



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis funcional del gen *SCEI* relacionado con
resistencia bacteriana en tomate silvestre
mediante un vector viral y CRISPR/Cas9**

Tesis que presenta

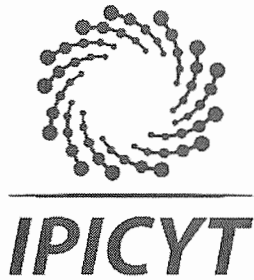
Melissa Archuleta Flores

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., marzo de 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Análisis funcional del gen SCEI relacionado con resistencia bacteriana en tomate silvestre mediante un vector viral y CRISPR/Cas9**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Melissa Archuleta Flores** y aprobada el seis de mayo del dos mil diecinueve 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. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial

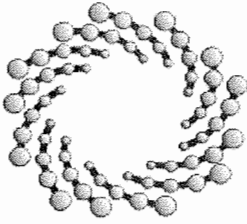
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Miembro del Comité Tutorial



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.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-611221) y al apoyo del proyecto 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 189 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 6 días del mes de mayo del año 2019, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dra. María Jazmín Abraham Juárez	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Melissa Archuleta Flores

sobre la Tesis intitulada:

Análisis funcional del gen SCEI relacionado con resistencia bacteriana en tomate silvestre mediante un vector viral y CRISPR/Cas9

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 12:00 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 6 días del mes de mayo de 2019.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A las personas más importantes de mi vida: mi gran padre Arturo Archuleta Zazueta y mi hermosa madre Ma. Elisa Flores Reyes. Los que me han formado, me han dado su cariño, amor y comprensión, su gran apoyo y sobretodo la fortaleza y las ganas para seguir siempre adelante y luchar por lo que quiero.

A mis hermanos Valeria y Arturo, las únicas personas que sólo yo puedo molestar y que siempre voy a cuidar. A mi pequeña Mía, esa bebé pañaluda que llegó para alegrarnos los días y para convertirme en la tía buena onda.

A mi Zeus, sin más ni menos.

A mis amigos, tanto de Sonora como de otros estados. Los nuevos que me regaló el ipi, amigos de generación, de otras divisiones y sobretodo de laboratorio. A mis dos personas favoritas de lab, Anita y Faby, quiénes siempre me apoyaron, confiaron en mí y me dejaron hacerles bromas todo el día.

A las locas de mis roomies, Val y Gab, fue un placer haber compartido tanto con ustedes y con los niños, Botitas y Ares Alejandro.

Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por su confianza, su apoyo, sus consejos y sus bromas. Por su gran paciencia y el gusto que compartimos por los deportes.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga, por sus consejos, su empatía y su conocimiento.

Al Dr. Luis Antonio Salazar Olivo, por su apoyo y sus recomendaciones para poder realizar el presente trabajo.

A la Dra. María Jazmín Abraham Juárez por formar parte de mi comité y por sus observaciones.

A la gran ayuda de los técnicos: Rosalba Castillo, Salvador Ambriz, Ana Luz Romero y Verónica Zarate.

A la excelente ayuda de Fabiola Ramírez, gracias por su amistad y por su gran apoyo en mi proyecto.

Al laboratorio de Biología Molecular de Plantas, el número 1.

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

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia del tomate y afectaciones causadas por la bacteria patógena <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	1
1.1.1. El papel de la sumoilación en las plantas	2
1.1.2. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) y la vía del RNA de interferencia (RNAi)	4
1.2. Edición génica por el sistema CRISPR/Cas9	6
1.2.1. Empleo de plataformas bioinformáticas para la reducción de blancos no deseados (off-targets)	8
1.2.2. Métodos de transformación con CRISPR/Cas9	12
1.2.2.1. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
1.2.2.2. Biobalística	13
2. RESULTADOS	14
2.1. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)	14
2.1.1. Identificación y obtención del fragmento a silenciar del gen <i>SCEI</i> y quelatasa	14

2.1.2.	Clonación del fragmento de <i>SCEI</i> y <i>ChII</i> en el vector ToMoV	15
2.1.3.	Biobalística y reto con <i>Cmm</i>	15
2.1.4.	Monitoreo del silenciamiento y avance de la enfermedad	16
2.2.	<i>CRISPR/Cas9</i>	19
2.2.1.	Diseño de guías	19
2.2.2.	Clonación de guías únicas	20
2.2.3.	Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
3.	DISCUSIÓN	25
3.1.	<i>Silenciamiento génico por virus (VIGS)</i>	25
3.2.	<i>CRISPR/Cas9</i>	29
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1.	<i>Ensayo con VIGS</i>	33
4.1.1.	Material biológico, crecimiento e infección de plantas	33
4.1.2.	Diseño de oligonucleótidos y clonación de fragmentos en el vector ToMoV Δ CP	33
4.1.3.	Inoculación del vector VIGS por biobalística y reto con <i>Cmm</i>	35
4.1.4.	Extracción de ARN y síntesis de cDNA de plantas inoculadas con VIGS	36
4.1.5.	Cuantificación por RT-qPCR de la expresión del gen <i>SCEI</i> y sus parálogos	37
4.2.	<i>CRISPR/Cas9</i>	38
4.2.1.	Diseño de guías para el knockout de <i>SCEI</i> y <i>ChII</i> por CRISPR/Cas9	38
4.2.2.	Clonación por Golden gate de guías únicas	38
4.2.3.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 por electroporación con guías únicas y de tomate mediante cultivo <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	39

4.2.3.1. Cultivo <i>in vitro</i> , transformación mediante sistema de co-cultivo	40
4.2.3.2. Transformación in planta mediante sonicación con <i>Agrobacterium</i>	41
4.2.4. Extracción de DNA de callos y plántulas y obtención de productos de PCR para verificar la edición génica por secuenciación	42
5. CONCLUSIONES	44
TABLAS	45
FIGURAS	49
BIBLIOGRAFÍA	61

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para la obtención del fragmento de <i>SCEI</i> y de <i>Chl</i> con los sitios de corte <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> .	45
Tabla 2. Diseño de guías para construcción como guía única y multiplex de <i>SCEI</i> y <i>Chl</i>	45
Tabla 3. Oligonucleótidos para síntesis de guías de <i>Chl</i>	46
Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para secuenciación del gen <i>SCEI</i> , sus parálogos y quelatasa.	46
Tabla 5. Guías específicas de <i>SCEI</i> en <i>N. tabacum</i>	47
Tabla 6. Oligonucleótidos específicos para RT-qPCR del gen <i>SCEI</i> y sus parálogos	47
Tabla 7. Protocolo de ensamblaje de “Golden Gate”	47
Tabla 8. Medios específicos para transformación de tomate	48

Lista de figuras

Figura 1. Silenciamiento génico mediado por siRNA	49
Figura 2. Esquema general del sistema CRISPR/Cas9	49
Figura 3. Análisis del gen <i>SCEI</i> por medio de VIGS tool de Solgenomics	50
Figura 4. Amplificación del fragmento de <i>SCEI</i> y <i>ChII</i>	51
Figura 5. Verificación del fragmento del gen <i>SCEI</i> y <i>ChII</i> en ToMoV	51
Figura 6. Fenotipo de <i>S. arcanum</i> 2157-28 días post inoculación (dpi)	52
Figura 7. Fenotipo de <i>S. arcanum</i> 2172 y <i>S. lycopersicum</i> -28 dpi	52
Figura 8. Alineamiento de secuencias de cDNA de <i>SCEI</i> y sus parálogos	53
Figura 9. Análisis de los parálogos por medio de VIGS tool de Solgenomics	54
Figura 10. Nivel de expresión del gen <i>SCEI</i> y su parálogo (44260) determinado por RT-qPCR 8 horas después del reto con <i>Cmm</i> en <i>S. arcanum</i> 2172	55
Figura 11. Nivel de expresión de los parálogos 78620 y 88680 del gen <i>SCEI</i> determinado por RT-qPCR 8 horas después del reto con <i>Cmm</i> en <i>S. arcanum</i> 2172	56
Figura 12. Predicción de guías con el programa CCTop	57
Figura 13. Esquema de clonación de guías para CRISPR/Cas9.	57
Figura 14. Verificación por PCR de clonación de guías.	58
Figura 15. Transformación con <i>Agrobacterium</i> de <i>S. lycopersicum</i> cv. Ailsa Craig, Micro-Tom, y <i>S. arcanum</i> 2157.	58
Figura 16. Análisis de edición génica de secuencia obtenida de callo contra la del gen <i>SCEI</i> descrita en NCBI.	59
Figura 17. Confirmación por PCR de transformación con <i>Agrobacterium</i> de diferentes callos con guías específicas.	59
Figura 18. Plántulas obtenidas después de la transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> directamente en semilla con sonicación.	60
Figura 19. Transformación en hojas de <i>N. benthamiana</i> .	60

Resumen

Análisis funcional del gen *SCEI* relacionado con resistencia bacteriana en tomate silvestre mediante un vector viral y CRISPR/Cas9

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas de mayor interés económico a nivel mundial, sin embargo, es un cultivo susceptible a diversos patógenos, entre los que sobresale *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), bacteria causante de la devastadora enfermedad del chancro bacteriano del tomate. Dicha enfermedad se ha propagado rápidamente por todo el mundo, causando grandes pérdidas económicas porque no existen tratamientos curativos o preventivos eficientes. En el 2011, Lara-Ávila llevó a cabo un análisis de la expresión génica de un cultivar comercial y dos especies silvestres de tomate, en el curso de sus interacciones con *Cmm*, en el que identificó diversos genes que se sobreexpresaron horas después de la infección. Uno de éstos genes fue el que codifica a la enzima de conjugación SUMO E2 (*SCEI*) la cual interviene en el proceso de sumoilación, sugiriendo que juega un papel en la respuesta de defensa temprana. Por lo anterior, el objetivo de mi trabajo fue realizar un estudio funcional del gen *SCEI* y de sus parálogos, utilizando dos estrategias diferentes: a) silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) y, b) la generación de un knockout de *SCEI* por la tecnología de CRISPR/Cas9. En ambos casos, la finalidad fue corroborar si el gen *SCEI* está involucrado en la defensa de la planta, y si es un gen esencial para el desarrollo de la misma. El vector viral para VIGS que contiene un fragmento del gen *SCEI* fue introducido por biobalística en las especies silvestres de tomate *S. arcanum* 2172 y 2157, y 60 días después fueron retadas con *Cmm*. Se analizó la expresión de *SCEI* y de sus 3 parálogos por RT-qPCR, 8 horas después del reto y se monitoreó, a la vez, el fenotipo de las plantas sanas y enfermas. Para la obtención de un knockout por CRISPR/Cas9 se clonaron guías específicas en el vector que contiene la endonucleasa Cas9 y otros componentes esenciales para el sistema, luego los vectores fueron usados para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de plantas de tomate, utilizando el sistema de co-cultivo y sonicación. Se obtuvieron diferentes niveles de silenciamiento en *S. arcanum* 2172 tanto para *SCEI* como de sus 3 parálogos, mismos que correlacionaron con el fenotipo de susceptibilidad observado en las plantas, lo cual indica que *SCEI* juega un papel en la defensa de respuesta temprana en la planta. Por el contrario, la especie más resistente, *S. arcanum* 2157 no presentó un claro desarrollo de la enfermedad, por lo que no fue necesario analizar el grado de silenciamiento del gen en cuestión. Finalmente, con la estrategia de CRISPR/Cas9 se lograron transformar explantes de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig y Micro-Tom, pero los resultados de secuenciación revelaron que no hubo edición génica alguna, probablemente porque la Cas 9 no está funcionando adecuadamente *in planta*. Es necesario estandarizar los protocolos de transformación tanto de biobalística como de *Agrobacterium*.

Palabras clave: Silenciamiento génico, edición génica, cáncer bacteriano, *SCEI*.

Abstract

Functional analysis of *SCEI* gene involved on the wild type tomato bacterial resistance through a viral vector and CRISPR/Cas9

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the vegetables of higher production and economic interest worldwide, however, it is susceptible to different pathogens attack, where outstands *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), a bacteria causative of the devastating disease the bacterial canker. This disease has rapidly propagated around the world, causing high economic losses since there are not efficient curative or preventive treatments. In 2011, Lara-Avila performed a genetic expression analysis during the interaction of commercial tomato and wild type species with *Cmm*, where he identified diverse genes that were overexpressed hours later after the infection. One of these genes was the one encoding the SUMO E2 conjugation enzyme (*SCEI*), which participates in the sumoylation process, suggesting that it plays a role on the early defense response. Therefore, the aim of this work was to develop a functional analysis of *SCEI* gene and its paralogous through two approaches: a) the virus-induced gene silencing strategy (VIGS) and b) the generation of a *SCEI* gene knockout by the CRISPR/Cas9 technology to corroborate if it is involved in the plant defense and if it is an essential gene for the development of it. The viral vector for VIGS harboring a fragment of the *SCEI* gene was introduced by biolistic in the wild tomato species *S. arcanum* 2172 and 2157, and 60 days later they were challenged with *Cmm*. The expression of *SCEI* and 3 paralogous was analyzed 8 hours after the challenge by RT-qPCR and at the same time, the phenotype of the healthy and diseased plants was recorded. To obtain the knockout by CRISPR/Cas9, specific guides were cloned into a vector harboring the endonuclease Cas9 and other essential components for the system. Then, the vectors were used for the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of tomato plants using the co-culture system and sonication. Different silencing levels were obtained in *S. arcanum* 2172 both for *SCEI* and the paralogous, which correlated with the susceptible plant phenotypes observed, indicating that *SCEI* plays a role in plant early defense response. Conversely, *S. arcanum* 2157, the most resistant specie, did not show a clear development of the disease, therefore it was not necessary to analyze the silencing level of *SCEI*. Finally, with the CRISPR/Cas9 strategy we managed to transform explants from *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig and Micro-Tom, however, the sequencing results obtained indicate that there was not gene edition at all, probably because the Cas 9 is not working properly *in planta*. It is necessary to standardize the transformation protocols both for ballistic and *Agrobacterium*.

Key words: gene silencing, gene edition, *bacterial canker*, *SCEI*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del tomate y afectaciones causadas por la bacteria patógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las principales hortalizas de mayor producción y de interés económico a nivel mundial. La demanda de dicha solanácea crece continuamente por el alto valor nutritivo de su fruto, el cual suele consumirse tanto fresco como procesado. Según la FAO (2017), China encabeza la lista de principales productores con 52,722,967 ton, seguido por India y Estados Unidos con 18,735,910 y 14,516,060 ton respectivamente. México se encuentra en el décimo lugar, con una producción de 3,536,305 ton, donde el estado de Sinaloa asume el primer lugar en producción anual con 813 mil ton y lo sigue San Luis Potosí con 200 mil ton.

La principal limitante para la producción de esta hortaliza es su susceptibilidad a ataques por diversos patógenos que incluyen hongos, bacterias, virus, entre otros. Dentro de las bacterias fitopatógenas sobresale *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), una bacteria Gram positiva causante de la enfermedad conocida como cáncer o chancro bacteriano del tomate. Dicha enfermedad fue reportada por primera vez en 1910 en Estados Unidos, y se ha propagado rápidamente por todo el mundo, dejando pérdidas económicas tanto en cultivos a cielo abierto como en invernadero, pues además de afectar los rendimientos, disminuye la calidad de fruto [Sen et al., 2015]. En Canadá se presentó una merma en el 84% de sus campos comerciales. A su vez, México reportó la pérdida de 40 millones de dólares a causa de *Cmm* en el estado de

Sinaloa [Borboa Flores et al., 2009]. Dicho patógeno se encuentra bajo estricta cuarentena internacional por la Organización Protectora de Plantas Europea.

Los principales síntomas que presenta la planta al ser invadida por *Cmm* es el marchitamiento unilateral de las hojas, chancros en el tallo y en los frutos, y finalmente necrosis de todos los tejidos que resulta en la muerte de la planta [Chalupowicz et al., 2010; Tripathi et al., 2018]. En la actualidad no existen tratamientos o estrategias preventivas eficientes, por lo que el laboratorio de biología molecular de plantas del IPICYT se ha dedicado a buscar una solución a este grave problema. En el 2011, Lara-Ávila y colaboradores realizaron un análisis de la expresión génica durante la interacción tomate-*Cmm* de un jitomate domesticado susceptible y dos especies silvestres resistentes (*S. habrochaites* LA2128 y *S. peruvianum* LA2172), en el que identificaron una sobreexpresión a las 8 horas post infección en las especies silvestres, y una ligera represión en la especie susceptible, de los genes que codifican las siguientes proteínas: endoquitinasa básica de 30 kDa, subunidad beta tipo 3 del proteasoma (PBC1) y la enzima de conjugación SUMO E2 (*SCEI*). La alta expresión en las primeras 8 horas después de la infección, sugiere que estos genes tienen un papel en la defensa temprana de la planta. Por su parte, el producto del gen *SCEI* interviene en el proceso de sumoilación, el cual realiza la modificación post-traducciona de diversas proteínas blanco por la adición del pequeño modificador relacionado con ubiquitina (SUMO, por sus siglas en inglés, small ubitiquin-related modifier).

1.1.1. El papel de la sumoilación en las plantas

Las modificaciones post-traduccionales de proteínas, como la metilación, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación y sumoilación, juegan un papel decisivo en diversos procesos biológicos. Además, dichas modificaciones intervienen en procesos de diferenciación celular, desarrollo y respuesta a estrés [Xiong and Wang, 2013; Castaño et al., 2017; Zhang et al., 2017]. La sumoilación es un proceso que involucra la unión covalente del polipéptido SUMO a una proteína específica. La vía de modificación es muy similar a la de ubiquitinación, pero difiere de ésta en la finalidad de la misma, ya que aquellas proteínas etiquetadas con ubiquitina terminan en degradación. Por el contrario, la modificación por SUMO conduce a diferentes resultados o escenarios, dependiendo de los sustratos [Guo et al., 2008; Sanchez-Duran et al., 2011]

El mecanismo de sumoilación es dependiente de ATP y con una etapa de activación y conjugación afín a la ubiquitinación. La activación de SUMO es llevada a cabo por la enzima E1, y su conjugación es mediada por la enzima E2 (*SCE1*), también conocida como Ubc9 o enzima de conjugación-SUMO. La transferencia al sustrato puede ser directa o asistida por ligasas SUMO. A su vez, la adición de SUMO ocurre únicamente en residuos de lisina [Miura and Hasegawa, 2010; Sanchez-Duran et al., 2011].

Se han identificado diversas modificaciones por sumoilación en respuesta a diferentes señales, como el frío extremo, el calor, estrés salino, floración, entre otras. Además, se ha observado que SUMO juega un papel importante en la defensa de la planta, ya que su expresión es alterada en la infección de ésta por patógenos y, asimismo, influye en la inmunidad innata [Sanchez-Duran et al., 2011; Guo and Sun, 2017]. Por otro lado, algunos patógenos pueden intervenir en la

manipulación del proceso de sumoilación del hospedero, contribuyendo a modificar el entorno para favorecer su propagación, conjugando o desconjugando SUMO [Sanchez-Duran et al., 2011; Castaño et al., 2017].

La enzima esencial para llevar a cabo la sumoilación es *SCEI*, que además es fundamental para el desarrollo normal de la planta; sin embargo, ésta puede tolerar niveles bajos de *SCEI* más no una mutación nula, ya que en *Arabidopsis* ha mostrado ser letal [Saracco et al., 2007; Sanchez-Duran et al., 2011]. Esparza y colaboradores (2015), realizaron silenciamiento del gen en *S. peruvianum* (especie silvestre de tomate de carácter resistente) por medio de un vector viral, y sus resultados sugieren que la enzima de conjugación E2 interviene en la respuesta de defensa de la planta ante *Cmm*. Por su parte, Castaño y colaboradores (2017), establecieron una inhibición de la conjugación de la sumoilación en *Arabidopsis* y se dieron cuenta de que la planta se vuelve más susceptible a los hongos necrótrofos *Botrytis cinerea* y *Plectosphaerella cucumerina*.

1.1.2. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) y la vía del RNA de interferencia (RNAi)

Se puede identificar la función de un gen en particular que responde al estrés en plantas, induciendo o reprimiendo el nivel de expresión del mismo. Un método eficiente para realizar el análisis funcional del gen de interés es el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). Esta tecnología se basa en el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional con el que cuenta la planta, ya que le permite regular la expresión génica degradando el mRNA. Esto juega un papel

crucial en la planta como sistema de defensa contra virus, puesto que ataca directamente la integridad del genoma viral [Valentine, 2004; Lam et al., 2015].

Se han desarrollado diversos tipos de vectores de silenciamiento a partir de virus de RNA o DNA, con diferente rango de hospederos, iniciando en *N. benthamiana*, hasta implementarlos en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*. Algunos tipos de virus empleados son el virus X de la papa, el virus del mosaico del tabaco y el virus del cascabeleo del tabaco (TRV), entre otros [Valentine, 2004; Fu et al., 2005]. Las secuencias complementarias al gen blanco se pueden insertar en sitios específicos del genoma viral sin destruir su infectividad, de tal forma que al replicarse se produce RNA de doble cadena, el cual es degradado y se induce el silenciamiento del gen de interés como respuesta de defensa en la planta hacia el invasor [Watson et al., 2005]. El vector viral utilizado en el presente trabajo fue construido por Esparza y colaboradores (2015), en el que se eliminó parte del gen que codifica la proteína de la cápside del Virus del Moteado del Tomate (ToMoV) para poder insertar fragmentos de cDNA que al transcribirse con promotores convergentes genera los blancos de la maquinaria de silenciamiento en tomate y otras plantas afines.

VIGS activa la vía del RNA de interferencia (RNAi) y esto sucede cuando las plantas son invadidas con un virus que al transcribir un fragmento de un gen en ambas direcciones produce RNAs de doble cadena, los cuales son blancos de la degradación mediada por la ribonucleasa clase III llamada DICER, y por el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés, *RNA-induced silencing complex*). Si el fragmento presenta homología a un gen específico del huésped, los transcritos del gen diana son degradados por la maquinaria de

silenciamiento celular, como mecanismo de defensa [Holzberg et al., 2002; Kant and Dasgupta, 2017]. En la Figura 1 se presenta el proceso de generación y acción del RNAi, el cual se puede resumir de la siguiente manera: el ARN de doble cadena (dsRNA) es procesado por Dicer en pequeños fragmentos de ARN de 21 nucleótidos (nt), para luego ser cargados en una sola hebra en el complejo RISC. Finalmente, se lleva a cabo el silenciamiento cuando el siRNA localiza las secuencias de ARNs monocatenarios afines por el apareamiento de bases de Watson y Crick, guiados por una proteína Argonauta y cortados por la enzima slicer, dando lugar a la degradación de los transcritos [Hammond, 2005; Watson et al., 2005].

1.2. Edición génica por el sistema CRISPR/Cas9

El desarrollo de tecnologías para la edición genómica ha revolucionado la investigación biológica, permitiendo la modificación de manera específica y controlada de la información genética de diversos organismos, lo que ha brindado grandes beneficios en los campos de la biomedicina, la biotecnología y la industria. La edición genómica se realiza por nucleasas sitio-dirigidas, como las endonucleasas con dedos de zinc (ZFNs, por sus siglas en inglés), las nucleasas unidas a efectores de tipo activador transcripcional (TALENs), y las endonucleasas guiadas por RNA, mejor conocidas como sistemas de repetidos palindrómicos cortos agrupados y regularmente interespaciados (CRISPR) asociados a la nucleasa Cas9 (CRISPR/Cas9). Todas ellas permiten el corte de sitios definidos en el DNA de doble cadena (DSB), que posteriormente puede ser reparado por dos diferentes mecanismos: por combinación de extremos no homólogos (NHEJ) o por

recombinación homóloga (HR). Como se presenta en la Figura 2, cada proceso altera de manera diferente el genoma; el primero ocasiona inserciones o deleciones (indels) que pueden cambiar la fase de lectura del gen de interés y provocar la pérdida de su función; el segundo mecanismo conduce a una modificación precisa, como el reemplazo génico [Ito et al., 2015; Kim et al., 2015; Ueta et al., 2017].

La tecnología CRISPR/Cas9 comparada con los ZFNs y TALENs, proporciona una plataforma más versátil y robusta para la edición de genomas, ya que tiene un diseño sencillo y menos costoso que dichas endonucleasas sintéticas [Wang et al., 2015]. Existen diferentes tipos de sistemas de CRISPR/Cas, que constan de distintos elementos para llevar a cabo el corte en secuencias muy específicas. El más estudiado es el sistema de tipo II, originario de *Streptococcus pyogenes*. Está constituido por la nucleasa Cas9 que contiene dos dominios de escisión de DNA, RuvC y HNH, un crRNA (RNAs cortos derivados de un transcrito del locus de CRISPR que contiene 20 nt complementarios al DNA blanco), y finalmente un crRNA transactivador (tracrRNA) que forma una estructura de horquilla en el extremo 3' e interactúa con la endonucleasa Cas9. Estos dos últimos componentes pueden fusionarse y dar como resultado una molécula quimérica de aproximadamente 100 nt conocida como guía única de RNA (sgRNA), que permite dirigir el corte específico por Cas9, donde dicha endonucleasa reconoce un motivo protoespaciador adyacente (PAM), con la secuencia 5'-NGG, indispensable para realizar el DSB 3 nucleótidos río arriba de este motivo [Butler et al., 2015; Jacobs et al., 2015; Char et al., 2017].

Esta nueva tecnología se usa para el análisis de expresión de genes en plantas, orientadas a identificar patrones moleculares de genes involucrados en

resistencia a enfermedades mediante análisis funcional, y su interpretación puede usarse para el mejoramiento genético de cultivos. En la actualidad se usa la estrategia del RNA de interferencia (RNAi), para el análisis funcional de genes específicos. Dicha estrategia se basa en reducir los transcritos de un gen en particular como un tipo de silenciamiento, generando “knock-downs”, pero no permite realizar la inactivación completa del gen, mejor conocido como “knock-out” y tampoco hace factible un reemplazo o modificación génica permanente, como la generada por el sistema CRISPR/Cas9.

1.2.1. Empleo de plataformas bioinformáticas para la reducción de blancos no deseados (off-targets)

Se ha descrito un sistema muy sencillo y dinámico para la edición de genomas y para la regulación de la expresión génica, no obstante, su principal desventaja es la generación de DBS en blancos no deseados (“off-targets, en inglés), que son secuencias que tienen gran similitud al segmento de interés. Puesto que un segmento de tan sólo veinte nt puede emerger varias veces en un genoma dado y algunos desajustes parecen ser aceptados por el complejo CRISPR/Cas9, es coherente tener como resultados diversos off-targets. Esto puede ser crítico en el campo de la terapia génica, ya que se busca realizar una modificación correctiva en un gen defectuoso, pero a la vez la manipulación del DNA puede originar enfermedades genéticas por la inducción de mutaciones en otros genes, por lo que es primordial el diseño de guías de alta especificidad para la secuencia blanco. En las plantas, puede aprovecharse esta “desventaja” y generar knockouts en múltiples

genes, como es el caso de los parálogos, ya que pueden presentar un alto grado de homología y, por ende, ser afectados por la misma Cas9 [Endo et al., 2015].

Aunado a esto, para llevar a cabo la correcta elección de una guía se debe tomar en cuenta la región “seed” o semilla, el segmento de 12 nt más cercano a la secuencia PAM o al extremo 3'. Esta es la zona más importante de la guía, ya que debe ser 100% complementaria a la secuencia blanco, de lo contrario, puede disminuir la eficiencia del corte y la generación de off-targets. Diversos estudios han mostrado que la Cas9 permite incompatibilidades o “mismatches” en los nucleótidos restantes de la guía (más cercanos al extremo 5'), inclusive han sugerido que la endonucleasa acepta hasta cinco mismatches en la región seed [Ran et al., 2013; Anderson et al., 2015].

Para remediar este problema de off-targets, se han desarrollado diversas plataformas web para llevar a cabo una predicción de guías del gen de interés, aprovechando el uso de algoritmos y el desarrollo de la bioinformática. Cada una de ellas tiene como ventaja el uso de parámetros que pueden ser modificados por el usuario, como el tipo de promotor utilizado, la secuencia PAM, limitaciones en el extremo 5 o 3' de la guía, el tamaño del segmento de predicción, entre otros. La principal limitante en cada una de estas herramientas web, es el listado de organismos que manejan, ya que no cuentan con todos los genomas en sus plataformas (esto es una desventaja para el usuario cuando su organismo de estudio no está en el registro y, por ende, no pueden predecirse las guías). Algunas de las plataformas utilizadas en este trabajo son: CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>), CCTop (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>),

CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), y CRISPR-P (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>).

CHOPCHOP es una herramienta versátil para un buen diseño de guías (<http://chopchop.cbu.uib.no/>), permite la modificación de diversos parámetros y el ingreso de una secuencia en distintas formas, como identificador génico, locus o hasta secuencia FASTA. Además, su registro cuenta con diversos tipos de organismos, entre ellos mamíferos, vertebrados, insectos, plantas, bacterias, entre otros. Además, posibilita un direccionamiento de guías hacia diferentes porciones del gen blanco, incluyendo regiones codificantes o intrónicas. Asimismo, permite anclar en la región promotora mediante el uso de dCas9, una mutante de Cas9 que carece de actividad endonucleolítica y que funciona como un regulador de la expresión génica cuando es fusionada a un dominio represor o activador. Por último, permite el implemento de CRISPR/Nickase para realizar un DBS más efectivo con el uso de un par de nucleasas que cortan una cadena (nickasas), dirigidas tanto a la hebra sentido como a la antisentido, reconociendo una unión de estos cortes individuales a 10-31 pb [Ran et al., 2013; Labun et al., 2016].

La interfaz de CCTop ofrece un diseño más completo que CHOPCHOP, puesto que permite modificar más parámetros y facilita información más específica de los off-targets. Puede trabajar una secuencia de manera individual o en lote. De igual forma, brinda una larga lista de organismos, entre ellos *S. lycopersicum* y *N. benthamiana*, y ofrece al usuario generar limitaciones en los extremos 5 y 3' de la guía en cuestión. Justificando estas restricciones, un estudio en *C. elegans* demostró que el uso de una guía con terminación NGG en el extremo 3' (cercano a

la secuencia PAM) produce una mayor eficiencia en el DBS, tanto en el mecanismo de NHEJ como en HDR [Farboud and Meyer, 2015].

La plataforma CRISPOR cuenta con 120 genomas, incluyendo los organismos *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Drosophila*, entre otros. Esta nueva herramienta no permite modificar los parámetros como en CCTop, sólo permite el cambio en la secuencia PAM necesaria. Los resultados exhibidos indican la eficiencia de cada guía (dando un puntaje y señalando con diferentes colores), la cantidad de off-targets que se pueden generar y el sentido de la cadena a la cual se dirige la guía. Además, permite descargar los resultados en tablas de Excel, indicando cada guía con los off-targets generados (indican sus coordenadas genómicas) y sus respectivos mismatches. Por último, el algoritmo que utiliza evade el diseño de guías ricas en GC, ya que se ha demostrado que un alto contenido baja la eficiencia de la edición [Eschstruth et al., 2016].

El sistema CRISPR/Cas9 se ha implementado en diversos organismos como bacterias, animales y plantas y se han desarrollado diversas plataformas bioinformáticas para el diseño adecuado de guías (anteriormente descritas), minimizando el efecto de los off-targets, ahora bien, CRISPR-P se ha enfocado a un solo grupo de estos organismos, las plantas. Dicha propuesta permite diseñar guías específicas de 42 genomas y en esta plataforma se basan los trabajos más recientes de edición génica. Asimismo, permite modificar algunos criterios como la selección de promotor, nucleasa y tamaño de secuencia, ofreciendo resultados muy descriptivos: porcentaje de GC por cada guía, la posición donde se hace el anclaje (exón/intrón), mismatches, off-targets e identificación génica [Lei et al., 2014; Liu et al., 2017].

1.2.2. Métodos de transformación con CRISPR/Cas9

La eficiencia del sistema CRISPR/Cas no sólo recae en el diseño de su guía y de la nucleasa empleada, sino también el método de transformación utilizado. En diversos reportes de edición génica en plantas se ha implementado el uso de *Agrobacterium* y biobalística para acarrear el vector con la Cas9 y su respectiva sgRNA.

1.2.2.1. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Char y colaboradores (2017) publicaron un trabajo donde generaron mutaciones en dos genes del maíz, que codifican la Argonauta 18 y la Dihidroflavonol 4-reductasa. El vector tenía como componentes principales a la Cas9, el promotor U6, el tracrRNA y por medio de una doble clonación se realizó la inserción del fragmento de doble cadena como guía. A continuación, llevaron a cabo el proceso de transformación por medio de *Agrobacterium tumefaciens*. Se logró obtener mutantes con indels provocadas por el mecanismo de reparación predominante en plantas, NHEJ, por lo que comprobaron que la transformación por *Agrobacterium* es muy efectiva [Char et al., 2017].

En otro estudio se hizo la comparación de dos promotores para la correcta edición del genoma mediados por la transformación con *Agrobacterium* en *Arabidopsis*. Se comparó el promotor YAO (expresado comúnmente en los tejidos con división celular activa como el meristemo radicular) y el 35S de CaMV, un promotor fuerte constitutivo. Se obtuvieron altos índices de mutación en las transformaciones con el promotor YAO y menores porcentajes en las que contenían

el 35S [Yan et al., 2015]. De lo anterior se puede concluir que es necesario seleccionar un promotor eficiente, aunque la transformación sea por *A. tumefaciens*.

1.2.2.2. Biobalística

El bombardeo con micropartículas es un método eficaz para la introducción de DNA a las células vegetales, y ofrece la ventaja de lograr una transformación estable de cloroplastos y mitocondrias. Es una buena alternativa de inoculación sin el trabajo que conlleva *Agrobacterium*, en cuestión de tiempo, y evita respuestas de defensa de la planta a la misma bacteria. Su punto crítico es el daño físico que puede ocasionar en la planta al momento de ser bombardeada, por lo que es necesario controlar adecuadamente los parámetros de disparo como presión y distancia al objetivo [Ghorbanzade and Ahmadabadi, 2015; Carqueijeiro et al., 2015; Srinivas et al., 2016].

2. RESULTADOS

2.1. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

2.1.1. Identificación y obtención del fragmento a silenciar del gen *SCEI* y quelatasa

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, el Dr. Pablo Lara mediante la técnica de cDNA-AFLP, identificó que el gen *SCEI* se sobreexpresaba al retarse una planta silvestre con *Cmm*, y posteriormente la Dra. Mayra Esparza introdujo un fragmento de ese gen en el vector VIGS desarrollado en su trabajo de doctorado. En el presente trabajo utilizamos una herramienta bioinformática adicional, que ayuda a identificar la región más adecuada para silenciar el gen *SCEI* (Figura 3) y el gen de quelatasa (*Chl*) mediante la herramienta VIGS de la plataforma Solgenomics (<http://vigs.solgenomics.net/>), que evita regiones tallo-asa para que pueda haber mejor unión de la doble cadena de RNA. El gen de quelatasa se usa como control del proceso de silenciamiento, ya que al silenciar ese gen se ve un fenotipo de blanqueamiento en la planta. Los resultados obtenidos fueron fragmentos de 300 pares de bases, y a partir de éstos se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 1), que flanquean aproximadamente el 90% de dichas secuencias. Además, cada oligonucleótido contenía los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII* para poder clonar el fragmento deseado en el vector viral ToMoV.

Se obtuvieron por medio de PCR los fragmentos de aproximadamente 300 pb tanto para el gen *SCEI* (Figura 4A) como de *Chl* (Figura 4B) a partir de cDNA de *S. arcanum* 2157. Asimismo, se purificaron dichos productos y se corroboraron por secuenciación.

2.1.2. Clonación del fragmento de *SCEI* y *ChII* en el vector ToMoV

Una vez purificados los productos de PCR de *SCEI* y *ChII*, se digirieron con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para ser ligados subsecuentemente al vector ToMoV Δ CP que también había sido digerido con esas enzimas. Dichas construcciones se corroboraron por digestión (Figura 5), y por secuenciación. Los vectores resultantes se denominaron ToMoV_*SCEI* y ToMoV_*ChII*.

2.1.3. Biobalística y reto con *Cmm*

Para poder realizar un silenciamiento adecuado se requiere linealizar los componentes genómicos A y B del ToMoV para ser bombardeados y permitir que completen el ciclo de replicación en la planta. Una vez verificadas las construcciones ToMoV_*SCEI* y ToMoV_*ChII* se procedió a digerir cada una de éstas con la enzima *ApaI* para liberar el componente A de ToMoV, ya que es un sitio único en el que fue clonado en el plásmido Bluescript (pBS II SK+/-). Asimismo, se digirió con *ApaI* el componente B del mismo vector viral. Una vez liberado cada componente viral, se realizó la preparación de micropartículas de tungsteno con una proporción 1:1 de cada componente, es decir, 1 μ g de ToMoV_*SCEI* mezclado con 1 μ g de ToMoV_B, 1 μ g de ToMoV_*ChII* con 1 μ g de ToMoV_B, y por último, ToMoV_ Δ CP como control negativo del silenciamiento con su respectivo componente B. Se trabajó con las especies silvestres *S. arcanum* 2157 y 2172, y se bombardearon 10 plantas por tratamiento, las cuales fueron retadas con la bacteria *Cmm*. Para los controles de silenciamiento con la construcción del gen de la quelatasa sólo usamos 5 plantas. Además, como control se utilizaron 6 plantas de la especie susceptible (*S.*

lycopersicum) de las cuales la mitad de éstas fueron retadas con *Cmm* (control de la infección) y 3 no fueron inoculadas, como control negativo.

Plantas de 40 días de edad fueron bombardeadas con una pistola de helio con los diferentes tratamientos (ToMoV_*SCEI*, ToMoV_*ChI* y ToMoV_ Δ CP) usando microproyectiles de tungsteno con una presión de 600 psi, colocando la planta entre 10 a 15 cm de distancia. Después de dicha inoculación, se mantuvieron en invernadero durante 60 días bajo una temperatura de 25°C, para luego ser retadas con *Cmm*. Se recolectó muestra a las 0 y 8 horas después de la infección.

2.1.4. Monitoreo del silenciamiento y avance de la enfermedad

Se observó el fenotipo de las plantas de cada tratamiento, y se constató que *S. arcanum* 2157 no presentó daño o deterioro a simple vista, sólo desarrolló chancros en algunos de sus tallos, pero su crecimiento fue normal (Figura 6A, B), lo cual era de esperarse pues es la especie más resistente a *Cmm*, y nuestro grupo de investigación ha observado que no puede ser infectada por ToMoV, y por lo tanto el VIGS no es funcional en plantas de esta especie. En el caso de *S. arcanum* 2172, las plantas bombardeadas con ToMoV_*SCEI* y retadas con *Cmm* presentaron marchitez y daño en las hojas laterales, además de chancro en sus tallos (Figura 7A, B). Por el contrario, las plantas silenciadas con la misma construcción, pero sin reto presentaron un desarrollo normal (Figura 7C), lo que sugiere que no es un gen esencial para el desarrollo. A su vez, plantas que no se bombardearon y fueron retadas mantuvieron un desarrollo normal (como era de esperarse pues es una especie resistente a *Cmm*), sólo exhibieron un poco de marchitez en sus hojas

laterales (Figura 7D). Por último, el control positivo que fue la especie susceptible *S. lycopersicum* presentó un daño total en la planta al ser retado con *Cmm*.

Como se muestra en la Figura 6, *S. arcanum* 2157 no presentó un fenotipo claro en cada tratamiento, por lo que se decidió dar por concluido este experimento. Ahora bien, *S. arcanum* 2172 presentó susceptibilidad al silenciar *SCEI*, y se observó diferencia en los fenotipos, por lo que se realizó PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión relativa del gen *SCEI*, y a diferencia del trabajo previo realizado por la Dra. Mayra Esparza, también analizamos la expresión de sus respectivos parálogos: Solyc03g044260, Solyc12g088680 y Solyc04g078620. Cada oligonucleótido se diseñó en una zona diferente para distinguir la expresión de cada uno de los cuatro genes como se muestra en la Figura 8A y 8B, donde se indican los oligonucleótidos tanto sentido como anti-sentido de cada una de las secuencias de cDNA. En la Figura 8C se señala el porcentaje de identidad obtenido por BLAST (herramienta de Solgenomics) que poseen los parálogos con respecto a *SCEI* (Solyc02g093110), donde Solyc03g044260 presenta 89.98%, Solyc12g088680 de 80.22% y, por último, Solyc04g078620 con 78.33%. Además, se realizó un análisis para cada uno de los genes con la herramienta VIGS y se verificó la alineación de cada parálogo con la secuencia de *SCEI* para definir si realmente el segmento clonado en ToMoV_*SCEI* afecta la expresión de los mismos (Figura 9).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la cuantificación relativa del gen *SCEI* (Figura 10A) que se llevó a cabo para *S. arcanum* 2172, se logró identificar silenciamiento en plantas con el vector ToMoV_*SCEI* retadas con *Cmm*, las cuales se pueden dividir en tres grupos por la variabilidad que presentan en su nivel de expresión. En el primer grupo de silenciamiento de *S. arcanum* 2172-*SCEI* el nivel

de expresión fue de 0.3311, 0.4437 y 0.3614, donde se engloban las muestras de SCE1, SCE4 y SCE5 respectivamente, en el segundo grupo de *S. arcanum* 2172-*SCEI* incluye la planta 3 y su nivel de expresión relativa fue de 0.8684 y por último el tercer grupo, *S. arcanum* 2172-*SCEI* planta 2 presentó un nivel de expresión aún más alto que el control (*S. arcanum* 2172 ToMoV_ΔCP + *Cmm*) con una expresión relativa de 1.7643. Los primeros dos grupos presentaron un nivel de expresión inferior con respecto al control, corroborando que el gen *SCEI* fue silenciado; sin embargo, en el último grupo de *S. arcanum* 2172-*SCEI* 2 aparentemente no hubo silenciamiento.

En la Figura 10B se presenta la cuantificación relativa del parálogo 44260, donde las 5 muestras de *S. arcanum* inoculadas con ToMoV_*SCEI* y retadas con *Cmm* exhiben un mayor nivel de expresión que el control ToMoV_ΔCP + *Cmm*, pero comparadas al nivel de expresión del gen *SCEI* de *S. arcanum* 2172 con y sin reto, la expresión de las plantas silenciadas es menor.

El análisis del nivel de silenciamiento del parálogo 78620 se indica en la Figura 11A, donde todos los tratamientos de *S. arcanum* 2172 con el vector ToMoV_*SCEI* y con reto, revelan claramente un nivel más bajo de expresión con respecto al control ToMoV_ΔCP + *Cmm*, un nivel que puede ir desde 0.0824 como es el caso de SCE2 o hasta 0.5824 para SCE4. Además, estos valores de expresión del gen *SCEI* son bastante menores al compararlos con el tratamiento de *S. arcanum* 2172 sin bombardear y con el reto, donde se muestra un nivel de expresión de 6.1883 para el parálogo 78620, confirmando el silenciamiento deseado en las otras muestras.

Finalmente, en la Figura 11B se presenta la expresión del último parálogo (88680), donde se exhiben diferentes niveles de expresión para cada uno de los tratamientos con el vector de *SCEI* y con reto, dos muestras (planta 4 y 5) sí se encontraron por debajo del control ToMoV_ΔCP + *Cmm*, con niveles de 0.7789 y 0.7027 respectivamente, sugiriendo silenciamiento de las mismas. Para SCE2 y SCE3 se obtuvieron valores más altos que el control ToMoV_ΔCP + *Cmm*, con 5.0330 y 1.0453 respectivamente. No obstante, todas las muestras con ToMoV_*SCEI* y con reto, tienen un nivel de expresión menor al tratamiento de *S. arcanum* 2172 sin bombardear y con reto, sugiriendo que hay silenciamiento del gen *SCEI* en éstas.

2.2. CRISPR/Cas9

2.2.1. Diseño de guías

Se llevó a cabo un escrutinio en diversas plataformas web, y en la Fig. 12 se muestra el resultado usando CCTop para la predicción de diferentes guías contra el gen *SCEI* y *ChlI* con el menor número de blancos no deseados. Se identificaron 3 guías para el gen de *SCEI* (Tabla 2), la primer guía es la más eficiente según las diversas plataformas porque presenta la menor cantidad de off-targets y tiene alta identidad con la secuencia blanco; la segunda se diseñó con el término –GG para hacer más eficiente el corte, ya que según el reporte de Farboud y Meyer (2015) este tipo de guía mejora el corte por Cas9, y la última sigue en la lista de las más adecuadas para realizar el corte en el segundo exón. Se utilizarán las dos primeras como guías únicas de manera independiente y en otra construcción las 3 guías en conjunto para el multiplex. Además, se diseñaron 3 guías más para los 3 parálogos de *SCEI* como

otro multiplex. Por último, como control se diseñaron 3 guías más para el gen *Chl1*, de las cuales una se manipuló como guía sencilla en un vector y en otra construcción se englobarían las 3 guías para conformar el multiplex.

2.2.2. Clonación de guías únicas

Se trabajó con el vector pKSE401 donado por el Dr. Amit Dhingra. Este vector, según Xing et al., (2014) funcionó con un 67% de eficiencia y en ese reporte se menciona puede aumentar utilizando 2 o más guías que hagan blanco en más sitios del gen de interés. El vector pKSE401 contiene el promotor U6, andamio, terminador, el gen que codifica para la nucleasa Cas 9 optimizado para plantas, con el borde izquierdo y derecho para transferir la información del vector mediante la transformación con *Agrobacterium*. En medio del promotor U6 y el andamio se encuentra una secuencia denominada “space holder” donde se insertará la guía deseada de 20 nucleótidos por medio de los dos sitios *Bsa1* que tiene en sus extremos. Cada guía se solicitó como oligonucleótido para hibridarse (Tabla 3), donde el oligonucleótido 5' contiene el sitio ATTG' y el 3' el sitio CAAA para rellenar los sitios de la enzima.

La clonación en el vector pKSE401 (Figura 13) se llevó a cabo hibridando cada guía entre sí, es decir, se mezclaron 10 μ L de oligonucleótido sentido y otros 10 μ L del reverso con una concentración de 100 μ M (cada uno), a una temperatura de 94°C y subsecuentemente decrementos de un grado por minuto hasta llegar a los 10°C. Seguido de esto, se realizó la clonación en el vector pKSE401 por medio de la técnica de ensamblado “Golden Gate” (Tabla 7). Una vez clonadas las 9 guías, se verificó cada una por secuenciación y por PCR (Figura 14), obteniendo un

producto de aproximadamente 700 pb que abarca desde el promotor U6 hasta el terminador.

2.2.3. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Se realizó transformación con las guías únicas gSC1, gSC2 y gCH1 clonadas en el vector pKSE401 en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 por electroporación, luego se realizó el co-cultivo de explantes de tomate, donde a pesar de hacer lavados cada dos días con antibiótico no se pudo controlar el exceso de bacteria, lo que llevó a la muerte de cada uno de los explantes de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig y *S. arcanum* 2157. Para tratar de solucionar este problema, se llevó a cabo una nueva transformación con las mismas guías, pero ahora en una cepa menos virulenta de *Agrobacterium*, la LBA4404. Se siguió el protocolo de transformación de tomate de Rodríguez-González (2014), agregando otros tipos de explantes además de hipocotilos, es decir, tanto cotiledones como hojas. La evolución de algunas transformaciones se presenta en la Figura 15.

Con respecto al progreso de las transformaciones con las diferentes guías únicas anteriormente descritas en LBA4404, se logró eliminar el problema del crecimiento excesivo de bacteria que se había presentado con la cepa GV3101, pero se presentó oxidación en los explantes, se iban perdiendo cada uno de éstos después de varias semanas de cambio de medio y en espera de su regeneración, se manifestó un exceso de condensación en todas las placas, teniendo que retirar el agua cada dos días. Como nueva solución a la condensación presentada, siguiendo el consejo de algunos integrantes de nuestro grupo de trabajo y con base

a su experiencia, se mantuvieron las placas bajo un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad por un día y al siguiente se volteaban, teniendo 24 h de oscuridad.

Se repitieron las transformaciones de cada una de las guías en *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig y Micro-Tom, aprovechando el rápido crecimiento de esta última para obtener explantes regenerados en un lapso más corto de tiempo. Sin embargo, persistió el problema de oxidación a pesar de que el medio de cultivo contaba con carbón activado el cual se ha utilizado en otros trabajos para reducir oxidación (Rodríguez-González, 2014). Aunque los explantes se desarrollaban correctamente como se muestran en la Figura 15(A-G), finalmente terminaban oxidándose y muriendo como se exhibe en la Figura 15H. Se sigue trabajando en este aspecto para lograr evitar oxidación, pero por cuestión de tiempo, solo pudimos reportar hasta esta etapa. De cualquier manera, se realizó extracción de DNA de diferentes callos (27 en total) para verificar si alguno de éstos se encontraba editado con la correcta transformación (Indels) de su respectiva guía, a dichas muestras se les extrajo DNA y se realizó PCR con oligonucleótidos diseñados específicamente para el gen *SCEI*, sus parálogos y el gen de la quelatasa (Tabla 3), que amplifican la región que abarca el blanco de la guía correspondiente (los 20 nt) y las otras bases adyacentes que pueden ser regiones exónicas o intrónicas según sea el caso. Los productos obtenidos se purificaron y se mandaron secuenciar. Los análisis de éstos 27 callos arrojaron secuencias idénticas a la planta sin transformación, es decir, sin edición como se muestra en la Figura 16, donde se alinea la secuencia genómica de *SCEI* obtenida de la base de datos de NCBI con la secuencia obtenida mediante secuenciación de un producto de PCR de una muestra de *S. arcanum* 2157 con la construcción gSC2, donde se confirma que no hay diferencia entre sus

nucleótidos y, por lo tanto, no hay edición génica (indels) en la misma. En esta etapa no sabíamos si las dificultades para editar la secuencia se debía a baja eficiencia en la actividad de Cas9 o a condiciones de transformación, por lo que se buscó otra alternativa para verificar la eficiencia de la transformación por *A. tumefaciens* (a diferencia del antibiótico de selección), y se realizó PCR para comprobar la presencia del gen que transcribe las guías únicas en las 27 extracciones de DNA anteriormente mencionadas y 9 más de otros callos, amplificando desde la región del promotor U6 de la guía hasta su terminador (producto de aproximadamente 700 pb), regiones que no se encuentran en un genoma de planta silvestre, y que al detectarse nos indicaría que se insertó este T-DNA en el genoma de la planta. Los resultados se presentan en la Figura 17 con 24 muestras positivas, además de contar en el segundo y tercer carril con un control negativo y positivo respectivamente. Del cuarto carril al diecinueve se encuentran las muestras con la gCH1, los trece siguientes callos con gSC1, los ocho carriles sucesivos presentan gSC2 y el último carece de muestra. Al menos esto nos indica que en algunas muestras si se insertó el T-DNA pero no está editándose el genoma al transcribirse la guía.

Además de haber realizado transformaciones por medio de cultivo *in vitro* como se mencionó anteriormente basado en el método de Rodríguez-González (2014), se llevó a cabo un nuevo método de transformación mediada por *Agrobacterium* pero directamente en la semilla, como sugiere Mayavan y colaboradores (2013) basado en sonicación, para ver si de esa manera se expresa mejor Cas9 o en ese tejido puede cortar mejor. Dicho tratamiento de sonicación en la semilla afectó el crecimiento de la misma, ya que tardaron más de 10 días en

germinar y desarrollar la plántula como tal, además de que algunas plántulas se encontraban más pequeñas que otras o simplemente carecían de raíz. La formación de hojas verdaderas fue más lenta de lo normal. Para verificar si realmente alguna de las plántulas se encontraba editada por la construcción del vector con la Cas 9 se extrajo DNA de 23 plántulas, se realizó PCR para amplificar el gen *SCEI* y se enviaron a secuenciar 14 muestras. Nuevamente los resultados fueron negativos, es decir, no se identificó algún cambio en los alineamientos. En la Figura 18 se muestran plántulas con el vector_CH1, donde se puede percibir la diferencia de tamaños entre éstas, además de lucir dos semillas sin germinar.

Finalmente, se realizó un nuevo diseño de guías específicas del gen *SCEI* (Tabla 4) para realizar transformación en *N. tabacum* y así obtener transformantes en un periodo más corto a diferencia de *Solanum*. Además, se realizó un alineamiento de las guías obtenidas en *S. lycopersicum* con la secuencia genómica de *SCEI* en *N. benthamiana*, coincidiendo gSC2 y gCH1 en las mismas, con algunos nucleótidos de diferencia por lo que se planteó que al menos esas dos guías podrían funcionar en tabaco. Seguido de esto, se realizó transformación en cultivo *in vitro* con las guías gSC2 y gCH1 en hojas de *N. benthamiana*, plantas de aproximadamente 4 semanas de edad. En la Figura 19 se presenta el progreso de la transformación anteriormente descrita con la construcción gCH1 después de dos semanas del co-cultivo, pero por cuestión de tiempo no se han obtenido brotes y no hemos podido realizar el PCR y secuenciación para verificar la edición del genoma.

3. DISCUSIÓN

3.1. Silenciamiento génico por virus (VIGS)

En la actualidad el estudio de genomas completos y secuencias génicas específicas de numerosas especies de plantas ha generado un conjunto masivo de datos crudos que se requieren anotar para convertirlos en información útil. Además, uno de los principales desafíos es identificar en dichas secuencias a genes que podrían estar involucrados en la resistencia a ciertas enfermedades. El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) es una estrategia muy útil para validar la función de un gen en particular, generando “knock downs” de una manera mucho más rápida que el proceso que conlleva una transformación estable, la cual es difícil de obtener en muchas especies; por otro lado, puede generar pérdida de función y observar un fenotipo de manera rápida [Fu et al., 2006].

Se han publicado un número importante de trabajos en los que se han construido y probado experimentalmente, diferentes vectores virales para llevar a cabo silenciamiento génico en distintas especies vegetales, como *N. benthamiana*, *Arabidopsis thaliana* y tomate [Valentine, 2004]. Existen vectores basados en RNA con alta efectividad en diferentes cultivos y otros de DNA, los cuales son más fáciles de transferir por diferentes métodos de transformación, como biobalística o por *Agrobacterium* [Purkayastha et al., 2010].

El vector viral derivado del virus moteado del tomate (ToMoV), empleado en el presente trabajo, fue desarrollado y probado en el 2015 por Esparza y colaboradores. En su estudio utilizó una secuencia parcial del gen *SCEI* obtenida previamente por Lara-Ávila et al., (2011) mediante la técnica de cDNA-AFLP y midió el grado de silenciamiento del VIGS mediante RT-qPCR, antes de retar la planta de

S. peruvianum LA2172 con *Cmm*. El nivel de silenciamiento obtenido respecto a la planta sin silenciar fue de un 40%. A diferencia del estudio anterior, en el presente trabajo se seleccionó la región de la secuencia del gen *SCEI* clonada en el vector ToMoV, mediante la herramienta de VIGS que presenta Solgenomics, la cual simula *in silico* los procesos de silenciamiento en la planta e identifica mediante algoritmos, la región de 300 a 500 nucleótidos que es la más adecuada para aumentar el porcentaje de silenciamiento. Fragmentos de aproximadamente 300 a 500 nucleótidos proporcionan una mayor eficiencia de silenciamiento mediante VIGS, pues los segmentos de mayor tamaño se pueden perder cuando el virus se mueve de una célula a otra [Shen et al., 2015].

Adicionalmente, se determinó el nivel de expresión tanto de *SCEI* (Solyc02g093110) como de sus parálogos (Solyc03g044260, Solyc12g088680 y Solyc04g078620) después del reto a las 8 horas con *Cmm*. Es importante mencionar que la eficiencia de VIGS depende de diferentes factores, entre ellos la edad de la planta al tiempo de ser inoculada, el vector viral utilizado, su método de introducción a la planta, el fotoperiodo, la temperatura de crecimiento y desarrollo de la planta. Se ha demostrado que el factor más importante es la temperatura, ya que de ésta depende la propagación viral y por ende, la eficiencia del silenciamiento [Shen et al., 2015; Kim et al., 2016]. En el presente análisis funcional del gen *SCEI* mediante VIGS, las plantas inoculadas con el ToMoV_*SCEI* mostraron un mayor daño por *Cmm* que los otros tratamientos, lo cual indica el papel de *SCEI* en defensa ya que al ser silenciado las plantas son más susceptibles. Aunque es importante resaltar que los fenotipos de susceptibilidad fueron más severos en el trabajo de Esparza-Araiza, 2015. Por otro lado, otra diferencia en este trabajo fue que se

realizó la cuantificación de la expresión génica a las 8 horas después del reto bacteriano y se calculó, asimismo, el nivel de expresión de cada parálogo de *SCEI*. Ahora bien, con respecto a los parálogos, según Senthil-kumar y coautores (2007), no es necesario que los genes exhiban un 100% de identidad para llevar a cabo un silenciamiento mediado por siRNA, la eficiencia de éste depende de la identidad que tenga la secuencia diana con los 21-23 nucleótidos correspondientes al siRNA. Esto significa que a pesar de que los parálogos de *SCEI* no presenten una identidad global del 100% (la menor es de Solyc04g078620 con 78.3% y la mayor es de Solyc03g044260 con 89.9%) la región clonada en el vector ToMoV_*SCEI* es similar en algún segmento de los parálogos como se indica en la Figura 9 y pueden ser silenciados por el siRNA.

Ahora bien, esta región clonada en el ToMoV_*SCEI* (93110), no siempre corresponde a la mejor región a silenciar de acuerdo al algoritmo del Solgenomics, en los otros parálogos, como en el caso del 88680 (Fig. 9E), pero en otros casos como el parálogo 44260 y el 78620 hay una región de aprox. 100 pb que coincide con la región clonada en el ToMoV_*SCEI* (93110) (Figura 9A y C). Tal vez esta diferencia en identidades y en las mejores regiones teóricas para silenciar, influyan en el grado de silenciamiento como se observó en la Figs. 10 y 11.

Lo interesante es que al analizar el nivel de silenciamiento comparado con la planta retada con *Cmm* sin silenciar, hay hasta 3 órdenes de magnitud de diferencia en *SCEI* respecto a las silenciadas y el parálogo más cercano, y de solo un orden magnitud de diferencia con parálogos menos parecidos como Solyc04g078620. Por otro lado, no sabemos si los parálogos compensen la función de *SCEI* y si al reducirse la expresión de alguno de ellos solo parcialmente, siguen aportando cierto

grado de resistencia a la planta y por eso el fenotipo no es tan drástico. En este tenor, existe un estudio de VIGS en frutos de tomate, donde realizaron silenciamiento en diferentes genes involucrados en la maduración. Entre sus estudios generaron una construcción para obtener silenciamiento a partir de la región más conservada de una familia de genes, los LeEILs (genes reguladores en la vía de señalización del etileno). Según sus resultados, dicho silenciamiento logró inhibir la maduración del fruto, además, también se deduce que VIGS puede suprimir varios genes de una misma familia y si se elige una región muy conservada entre éstos, se puede evitar la posible redundancia funcional [Fu et al., 2005].

La eficiencia del silenciamiento también depende del método de transformación utilizado. El bombardeo de partículas es un método eficaz para la introducción de DNA en la célula vegetal, y ofrece la ventaja de lograr una transformación estable de cloroplastos y mitocondrias, lo que no puede lograrse usando *Agrobacterium* puesto que ésta usa el complejo T-DNA dirigido al núcleo. El aspecto negativo de la biobalística es el daño físico que puede ocasionar en la planta. Por lo tanto, es necesario estandarizar diferentes parámetros como el tamaño del disco de ruptura, distancia entre el objetivo y el tejido blanco, la orientación de la hoja, el tipo y tamaño de partícula [Ghorbanzade and Ahmadabadi, 2015; Srinivas et al., 2016]. Como ejemplo de lo anterior, Carqueijeiro y colaboradores (2015) realizaron VIGS en *Catharanthus roseus*, en el que llevaron a cabo un estudio previo silenciando fitoeno desaturasa (PDS) mediante bioalística, variando diferentes parámetros como la distancia del disparo, tamaño de la planta, daño de la hoja, tamaño de los microproyectiles y cantidad de DNA, y concluyeron que las condiciones óptimas eran 2 µg de plásmido por mg de partículas de oro de

1 µm de diámetro, distancia de disparo de 6 cm y la edad de la planta correspondiente a la etapa con las primeras dos hojas totalmente desarrolladas. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, es necesario establecer un protocolo adecuado de transformación mediante biobalística y lo cuál podría incrementar el grado de silenciamiento.

3.2. CRISPR/Cas9

A diferencia de la estrategia del RNA de interferencia (RNAi) que utiliza VIGS, CRISPR/Cas 9 permite realizar la inactivación completa del gen, mejor conocido como “knock-out”; y así posibilita determinar si el gen en cuestión es esencial o no para el desarrollo de la planta, ya que eliminar un gen esencial no permite el crecimiento de una planta, además de que permite generar un reemplazo o modificación génica permanente. Sin embargo, CRISPR/Cas9 presenta la desventaja de inducir cambios no deseados o mutaciones en otros genes que muestran similitud en la secuencia diana (off-targets).

En las plantas, puede aprovecharse esta “desventaja” y generar knockouts en homeólogos y parálogos, puesto que la mayoría de las plantas se caracterizan por ser poliploides; para obtener un fenotipo de nuestro interés es necesario hacer un múltiplex a todos los parálogos [Endo et al., 2015]. Ma y colaboradores (2015), presentaron un estudio en arroz y *Arabidopsis*, en el que insertaron de manera eficaz diferentes guías en un solo vector con la clonación por la técnica de Golden Gate o por el ensamblaje de Gibson. Tomando en cuenta lo anterior, se logró clonar de forma independiente, por la técnica Golden Gate, cada una de las guías específicas para *SCEI*, sus parálogos y el gen de la quelatasa. Sin embargo, se

realizaron diversos intentos para obtener los diferentes multiplex descritos en la Tabla 2 por el mismo método de Golden Gate y también con el uso de otras enzimas de restricción, pero los resultados fueron negativos. Como una alternativa y trabajo a futuro, se deberían de diseñar nuevos oligonucleótidos para llevar a cabo la clonación por Golden Gate o seguir el ensamblaje de Gibson.

Mientras se trataba de obtener los diferentes multiplex, se continuó el trabajo de transformación de tomate con las guías gSC1, gSC2 y gCH1, en el que un factor importante a considerar es el método de transformación utilizado. En diversos reportes de edición génica en plantas se ha implementado el uso de *Agrobacterium* y biobalística para acarrear el vector con la Cas9 y su respectiva sgRNA. Qianru y colaboradores (2017), establecieron que en la planta de Té (*Camellia sinensis*) es muy importante definir el tiempo en que los explantes se encuentran en contacto con la suspensión bacteriana y el tiempo de co-cultivo en la transformación mediada por *Agrobacterium*. Por su parte, Sun y colaboradores (2015), reportan que la eficiencia de transformación del tomate depende del tipo del explante, la composición del medio y el agente de selección. Ellos lograron establecer un protocolo de regeneración para hipocótilos y cotiledones, y obtuvieron un porcentaje de transformación que fluctuaba entre 33 a 45%. En mi trabajo, la transformación fue mediada por *Agrobacterium* y al obtener resultados negativos con el primer protocolo desarrollado, se optó por probar diferentes estrategias de transformación, en las que se variaron los reguladores de crecimiento y el periodo de co-cultivo de acuerdo a las descripciones de algunos autores, el cual extendimos hasta un tercer día. Sin embargo, los problemas persistieron, como la lenta regeneración de los explantes y, sobre todo, la oxidación y muerte de los mismos, como se ilustra en la

Figura 15H. La causa puede atribuirse al uso de antibióticos, ya que se ha establecido que el uso de éstos puede suprimir la regeneración de brotes en diferentes tipos de cultivos, aun cuando los mismos brotes expresen genes de resistencia [Chen et al., 2018].

En cuanto a la oxidación, Kumar Sah y colaboradores (2014), sugieren en un reporte en donde mencionan que utilizaron arroz japonés, cambiar la sacarosa por maltosa, ya que la primera promueve la producción de etileno y por ende, la oxidación en el tejido. Lo anterior lo apoya otro estudio realizado in vitro por Nicholson y colaboradores (2012), en el que mencionan que un exceso de sacarosa puede impedir la fotosíntesis y por lo tanto, causar estrés en todo el explante. En consecuencia, hay una producción elevada de compuestos fenólicos que causan el oscurecimiento, inhibición de la regeneración y, por último, la muerte del tejido. Además, Ahsan y colaboradores (2007), establecieron un protocolo para la transformación en cotiledones de tomate, analizando diferentes parámetros, como el efecto de las heridas en el explante, el daño necrótico, la composición del medio, la temperatura y el periodo de co-cultivo. En el presente trabajo, a pesar de haber cambiado los diferentes parámetros de transformación, no se logró obtener una plántula regenerada a partir de callos, por lo tanto, es necesario establecer un protocolo más efectivo de transformación específico para el vector de Cas9, ejecutando más pruebas con los parámetros anteriormente mencionados y variando cada uno de éstos por el tipo de explante a utilizar, además de experimentar con el uso de maltosa como lo mencionan Kumar Sah y colaboradores (2014). Cabe mencionar que nuestro grupo de trabajo ya había transformado tomate, pero cada

gen en particular y vector binario puede generar un efecto diferente y deben manipularse las condiciones de transformación caso por caso.

Por otra parte, los resultados de PCR presentados en la Figura 17 demuestran que se realizó una correcta transformación con las diferentes guías únicas (gCH1, gSC1 y gSC2) ya que se identificó el inserto de 700 pb en 24 muestras, de las cuáles, al momento de ser secuenciadas no presentaron edición génica o algún cambio en su secuencia nucleotídica. Ma y colaboradores (2015) mencionan que la eficiencia de la edición génica mediada por CRISPR depende de diferentes factores, como el nivel de expresión de la nucleasa Cas9 y de la misma guía, además del contenido de GC de ésta, la cantidad de off-targets y las estructuras secundarias que adopte. Los resultados negativos obtenidos en el presente trabajo se pueden explicar con los factores anteriormente descritos o por la posibilidad de que las guías de *SCEI* y quelatasa no sean funcionales. Algunos sgRNAs pueden presentar una baja eficiencia o simplemente no ser funcionales, probablemente por el estado en que se encuentre la cromatina, la formación de estructuras no deseadas del sgRNA (horquillas) u otros factores [Periwal, 2017], además se ha mencionado que Cas9 puede no cortar eficientemente a temperaturas de 24°C y se requiere estresar un poco a la planta (Alpuche-Solís, comunicación personal), por lo que sería una alternativa para una futura estrategia. Asimismo, se puede optar por validar en trabajo a futuro la eficiencia de cada una de las guías de *SCEI* y *Chl* siguiendo el método de Xing y coautores (2014), quienes analizaron sus sgRNAs en protoplastos para luego corroborar en maíz y *Arabidopsis* con transformaciones transitorias y estables.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ensayo con VIGS

4.1.1. Material biológico, crecimiento e infección de plantas

Se utilizaron semillas de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig (variedad susceptible a *Cmm*), *S. arcanum* LA2172 y *S. arcanum* LA2157 (variedades tolerantes a *Cmm*). Se manipuló como cepa patogénica *Cmm* acr42, proporcionada por Ana Luz Romero García del laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT. 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), fueron proporcionado por la Dra. Esparza-Araiza.

Las semillas fueron colocadas en charolas de germinación con una mezcla de suelo comercial (Sunshine Mix #6, Sun Grow Horticulture, Vancouver, BC, CA), donde permanecieron en cámara bioclimática con temperatura de 25°C y periodo de luz/oscuridad de 16h/8h respectivamente. Una vez que las plántulas presentaron hojas verdaderas fueron transferidas a macetas individuales y situadas en invernadero con temperatura controlada de 28°C y humedad de 60%.

4.1.2. Diseño de oligonucleótidos y clonación de fragmentos en el vector ToMoV Δ CP

Se utilizó la herramienta VIGS de Solgenomics (<http://vigs.solgenomics.net/>) para determinar la región más adecuada para silenciar el gen de *SCEI* y *ChII* respectivamente, por medio de un algoritmo que simula *in silico* los procesos de VIGS en la célula vegetal. Dicho algoritmo identifica fragmentos de 18-24 nt que son equivalentes a siRNAs, los compara con el transcriptoma de la especie de interés,

y finalmente, da como resultado una región de 300 a 500 nt que es la más apta para silenciar el gen blanco. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la región recomendada por la plataforma de VIGS para el gen de *SCEI*: Forward 5'-CTCGAATTCTGCCCAAAGTGGGGTATC-3' y Reverse 5'-ATTAAGCTTAGCTGTGCTTGTCTTCTTCTACA-3' que dan como producto un fragmento de 281 pb. Con respecto al gen de *Chl* se diseñaron los siguientes oligonucleótidos: Forward 5'-CTCGAATTCTGGCTTCACTATTGGGAACTTC-3' y Reverse 5'-ATAAAGCTTTCTCTGGCTGTCTTCAGCAAG-3' que amplifican una región de 263 pb. Además, a cada uno de los oligonucleótidos anteriores se les agregó sitios de restricción *EcoRI* en los sentido (Forward) y *HindIII* en los antisentido (Reverse) para realizar la correcta clonación de los diferentes productos de forma individual en el vector ToMoVΔCP.

Para la obtención de los vectores de silenciamiento de *SCEI* y *Chl* se amplificaron los fragmentos de 281 y 263 pb respectivamente, a partir de cDNA de *S. arcanum* LA2157 bajo las siguientes condiciones de PCR: 5 min para desnaturalización inicial a 94°C, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 50 s, 55°C por 40 s, 72°C por 30 s y 72°C por 5 min como extensión final. Cada uno de los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para luego ser purificados por columna (kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega), además de realizar la misma doble digestión con el vector ToMoVΔCP.

Finalmente, dichos productos purificados de *SCEI* y *Chl* fueron clonados por separado directamente en el vector ToMoVΔCP con el uso de 400 U/μL de T4 DNA ligasa (New England Biolabs Inc.), dando como resultado los vectores de

silenciamiento ToMoV_*SCEI* y ToMoV_*ChII*. Estas construcciones se verificaron por medio de digestión de miniprep y por secuenciación.

4.1.3. Inoculación del vector VIGS por biobalística y reto con *Cmm*

Seguido de la confirmación de las construcciones con *SCEI* y *ChII* se procedió a digerir con *Apal* para liberar cada una como ToMoV_*SCEI* y ToMoV_*ChII* del plásmido BlueScript (pBS II SK+/-). Asimismo, se digirió nuevamente con *Apal* el componente B (contiene los genes de movilidad del virus). Una vez liberado cada componente viral se realizó la preparación de los miroyectiles de tungsteno con una proporción 1:1 de cada componente, es decir, 1 µg de ToMoV_*SCEI* mezclado con 1 µg de ToMoV_B, o 1 µg de ToMoV_*ChII* con 1 µg de ToMoV_B, y por último, ToMoV_ Δ CP con su respectivo componente B. Se trabajó con las especies silvestres *S. arcanum* 2157 y 2172, donde se bombardearon 10 plantas por tratamiento, de las cuales 5 fueron retadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) y las otras 5 sólo se les inyectó agua como control por cada uno de los tratamientos empleados. En el caso de ToMoV_*ChII* fueron bombardeadas 10 plantas y ninguna fue retada con *Cmm*. Además, como control de virulencia de *Cmm* se utilizaron 3 plantas de la especie susceptible (*S. lycopersicum*) las cuales fueron retadas con *Cmm* y 3 no fueron retadas y se usaron como testigo o control negativo.

Plantas de 40 días de edad fueron bombardeadas con pistola de helio con los diferentes tratamientos (ToMoV_*SCEI*, ToMoV_*ChII* y ToMoV_ Δ CP) usando microprojectiles de tungsteno con una presión de 600 psi. Después de dicha inoculación, se mantuvieron en invernadero durante 60 días bajo una temperatura

de 25°C para que las bombardeadas con ToMoV_SCEI, y ToMoV_ΔCP, fueran retadas con *Cmm*. Se recolectó muestra a las 0 y 8 horas después de la infección.

4.1.4. Extracción de ARN y síntesis de cDNA de plantas inoculadas con VIGS

Se realizó extracción de ARN por medio de TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de las diferentes muestras que habían sido bombardeadas con los vectores de silenciamiento. Se homogenizó tejido vegetal (50 a 100 mg de hoja) con nitrógeno líquido y 1 mL de TRizol, seguido de una incubación por 5 min a temperatura de 15-30°C. Después se adicionaron 200 µL de cloroformo y se mezcló con vortéx por 15 s, para luego ser incubado en hielo por 2 min. Se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 15 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, a la cual se le agregaron 500 µL de isopropanol frío. Lo anterior se volvió a mezclar y se incubó en hielo por 15 min. Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol-DEPC al 75%. Finalmente se centrifugó a 7,000 rpm por 5 min a 4°C, se dejó secar la pastilla en hielo y se resuspendió en 30 µL de agua DEPC. Para evitar la presencia de DNA genómico en la extracción de ARN, cada muestra se trató con DNAsa I (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Después de la extracción de RNA se llevó a cabo la síntesis de cDNA de cada muestra a partir de aprox. 300 ng de ARN con 200 U/ µL de transcriptasa reversa SuperScriptII RT (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Se corroboró dicha síntesis amplificando una región del gen de actina de tomate con los siguientes oligonucleótidos: Forward 5'- CCACCATGTTCCCTGGTATC-3', Reverse 5'-GTGCTGAGGGATGCAAGAAT-3' obteniendo un producto de 146 pb.

Las condiciones de PCR fueron 5 min para desnaturalización inicial a 94°C, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 50 s, 55°C por 30 s, 72°C por 50 s y 72°C por 5 min como extensión final.

4.1.5. Cuantificación por RT-qPCR de la expresión del gen *SCEI* y sus parálogos

Se ajustó la concentración de cDNA de cada muestra a 300 ng/μL con NanoDrop ND-1000-UV-Vis-spectrofotómetro (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) y se cuantificó la expresión del gen *SCEI* por PCR en tiempo real mediante el equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time, versión 2.0. Para este último se utilizó el kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) con los siguientes componentes de reacción: 5 μL mix SYBR Green, 200 nM de cada oligonucleótido específico, 300 ng de cDNA y agua inyectable para un volumen final de 10 μL. El cálculo del nivel de expresión relativa del gen *SCEI* (Solyc02g093110.2) y de cada uno de sus parálogos (Solyc03g044260.2, Solyc04g078620.2 y Solyc12g088680.1) se basó en el valor de CT del mismo, normalizado con el gen de actina y respecto al vector delta CP. Éste último gen constitutivo fue amplificado por los oligonucleótidos anteriormente descritos en la síntesis de cDNA. Los oligonucleótidos específicos para cada gen se encuentran descritos en la Tabla 6. La RT-qPCR se elaboró en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time, versión 2.0. Las condiciones de reacción fueron: 20 s a 95°C seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 s y 30 s a 60°C, la curva de disociación se realizó por 80 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C con incrementos de 0.5°C hasta alcanzar los 95°C y finalmente 30 s a 95°C.

4.2. CRISPR/Cas9

4.2.1. Diseño de guías para el knockout de *SCEI* y *ChII* por CRISPR/Cas9

Se realizó un análisis en diversas plataformas web (Figura 12) para la predicción de diferentes guías contra el gen *SCEI* y *ChII*, tratando de evitar la presencia de blancos no deseados y mismatch entre la secuencia blanco y la guía, además de identificar guías que sean de los primeros exones. Las plataformas utilizadas fueron CCTop (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>), CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>), y CRISPR-P (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CR-IPR>). La selección de las diferentes guías se basó en la comparación de los resultados obtenidos de dichos predictores bioinformáticos, donde se presentaron los siguientes parámetros: porcentaje de GC por cada guía, la posición donde se hace el anclaje (exón/intrón), mismatches, off-targets e identificación génica.

4.2.2. Clonación por Golden gate de guías únicas

Se trabajó con el vector pKSE401 donado por el Dr. Amit Dhingra, el cual contiene el promotor U6, andamio, terminador, el gen que codifica para la nucleasa Cas 9 optimizado para su expresión en plantas, y el borde izquierdo y derecho para la transformación con *Agrobacterium*. En medio del promotor U6 y el andamio se encuentra una secuencia denominada “space holder” donde se insertará la guía deseada de 20 nucleótidos por medio de los dos sitios *Bsal* que tiene en sus extremos. Cada guía se solicitó como oligonucleótido (Tabla 3), donde el oligonucleótido 5' contiene el sitio ATTG' y el 3' el sitio CAAA para rellenar los sitios de la enzima de restricción.

La clonación en el vector pKSE401 (Figura 13), se llevó a cabo hibridando cada guía entre sí, es decir, se mezclaron 10 μ L de oligonucleótido sentido y otros 10 μ L del reverso con una concentración de 100 μ M a una temperatura de 94°C y se fue bajando un grado por minuto hasta llegar a los 10°C. Seguido de esto se realizó la clonación en el vector pKSE401 por medio de la técnica de ensamblado “Golden Gate” donde se realizó digestión y ligación en una sola reacción. Las condiciones de esta clonación se describen en la Tabla 7. Se transformaron en células de *E. coli* calcio-competentes, cada uno de los productos obtenidos por el ensamblaje anterior, con las diferentes guías únicas. Se realizaron minipreps y se obtuvieron productos de PCR (Figura 14), con los siguientes oligonucleótidos: MpxHFwd 5'-ATATATAAGCTTCGACTTGCCTTCCGC-3' y MpxHRev 5'-ATATATGAAGCTTATTGGTTTATCTCATCGG-3', presentando un producto de aproximadamente 700 pb que abarca desde el promotor U6 hasta el terminador. Las condiciones de PCR fueron 5 min para desnaturalización inicial a 94°C, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 50 s, 55°C por 30 s, 72°C por 50 s y 72°C por 5 min como extensión final. Por último, para tener mayor precisión de la clonación de cada una de las guías, se verificaron por secuenciación los productos anteriores.

4.2.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por electroporación con guías únicas y de tomate mediante cultivo *in vitro* e *in planta*

Se procedió a transformar *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por medio de electroporación con las siguientes construcciones de guías únicas: pKSE_GS1, pKSE_GS2 y pKSE_CH1. Para cada construcción se llevaron a cabo los siguientes

pasos: se colocó un μg de plásmido sobre la superficie de una alícuota de 50 μL de células electrocompetentes y se incubó en hielo por 2 min. Luego se transfirió la mezcla a una celda de electroporación de 2 mm colocada en hielo. Los parámetros de electroporación fueron 25 μF , 400 Ω y un pulso de 2.5 KV en un electroporador de BioRad, después se agregaron 200 μL de medio YEP y se transfirió la mezcla a un tubo Eppendorf estéril donde se incubó por 2 horas a 28°C. En seguida de la recuperación, se centrifugó la bacteria y se resuspendió la pastilla, misma que se sembró en placa con medio YEP adicionado con kanamicina 100 mg/L y rifampicina 50 mg/L y se incubó a 28°C por 48 horas. Finalmente, se verificó cada construcción por PCR de colonia y se procedió a transformar tomate *in vitro* e *in planta*.

4.2.3.1. Cultivo *in vitro*, transformación mediante sistema de co-cultivo

Para la transformación nuclear de tomate se siguió el protocolo descrito por Rodríguez-González (2014), utilizando dos tipos de explantes: hipocotilos y cotiledones. Primeramente, se germinaron semillas *in vitro* durante 10 días de las siguientes especies de tomate: *Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig, *Solanum arcanum* 2157 y *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. De manera aséptica se cortaron los diferentes explantes, donde se dio inicio con los cotiledones de cada plántula, los cuales fueron heridos por el envés de cada uno de éstos con pequeños cortes con bisturí. Por el contrario, para el caso del hipocotilo, no se realizó ningún corte sobre éste, sólo se escindió de la radícula y de los mismos cotiledones, quedando un fragmento de aproximadamente 1 cm. Una vez obtenidos todos los explantes, se mantuvieron en la suspensión bacteriana correspondiente de *Agrobacterium* por 10 min. Cada cultivo se originó de la incubación a 28°C de

Agrobacterium con pKSE_GS1, pKSE_GS2 y pKSE_CH1 en 30 mL de medio YEP líquido con kanamicina 100 mg/L y agitación constante durante 48 horas hasta obtener una D.O. de 0.3.

Transcurrido el tiempo en la suspensión bacteriana, se procedió a colocar cada uno de los explantes en papel filtro estéril para remover el exceso de bacteria. Seguido de esto se distribuyeron en placas con medio PM (Tabla 7), para co-cultivar durante 2 días en oscuridad a una temperatura de 25 +/- 2°C. Finalmente, con el objetivo de obtener regeneración de tejido de los explantes transformados, se transfirieron a placas con medio RM1 adicionadas con cefatoxima 250 mg/L y kanamicina 100 mg/L, y se realizó cambio a medio fresco cada 15 días.

4.2.3.2. Transformación *in planta* mediante sonicación con *Agrobacterium*

Como una alternativa a la transformación por co-cultivo por los problemas ya mencionados de oxidación de explantes se optó por probar la transformación directa en semillas, siguiendo el protocolo descrito para caña de azúcar por Mayavan y colaboradores (2013), con unas leves modificaciones que se pretendía ayudaran a la eficiencia de la transformación en tomate.

Se llevó a cabo la desinfección de semillas de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig y Micro-Tom con cloro al 10% durante 4 minutos, seguido de 3 lavados con agua destilada. Luego se colocaron por igual en 4 tubos Eppendorf estériles, 10 semillas de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig y 7 semillas para *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. A cada uno de los tubos se les agregó acetosiringona 100 µM y un mL de cultivo de *Agrobacterium* (con la suspensión bacteriana anteriormente descrita en la transformación mediante co-cultivo pero con D.O. de 1) con las diferentes

construcciones, es decir, pKSE_GS1, pKSE_GS2 y pKSE_CH1. Seguido de esto se efectuó la sonicación en un baño de ultrasonidos con frecuencia de 40 KHz por un periodo de 10 min y una vez transcurrida ésta, se eliminó el resto de suspensión bacteriana en cada una de las semillas colocándolas en papel filtro estéril e inmediatamente se sembraron por separado en placas con medio CCM, donde se mantuvieron en etapa de co-cultivo por 3 días en oscuridad a una temperatura de 25 +/- 2°C. Pronto se pasaron a frascos con medio RM2 y se dejaron germinar en una cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y a una temperatura de 25 +/- 2°C.

4.2.4. Extracción de DNA de callos y plántulas y obtención de productos de PCR para verificar la edición génica por secuenciación

Se extrajo DNA de los callos obtenidos por el sistema de co-cultivo y de las plántulas obtenidas por método de sonicación con las diferentes construcciones de CRISPR anteriormente descritas. La extracción se realizó usando el protocolo de Dellaporta y colaboradores (1983) modificado, el cual consta de los siguientes pasos: pesar 0.5 g de tejido vegetal y moler con mortero con la adición de 600 µL de buffer de extracción. Se incuba la muestra a 65°C por 45 min y luego se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min. Se transfiere sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL y se agrega un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcla en vórtex y se centrifuga a 12,000 rpm por 3 min. Se transfiere la fase acuosa y nuevamente se adiciona un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcla en vórtex y se centrifuga a 12,000 rpm. Luego se lleva la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 mL y se le agregan 2 µL de RNAsa 10 mg/mL, seguido de una incubación de

15 min a 37°C. Transcurrido dicho tiempo, se precipita el DNA con un volumen de isopropanol frío, el cual se mezcla por inversión y se mantiene en hielo por 10 min. Se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min y se descarta el sobrenadante, en seguida se lava la pastilla con etanol 70% y se vuelve a centrifugar a 12,000 rpm por 5 min. Se deja secar al aire, se resuspende en 30 µL de agua Milli Q y se almacena a -20°C.

Una vez obtenido el DNA de las diferentes muestras (callos y plántulas), se amplificó una región del gen de *SCEI* para las muestras tratadas con pKSE_GS1 y pKSE_GS2 con los siguientes oligonucleótidos: Forward 5'- ACG AAA GCA GGA CCA TTG AC -3', Reverse 5'- TGG TTT GCC CTC ATC CTC AC -3' obteniendo un producto de 771 pb. Las condiciones de PCR fueron 5 min para desnaturalización inicial a 94°C, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 50 s, 55°C por 40 s, 72°C por 45 s y 72°C por 5 min como extensión final. En el caso de las muestras con el vector pKSE_CH1, se amplificó un fragmento del gen de quelatasa de 986 pb, con los siguientes oligonucleótidos: Forward 5'- ATG GCT TCA CTA TTG GGA AC -3', Reverse 5'- AGA ACT CCA CAA CCA AAC AC -3' y con las condiciones de PCR fueron 5 min para desnaturalización inicial a 94°C, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 50 s, 55°C por 40 s, 72°C por 1 min y 72°C por 5 min como extensión final. Cada uno de los productos de PCR fueron purificados por columna (kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) y se secuenciaron para verificar si presentaban cambios y por ende, edición en su secuencia. Además, se confirmó la transformación en las diferentes muestras por medio de PCR con los oligos MpxHFwd y MpxHRev, con las mismas condiciones de reacción, generando un producto de 700 pb.

5. CONCLUSIONES

1. Es posible silenciar *SCEI* y sus parálogos en *S. arcanum 2172* mediante VIGS.
2. La especie *S. arcanum 2157* después de ser bombardeada, parece no presentar silenciamiento ya que no muestra susceptibilidad alguna después de ser retada con *Cmm*.
3. La especie silvestre *S. arcanum 2172* se vuelve susceptible a *Cmm* al ser silenciada con el vector ToMoV_*SCEI*, lo cual indica el papel de este gen en la defensa de la planta al chancro bacteriano.
4. Al bombardear la planta con el vector ToMoV_ Δ CP, no se afecta ni el desarrollo ni la susceptibilidad de la planta.
5. Es posible clonar guías únicas en el vector pKSE401, el cual contiene el promotor U6, scaffold, terminador y la Cas9 optimizada para plantas.
6. Es posible transformar *S. lycopersicum* var. Ailsa Craig y Micro-Tom por medio de *Agrobacterium* ya sea *in vitro* o *in planta*.
7. Ninguna de las guías probadas con los vectores para CRISPR/Cas 9 en este trabajo edita el genoma de interés, probablemente por ineficiencia de la Cas9, lo cual debe demostrarse.

TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos para la obtención del fragmento de *SCEI* y de *Chl* con los sitios de corte *EcoRI* y *HindIII*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tm	Producto (pb)
<i>SCEI</i>	FWD	<u>CTC GAA TTC</u> TGC CCA AAC TGA AGG GTA TC	56	278
	REV	ATT AAG CTT <u>AGC TGT GCT TGT TCT TCT</u> ACA	56	
<i>Chl</i>	FWD	<u>CTC GAA TTC</u> TGG CTT CAC TAT TGG GAA CTT C	56	262
	REV	ATA AAG CTT <u>TCT CTG GCT GTC TTC</u> AGC AAG	58	

Tabla 2. Diseño de guías para construcción como guía única y multiplex de *SCEI* y *Chl*

SCE1				
	GUIDE	PAM	Nombre/Gen	Región
gSC1	GTGAGTGGCAGATTGAACGA	TGG	Solyc02g093110.2.1	UTR

SCE1-GG				
	GUIDE	PAM	Nombre/Gen	Región
gSC2	TAAACAACAACAATGTCGGG	AGG	Solyc02g093110.2.1	UTR-EXON 1

MULTIPLEX SCE1				
	GUIDE	PAM	Nombre/Gen	Región
gSC1	GTGAGTGGCAGATTGAACGA	TGG	Solyc02g093110.2.1	UTR 5'
gSC2	TAAACAACAACAATGTCGGG	AGG	Solyc02g093110.2.1	EXON 2
gSC3	CACCATCCCTGGTAAAGCTG	AGG	Solyc02g093110.2.1	UTR-EXON 1

MULTIPLEX PARÁLOGOS C/93110				
	GUIDE	PAM	Nombre/Gen	Región
g44	ATCAAGTTCACCTGACCCATC	TGG	Solyc03g044260.2.1	EXON 2
	ATCAAGTTCACCTGACCCATC	TGG	Solyc02g093110.2.1	EXON 2
g88	ATGGCTGACGGAATCGCACG	TGG	Solyc12g088680.1.1	EXON 1
	ATG TCTGC [AGGAATCG T CG]	TGG	Solyc03g044260.2.1	EXON 1
	ATG TCTGG [CGGAAT T CG C CG]	TGG	Solyc04g078620.2.1	EXON 1
g78	CTACCATCAGGACCAGTCTC	CGG	Solyc04g078620.2.1	EXON 3

CHLI				
	GUIDE	PAM	Nombre/Gen	Región
gCH1	AGGGAGGTCCCAATTCCATG	TGG	Solyc10g008740.2.1	EXON 2

MULTIPLEX CHLI				
	GUIDE	PAM	Nombre/Gen	Región
gCH1	AGGGAGGTCCCAATTCCATG	TGG	Solyc10g008740.2.1	EXON 2
gCH2	GTTGTTGTAGGACATAGCCA	AGG	Solyc10g008740.2.1	INTRON 1 - EXON 2
gCH3	CTTAGAGGAACGAGAAGTGA	AGG	Solyc10g008740.2.1	EXON 1

Tabla 3. Oligonucleótidos para síntesis de guías de *Chl*

1	FORWARD	AGGGAGGTCCCAATTCCATG	TGG	Solyc10g008740.2.1
	FWD	attg AGGGAGGTCCCAATTCCATG		
	REV	aaac CATGGAATTGGGACCTCCCT		
2	FORWARD	GTTGTTGTAGGACATAGCCA	AGG	Solyc10g008740.2.1
	FWD	attg GTTGTTGTAGGACATAGCCA		
	REV	aaac TGGCTATGTCCTACAACAAC		
3	REVERSE	CTTAGAGGAACGAGAAGTGA	AGG	Solyc10g008740.2.1
	FWD	attg CTTAGAGGAACGAGAAGTGA		
	REV	aaac TCACTTCTCGTTCCTCTAAG		

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para secuenciación del gen *SCEI*, sus parálogos y quelatasa.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'->3')	Tm	Producto (Pb)
<i>SCEI</i> Solyc02g093110.2	Forward	ACG AAA GCA GGA CCA TTG AC	57	771
	Reverse	TGG TTT GCC CTC ATC CTC AC	58	
Solyc03g044260.2	Forward	CAA TGT CTG CAG GAA TCG CT	57	658
	Reverse	GAG GTC TAG GGA GGG TAG AG	55	
Solyc04g078620.2	Forward	GTT CGT CCT GCT GAA GAG TG	56	739
	Reverse	CAC CAA CCA AAT AGA GCC TG	54	
Solyc12g088680.1	Forward	GAC AGA GAA TGC CCA ACA AC	55	932
	Reverse	CCT CAC ACA AGC AAA CAC TC	55	
Quelatasa Solyc10g008740.2	Forward	ATG GCT TCA CTA TTG GGA AC	54	986
	Reverse	AGA ACT CCA CAA CCA AAC AC	54	

Tabla 5. Guías específicas de *SCEI* en *N. tabacum*

Nombre	Guía	Región diana
gSCNt1	ATCAGGTTCACTGACCCATC	Exón
gSCNt2	TATCTCTCCACAGCCAGGGG	Intrón
gCH1	AGGGAGGTCCCAATTCCATG	Exón

Tabla 6. Oligonucleótidos específicos para RT-qPCR del gen *SCEI* y sus parálogos

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'->3')	Producto (Pb)
<i>SCEI</i> Solyc02g093110.2	Forward	CTC GTG GTC GTC TTG CTG AG	158
	Reverse	CAA CCA CCT TCC CAA TCA GT	
Solyc03g044260.2	Forward	TGG CCG TCT TGC TGA AGA AC	148
	Reverse	CCT TCC CAA TCC GTC CCT GT	
Solyc04g078620.2	Forward	GAC TGG TCC TGA TGG TAG TG	152
	Reverse	GAA ACC TGC TGG AAA CTT GC	
Solyc12g088680.1	Forward	AAC GCA AAT CAT GGC GGA AG	143
	Reverse	GCT AGG GAA GTC TTC GCT GA	

Tabla 7. Protocolo de ensamblaje de “Golden Gate”

Componentes	Volumen	Condiciones de reacción
VectorpKSE401 (~100 ng/μL)	2 μL	(37°C por 5 min, 16°C por 5 min) x 30
Inserto (guía hibridada)	8 μL	ciclos
T4 DNA ligasa buffer (10x)	2 μL	55°C por 5 min
BSA (10x)	2 μL	80°C por 5 min
T4 DNA ligasa (400 u/μL)	1 μL	
<i>Bsal</i>	1 μL	
H ₂ O	4 μL	Enzimas y reactivos de NEB

Volumen total	20 μ L
----------------------	------------

Tabla 8. Medios específicos para transformación de tomate

Componentes	Medios para transformación por sistema co-cultivo		Medios para transformación por sonicación	
	PM	RM1	CCM	RM2
Sales MS	Si	Si	Si	Si
Vitaminas MS	Si	Si	-	Si
BA	1 mg/L	-	-	-
ANA	1 mg/L	-	-	-
IAA	-	0.1 mg/L	0.1 mg/L	0.1 mg/L
Tiamina	-	0.1 mg/L	0.1 mg/L	0.1 mg/L
Zeatina	-	2 mg/L	-	2 mg/L
Sacarosa g/L	30	30	30	30
Acetosiringona	-	-	100 μ M	-
pH	5.7	5.7	5.7	5.7
Fitagel g/L	3	3	3	3
Cefatoxima	-	250 mg/L	-	250 mg/L
Kanamicina	-	100 mg/L	-	100 mg/L
Carbón activado g/L	-	3	-	-
Ácido Cítrico mg/L	25	25	-	-

FIGURAS

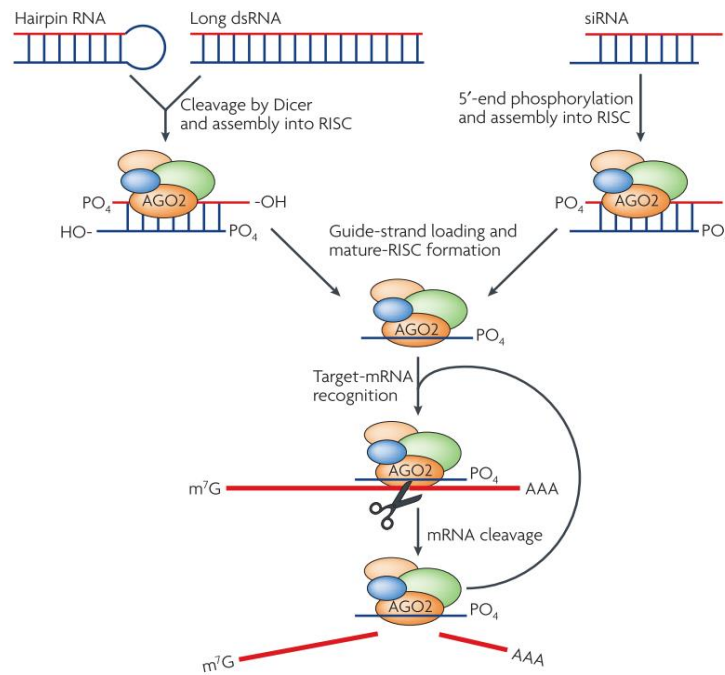
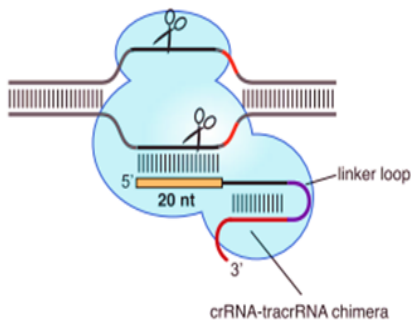


Figura 1. Silenciamiento génico mediado por siRNA

El RNA bicatenario se procesa mediante Dicer para generar siRNAs, pequeños fragmentos de 21 nt. Luego la cadena antisentido del siRNA se ensambla en el complejo RISC para encontrar el ARN diana. Finalmente, se une a éste por complementariedad y realiza la escisión, promoviendo la degradación del mRNA. (Tomado de Rana, 2007).

A

Cas9 programmed by single chimeric RNA



B

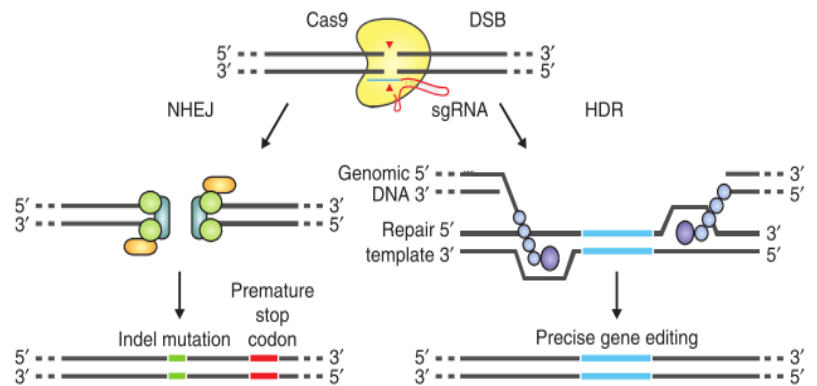


Figura 2. Esquema general del sistema CRISPR/Cas9

A) Representación del sistema Cas 9 con sus principales componentes: el sgRNA, molécula quimérica resultante de la fusión del crRNA (secuencia de 20 nucleótidos específicos al gen blanco) con el tracrRNA para programar el corte por la endonucleasa Cas 9 y la secuencia PAM. B) El sistema de edición genética

CRISPR/Cas 9 permite modificar el genoma con un corte de doble cadena (DBS) en un segmento específico de DNA, provocando la reparación de éste por combinación de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HDR). El primer mecanismo comúnmente llamado “knock-out”, introduce inserciones o deleciones (indels) que inactivan el gen de interés. Por otra parte, HDR, conocido como knock-in, edita de manera precisa el gen blanco con ayuda de un fragmento donador que contiene mutaciones puntuales, el cual es insertado por recombinación de sus extremos homólogos. (Modificado de Jinek *et al.*, 2012; Cong y Zhang, 2014).

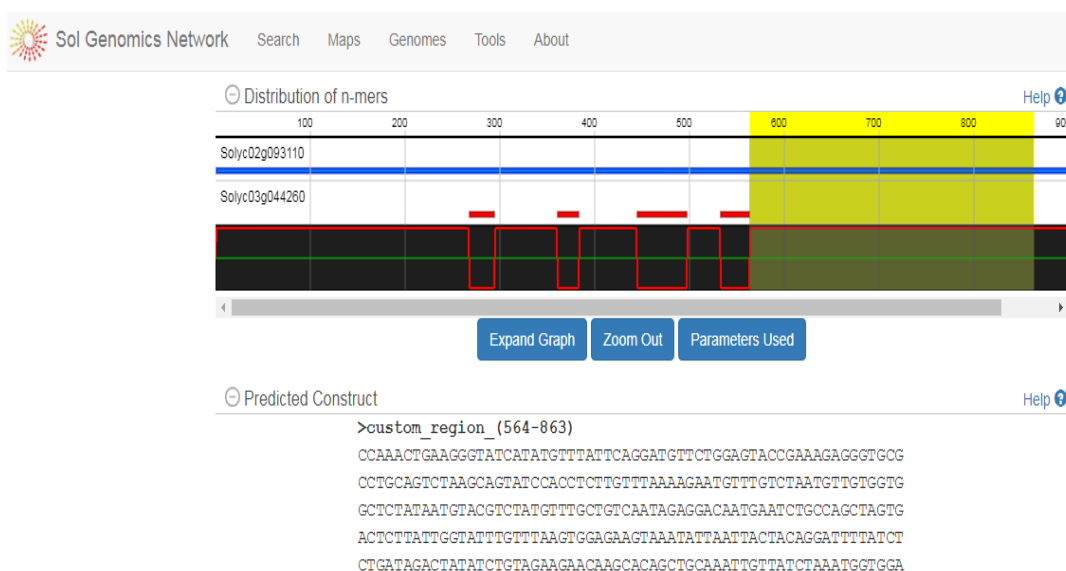


Figura 3. Análisis del gen *SCE1* por medio de VIGS tool de Solgenomics

Se identificó mediante un algoritmo específico de la herramienta VIGS la región más apta para ser silenciada del gen *SCE1*, la cual se presentó con una secuencia de 300 pb. El gráfico presenta en amarillo la región más apropiada para silenciar y en color rojo, los blancos no deseados.

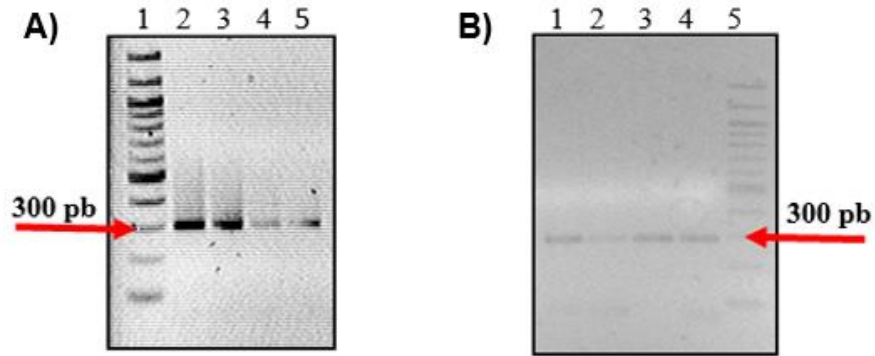


Figura 4. Amplificación del fragmento de *SCEI* y *ChII*

A) Obtención por PCR del fragmento de *SCEI* de aproximadamente 300 pb, a partir de cDNA de *S. arcanum* 2157. En el primer carril se presenta el marcador de peso molecular y en los siguientes el producto esperado de diferentes cDNA. B) Amplificación del segmento de *ChII* con diferentes repeticiones.

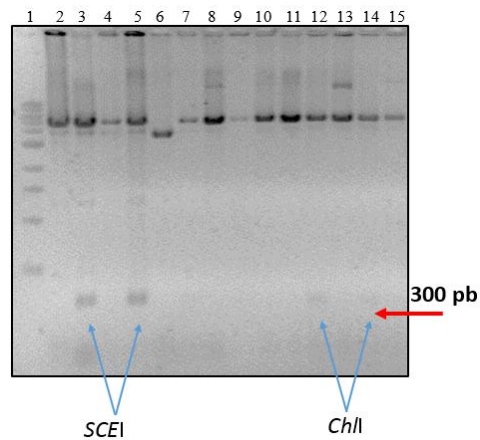


Figura 5. Verificación del fragmento del gen *SCEI* y *ChII* en ToMoV

Comprobación de construcciones de ToMoV_*SCEI* y ToMoV_*ChII* por medio de digestión con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*. En el carril 1 se muestra el MPM, en el 3 y 5 verificación de inserto de *SCEI*. En los carriles 12 y 15 se presenta el fragmento de *ChII*.

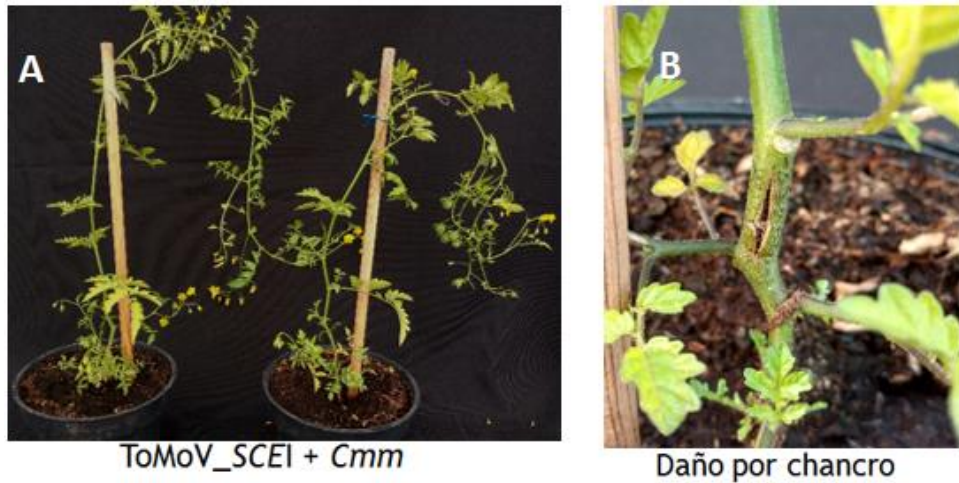


Figura 6. Fenotipo de *S. arcanum* 2157-28 días post inoculación (dpi)

A) Plantas de *S. arcanum* 2157 con desarrollo normal después del reto con *Cmm* e inoculadas con el vector ToMoV_SCEI. B) Se presenta chancro bacteriano en planta silenciada con ToMoV_SCEI lo cual indica que se pierde parcialmente su resistencia.

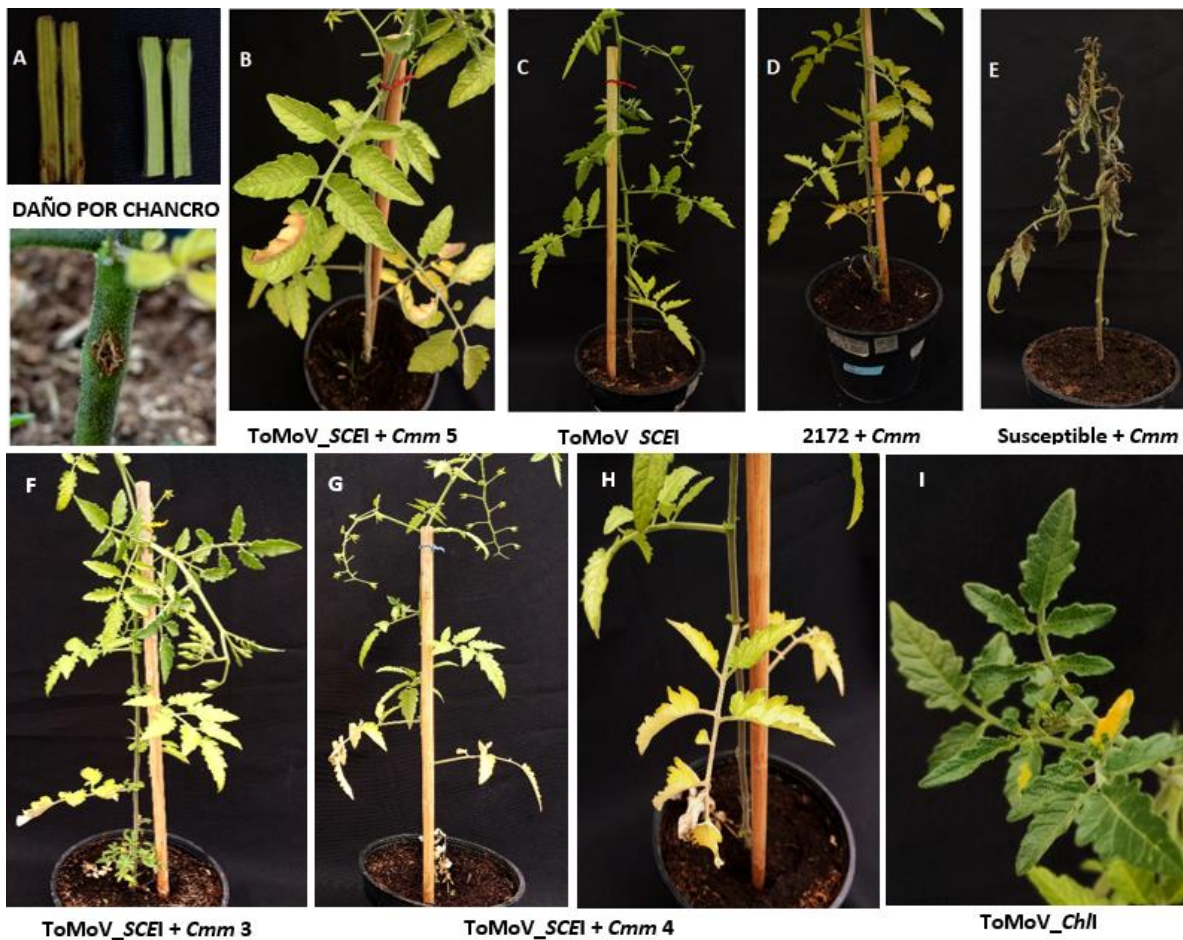
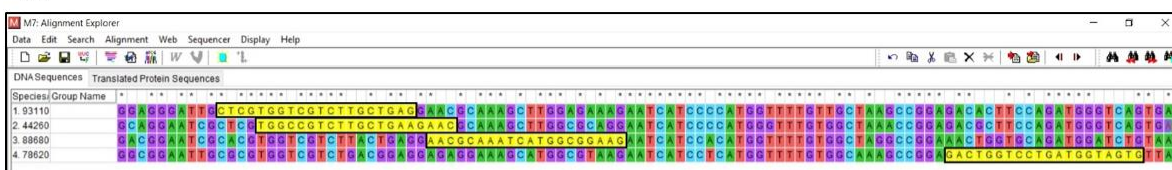


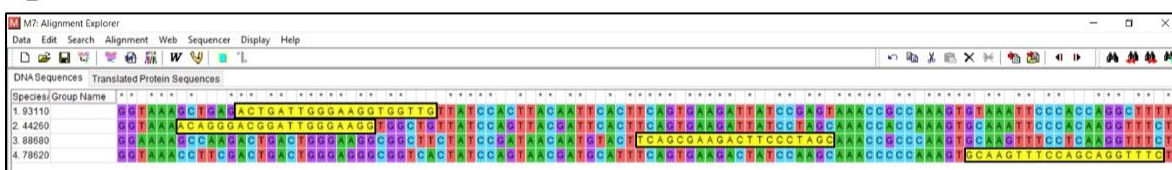
Figura 7. Fenotipo de *S. arcanum* 2172 y *S. lycopersicum*-28 dpi

A) Se muestra del lado izquierdo de la figura un tallo con daño por la presencia de *Cmm* y otro del lado derecho sano, además en la parte inferior se muestra un tallo con chancro bacteriano. B) *S. arcanum* 2172 inoculada con ToMoV_*SCEI*, donde se observó daño en las hojas por causa de *Cmm* (planta 5 de 5). C) *S. arcanum* 2172 disparada con ToMoV_*SCEI* y sin reto, por lo tanto, presentó un desarrollo normal. D) *S. arcanum* 2172 sin bombardeo con el vector, pero con reto, donde exhibió un bajo grado de marchitez en sus hojas laterales. E) *S. lycopersicum* con reto, donde la planta manifestó un deterioro completo por causa de *Cmm* ya que es una especie susceptible. F) Tercer planta bombardeada con ToMoV_*SCEI*, y retada, donde se presentó daño en hojas laterales por causa de *Cmm*. G) Cuarta planta bombardeada con ToMoV_*SCEI*, donde se observó daño en las hojas por causa de *Cmm*. H) Acercamiento para mostrar la marchitez en hojas de la cuarta planta anteriormente mencionada. I) *S. arcanum* 2172 inoculada con ToMoV_*Chl* donde se observó blanqueamiento parcial en una planta.

A



B



C

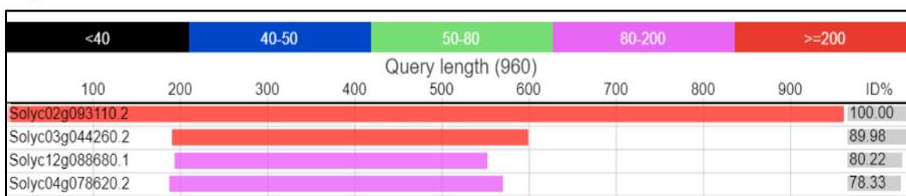


Figura 8. Alineamiento de secuencias de cDNA de *SCEI* y sus parálogos

A) Alineamiento de *SCEI* y de sus tres parálogos (44260, 88680 y 78620), donde se identifica con amarillo los oligonucleótidos sentido de cada uno, asegurando la especificidad de los mismos. B) Alineamiento de *SCEI* y sus parálogos con sus respectivos oligonucleótidos anti-sentido para la cuantificación de expresión relativa por RT-qPCR. C) Porcentaje de identidad de los parálogos con *SCEI* (Solyc02g0393110), donde se indica que Solyc03g044260 cuenta con el porcentaje más alto con 89.98%, seguido por Solyc12g088680 con 80.22% y, por último, Solyc04g078620 con 78.33%.

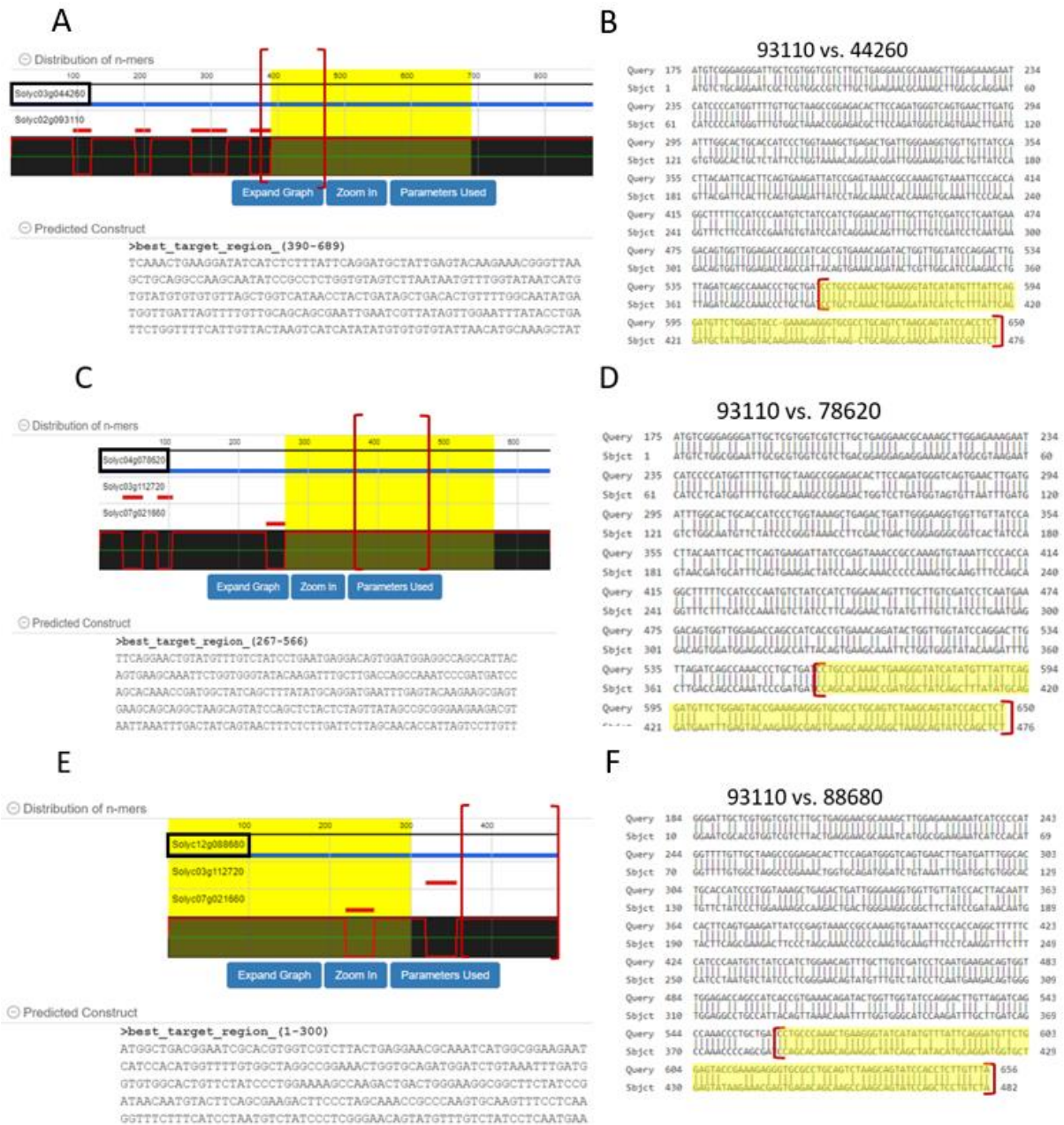


Figura 9. Análisis de los parálogos por medio de VIGS tool de Solgenomics

A) Se presenta en amarillo la región más adecuada para silenciar del parálogo 44260. Con corchete rojo se indica la región que se abarca con ToMoV_SCEI. B) Alineamiento mediante BLAST de los cDNA de SCEI y de su parálogo 44260, donde se muestra en amarillo y con corchete la región que corresponde el segmento clonado en ToMoV_SCEI. C) Se indica con amarillo el fragmento de secuencia más apto para ser silenciado según Solgenomics, mismo que se encuentra marcado con corchetes rojos, lo cual indica que coincide con la región clonada en ToMoV_SCEI. D) Alineamiento de cDNA del gen SCEI con el parálogo 78620, el cual tiene el menor porcentaje de identidad. E) Se indica en amarillo el segmento de secuencia que da como mejor blanco la herramienta VIGS de Solgenomics y con corchetes rojos y a una distancia más alejada la región que debe silenciar el vector ToMoV_SCEI. F)

Alineamiento de cDNA de *SCEI* contra el gen 88680. En amarillo y en corchete se define la región que corresponde al vector ToMoV_*SCEI*.

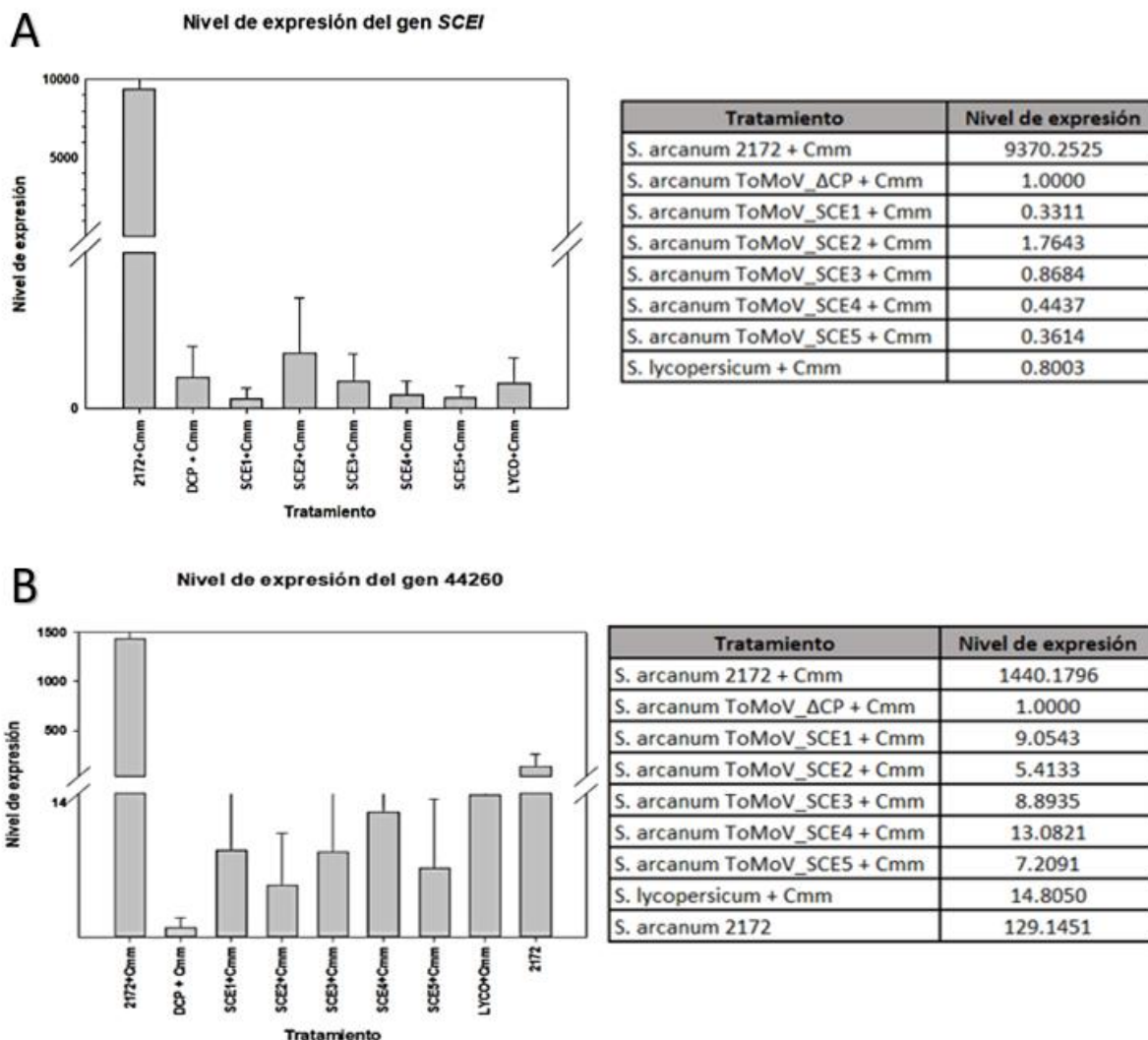
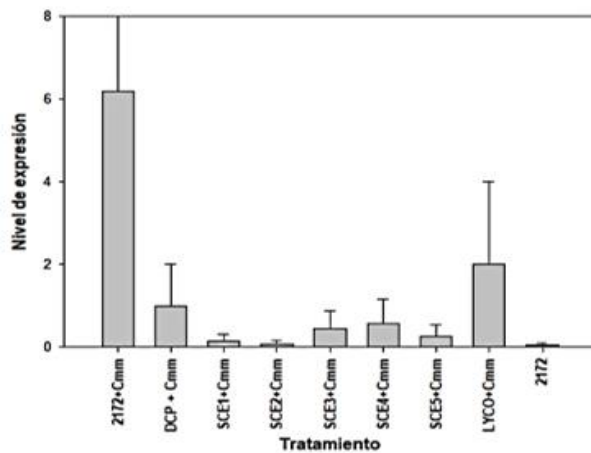


Figura 10. Nivel de expresión del gen *SCEI* y su parólogo (44260) determinado por RT-qPCR 8 horas después del reto con *Cmm* en *S. arcanum* 2172

A) Se presentan 3 diferentes niveles de silenciamiento entre *S. arcanum* 2172-*SCEI* con respecto al control *S. arcanum* 2172 + *Cmm*, siendo el primer grupo el que tiene menor nivel de expresión del gen *SCEI* (plantas 1, 4 y 5), es decir, mayor eficiencia en el silenciamiento, seguido por el grupo 2 con la planta 3 que da un valor cercano a el control (*S. arcanum* 2172 ToMoV-ΔCP + *Cmm*). Por el contrario, el tercer grupo con la planta 2, presenta una mayor expresión del gen con respecto al control, lo que indica que no se obtuvo el silenciamiento deseado. B) Las plantas bombardeadas con ToMoV_*SCEI* y retadas con *Cmm* mostraron niveles más altos de expresión del parólogo 44260 con respecto al control ToMoV_ΔCP + *Cmm*, pero muestran valores menores con respecto a las plantas de *S. arcanum* 2172 con y sin reto, demostrando que si hay silenciamiento de dicho gen.

A

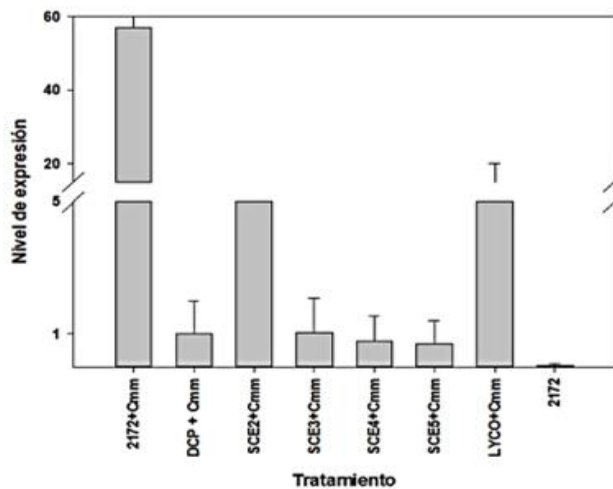
Nivel de expresión del gen 78620



Tratamiento	Nivel de expresión
S. arcanum 2172 + Cmm	6.1883
S. arcanum ToMoV_ΔCP + Cmm	1.0000
S. arcanum ToMoV_SCE1 + Cmm	0.1585
S. arcanum ToMoV_SCE2 + Cmm	0.0824
S. arcanum ToMoV_SCE3 + Cmm	0.4433
S. arcanum ToMoV_SCE4 + Cmm	0.5824
S. arcanum ToMoV_SCE5 + Cmm	0.2700
S. lycopersicum + Cmm	1.9992
S. arcanum 2172	0.0494

B

Nivel de expresión del gen 88680



Tratamiento	Nivel de expresión
S. arcanum 2172 + Cmm	57.0104
S. arcanum ToMoV_ΔCP + Cmm	1.0000
S. arcanum ToMoV_SCE2 + Cmm	5.0330
S. arcanum ToMoV_SCE3 + Cmm	1.0453
S. arcanum ToMoV_SCE4 + Cmm	0.7789
S. arcanum ToMoV_SCE5 + Cmm	0.7027
S. lycopersicum + Cmm	9.9972
S. arcanum 2172	0.0452

Figura 11. Nivel de expresión de los parálogos 78620 y 88680 del gen *SCEI* determinado por RT-qPCR 8 horas después del reto con *Cmm* en *S. arcanum* 2172

A) Se presenta el nivel de expresión del parálogo 78620 en los diversos tratamientos, demostrando silenciamiento en todas las muestras bombardeadas con ToMoV_ *SCEI* y retadas, con cifras menores a uno como lo es el control, además de estar por debajo de la expresión de *S. arcanum* 2172 sin bombardear y con reto. B) Se exhiben diferentes niveles de expresión en *S. arcanum* bombardeadas con el vector ToMoV_ *SCEI* y retadas; las muestras SCE2 y SCE3 muestran niveles por encima del control ToMoV_ΔCP + *Cmm*, y SCE4 y SCE5 niveles por debajo del control. A pesar de estas diferencias de silenciamiento con respecto al control, comparados con *S. arcanum* 2172 sin bombardear y con reto sus valores de expresión están por debajo, sugiriendo silenciamiento de dicho parálogo.

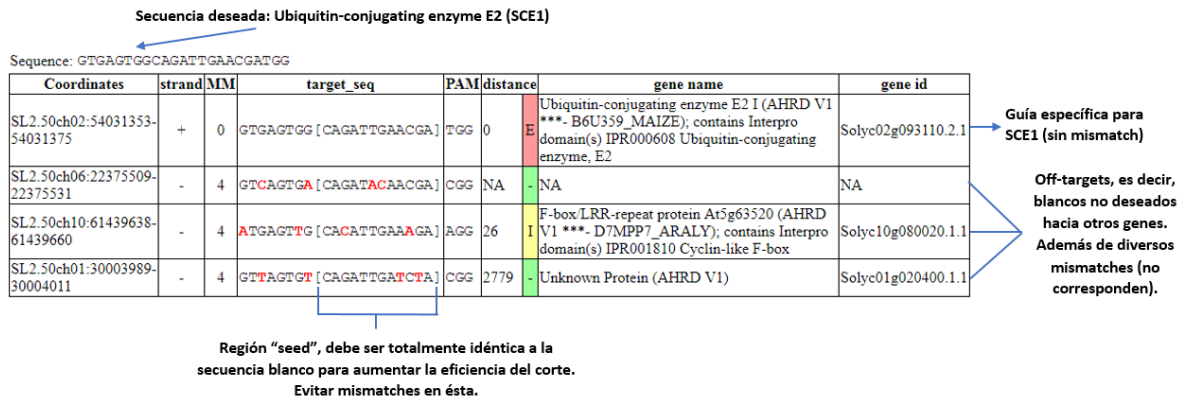


Figura 12. Predicción de guías con el programa CCTop

Se predice una guía para el gen *SCE1*, seguido de identificar cuántos blancos no deseados se presentan para la misma secuencia y verificar la secuencia "seed" de éstos.

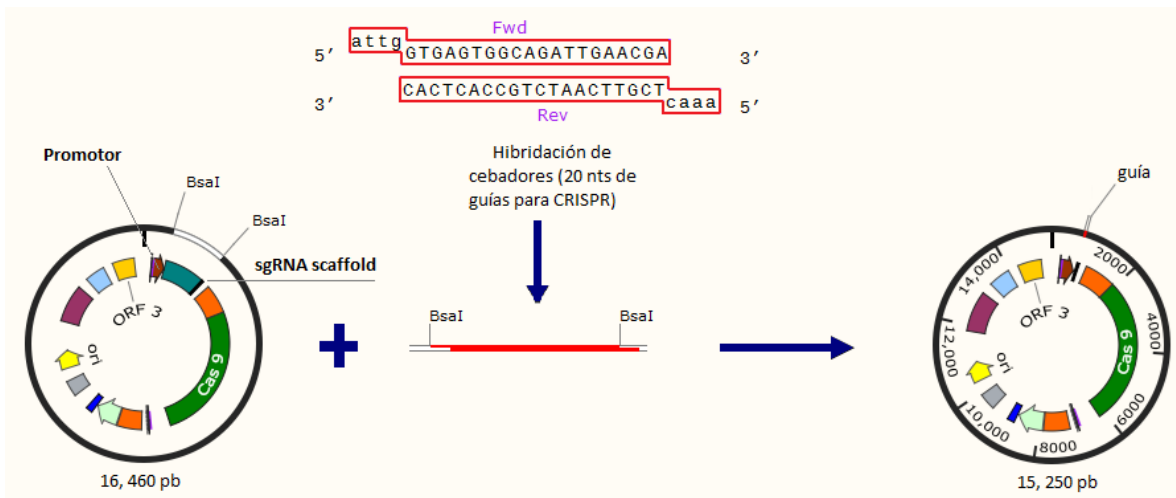


Figura 13. Esquema de clonación de guías para CRISPR/Cas9.

Se hibridaron los oligonucleótidos entre sí para formar una guía, seguido de esto se clonó al vector por medio de la técnica de ensamblaje "Golden Gate" (donde se realizó ligación y digestión en una sola reacción).

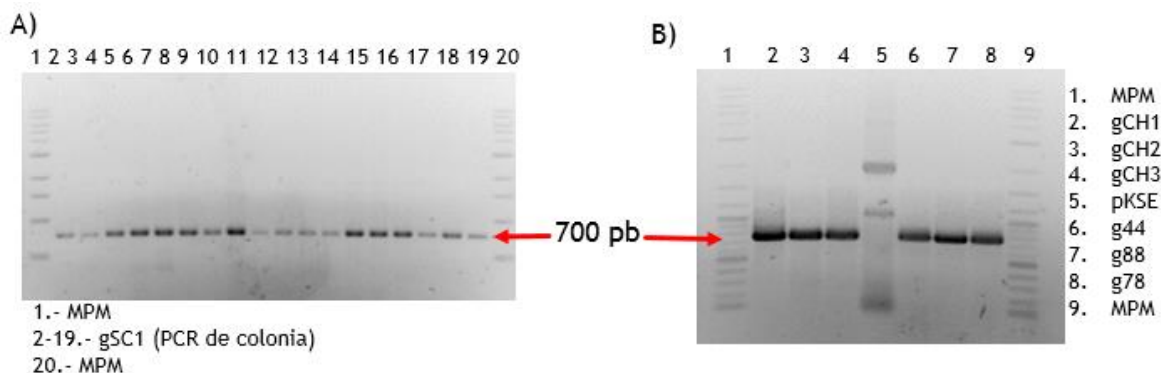


Figura 14. Verificación por PCR de clonación de guías.

A) PCR de colonia de gSC1 clonado en pKSE401 con producto aproximado de 700 pb. B) PCR de minipreps con diferentes guías únicas clonadas en pKSE401, banda de aproximadamente 700 pb.

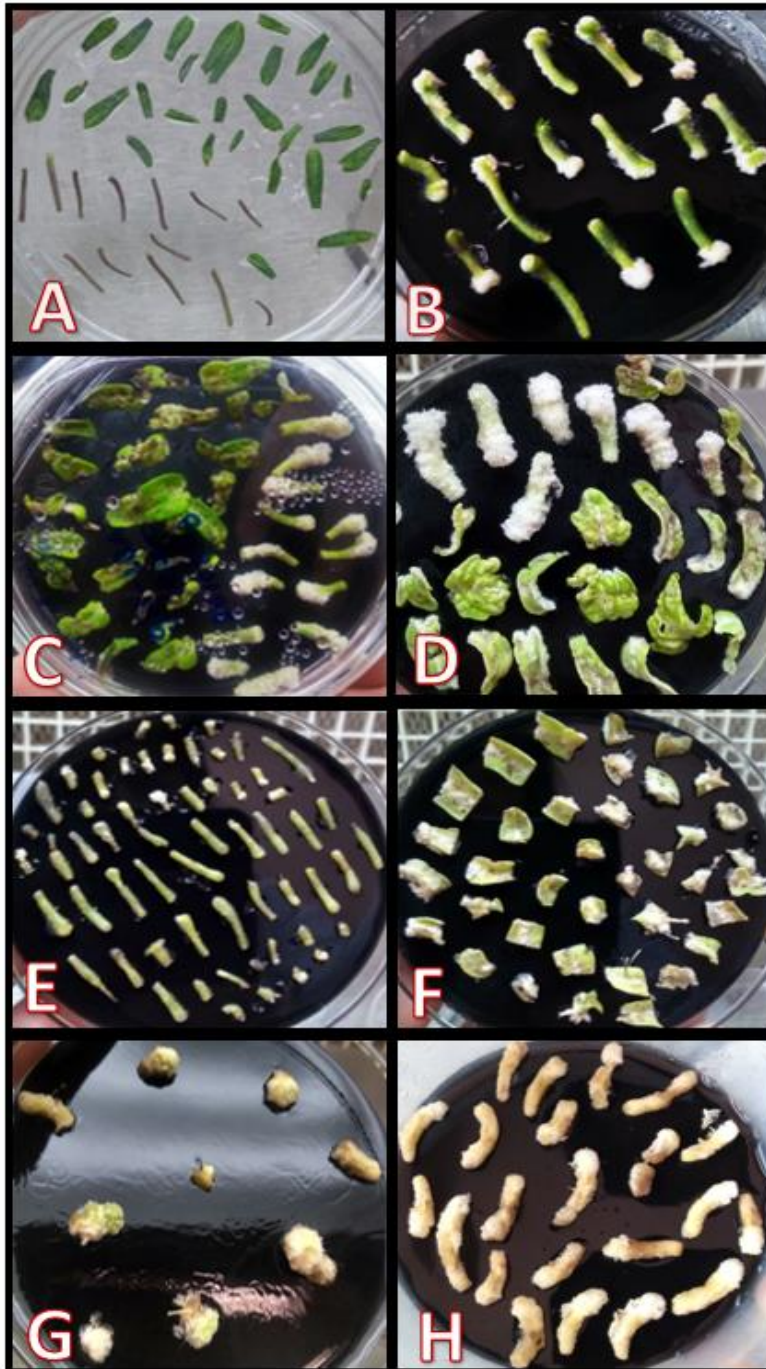


Figura 15. Transformación con *Agrobacterium* de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, Micro-Tom, y *S. arcanum* 2157.

A) Explantes de *S. lycopersicum* recién colocados en medio para co-cultivo. B) Evolución durante un mes de transformación en *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig con

la guía gSC1 clonada en el vector pKSE401. C) Explantes después de una semana de haber sido expuestos a *Agrobacterium* con gSC1 en *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. D) Progreso de transformación en *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom con los tres tipos de explantes: hipocótilos, cotiledones y hojas (de arriba abajo respectivamente). E) Transformación en *S. arcanum* 2157, donde el avance después de mes y medio es muy lento comparado a *S. lycopersicum*. F) Desarrollo de transformación en cotiledones como explantes de *S. lycopersicum* cv Ailsa Craig. G) Evolución de callos escindidos de hipocótilos de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig con la guía clonada gSC1. H) Oxidación y muerte de explantes de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig después de haber presentado un buen desarrollo en la transformación. Todos los explantes anteriores llegaron al mismo punto de oxidación y muerte.

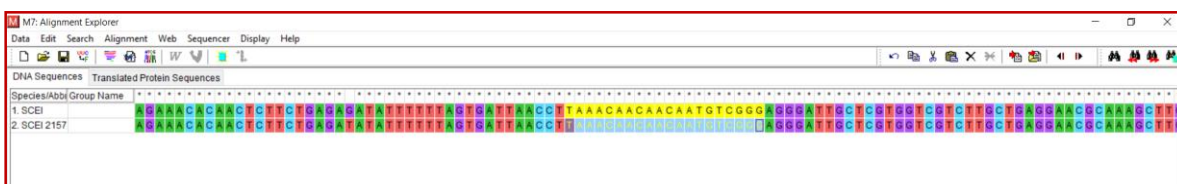


Figura 16. Análisis de edición génica de secuencia obtenida de callo contra la del gen *SCEI* descrita en NCBI.

Se enfocan en amarillo los nucleótidos correspondientes a la guía gSC2 tanto en la secuencia genómica de *SCEI* de NCBI, como de los resultados obtenidos por secuenciación de la muestra de DNA de callo de *S. arcanum* 2157. Se confirma que la edición génica fue negativa, ya que no hay cambio o diversidad en dichas secuencias.

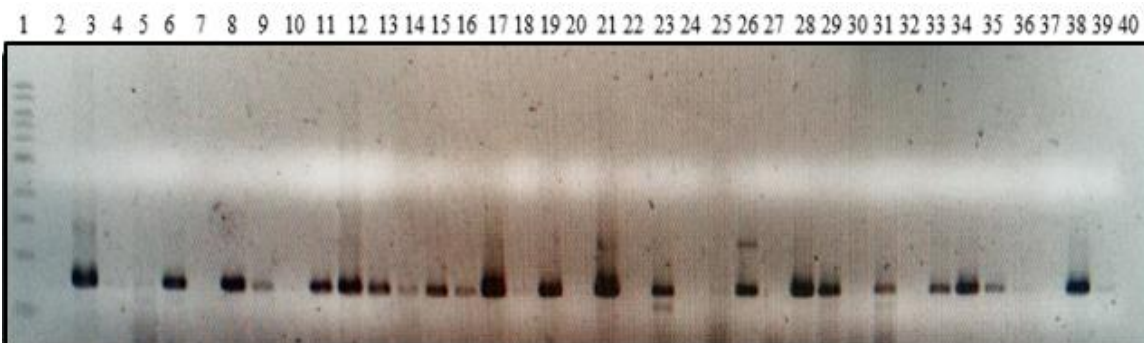


Figura 17. Confirmación por PCR de transformación con *Agrobacterium* de diferentes callos con guías específicas. En el primer carril se muestra el marcador de 1 Kb, seguido por el control negativo en el segundo y en el tercero el positivo (donde se presenta la banda esperada de 700 pb). Los siguientes quince carriles corresponden a las muestras transformadas con gCH1, y posteriormente 13 carriles con gSC1 y finalmente, los ocho carriles restantes presentan gSC2. El último carril carece de muestra.



Figura 18. Plántulas obtenidas después de la transformación mediada por *Agrobacterium* directamente en semilla con sonicación.

Se presenta el desarrollo de las plántulas después de 24 días del tratamiento de sonicación con la suspensión bacteriana conteniendo la construcción de la guía gCH1. Se logra identificar un crecimiento variado, es decir, unas semillas sin germinar, además de que algunas plántulas se ven más grandes que otras y con diferente coloración.



Figura 19. Transformación en hojas de *N. benthamiana*.

Se muestra el avance de transformación mediada por *Agrobacterium* de *N. benthamiana* 15 días después de haber sido expuesta a la suspensión bacteriana con la construcción de quelatasa, gCH1.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahsan N, Lee S-H, Lee D-G, Anisuzzaman M, Alam MF, Yoon H-S, Choi MS, Yang J-K, Lee B-H. 2007. The effects of wounding type, preculture, infection method and cocultivation temperature on the *Agrobacterium*-mediated gene transfer in tomatoes. *Ann. Appl. Biol.* 151: 363–372.
- Anderson EM, Haupt A, Schiel JA, Chou E, Machado HB, Strezoska Ž, Lenger S, McClelland S, Birmingham A, Vermeulen A, Smith AVB. 2015. Systematic analysis of CRISPR-Cas9 mismatch tolerance reveals low levels of off-target activity. *J. Biotechnol.* 211: 56–65.
- Borboa Flores J, Rueda Puente EO, Acedo Félix E, Ponce JF, Cruz M, Grimaldo Juárez O, García Ortega AM. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 319–326.
- Butler NM, Atkins PA, Voytas DF, Douches DS. 2015. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) Using the CRISPR/Cas System. *PLoS One* 10: 1–12.
- Carqueijeiro I, Masini E, Foureau E, Sepúlveda LJ, Marais E, Lanoue A, Besseau S, Papon N, Clastre M, Dugé de Bernonville T, Glévarec G, Atehortúa L, Oudin A, Courdavault V. 2015. Virus-induced gene silencing in *Catharanthus roseus* by biolistic inoculation of tobacco rattle virus vectors. *Plant Biol.* 17: 1242–1246.
- Castaño L, Mas A, Teixeira I, Seguí J, Perearnau A, Thampi BN, Schapire AL, Rodrigo N, La Verde G, Manrique S, Coca M, Lois LM. 2017. SUMOylation inhibition mediated by disruption of SUMO E1-E2 interactions confers plant susceptibility to necrotrophic fungal pathogens. *Mol. Plant* 10: 709–720.
- Chalupowicz L, Barash I, Cohen-Kandli M, Eichenlaub R, Manulis-Sasson S, Dror O, Gartemann K-H, Sessa G. 2010. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 100: 252–261.
- Char SN, Neelakandan AK, Nahampun H, Frame B, Main M, Spalding MH, Becraft PW, Meyers BC, Walbot V, Wang K, Yang B. 2017. An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol. J.* 15: 257–268.
- Chen L, Li W, Katin-Grazzini L, Ding J, Gu X, Li Y, Gu T, Wang R, Lin X, Deng Z, McAvoy RJ, Gmitter FG, Deng Z, Zhao Y, Li Y. 2018. A method for the production and expedient screening of CRISPR/Cas9-mediated non-transgenic mutant plants. *Hortic. Res.* 5.
- Cong L, Zhang F. 2014. Genome engineering using crispr-cas9 system. *Chromosom. Mutagen. Second Ed.* 8: 197–217.
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J. 1983. A plant DNA minipreparation. *Plant Mol. Biol. Report.* March, vol: 19–20.
- Doudna JA, Charpentier E, Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (80-.). 337: 816–821.
- Endo M, Mikami M, Toki S. 2015. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/cas9 system in rice. *Plant Cell Physiol.* 56: 41–47.
- Eschstruth A, Kent J, Renaud J-B, Shkumatava A, Schönig K, Eckert H, Haeussler

- M, Concordet J-P, Joly J-S, Schneider-Maunoury S, Teboul L, Mianné J. 2016. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 17: 148.
- Esparza-Araiza MJ, Argüello-Astorga GR, Rougon-Cardoso A, Isordia-Jasso MI, Castillo-Collazo R, Bañuelos-Hernández B, Lara-Ávila JP, Goodwin PH, Alpuche-Solís ÁG. 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: 1–11.
- FAO. 2017. Publicaciones de la FAO catalogos 2017. Organ. las Nac. Unidas para la Aliment. y la Agric. 1: 5–30.
- Farboud B, Meyer BJ. 2015. Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/cas9 through improved guide RNA design. *Genetics* 199: 959–971.
- Fu DQ, Zhu BZ, Zhu HL, Jiang WB, Luo YB. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J.* 43: 299–308.
- Fu DQ, Zhu BZ, Zhu HL, Zhang HX, Xie YH, Jiang WB, Zhao XD, Luo YB. 2006. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Mol. Cells* 21: 153–160.
- Ghorbanzade Z, Ahmadabadi M. 2015. Stable Transformation of the *Saintpaulia ionantha* by Particle Bombardment. *Iran. J. Biotechnol.* 13: 11–16.
- Guo B, Yang S-H, Witty J, Sharrocks AD. 2008. Signalling pathways and the regulation of SUMO modification. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 1414–1418.
- Guo R, Sun W. 2017. Sumoylation stabilizes RACK1B and enhance its interaction with RAP2.6 in the abscisic acid response. *Sci. Rep.* 7: 1–13.
- Hammond SM. 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579: 5822–5829.
- Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue GP. 2002. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J.* 30: 315–327.
- Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S. 2015. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467: 76–82.
- Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, Parrott WA. 2015. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol.* 15: 16.
- Kant R, Dasgupta I. 2017. Phenotyping of VIGS-mediated gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus. *Plant Cell Rep.* 36: 1159–1170.
- Kim J-S, Cho SW, Kim S-T, Kim H, Woo JW, Choe S, Kwon S Il, Kim S-G, Corvalán C, Kim J. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33: 1162–1164.
- Kim KH, Lim S, Kang YJ, Yoon MY, Nam M, Jun TH, Seo MJ, Baek SB, Lee JH, Moon JK, Lee SH, Lee SH, Lim HS, Moon JS, Park CH. 2016. Optimization of a virus-induced gene silencing system with soybean yellow common mosaic virus for gene function studies in soybeans. *Plant Pathol. J.* 32: 112–122.
- Kumar Sah S, Kaur A. 2016. High Frequency Embryogenic Callus Induction and Whole Plant Regeneration in Japonica Rice Cv. Kitaake. *Rice Res. Open Access* 2: 125.
- Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. 2016. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 44: W272–W276.

- Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. 2015. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 4: e252.
- Lei Y, Lu L, Liu H-Y, Li S, Xing F, Chen L-L. 2014. CRISPR-P: A Web Tool for Synthetic Single-Guide RNA Design of CRISPR-System in Plants. *Mol. Plant* 7: 1494–1496.
- Liu H, Ding Y, Zhou Y, Jin W, Xie K, Chen LL. 2017. CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Mol. Plant* 10: 530–532.
- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu YG. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant* 8: 1274–1284.
- Mayavan S, Subramanyam K, Arun M, Rajesh M, Kapil Dev G, Sivanandhan G, Jaganath B, Manickavasagam M, Selvaraj N, Ganapathi A. 2013. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane. *Plant Cell Rep.* 32: 1557–1574.
- Miura K, Hasegawa PM. 2010. Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *Trends Cell Biol.* 20: 223–232.
- Nicholson KL, Tarlyn N, Armour T, Swanson ME, Dhingra A. 2012. Effect of phyllotactic position and cultural treatments toward successful direct shoot organogenesis in dwarf “Pixie” grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 111: 123–129.
- Periwal V. 2017. A comprehensive overview of computational resources to aid in precision genome editing with engineered nucleases. *Brief. Bioinform.* 18: 698–711.
- Purkayastha A, Mathur S, Verma V, Sharma S, Dasgupta I. 2010. Virus-induced gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus. *Planta* 232: 1531–1540.
- Qianru L, Chen CS, Xu YJ, Hu SK, Wang L, Sun K, Chen X, Li XH. 2017. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation systems in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Hortic. Plant J.* 3: 105–109.
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154: 1380–1389.
- Rana TM. 2007. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 23–36.
- Rodríguez González EM. 2014. Obtención de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sobreexpresantes del gen *sce1*, como candidato a conferir resistencia contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Sanchez-Duran MA, Dallas MB, Ascencio-Ibanez JT, Reyes MI, Arroyo-Mateos M, Ruiz-Albert J, Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER. 2011. Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO-conjugating enzyme is required for viral infection. *J. Virol.* 85: 9789–9800.
- Saracco SA, Miller MJ, Kurepa J, Vierstra RD. 2007. Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol.* 145: 119–134.
- Sen Y, Wolf J van der, Visser R, Heusden S van. 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Dis.* 99: 4–13.

- Senthil-kumar M, Hema R, Anand A, Kang L, Udayakumar M, Mysore KS. 2007. A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytol.* 176: 782–791.
- Shen Z, Sun J, Yao J, Wang S, Ding M, Zhang H, Qian Z, Zhao N, Sa G, Zhao R, Shen X, Polle A, Chen S. 2015. High rates of virus-induced gene silencing by tobacco rattle virus in *Populus*. *Tree Physiol.* 35: 1016–1029.
- Srinivas K, Muralikrishna N, Kumar KB, Raghu E, Mahender A, Kiranmayee K, Yashodahara V, Sadanandam A. 2016. Biolistic transformation of *Scoparia dulcis* L. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 22: 61–68.
- Stemmer M, Thumberger T, del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. 2015. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* 10: e0124633.
- Sun S, Kang XP, Xing XJ, Xu XY, Cheng J, Zheng SW, Xing GM. 2015. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29: 861–868.
- Tripathi R, Tiwari R, Vishunavat K. 2018. Evaluation of different growth media for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and formation of biofilm like structures. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7: 207–216.
- Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K. 2017. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* 7: 507.
- Valentine T. 2004. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. *Plant Physiol.* 136: 3999–4009.
- Wang S, Zhang S, Wang W, Xiong X, Meng F, Cui X. 2015. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep.* 34: 1473–1476.
- Watson JM, Fusaro AF, Wang M, Waterhouse PM. 2005. RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett.* 579: 5982–5987.
- Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 14: 327.
- Xiong R, Wang A. 2013. SCE1, the SUMO-Conjugating Enzyme in plants that interacts with N1b, the RNA-dependent RNA polymerase of turnip mosaic virus, is required for viral infection. *J. Virol.* 87: 4704–4715.
- Yang W, Wu Y, Li H, Wei S, Yan L, Xie Q, Hu R. 2015. High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant* 8: 1820–1823.
- Zhang S, Zhuang K, Wang S, Lv J, Ma N, Meng Q. 2017. A novel tomato SUMO E3 ligase, SISIZ1, confers drought tolerance in transgenic tobacco. *J. Integr. Plant Biol.* 59: 102–117.