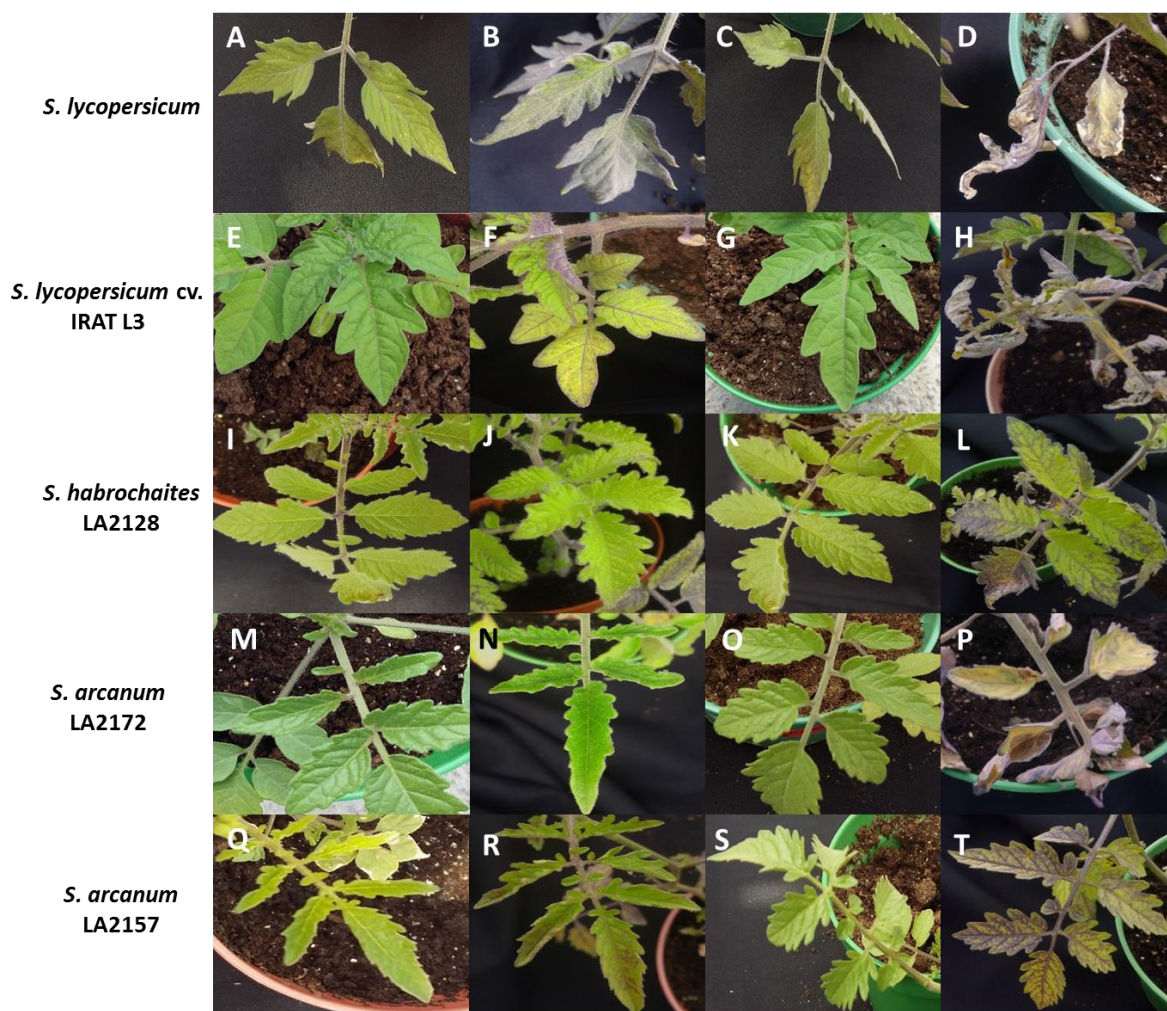


Figura 1. Marchitamiento lateral de hojas en distintas especies de tomate después de la infección con *Cmm* 1387. A y B) *S. lycopersicum*, control negativo (no infectadas) 1 y 25 días después de iniciado el experimento (ddi) respectivamente; C y D) plantas infectadas 1 y 25 días post-infección (dpi) respectivamente. E y F) *S. lycopersicum* cv IRAT L3, control negativo 1 y 25 ddi respectivamente; G y H) plantas infectadas 1 y 25 dpi respectivamente. I y J) *S. habrochaites* LA2128, control negativo 1 y 25 ddi respectivamente; K y L) plantas infectadas 1 y 25 dpi respectivamente. M y N) *S. arcanum* LA2172, control negativo

1 y 25 ddi respectivamente; O y P) plantas infectadas 1 y 25 dpi respectivamente. Q y R) *S. arcanum* LA2157, control negativo 1 y 25 ddi respectivamente; S y T) plantas infectadas 1 y 25 dpi respectivamente. El aspecto morado de algunas plantas, es debido al sustrato utilizado.

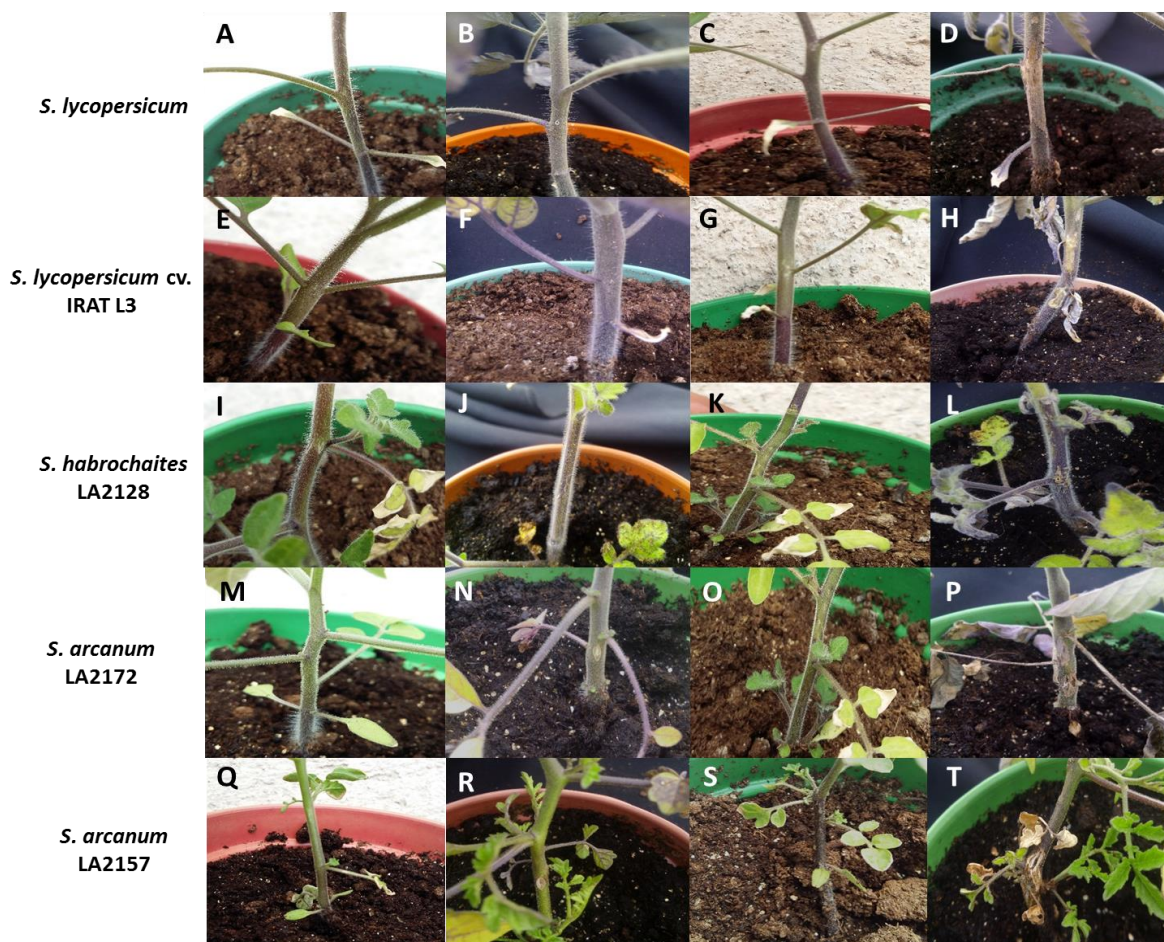


Figura 2. Lesión al tallo en distintas especies de tomate después de la infección con *Cmm* 1387. A y B) *S. lycopersicum*, control negativo 1 y 25 ddi respectivamente; C y D) plantas infectadas 1 y 25 dpi respectivamente. E y F) *S. lycopersicum* cv IRAT L3, control negativo 1 y 25 ddi respectivamente; G y H) plantas infectadas 1 y 25 dpi respectivamente. I y J) *S. habrochaites* LA2128, control negativo 1 y 25 ddi respectivamente; K y L) plantas infectadas 1 y 25 dpi

respectivamente. M y N) *S. arcanum* LA2172, control negativo 1 y 25 ddi respectivamente; O y P) plantas infectadas 1 y 25 dpi respectivamente. Q y R) *S. arcanum* LA2157, control negativo 1 y 25 ddi respectivamente; S y T) plantas infectadas 1 y 25 dpi respectivamente.

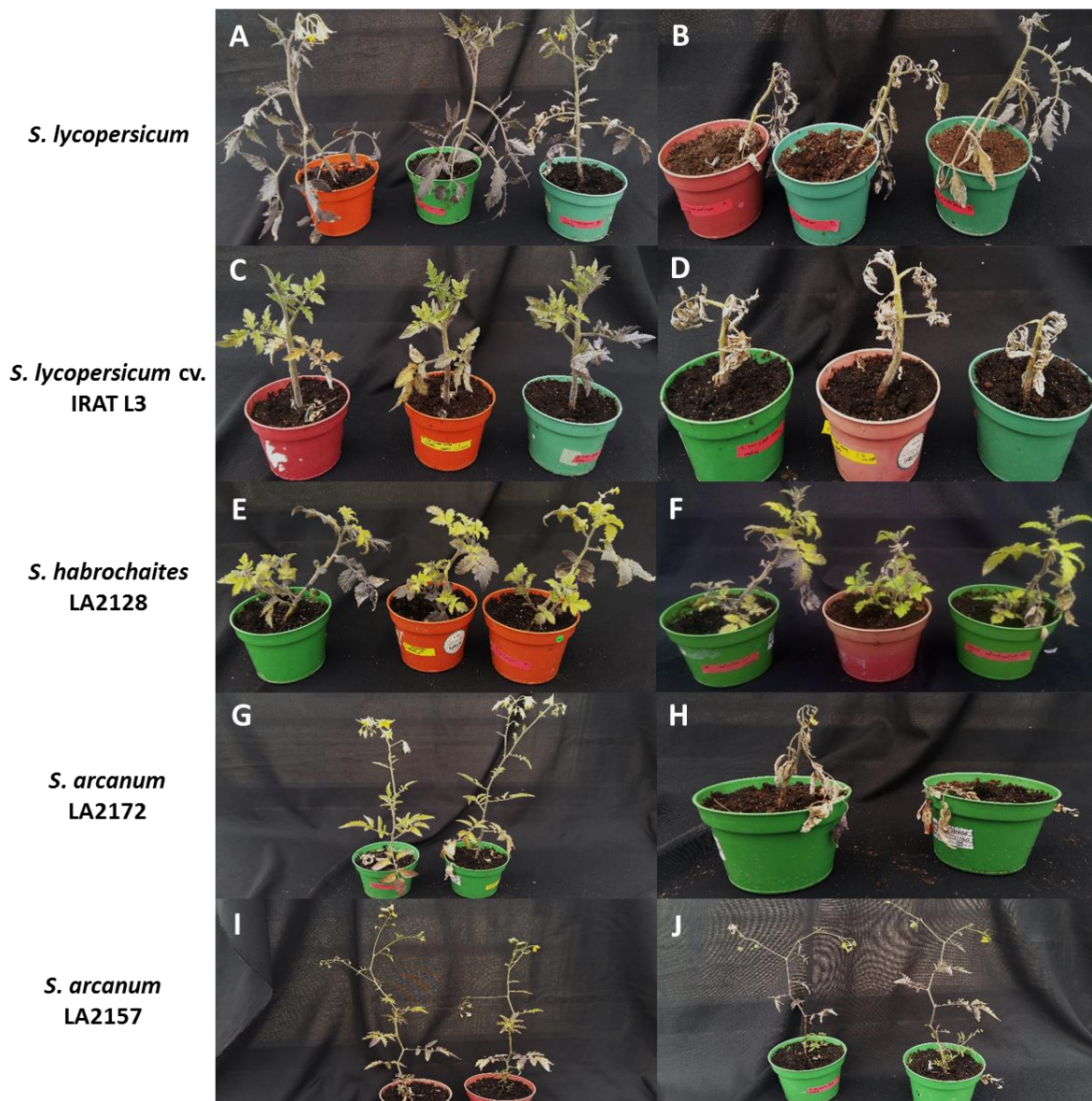


Figura 3. Progreso de la infección con *Cmm* 1387 en distintas especies de tomate 40 dpi. A y B) *S. lycopersicum*, control negativo y plantas infectadas. C y D) *S. lycopersicum* cv. IRAT L3, control negativo y plantas infectadas. E y F) *S.*

habrochaites LA2128, control negativo y plantas infectadas. G y H) *S. arcanum* LA2172, control negativo y plantas infectadas I y J) *S. arcanum* LA2157, control negativo y plantas infectadas. Las especies *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2157 mostraron un fenotipo asociado a mayor tolerancia; *S. lycopersicum*, *S. lycopersicum* cv. IRAT L3 y *S. arcanum* LA2172 desarrollaron síntomas severos durante la infección.

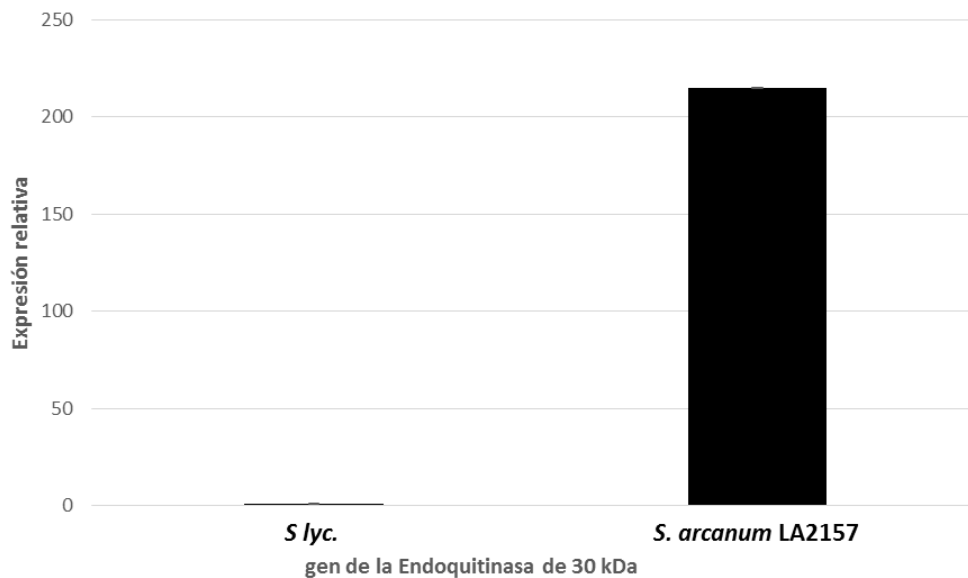


Figura 4. Expresión diferencial del gen de la endoquitinasa de 30 kDa por RT-qPCR en *S. lycopersicum* y *S. arcanum* LA2157 8 h después del reto con *Cmm*. Gráfica que muestra que la expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa es mayor de 200 veces en *S. arcanum* LA2157 respecto a la expresión del gen en *S. lycopersicum*.



B

```

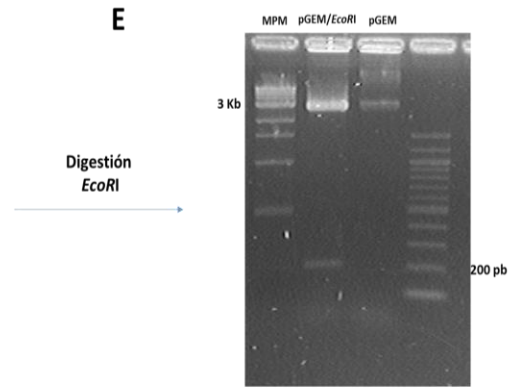
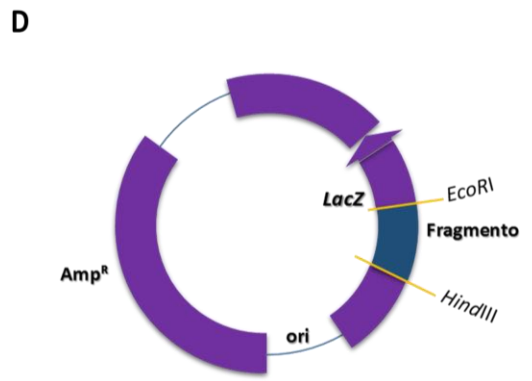
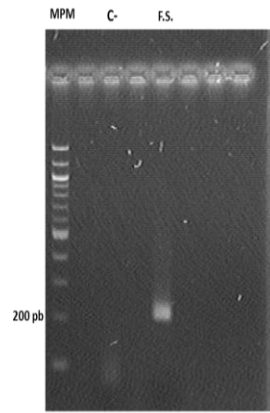
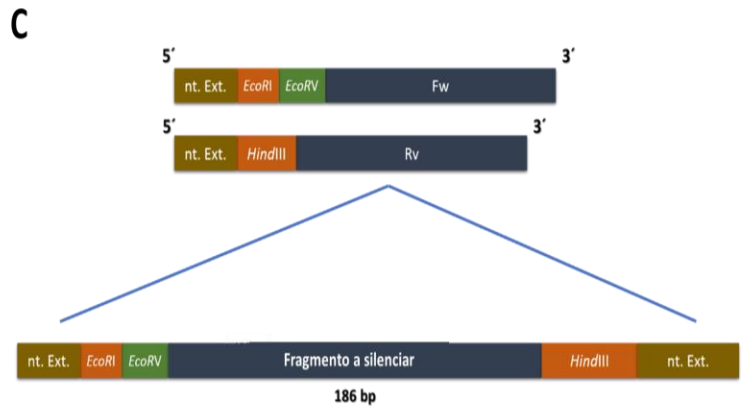
S. lycopersicum      ATGAGGCTTTCGAATCACTACTCTTTTCTACTATTTCCTGTGCTTTTGCCTGCTGCC 60
S. pimpinellifolium ATGAGGCTTTCGAATCACTACTCTTTTCTACTATTTCCTGTGCTTTTGCCTGCTGCC 60
S. pennellii        ATGAGGCTTTCGAATCACTACTCTTTTCTACTATTTCCTGTGCTTTTGCCTGCTGCC 60
S. peruvianum       NTGAGGCTTTCGAATCACTACTCTTTTCTACTATTTCCTGTGCTTTTGCCTGCTGCC 60
*****

S. lycopersicum      TCTGCAGAGCAATGTGGTTCACAGGCCGGAGCGCACTTTGTGCATCCGGACTGTGTTC 120
S. pimpinellifolium TCTGCAGAGCAATGTGGTTCACAGGCCGGAGCGCACTTTGTGCATCCGGACTGTGTTC 120
S. pennellii        TCTGCAGAGCAATGTGGTTCACAGGCCGGAGCGCACTTTGTGCATCCGGACTGTGTTC 120
S. peruvianum       TCTGCAGAGCAATGTGGTTCACAGGCCGGAGCGCACTTTGTGCATCCGGACTGTGTTC 120
*****

S. lycopersicum      AGTAAATTTGGTGGTGGTAACTAATGAGTATTGGTCCCTGGTAATTGTTCAGAGC 180
S. pimpinellifolium AGTAAATTCGGTGGTGGTAACTAATGAGTATTGGTCCCTGGTAATTGTTCAGAGC 180
S. pennellii        AGCAATTCGGTGGTGGTAACTAATGAGTATTGGTCCCTGGTAATTGTTCAGAGC 180
S. peruvianum       AGCAATTCGGTGGTGGTAACTAATGAGTATTGGTCCCTGGTAATTGTTCAGAGC 180
*****

S. lycopersicum      CAGTGTCCCTGGCGGTCCCGGTCCCTCAGGGACCTAGGCGGTGTTATTTCARATCCATG 240
S. pimpinellifolium CAGTGTCCCTGGCGGTCCCGGTCCCTCAGGGACCTAGGCGGTGTTATTTCARATCCATG 240
S. pennellii        CAGTGTCCCTGGCGGTCCCGGTCCCTCAGGGACCTAGGCGGTGTTATTTCARATCCATG 240
S. peruvianum       CARTGTCCCTGGCGGTCCCGGTCCCTCAGGGACCTAGGCGGTGTTATTTCARATCCATG 240
*****

```



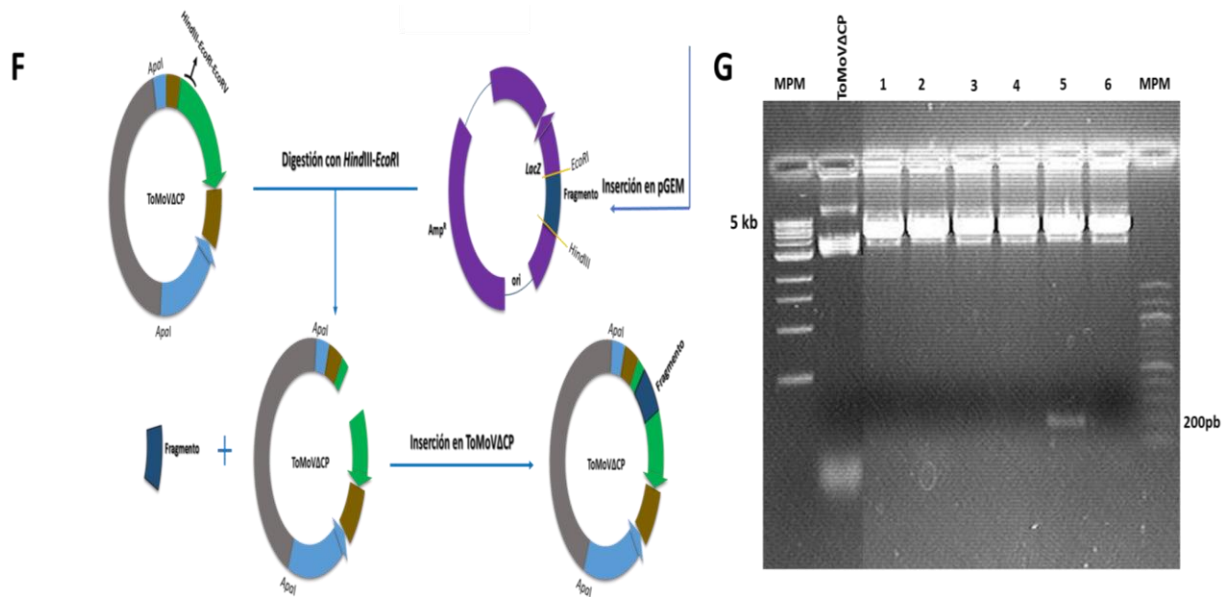


Figura 5. Construcción del vector ToMoV_Ech. A) Predicción con el software VIGS tool en cuatro especies de solanaceas de la mejor región para el VIGS (zona amarilla) que se encuentra en los primeros 300 nt del gen de la endoquitinasa de 30kDa, las líneas azules indican los siRNA (21-24 nt) que servirían para silenciar el gen específico, las líneas rojas indican formación de fragmentos que podrían silenciar genes inespecíficos. B) Sitios de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados para la obtención del fragmento a silenciar, corresponde a una región conservada del gen en distintas especies de tomate. C) Obtención del fragmento mediante PCR, el amplicón corresponde a un tamaño de 200 pb aprox, C- (Control negativo), F.S. (Fragmento a silenciar), MPM (marcador de peso molecular). D) Esquema representativo del vector pGEM-F.S. con el fragmento a silenciar insertado E) Identificación del fragmento mediante la digestión del vector pGEM-F.S; pGEM (vector sin digerir), pGEM/*EcoRI* (vector digerido con *EcoRI*). F) Esquema representativo de la subclonación de fragmento en el vector ToMoVΔCP, haciendo digestiones dobles con *EcoRI* y *HindIII*. G) Identificación del fragmento

mediante la digestión del vector ToMoV_ *Ech* (digestión con *EcoRI* y *HindIII*), carril 5 (clona que incorporó el vector de silenciamiento con el fragmento a silenciar), ToMoV Δ CP (vector de silenciamiento sin digerir). En cada paso se confirmó la identidad del fragmento mediante secuenciación.

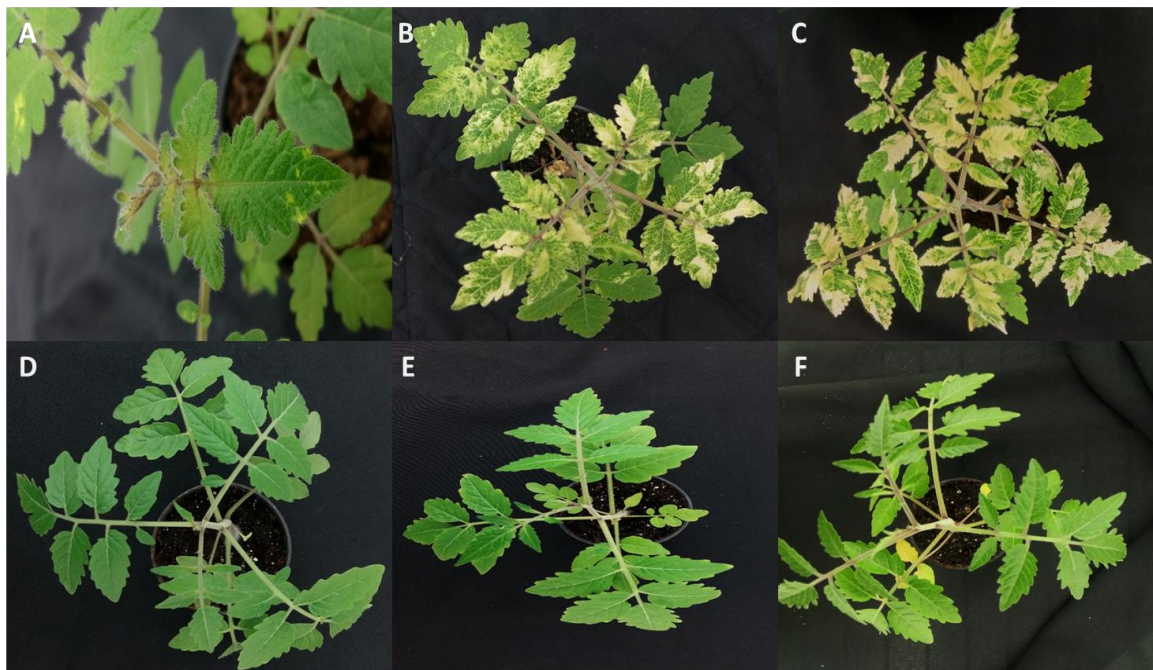


Figura 6. Seguimiento del blanqueamiento en plantas inoculadas con el vector ToMoV_ *ChlI*. A, B y C) planta de *S. habrochaites* LA2128 (control, quelatasa), 10, 25 y 40 días post-inoculación respectivamente. D, E, y F) planta de *S. arcanum* LA2172 (control, quelatasa), 10, 25 y 40 días post-inoculación respectivamente. Se logró obtener blanqueamiento en dos de las tres réplicas de *S. habrochaites* LA2128, mientras que en las plantas de *S. arcanum* LA2172 no hubo silenciamiento del gen de la quelatasa, por lo tanto las plantas no perdieron su color.

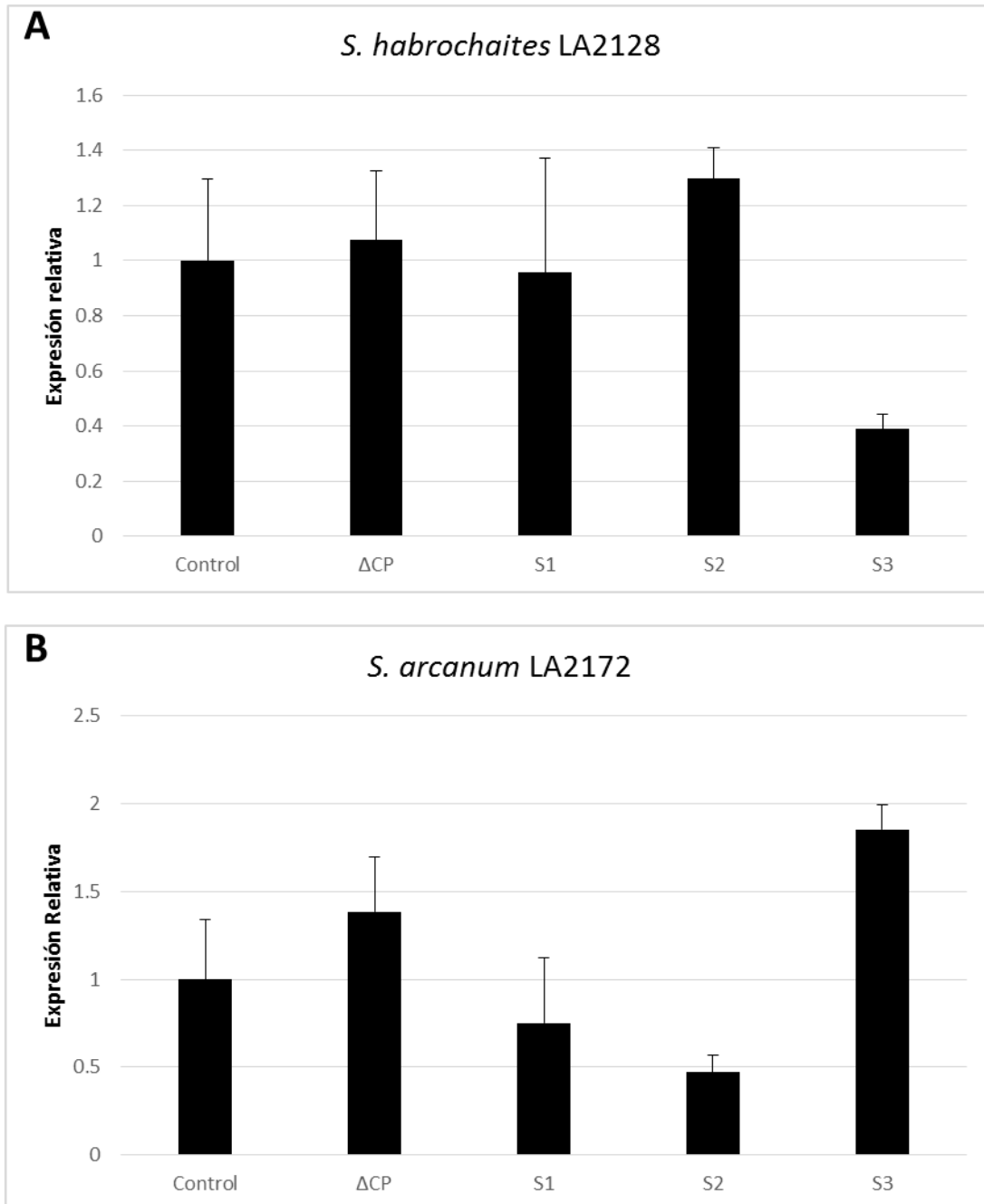


Figura 7. Nivel de expresión del gen de la endoquitinasa de 30 kDa en *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172, 40 días post-inoculación con el vector de silenciamiento ToMoV_*Ech*. A) *S. habrochaites*, Planta S3 inoculada con ToMoV_*Ech* sugiere un 60 % de silenciamiento del gen, plantas S2 y S3, no muestran expresión reducida. B) *S. arcanum*, Planta S2 inoculada con ToMoV_*Ech*

sugiere un 60 % de silenciamiento, Planta S1 un 30%, sin embargo, la desviación estándar es amplia, la planta S3 muestra un nivel de expresión incluso mayor al control.



Figura 8. Infección con *Cmm* 1387 en plantas de *S. habrochaites* LA2128 en ensayos VIGS. A) Plantas no inoculadas con ToMoV, antes del reto con *Cmm* 1387. B) Plantas no inoculadas, 60 ddi con *Cmm* 1387. C) Plantas ToMoV Δ CP inoculadas, antes del reto con *Cmm* 1387. D) Plantas ToMoV Δ CP inoculadas, 60 dpi con *Cmm* 1387. E) Plantas ToMoV_*Ech* inoculadas, antes del reto con *Cmm* 1387. F) Plantas ToMoV Δ CP inoculadas, 60 dpi con *Cmm* 1387, de izquierda a derecha, la tercera

planta muestra un fenotipo distinto (mayor daño), respecto a las plantas no inoculadas, inoculadas con ToMoV Δ CP e incluso dos de las plantas inoculadas con ToMoV_*Ech*.



Figura 9. Planta de *S. habrochaites* LA2128 inoculada con ToMoV_*Ech* 60 días después del reto con *Cmm* 1387. A) De arriba hacia abajo, la primer planta muestra el fenotipo resultante tras el silenciamiento aparente del gen de la endoquitinasa de 30 kDa, respecto a dos plantas ToMoV_*Ech* inoculadas no silenciadas. B y D) planta potencialmente silenciada, cambio de fenotipo, con un mayor daño en tallo y hojas respectivamente. C y E) planta inoculada con ToMoV_*Ech* no silenciada, muestra daño leve originado en tallo hojas respectivamente, comparable con el fenotipo de las plantas control.

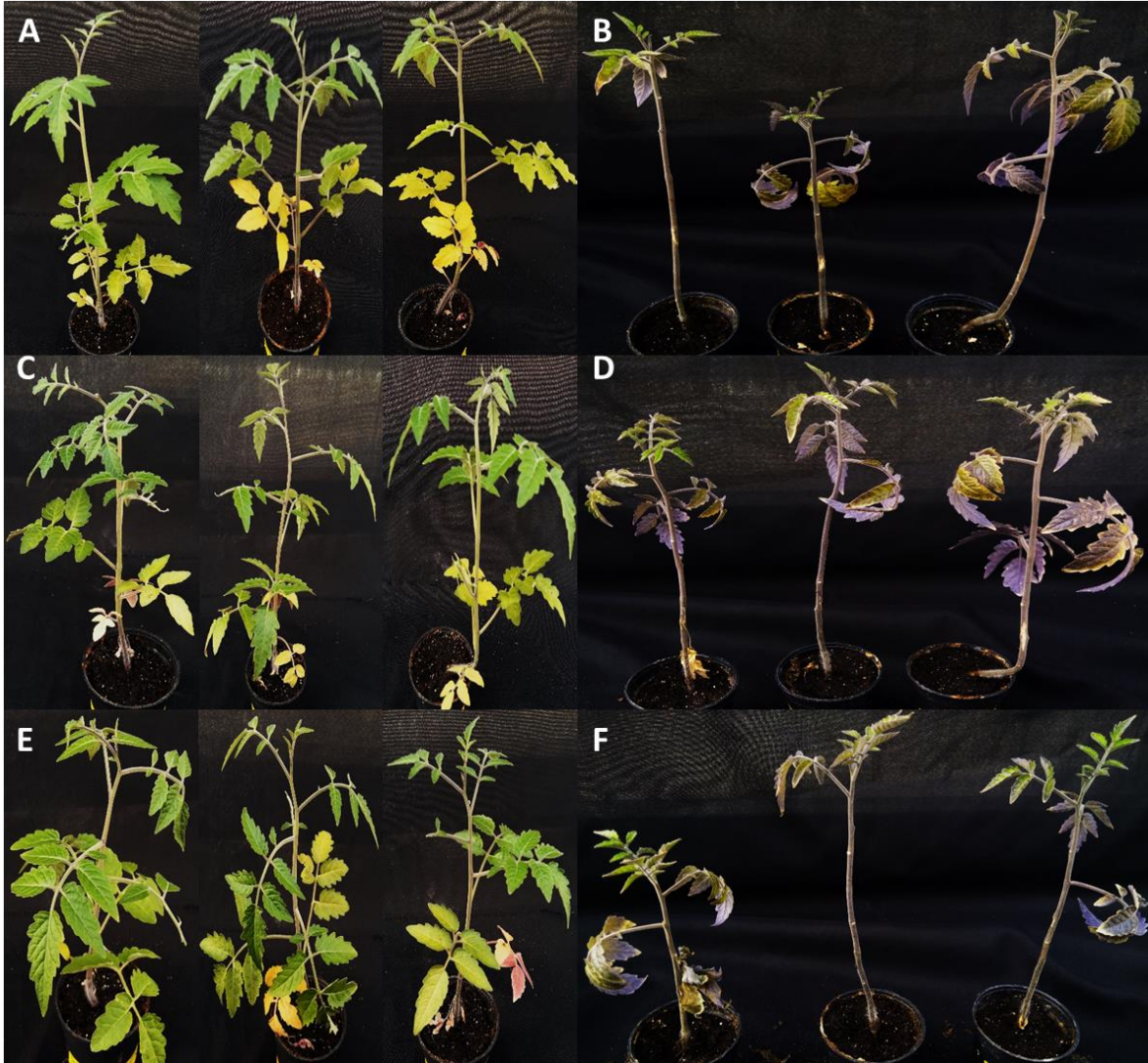


Figura 10. Infección con *Cmm* 1387 en plantas de *S. arcanum* LA2172 en ensayos VIGS. A) Plantas no inoculadas con ToMoV, antes del reto con *Cmm* 1387. B) Plantas no inoculadas, 60 ddi con *Cmm* 1387. C) Plantas ToMoV Δ CP inoculadas, antes del reto con *Cmm* 1387. D) Plantas ToMoV Δ CP inoculadas. 60 dpi con *Cmm* 1387. E) Plantas ToMoV_*Ech* inoculadas, antes del reto con *Cmm* 1387. F) Plantas ToMoV_*Ech* inoculadas. 60 dpi con *Cmm* 1387. Todas las plantas mostraron el mismo fenotipo, no hubo diferencia evidente en el grado de lesión (chancro y marchitamiento lateral de las hojas).

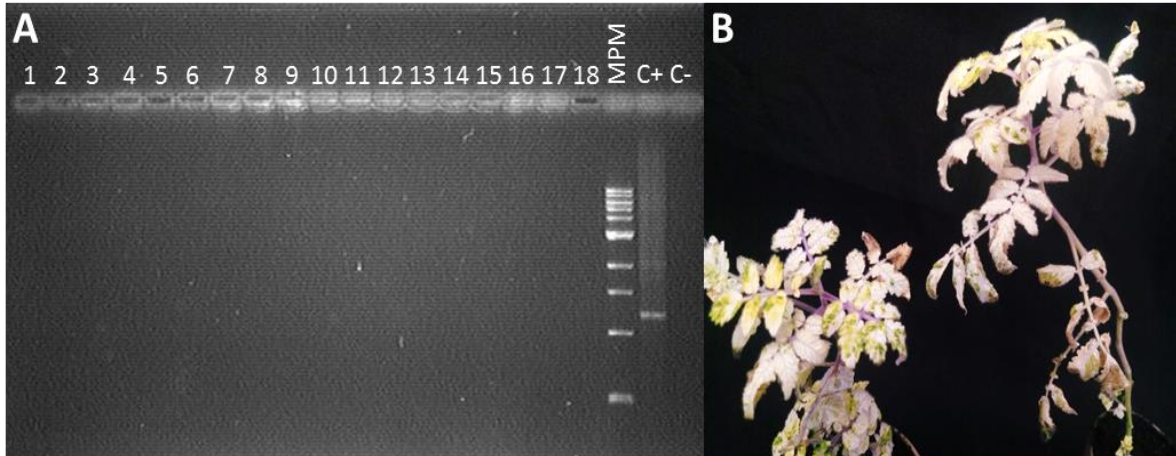
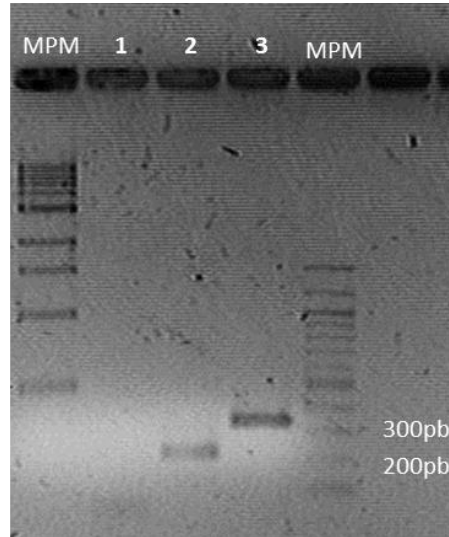
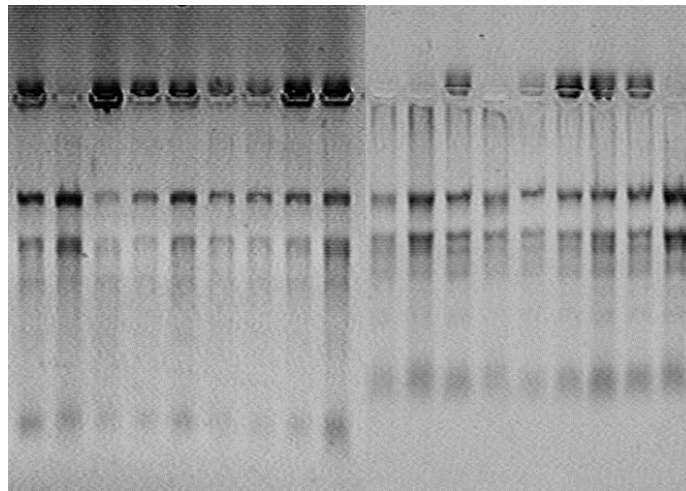


Figura 11. Evaluación de la replicación viral en plantas inoculadas 3 meses después del bombardeo. A) Gel de agarosa al 1%, para visualizar los productos de PCR que amplifican una región del componente A de ToMoV. PCR de ADN de plantas de *S. habrochaites* LA2128 inoculadas con ToMoV_*ChII* (carriles 1-3), ToMoV Δ CP (carriles 4-6) y ToMoV_*Ech* (carriles 7-9); PCR de ADN de plantas de *S. arcanum* LA2172 inoculadas con ToMoV_*ChII* (carriles 10-12), ToMoV Δ CP (carriles 13-15) y ToMoV_*Ech* (carriles 16-18), no hay presencia del producto de PCR esperado; carril 18 control negativo, carril 20 marcador de peso molecular, carril 21 control positivo (PBS-ToMoV A). B) Plantas de *S. habrochaites* LA2128 inoculadas con ToMoV_*ChII*, señalan el fenotipo de plantas blancas 90 días post inoculación, silenciamiento en curso independientemente de la ausencia del virus.

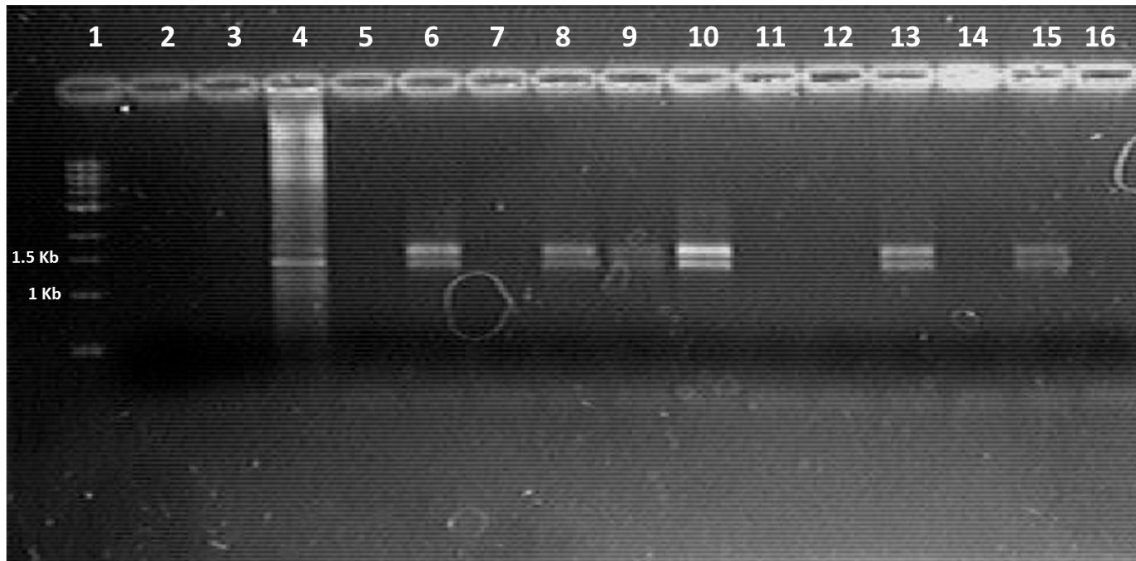
9. Anexos



Anexo 1. Detección de los plásmidos pCM1 y pCM2 en la cepa *Cmm 1387*. 1: control negativo; 2: detección del amplicón de 233pb de una porción del gen *ce/A* (pCM1); 3: detección del amplicón de 332pb de una porción del gen *pat-1* (pCM2); MPM: marcador de peso molecular).



Anexo 2. Integridad de ARN de plantas de *S. habrochaites* LA2128 y *S. arcanum* LA2172. Muestras de ARN de las plantas control (no inoculadas) e inoculadas con ToMoV Δ CP, ToMoV_*ChI* y ToMoV_*Ech*.



Anexo 3. Replicación viral de plantas inoculadas 30 días después del bombardeo. Gel de agarosa 1% que muestra el producto de la amplificación de una región del componente A del virus de ToMoV, de aprox. 1,400 pb. 1: MPM 1 Kb; 2: Control (-) de PCR; 3: Control (-) Tomate sano; 4: Control (+) Miniprep ToMoV. 5 y 6) *S. habrochaites* LA2128 ToMoV_*ChII* inoculadas. 7 y 8) *S. habrochaites* ToMoV_*Ech* inoculadas. 9 y 10) *S. habrochaites* ToMoV Δ CP inoculadas. 11 y 12) *S. arcanum* LA2172 ToMoV_*ChII* inoculadas. 13 y 14) *S. arcanum* ToMoV_*Ech* inoculadas. 15 y 16) *S. arcanum* ToMoV Δ CP inoculadas.