

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis de la tolerancia al chancro bacteriano de
una especie de tomate comercial que sobreexpresa
el gen *SCEI***

Tesis que presenta

Norma Angélica Luna Cruz

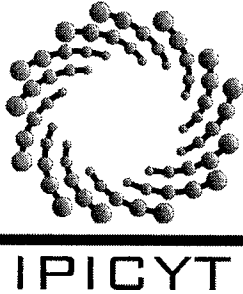
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

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



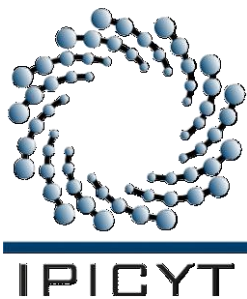
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Análisis de la tolerancia al chancro bacteriano de una especie de tomate comercial que sobreexpresa el gen SCEI**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Norma Angélica Luna Cruz** y aprobada el catorce de julio del dos mil dieciséis por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Director de la tesis

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

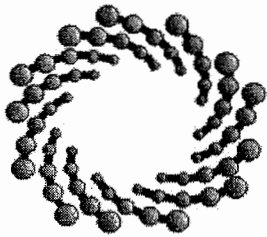
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con No. de registro 331850 y contó con el apoyo de los proyectos Control del cáncer bacteriano de la Fundación Produce-SLP, del Fordecyt-CONACYT No. 2012-02-193512 y del FOMIX FMSLP-2013-C01-209337.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 157 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de julio del año 2016, se reunió a las 17:30 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
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Norma Angélica Luna Cruz

sobre la Tesis intitulada:

Análisis de la tolerancia al chancro bacteriano de una especie de tomate comercial que sobreexpresa el gen SCEI

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 19:00 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 14 días del mes de julio de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis papás y hermanos por ser cómplices incondicionales de cada aventura.
Por ser lo más hermoso que tengo en la vida.

A mi princesa.

Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por la paciencia, consejos y guía en este tiempo. Por confiar en mí para formar parte de su grupo de trabajo.

A la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por fungir como mis sinodales, por sus consejos y sus valiosas aportaciones.

A mis compañeros del laboratorio 1 de Biología Molecular de Plantas por el apoyo, disposición y muy agradables platicas diarias. A Mayra por compartir conmigo sus conocimientos, por su amistad, por todo el apoyo y el cariño.

A los técnicos Rosy Castillo, Anita Romero y Salvador Ambriz por hacer de este laboratorio un buen lugar para trabajar.

A la Sra. Rosy Cruz, por su esfuerzo y dedicación.

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

Al IPICYT por abrirme sus puertas. A CONACYT por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1. Introducción	1
2. Metodología	8
2.1 Obtención de semillas, esterilización y germinación en medio de cultivo	8
2.2 Extracción de ADN e identificación del transgén y marcador de selección por PCR.	9
2.3 Bioensayos de tolerancia a <i>Cmm</i>	9
2.4 Evaluación del fenotipo de las plantas transgénicas.	10
2.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	11
2.6 Confirmación de la sobreexpresión del transgén <i>SCEI</i> por PCR en tiempo real (qRT-PCR)	11

3. Resultados	13
3.1 Obtención de semillas, germinación, crecimiento y maduración del fruto.	13
3.2 Identificación del transgén <i>SCEI</i> y el marcado de selección <i>NPTII</i> en las plantas de la generación T1 y T2 de las plantas transformadas.	13
3.3 Bioensayos de tolerancia a <i>Cmm</i> y evaluación del fenotipo de la generación T2.	14
3.4 Validación de la expresión del transgén <i>SCEI</i> en líneas transgénicas de la generación T2	16
4. Discusión	17
5. Bibliografía	23

Listas de Tablas

Tabla 1. Componentes de la mezcla basal de sales MS

Tabla 2. Descripción de las líneas transgénicas de tres generaciones de plantas de *S. lycopersicum* var. Ailsa Craig

Lista de Figuras

Figura 1. Semillas de diferentes líneas transgénicas sobreexpresantes del gen *SCEI* y apariencia de una planta adulta

Figura. 2. Integridad del ADN de las muestras de plantas sobreexpresantes de la generación T2

Figura 3. Representación esquemática de la construcción pBI121-5' UTR-*SCEI*

Figura 4. Análisis de PCR de las plantas transformadas para el transgén *SCEI* y el marcador de selección *NPTII*

Figura 5. Síntomas característicos del chancro bacteriano a los 19 días post-infección

Figura 6. Progresión de los síntomas en el tallo

Figura 7. Cortes del tallo que muestran la progresión del chancro bacteriano

Figura 8. Diferencias fenotípicas entre una planta transgénica, una no transgénica y una planta control

Figura 9. Prueba de inocuidad para la planta de Medio LB o solución de MgCl₂.

Figura 10. Crecimiento diferencial de las plantas de la generación T2 respecto a las plantas WT

Figura 11. Fenotipo diferencial entre plantas transgénicas respecto a una planta WT

Figura 12. Validación por qRT-PCR de la sobreexpresión del gen *SCEI* en las líneas transgénicas

Figura 13. Fruto sano de una planta transgénica tolerante a *Cmm*

Resumen

Análisis de la tolerancia al chancro bacteriano de una especie de tomate comercial que sobreexpresa el gen *SCEI*

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es una de las hortalizas de mayor producción a nivel mundial. Sin embargo, el cáncer o chancro bacteriano causado por la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), constituye uno de los factores limitantes más importantes en su producción. El control convencional empleado para esta enfermedad implica el uso de agroquímicos, que no siempre resultan efectivos contra *Cmm*, generando incluso poblaciones bacterianas resistentes. La obtención de cultivares de tomate resistentes a este patógeno sería una estrategia de control favorable para el ambiente.

En este trabajo se logró la sobreexpresión del gen que codifica para la enzima de conjugación E2 (*SCEI*) en una especie de tomate susceptible a *Cmm*. *SCEI* codifica para una proteína que participa en la sumoilación, proceso involucrado en los mecanismos de defensa de la planta contra patógenos. En nuestro grupo de trabajo se demostró que *SCEI* participa en la resistencia a la infección por *Cmm* ya que su silenciamiento por ARN interferente en una especie silvestre resistente a *Cmm*, aumentó la susceptibilidad de las plantas a la infección por esta bacteria lo que sugiere su participación en la resistencia a la enfermedad.

La sobreexpresión de *SCEI* en *S. lycopersicum* var. Ailsa Craig se logró mediante la transformación de hipocotilos con *Agrobacterium tumefaciens*, que alberga un vector binario de expresión del gen *SCEI* bajo la regulación del promotor 35S CaMV. La transformación de las plantas se confirmó mediante PCR, tanto para el transgén *SCEI* como para el marcador de selección *NPTII*. Las líneas transgénicas sobreexpresantes fueron inoculadas con *Cmm* como reto, observándose una clara resistencia a la infección, que contrasta con la elevada susceptibilidad a la enfermedad de la línea silvestre. Esto demuestra que la sobreexpresión del gen *SCEI* confiere a las plantas de tomate una mayor resistencia al desarrollo de la enfermedad, lo que sugiere la participación de *SCEI* en etapas tempranas post-infección de *Cmm* como un mecanismo de defensa de la planta.

PALABRAS CLAVE: Sumoilación, tolerancia al chancro bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, plantas cisgénicas.

Abstract

Analysis of bacterial canker tolerance of a commercial tomato species overexpressing the *SCEI* gene.

Tomato (*Solanum lycopersicum*), is one of the most produced hortcrops worldwide. However, cancer or bacterial canker caused by the Gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), represents one of the most important limiting factors in its production. The conventional control method used for this disease implies the use of chemicals, which not always turns out to be effective against *Cmm*, even producing resistant bacterial populations. Obtaining resistant tomato cultivars to this pathogen could be an environmentally friendly control strategy.

In this work we achieved the overexpression of the *SCEI* gene which encodes for the E2 conjugating enzyme (*SCEI*) in a tomato species susceptible to *Cmm*. *SCEI* encodes proteins related to sumoylation, a process involved in the plant's defense mechanism against pathogens. Our research group demonstrated that *SCEI* participates in the resistance to infection by *Cmm*, because its silencing by RNA interference in a related wild tomato species resistant to *Cmm*, increased the susceptibility of plants to this disease, which suggests its participation in disease resistance. *SCEI* overexpression in *S. lycopersicum* var. Aisa Craig was performed by transformation of hypocotyls with *Agrobacterium tumefaciens* harboring a binary vector for the expression of the *SCEI* gene driven by the CaMV 35S promoter. The plant transformation was confirmed by PCR assay for the *SCEI* and the *NPTII* selection marker transgenes. The overexpressing transgenic lines were infected with *Cmm* as a challenge showing a clear resistance to the infection contrasting with the high susceptibility to the disease in the wild type line. This demonstrate that overexpression of the *SCEI* gene confers tolerance to the disease to a susceptible species which suggests a possible participation of *SCEI* in early *Cmm* post-infection stages as a defense mechanism of the plant.

KEY WORDS: Sumoylation, bacterial canker tolerance, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, cisgenic plants.

1. Introducción

1
2
3 La bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) es el agente
4 causal del chancro o cáncer bacteriano del tomate (*Solanum lycopersicum*) (Balaji
5 *et al.*, 2008). Esta enfermedad ha causado grandes pérdidas económicas que
6 pueden llegar a ser devastadoras para las regiones productoras de tomate en todo
7 el mundo. *Cmm* fue inicialmente aislado en Michigan, E.U.A., en 1909 y rápidamente
8 se extendió a estados cercanos incluyendo Nueva York. A partir del impacto en la
9 agricultura de Estados Unidos, *Cmm* fue incluida en la lista de organismos bajo
10 cuarentena para Europa, Asia, el Caribe y África (Dreier *et al.*, 1997; Tancos *et al.*,
11 2013). En México, *Cmm* fue identificada en 1994 en el Valle de Culiacán
12 extendiéndose posteriormente a las principales áreas hortícolas de producción
13 nacional y exportación como Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur y Baja
14 California Norte (Holguín *et al.*, 2006). Las afectaciones agrícolas por esta
15 enfermedad se han visto reflejadas en pérdidas económicas de hasta 40 millones
16 de dólares anuales (Borboa, 2009).

17 *Cmm* es un bacilo Gram-positivo, no móvil, aeróbico, cuya temperatura óptima de
18 crecimiento *in vitro* es de 25 a 28 °C (Borboa, 2009). La bacteria ingresa a la planta
19 a través de heridas, estomas, tricomas e hidátodos de la hoja (Carlton, *et al.*, 1998).
20 Una vez dentro de la planta, la bacteria se multiplica en los vasos del xilema,
21 formando una biopelícula sobre las estructuras, lo que le permite la colonizar
22 gradualmente todos los órganos de la planta, desarrollando una infección sistémica
23 que usualmente aparece a partir de los 30-40 días (Chalupowicz *et al.*, 2012; Chang
24 *et al.*, 1991).

25 Los síntomas que se observan durante las etapas tempranas del desarrollo de la
26 enfermedad son el marchitamiento unilateral de las hojas (secado de los márgenes
27 de los folíolos) que progresa tallo arriba (Gartemann *et al.*, 2008). En etapas
28 avanzadas de la infección, se forman lesiones en los tallos conocidas como
29 chancros, mientras que en el fruto aparecen pequeños puntos negros rodeados por
30 un halo blanco, que se denominan “ojos de pájaro”, estos síntomas progresan hasta
31 la muerte de la planta (Smith, 1920). *Cmm* puede sobrevivir como endófito activa
32 en el tomate pero al parecer necesita establecer una población endofítica mayor a
33 10^8 UFC/ g de tejido de la planta para inducir los síntomas de la enfermedad
34 (Chalupowicz *et al.*, 2012). La patogenicidad de *Cmm* está dada por serín-
35 proteasas y otras enzimas que degradan la pared celular, las cuales se encuentran
36 codificadas en dos plásmidos, pCM1 y pCM2 (Meletzus *et al.*, 1993; Savidor *et al.*,
37 2014). Además, en el cromosoma de la bacteria se ha delimitado una región de
38 aproximadamente 129 Kb que está flanqueada por los genes *chpC* y *tomA* conocida
39 como isla de patogenicidad, ya que cepas mutantes carentes de esta región son
40 incapaces de colonizar eficazmente a la planta (Gartemann *et al.*, 2008). La
41 degradación de las paredes celulares de los vasos del xilema resulta en la
42 disminución en el transporte de agua y el consiguiente marchitamiento (Gartemann
43 *et al.*, 2008).

44 Actualmente el control del chancro bacteriano se basa principalmente en el uso de
45 semillas certificadas libres de *Cmm*, prácticas de trasplantes sanos y la rotación de
46 cultivos. Sin embargo, una vez que la enfermedad se establece y debido a la
47 capacidad de *Cmm* de permanecer en el suelo por largos periodos de tiempo, se

48 emplean tratamientos químicos, como el uso de bactericidas a base de cobre o
49 antibióticos, los cuales tienen un impacto limitado en el control de la enfermedad y
50 generan además poblaciones bacterianas resistentes (Hausbeck, 2000). No existen
51 cultivares comerciales resistentes, pero sí especies silvestres que poseen
52 resistencia a *Cmm* como *Solanum peruvianum* (van Heusden *et al.*, 1999) y *S.*
53 *habrochaites* (Francis *et al.*, 2001), que representan una alternativa viable al ser una
54 fuente de resistencia genética compatible con la especie susceptible comercial
55 susceptible (*Solanum lycopersicum*). Con base en esto, se ha propuesto la
56 obtención de plantas cisgénicas de valor comercial tolerantes a *Cmm* como
57 estrategia de control favorable para el medio ambiente.

58 Las modificaciones postraduccionales de proteínas tienen un papel fundamental en
59 una variedad de procesos biológicos como respuestas rápidas y concretas a
60 estímulos tanto endógenos como exógenos. Además de la fosforilación,
61 glicosilación y ubiquitinación de proteínas, la sumoilación ha surgido como tema
62 central en la diversificación de la actividad del proteoma (Xiong y Wang, 2013).

63 La sumoilación consiste en la unión covalente entre el carboxilo terminal de la glicina
64 de la proteína SUMO (del inglés Small Ubiquitin-like Modifiers), con el grupo amino
65 del residuo de lisina de una proteína diana. La vía enzimática de unión de SUMO a
66 sus proteínas blanco posee cierta similitud con el mecanismo de ubiquitinación pero
67 las enzimas involucradas en la sumoilación son SUMO-específicas. Las proteínas
68 SUMO se sintetizan como precursores y son procesadas por una isopeptidasa
69 SUMO-específica que expone la glicina en el C-terminal de la SUMO madura. La
70 SUMO madura es activada por E1, una enzima específica de SUMO. Una vez que

71 SUMO es activada, es transferida al residuo de cisteína de la enzima de conjugación
72 E2 y posteriormente transferida desde la E2 al residuo de lisina del sustrato diana
73 con la ayuda de la ligasa E3 también específica de SUMO (Johnson, 2004). Esta
74 reacción enzimática de tres pasos es un proceso altamente dinámico y reversible
75 en el cual las proteínas SUMO se conjugan a una amplia gama de proteínas
76 celulares. (Guo *et al.*, 2007; Xiong y Wang, 2013). En eucariotas, la sumoilación
77 modifica la actividad de diversas proteínas blanco (Elrouby y Coupland, 2010).

78 Se ha demostrado que la sobreexpresión de SUM1, SUM2 o SUM3, variantes de
79 SUMO en *Arabidopsis*, resulta en la activación constitutiva de la vía de señalización
80 del ácido salicílico (SA) que incrementa la tolerancia a *Pseudomonas syringae pv.*
81 *tomato* DC3000 (*Pst*DC3000). En las sobreexpresantes de SUMO se observa un
82 incremento de los niveles de SA y una disminución del crecimiento bacteriano así
83 como de los síntomas de la enfermedad, también se observó una floración temprana
84 respecto a las plantas control (van den Burg *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2006).

85 Se cree que proteínas codificadas por genes involucrados con la respuesta a estrés
86 se encuentran sumoiladas y dos ejemplos soportan esta teoría. El patógeno
87 *Xanthomonas campestris*, posee SUMO proteasas como AvrBst que entra a la planta
88 durante el proceso de infección e interfiere en la respuesta de defensa mediante la
89 desumoilación de algún factor importante en la respuesta a estrés, favoreciendo así
90 el proceso de colonización del huésped (Orth *et al.*, 2000). De manera similar, se
91 observó que XopD, un efector de *Xanthomonas campestris* codifica una proteasa
92 que escinde conjugados de SUMO. Después de su ingreso a la planta, XopD se
93 localiza en el núcleo, lo que indica que su sustrato son proteínas nucleares

94 sumoiladas. La presencia de XopD suprime el desarrollo de síntomas en plantas de
95 tomate lo que permite a la bacteria multiplicarse con éxito en el tejido reduciendo
96 además los niveles de SA y modulando los niveles de ARNm de genes asociados
97 con senescencia y defensa. La escisión de proteínas sumoiladas por acción de
98 XopD y la represión transcripcional de genes del huésped indica que la sumoilación
99 juega un papel importante en el mecanismo de defensa de la planta (Kim *et al.*,
100 2008).

101 La sumoilación no solo ocurre en proteínas nucleares; en *Arabidopsis* por ejemplo,
102 ocurre en proteínas con una amplia gama de funciones y que pueden encontrarse
103 en el núcleo, citoplasma, cloroplasto y mitocondria (Elrouby y Coupland, 2010;
104 Watts, 2004). Incluso algunos conjugados de SUMO pueden participar también en
105 el transporte núcleo-citoplasma (Rangasamy *et al.*, 2000).

106 La sumoilación ocurre también bajo condiciones de estrés abiótico. Los niveles de
107 los conjugados de SUMO1 y SUMO 2 incrementan transitoriamente bajo ciertos
108 tipos de estrés como la exposición a choque térmico, H₂O₂, etanol y canavanina.
109 Cuando las condiciones de estrés disminuyen, aumentan los niveles de SUMO1 y
110 SUMO2 libres lo que sugiere que la conjugación es reversible y que la sumoilación
111 ocurre rápidamente como respuesta a señales de estrés. Se sugiere también que la
112 conjugación SUMO 1 y SUMO 2 pudiera aumentar la solubilidad de proteínas que
113 han sido desnaturalizadas durante condiciones de estrés, y esto incrementaría su
114 remoción mediante vías proteolíticas como la que ocurre en el proteasoma.
115 Cualquiera que sea su función, un incremento en los conjugados de SUMO es, por
116 sí solo, suficiente para aumentar la tolerancia al estrés en *Arabidopsis*. La

117 conjugación de SUMO a sustratos proteicos es significativamente inducida por
118 choque térmico, estrés por frío, por oxidación y sequía. El análisis de la pérdida y
119 ganancia de función revelan que la sumoilación está implicada en la respuesta de
120 las plantas a las señales ambientales y vías de señalización (Kurepa *et al.*, 2003).

121 Incluso se ha mostrado que la presencia de SUMO1 (E1) y SUMO2 (SCE1 E2) es
122 esencial en *Arabidopsis* pues en mutantes que carecen de estas proteínas SUMO
123 se observa un arresto embrionario temprano que se traduce en letalidad. En este
124 mismo estudio se demostró que bajo condiciones de estrés por calor en plantas de
125 *Arabidopsis*, existe un aumento de los conjugados nucleares de SUMO1/2
126 indicando que la sumoilación inducida por estrés de proteínas nucleares puede
127 representar un paso temprano importante en el mecanismo de defensa de la planta
128 (Saracco *et al.*, 2007).

129 Con el fin de obtener información sobre las diferencias en la expresión génica entre
130 una especie de tomate resistente a *Cmm* respecto a una susceptible, Lara-Avila *et*
131 *al.* (2012), llevó a cabo un perfil de expresión diferencial mediante cDNA- AFLP, de
132 algunas especies silvestres de tomate resistentes a *Cmm*. En este trabajo se mostró
133 que la expresión del gen *SCE1*, que codifica a la enzima de conjugación SUMO E2
134 que participa en el proceso de sumoilación, fue altamente inducida a 8 horas post-
135 infección en las especies resistentes estudiadas mientras que en la especie
136 susceptible no hubo cambios, sugiriendo así una posible participación de *SCE1* en
137 las etapas tempranas post-infección de *Cmm* como un mecanismo de defensa.

138 Posteriormente Esparza-Araiza *et al.* (2015), evaluó el papel de *SCE1* en plantas
139 resistentes a la infección por *Cmm*. Mediante silenciamiento génico inducido por

140 virus (VIGS) fue suprimida parcialmente la expresión del gen *SCEI* en plantas de
141 *Solanum peruvianum*. Este silenciamiento no tuvo ningún efecto aparente sobre el
142 fenotipo de la planta, pero se asoció con un aumento en la susceptibilidad a la
143 enfermedad del chancro bacteriano causado por *Cmm* y con un aumento de las
144 poblaciones de la bacteria en las plantas inoculadas. El silenciamiento de *SCEI* en
145 *S. peruvianum* produce plantas susceptibles a *Cmm* sugiriendo un papel importante
146 de *SCEI* en el mecanismo de defensa de la planta. Basado en estos resultados,
147 Rodríguez-González (2014) llevó a cabo la sobreexpresión de *SCEI* (SUMO E2) en
148 plantas de *S. lycopersicum* con el fin de evaluar la tolerancia al chancro bacteriano.
149 La transformación nuclear se realizó en hipocotilos mediante co-cultivo con
150 *Agrobacterium tumefaciens*, la cual albergaba un plásmido que contiene el gen
151 *SCEI* bajo el control del promotor 35S y que además posee un gen de resistencia a
152 Kanamicina para seleccionar los tejidos transformados. Se obtuvo la generación T0
153 de plantas putativas transgénicas.

154 En el presente trabajo, se dio seguimiento a las plantas sobreexpresantes de *SCEI*
155 mediante la obtención de la generación T1 y T2, la identificación del transgén y la
156 evaluación de la susceptibilidad a *Cmm*.

157

158

159

160

161

2. Metodología

2.1 Obtención de semillas, esterilización y germinación en medio de cultivo.

Se obtuvieron semillas del fruto de la generación T0. Cada fruto representa una línea trasgénica distinta. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente empleando cuatro lavados con Extrán en agitación durante 5 min, lavado con agua destilada, lavado con etanol al 70 % por 30 segundos, lavado con agua destilada, lavado con Cloro al 10% en agitación por 15 min y por último lavado con agua destilada. Las semillas se dejaron secar en papel filtro estéril y fueron germinadas en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962). Los cultivos fueron mantenidos a 25° C con un fotoperiodo de 16 h luz, 8 h oscuridad.

Para elaborar un litro de medio MS se emplearon 30 gramos de sacarosa y 500 mL de cada solución MS (MSI, MSII, MSIII, MSIV y MSV), se ajustó el pH a 5.7 y se agregó 3.7 gramos de Phytigel (Soria-Guerra, 2007). Se ajustó el volumen a 1 litro con agua destilada. El medio MS se esterilizó a 15 lb/ pulgada² durante 15 min. Los componentes de las sales MS se enlistan en la Tabla 1, se preparó una mezcla de sales MS 2X concentrada en agua destilada y se almacenó a 4° C.

Plantas de 10 días fueron trasplantadas a suelo estéril (turba sunshine) para aclimatarlas a invernadero. Fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad hasta obtener fruto correspondiente a la generación de transgénicas 1 y generación 2. Las semillas de cada generación fueron esterilizadas y germinadas bajo el mismo protocolo.

185 **2.2 Extracción de ADN e identificación del transgén y marcador de selección**
186 **por PCR.**

187 La extracción de ADN genómico de la planta se realizó mediante el protocolo de
188 Dellaporta (1983), la concentración de ADN en cada muestra se ajustó a 100 ng. La
189 presencia del transgén fue confirmada por PCR usando oligonucleótidos específicos
190 para un fragmento del gen *SCEI* de secuencia *SCEI-F* (5'–
191 GCTAAGCCGGAGACACTTCC–3') y *SCEI-R* (5'– ATGGAAAAAGCCTGGTGGGA-
192 3'). La presencia del marcador de selección *NPTII* se determinó usando el par de
193 oligonucleótidos *NPTII-F* (5'– TATTCGGCTATGACTGGGCA – 3') y *NPTII-R* (5' –
194 GCCAACGCTATGTCCTGAT – 3'). La mezcla de reacción de PCR contiene Buffer
195 1x, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, Taq DNA polimerasa 5U/ μL y 10 μM de cada
196 oligonucleótido, a un volumen de mezcla final de 25 μL. La temperatura de
197 alineamiento de los oligonucleótidos para *SCEI* fue de 58.3°C mientras que para
198 *NPTII* fue de 54°C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en
199 gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (1 μg/mL), observados y
200 digitalizados en fotodocumentador.

201

202

203 **2.3 Bioensayos de tolerancia a *Cmm***

204

205 Para los ensayos de tolerancia bacteriana, la cepa AcR42 de *Cmm* (aislada de
206 cultivos de *S. lycopersicum* en Pénjamo, Guanajuato), fue crecida en medio LB
207 (Luria- Bertani) durante 36 h a 28°C en agitación constante. La concentración
208 bacteriana fue ajustada a 1x10⁸ ufc/mL en medio LB o en 10 mM de MgCl₂ para

209 emplearla en la inoculación de las plantas. Plantas de la generación T2 (4 semanas
210 de edad) de cada línea transgénica (tres plantas por línea) así como plantas control
211 silvestres o wild type (WT), que no fueron transformadas, fueron inoculadas en el
212 tallo mediante inyección y en hoja por infiltración usando una jeringa de insulina.
213 Fueron inoculados 0.1 mL de la suspensión que contiene a *Cmm*. Adicionalmente,
214 plantas control (WT) fueron inoculadas con medio LB o MgCl₂ sin *Cmm*, para
215 descartar algún efecto a los componentes de ambas soluciones. Las plantas fueron
216 mantenidas en invernadero bajo temperatura y humedad controlada. La
217 susceptibilidad de las líneas transgénicas y las plantas control fue estimada
218 mediante la aparición de síntomas característicos de la infección por un periodo de
219 40 días.

220

221 **2.4 Evaluación del fenotipo de las plantas transgénicas.**

222

223 Se analizaron las diferencias fenotípicas entre las plantas putativas transgénicas y
224 las plantas WT mediante la observación del crecimiento y desarrollo de las líneas
225 correspondientes a la generación T2. Tanto para las plantas T2 transgénicas como
226 para las plantas control WT fueron registrados los datos de longitud y diámetro del
227 tallo, dosel y número de hojas. Las mediciones iniciaron para ambos grupos a partir
228 de los 10 días, desde que fueron trasplantadas a suelo estéril y hasta los 55 días de
229 edad.

230

231

232 **2.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc**

233

234 Se realizó la extracción de ARN total de cada planta retada con *Cmm* así como de
235 plantas control empleando el reactivo Trizol® y siguiendo el protocolo del fabricante.
236 La concentración de ARN en cada muestra fue cuantificada con ayuda del
237 espectrofotómetro Nanodrop2000. Las muestras fueron almacenadas
238 inmediatamente a -70° C. Para la obtención de ADNc, las muestras fueron
239 previamente tratadas con 1 UI de DNAsa (Thermo Scientific) durante 10 min
240 siguiendo las recomendaciones del proveedor. El ADNc se sintetizó a partir de 200
241 ng de ARN tratado con DNAsa en un volumen de reacción final de 20 µL. Fue
242 empleada la enzima Super Script® II Transcriptase reverse (Invitrogen) del kit para
243 síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del fabricante.

244

245 **2.6 Confirmación de la sobreexpresión del transgén *SCEI* por PCR en tiempo** 246 **real (qRT-PCR)**

247

248 La confirmación de los niveles de expresión de *SCEI* por PCR tiempo real, se llevó
249 a cabo a partir del ADNc obtenido previamente. La cuantificación se realizó en el
250 equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real time PCR system versión 2.0, en formato
251 de 96 pozos. El programa de ciclado incluyó una desnaturalización inicial 94°C por
252 5 min; 40 ciclos de 94°C durante 25 s, 60°C por 30 s, la mezcla de reacción para
253 cada muestra se basa en las condiciones del kit SYBR Green Master Mix (Applied
254 Biosystems). Los niveles de expresión fueron normalizados con el gen de actina y
255 los cambios en los niveles de expresión fueron determinados utilizando el ciclo

256 umbral (Ct) con el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001); cada determinación
257 se realizó por duplicado y los valores reportados representan el promedio más la
258 desviación estándar.

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

3. Resultados

3.1 Obtención de semillas, germinación, crecimiento y maduración del fruto.

De la generación T0 (transformada con el vector binario pBI121 que alberga al gen *SCEI* y al marcador de selección *NPTII*) se obtuvieron únicamente 4 líneas (39.1, 39.2, 41.1 y 41.2), las cuales fueron resistentes al medio de cultivo de selección que contiene kanamicina (100 mg/L); estas líneas dieron origen a la generación de transgénicas T1. De la generación T1 se obtuvieron un total de 38 líneas, de las cuales solo 12 líneas fueron evaluadas respecto a su susceptibilidad a infecciones por *Cmm*. De las 12 líneas correspondientes a la generación T2, hasta el momento solo se han obtenido semillas de 3 líneas (Tabla 2). Cada línea representa un fruto diferente y de cada fruto se obtienen no menos de 50 semillas (Figura 1). Para cada experimento de tolerancia se emplearon 6 repeticiones por línea, que se traducen en 6 eventos independientes pues cada uno es una semilla diferente del mismo fruto.

3.2 Identificación del transgén *SCEI* y el marcador de selección *NPTII* en las plantas de la generación T1 y T2 de las plantas transformadas.

Para determinar si las plantas de las generaciones T1 y T2 poseen el transgén *SCEI*, y el marcador de selección *NPTII*, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de las plantas transformadas de *S. lycopersicum*. La integridad del ADN de cada una de las muestras fue confirmada en gel de agarosa al 1% (Figura 2). Se

300 llevó a cabo la amplificación por PCR del fragmento correspondiente al gen *SCEI*
301 así como *NPTII* y los resultados muestran la presencia del transgén *SCEI* y el
302 marcador de selección *NPTII* en las plantas transformadas con el vector binario
303 pBI121 (Figura 3). En los geles se observa la presencia de la banda de 600 pb
304 correspondiente al marcador de selección *NPTII* para las líneas 41.24, 41.2.5 y
305 41.2.17 (Figura 4a) así como la banda de 180 pb correspondiente al transgén *SCEI*
306 para las mismas líneas de la generación T2 (Figura 4b). Para las líneas 41.2.18,
307 41.1.3, 41.2.2 (1) y 41.2.2 (2) se observa la banda de 600 pb para *NPTII* así como
308 la de 180 pb para *SCEI*.

309 Cada fruto representa una línea diferente. La selección de las líneas para los retos
310 de tolerancia a *Cmm* se realizó al azar, comprobando primero la presencia del
311 transgén *SCEI* y del marcador de selección *NPTII* mediante PCR.

312

313 **3.3 Bioensayos de tolerancia a *Cmm* y evaluación del fenotipo de la** 314 **generación T2.**

315 Una vez confirmada la presencia del transgén *SCEI* en las sobreexpresantes, se
316 llevó a cabo la infección de las plantas de la generación T2 para evaluar la
317 susceptibilidad a *Cmm*. Plantas de 4 semanas de edad fueron inoculadas con *Cmm*.
318 La susceptibilidad de las plantas transgénicas, las que no integraron el transgén
319 *SCEI* y las plantas control sin transformar (WT), fue estimada por la aparición de
320 síntomas en un periodo de 40 días. Las plantas transgénicas que contienen tanto
321 el transgén *SCEI* como el marcador de selección *NPTII* inoculadas con *Cmm*,

322 mostraron diferencias respecto a las plantas que no integraron el transgén (que solo
323 poseen el marcador de selección) y a las plantas control WT. Los síntomas de la
324 infección aparecieron en las plantas control WT y en las plantas no transgénicas
325 progresando hasta la muerte de la planta. El primer síntoma visible característico
326 del chancro bacteriano es el amarillamiento unilateral de las hojas que progresa tallo
327 arriba hasta el marchitamiento de todas las hojas de la planta. En las plantas WT y
328 no transgénicas, todas las hojas marchitan mientras que en las plantas transgénicas
329 el marchitamiento únicamente ocurre en las hojas cercanas al sitio de inoculación
330 que terminan por caerse. Las hojas de la parte superior de la planta, lejanas al sitio
331 de inoculación permanecen intactas (Figuras 5 y 8). Cuando la infección pasó a las
332 etapas tardías, en el tallo de las plantas control WT y de las no transgénicas
333 aparecieron los chancros típicos de la enfermedad; el sitio de inoculación de *Cmm*
334 no sanó favoreciendo la formación del chancro, mientras que en el tallo de las
335 plantas transgénicas el sitio de inoculación sanó y no se observa ningún chancro
336 (Figura 6). La progresión de los síntomas conduce a la planta a la muerte con el
337 marchitamiento total de la misma debido a la necrosis del sistema vascular,
338 resultado de la colonización del tallo por *Cmm*. Si se observa el interior de un tallo
339 enfermo puede notarse la de necrosis del tejido vascular que impide el transporte
340 de agua favoreciendo el marchitamiento de la planta, mientras que en un tallo sano
341 se puede apreciar la estructura intacta del sistema vascular (Figura 7).

342 Las diferencias fenotípicas entre las plantas transgénicas, no transgénicas y plantas
343 control WT, abarcan la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad, la
344 longitud y diámetro del tallo y el número de hojas (frondosidad). A pesar de que

345 todas las plantas para los ensayos de tolerancia fueron germinadas al mismo tiempo
346 y bajo las mismas condiciones, el fenotipo no es el mismo. Las plantas transgénicas
347 muestran un crecimiento significativamente mayor que las plantas no transgénicas
348 o las plantas control, el número de hojas aumenta significativamente en las plantas
349 transgénicas respecto a las plantas control y no transformadas (Figura 10). Dentro
350 de la generación T2, existen plantas transformadas en las que solo fue posible
351 detectar el marcador de selección, que exhiben un retraso en el crecimiento,
352 diámetro y longitud del tallo (Figura 11). Estas plantas no transgénicas resultan
353 susceptibles a la infección por *Cmm* del mismo modo que una planta control WT,
354 mientras que las plantas transgénicas que muestran una mayor frondosidad,
355 crecimiento, diámetro y longitud del tallo, son tolerantes a *Cmm*. En dichas plantas
356 se detectó la presencia del transgén *SCEI* así como del marcador de selección
357 *NPTII* (Figura 8). Cabe mencionar que no hay diferencia visible respecto al uso de
358 medio LB o MgCl₂ para la inoculación e infección. Ambas soluciones permiten la
359 infección y son inocuas para la planta por sí solas (Figura 9).

360

361 **3.4 Validación de la expresión del transgén *SCEI* en líneas transgénicas de la** 362 **generación T2**

363

364 Las líneas transgénicas positivas para el transgén *SCEI* y el marcador de selección
365 *NPTII*, tolerantes a la infección por *Cmm*, muestran un ligero incremento en la
366 expresión de *SCEI* respecto al valor de la WT (Figura 12). La validación se realizó
367 en la planta 5 de la línea 41.2.18 (**182**), en la planta 1 de la línea 41.2.2 (**B1**) y en la
368 planta 5 de la línea 41.1.3 (**B3**), con oligonucleótidos específicos.

369

4. Discusión

370 En este trabajo se demostró la tolerancia que la sobreexpresión del transgén *SCEI*
371 confiere a las plantas susceptibles de la variedad comercial *Solanum lycopersicum*
372 ante la infección por *Cmm*. En estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Lara-
373 Avila *et al.*, 2012), se obtuvo información acerca de las diferencias en la expresión
374 génica entre una especie de tomate resistente a *Cmm* respecto a una susceptible,
375 mostrando que durante la infección con *Cmm*, la expresión del gen *SCEI* (que
376 codifica para la enzima SUMO E2, involucrada en sumoilación) en la especie
377 silvestre resistente, es altamente inducida durante las etapas tempranas de la
378 infección mientras que en una especie susceptible no hay cambios en la expresión.
379 Basado en estos resultados, Esparza-Araiza *et al.* (2015), mediante silenciamiento
380 génico inducido por virus (VIGS) suprimió la expresión de *SCEI* en plantas de *S.*
381 *peruvianum* resistentes a *Cmm*, observando en dichas plantas susceptibilidad a la
382 infección por la bacteria. El silenciamiento del gen permite un aumento en las
383 poblaciones de *Cmm* y la aparición de síntomas. Ambos estudios permiten inferir la
384 importancia de *SCEI* en etapas tempranas del mecanismo de defensa de la planta
385 ante la infección por *Cmm*, sugiriendo que la sobreexpresión *SCEI* pudiera conferir
386 tolerancia a *Cmm*.

387 Rodríguez- González, *et al.* (2014), llevó a cabo la sobreexpresión de *SCEI* (SUMO
388 E2) en hipocotilos de plantas de *S. lycopersicum*, estableciendo un protocolo de
389 transformación eficiente de tomate y obteniendo la generación T0 de plantas
390 transgénicas en corto tiempo. En el presente estudio, se dio seguimiento a las
391 plantas transformadas con el fin de obtener la generación T2 para poder llevar a

392 cabo los experimentos que permitirían evaluar la tolerancia al chancro bacteriano
393 de las plantas transformadas.

394 Como primer paso se realizó la identificación del transgén *SCEI* y el marcador de
395 selección mediante PCR en las líneas transformadas. Un total de 12 líneas
396 sobreexpresantes resultaron positivas para ambos genes y estas líneas fueron
397 retadas con *Cmm* para evaluar su capacidad de tolerar la infección. También se
398 realizó el análisis del fenotipo de las líneas transformadas respecto a plantas WT.

399 Los síntomas de la enfermedad aparecen en las plantas que no integraron el
400 transgén (no transgénicas) y en las plantas control WT, los cuales son el
401 marchitamiento unilateral de las hojas que termina por marchitar todas las hojas de
402 la planta y en el sitio de inoculación aparecen los chancros típicos de la enfermedad
403 que permiten observar la necrosis en el tejido vascular de la planta debido a la
404 presencia de *Cmm*, como consecuencia el paso de agua se ve limitado y el tallo
405 pierde estructura, la enfermedad progresa hasta la muerte de la planta. Sin
406 embargo, en las plantas transgénicas sobreexpresantes de *SCEI*, los síntomas
407 aparecen retardados únicamente en la cercanía al punto de inoculación, es decir,
408 las hojas cercanas al sitio de inoculación sufren de marchitamiento pero ni el tallo ni
409 las hojas superiores presentan síntomas y se producen frutos con semilla fértil. Las
410 hojas cercanas al sitio de inoculación terminan por desprenderse del tallo de la
411 planta mientras el sitio de inoculación sana exitosamente. Posterior a una ronda de
412 fertilización, nuevas ramas con hojas intactas y sanas comienzan a salir
413 sustituyendo a las que marchitaron inicialmente. Posterior a los 25-30 días, no se
414 observa ningún síntoma de marchitamiento ni lesión en el tallo. Incluso se

415 obtuvieron frutos de las primeras líneas transgénicas evaluadas, que no presentan
416 ningún síntoma de la enfermedad como el característico “ojo de pájaro” en la dermis
417 del fruto o síntomas internos como decoloración vascular como se observa en la
418 Figura 13. La planta 5 de la línea 41.2.18 y la planta 2 de la línea 41.2.5 son las más
419 tolerantes a la infección.

420 Existen también diferencias fenotípicas atribuidas a la sobreexpresión de *SCEI*. El
421 crecimiento de las plantas transformadas es significativamente mayor respecto al
422 de plantas WT. Con la misma edad, las plantas transgénicas (positivas para *SCEI* y
423 *NPTII*) poseen mayor número de hojas, mayor longitud y diámetro del tallo. De
424 hecho, la floración en las transgénicas ocurre primero posiblemente como resultado
425 del desarrollo temprano y acelerado de las plantas. Además, se observó que
426 algunas plantas, en las que solo fue identificado el marcador de selección y que
427 mostraron ser susceptibles a la infección por *Cmm* (no transgénicas) retardaron su
428 crecimiento (plantas enanas) exhibiendo un fenotipo contrastante con las
429 transgénicas al observarse un número de hojas y longitud del tallo incluso menor
430 que el de las plantas WT de la misma edad.

431 Los resultados de la validación en la expresión del transgén por qR-PCR, muestran
432 un valor superior en las plantas transgénicas respecto a la planta control WT. Y
433 aunque el nivel de expresión del ARNm para *SCEI* se esperaba significativamente
434 mayor al de la planta control debido a la presencia del promotor 35S, en las 3
435 muestras analizadas correspondientes a plantas que toleraron la infección el valor
436 es ligeramente mayor que el de la WT. Se pretende analizar un mayor número de
437 líneas transformadas mediante qRT-PCR.

438 El mecanismo por el cual la sobreexpresión de *SCEI* confiere a las plantas tolerancia
439 a *Cmm* no está claro, pero se sugieren al menos dos teorías que podrían explicarlo.

440 Se sabe que *Cmm* posee una variedad de enzimas que degradan la pared celular
441 de las vesículas del xilema impidiendo el movimiento de agua. La maceración del
442 tejido vascular le facilita la obtención de nutrientes, su crecimiento, movimiento y
443 colonización del huésped (Tancos *et al.*, 2013). En un estudio en plantas de tomate,
444 se llevó a cabo la sobreexpresión de *ELP*, una glicoproteína de la pared celular
445 vegetal. Esta sobreexpresión modifica la composición de la pared celular que junto
446 con otras proteínas pueden favorecer la aglutinación de *Cmm* ayudando a prevenir
447 su proliferación desde las primeras etapas de la infección. De hecho, uno de los
448 mecanismos de defensa de las plantas involucra el remodelado de la pared celular
449 para fortalecerla y prevenir la proliferación de patógenos. Si la degradación de la
450 pared celular disminuye, la baja disponibilidad de nutrientes para *Cmm* limita su
451 crecimiento y colonización, y por lo tanto los síntomas en las plantas transgénicas
452 disminuyen. También se sugiere que dichas proteínas podrían estar inmovilizando
453 al patógeno mediante la unión a su superficie modificando la carga negativa de
454 *Cmm* y posiblemente interviniendo en la estabilidad de los componentes de la pared
455 bacteriana modificando su fisiología y limitando la invasión del huésped (Balaji y
456 Smart, 2012). Nuestra primera hipótesis basada en el fenotipo de las transgénicas,
457 sugiere que la sobreexpresión de *SCEI*, gen también involucrado en crecimiento y
458 desarrollo además de sumoilación, lo que le confiere a la planta resistencia a *Cmm*
459 mediante la aglutinación de la bacteria. La sobreexpresión de *SCEI* le permite a la
460 planta regenerar tejidos de manera más rápida, la destrucción del tejido vascular se

461 ve compensada mediante la reposición casi inmediata de las células afectadas
462 impidiéndole a *Cmm* colonizar y avanzar hacia tejidos adyacentes. Lo anterior
463 limitaría la disponibilidad de nutrientes resultando en la muerte de la población de
464 *Cmm*. Las plantas transgénicas desprenden las hojas marchitas infectadas y sanan
465 el sitio de inoculación eficientemente previniendo la progresión de *Cmm* hacia otras
466 zonas de la planta.

467 La segunda hipótesis basada en las funciones reportadas para *SCEI* relacionadas
468 con sumoilación, sugiere que la sobreexpresión de *SCEI* le permite a la planta
469 “sumoilar” proteínas con diversas funciones. La sumoilación podría ocurrir en
470 proteínas involucradas en la activación de factores de transcripción tipo WRKYS
471 (Esparza-Araiza, 2015) que activan genes de defensa como respuesta al ataque por
472 *Cmm*. Algunos patógenos poseen SUMO proteasas que escinden los conjugados
473 de SUMO, la escisión de estas proteínas resulta en la represión transcripcional de
474 genes de defensa como el caso de XopD de *Xanthomonas campestris* (Kim *et al.*,
475 2008). Esto último permite inferir que la sumoilación está, directa o indirectamente,
476 involucrada en la activación de genes de defensa de la planta. La sobreexpresión
477 de *SCEI* permite a la planta hacer frente a la infección por *Cmm* mediante la
478 activación temprana de genes de defensa y probablemente en especies silvestres
479 de tomate resistentes a la enfermedad, este mecanismo es más eficiente.

480 Una hipótesis alterna se basa en un estudio reciente en el cual demuestran que
481 SUMO puede asumir el papel de activador transcripcional de genes. Se observó
482 que algunos factores de unión a promotores son sumoilados despejando la región
483 del promotor y permitiendo la activación de genes que deben transcribirse

484 rápidamente (Monribot et al., 2013). La sobreexpresión de *SCEI* podría entonces,
485 facilitar la sumoilación de factores que pudieran estar reprimiendo la transcripción
486 de genes de defensa.

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

5. Bibliografía

512

513

514 **Balaji, V. et al.** (2008) Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter*
515 *michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease
516 development. *Plant Physiol.* **146**, 1797- 1809.

517

518 **Balaji, V., Sessa, G. and Smart, C.D.** (2011) Silencing of host basal defense
519 response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana*
520 to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *APS Symp Ser.* Volume 101.
521 **3**, 349- 357.

522

523 **Balaji, V. y Smart, C.** (2012) Over-expression of snakin-2 and extensin-like protein
524 genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter*
525 *michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*).
526 *Transgenic Res.* **21**, 23–37.

527

528 **Borboa, F.J.** (2009) Detection of *Clavibacter michiganensis* subspecies
529 *michiganensis* in tomato of the state of Sonora, Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* **32**, 319-
530 326.

531

532 **Carlton, W., Braun, E. and Gleason, M.** (1998) Ingress of *Clavibacter*
533 *michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *APS*
534 *Symp Ser.* 88, 525- 529.

535

536 **Chalupowicz, L., et al.** (2012) Colonization and movement of GFP-Labeled
537 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *APS Symp*
538 *Ser.* **102**, 23- 31.

539

540 **Chang, R.J., Ries, S.M. and Pataky, J.K.** (1991) Dissemination of *Clavibacter*
541 *michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato
542 transplants. *Phytopathology.* **81**, 1276- 1281.

543

544 **Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1983) A plant DNA miniprep: preparation
545 Version II. *Plant Mol Biol.* **1**, 19-21.

546

547 **Dreier, J., Meletzus, D. y Eichenlaub.** (1997) Characterization of the plasmid
548 encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis*
549 subsp. *michiganensis*. *APS Symp Ser.* **10**, 195- 205.

550

551 **Elrouby, N. y Coupland G.** (2010) Proteome-wide screens for small ubiquitin-like
552 modifier (SUMO) substrates identify *Arabidopsis* proteins implicated in diverse
553 biological processes. *Natl Acad Sci.* **107**, 17415- 17420.

554

555 **Esparza-Araiza, M.J. et al.** (2015) Evaluation of a SUMOE2 conjugating enzyme
556 involved in resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in
557 *Solanum peruvianum*, through a Tomato mottle virus VIGS assay. *Front Plant Sci.*
558 **6**, 1-11.

559

560 **Francis, D., et al.** (2001) Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon*
561 *hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis.*
562 **85**, 1171- 1176.

563 **Gartemann, K., et al.** (2008) The genome sequence of the tomato-pathogenic
564 actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals
565 a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol.* **190**, 2138- 2149.

566

567 **Guo, B., et al.** (2007) Signalling pathways and the regulation of SUMO modification.
568 *Biocheml Soc Symp.* **35**, 1414-1418.

569

570 **Hausbeck, M.K.** (2000) Effect of bactericides on population sizes and spread of
571 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse
572 and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology.* **90**, 38-
573 44.

574

575 **Holguín, P., Vázquez, J. and Rueda P.** (2006) Bacterial canker caused by
576 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato in the Baja California
577 Peninsula of Mexico. *Plant Dis.* **90**, 1139- 1150.

578

579 **Johnson, E.S.** (2004) Protein modification by SUMO. *Biochemical.* **73**, 356- 382.

580

581 **Kim, J.G. et al.** (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes
582 pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected
583 tomato leaves. *Plant Cell*. **20**, 1915-1929.

584

585 **Kurepa, J. et al.** (2003) The Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) protein
586 modification system in *Arabidopsis*: accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is
587 increased by stress. *J Biol Chem*. **278**, 6862- 6872.

588

589 **Lara-Avila, J.P. et al.** (2012) Gene expression analysis during Interaction of tomato
590 and related wild species with *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. *Plant*
591 *Mol. Biol. Rep.* **30**, 498- 511.

592

593 **Lee, J., et al.** (2006) Salicylic acid-mediated innate immunity in *Arabidopsis* is
594 regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant J.* **49**, 79- 90.

595

596 **Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression
597 data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods*. **25**, 402–
598 408.

599

600 **Meletzus, D. et al.** (1993) Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the
601 phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*
602 NCPPB382. *J Bacteriol.* **175**, 2131- 2136.

603

604 **Monribot, V. et al.** (2013) *TnaA*, an SP-RING protein interacts with *Osa*, a subunit
605 of the cromatin remodeling complex BRAHMA and with the SUMOylation pathway
606 in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. **8**, 1- 12.

607

608 **Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and
609 bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. **15**, 473- 497.

610

611 **Orth, K. et al.** (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector *YopJ*, a ubiquitin-
612 like protein protease. *Science*. **290**, 1594- 1597

613

614 **Rangasamy, D., et al.** (2000) SUMO1 modification of bovine papillomavirus E1
615 protein is required for intranuclear accumulation. *J. Biol. Chem*. **275**, 37999- 38004.

616

617 **Rodríguez-González, E.M.** (2014) Obtención de plantas de tomate (*Solanum*
618 *lycopersicum*) sobreexpresantes del gen *SCEI* como candidato a conferir resistencia
619 contra *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Tesis de maestría. Instituto
620 Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, México.

621

622 **Saracco, S., et al.** (2007) Genetic analysis of SUMOylation in Arabidopsis:
623 conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol*.

624 **145**, 119-134.

625

626 **Savior, A. et al.** (2014) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Vatr1 and
627 Vatr2 transcriptional regulators are required for virulence in tomato. *APS Symp Ser.*
628 **27**, 1035-1047.

629 **Smith, E. F.** (1920) Bacterial canker of tomato. *Bacterial Diseases of Plants.* **202-**
630 222.

631 **Soria-Guerra, R.E.** (2007) Expresión en tomate de un polipéptido antigénico con
632 epítopos de 3 exotoxinas bacterianas (DPT) codificado por un gen sintético. Tesis
633 de doctorado, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, México.
634

635 **Tancos, M.A., et al.** (2013) Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter*
636 *michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Appl*
637 *Environ Microb.* **79**, 6948–6957.

638

639 **van Heusden, A., et al.** (1999) Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer
640 a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor.*
641 *Appl. Genet.* **99**, 1068- 1074.

642

643 **van den Burg, H., et al.** (2010) *Arabidopsis* Small Ubiquitin-Like Modifier paralogs
644 have distinct functions in development and defense. *Plant Cell.* **22**, 1998- 2015.

645

646 **Xiong, R. y Wang, A.** (2013) SCE1, the SUMO-Conjugating enzyme in plants that
647 interacts with NIb, the RNA-Dependent RNA polymerase of *Turnip mosaic virus*, is
648 required for viral infection. *J Virol.* **87**, 4704- 4715.

649

650 **Watts, F. Z.** (2004) SUMO modification of proteins other than transcription factors.
651 *Cell Dev. Sem. Biol.* **15**, 211–219.

Tabla 1. Componentes de la mezcla basal de sales MS

Solución	Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del stock 100X (g/L)
MS I	Nitrato de amonio	1650.0	165.0
	Nitrato de potasio	1900.0	190.0
MS II	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.860
MS III	Sulfato de cobre	0.025	0.0025
	Cloruro de calcio	440.0	44.0
	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobalto	0.025	0.0025
MS IV	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
	Ácido bórico	6.2	0.62
	Molibdato de sodio dihidratado	0.25	0.025
MS V	Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	2.78
	EDTA dihidratado	37.3	3.73

Tabla 2. Descripción de las líneas transgénicas de tres generaciones de plantas de *S. lycopersicum* var. Ailsa Craig

Generación T1	Generación T2	Líneas T2 evaluadas ante <i>Cmm</i>	Generación T3
39.1	39.1.1 – 39.1.6 (6 líneas)		
39.2	39.2.1 – 39.2.7 (7 líneas)		
41.1	41.1.1 – 41.1.4 (3 líneas)	41.1.2 41.1.3 41.1.4	
41.2	41.2.1 – 41.2.22 (22 líneas)	41.2.1 41.2.2 41.2.4	
		41.2.5	5.1 5.2 5.3
		41.2.15 41.2.17 41.2.18 41.2. A 41.2. B	



Figura 1. Semillas de diferentes líneas transgénicas sobreexpresantes del gen *SCEI* y apariencia de una planta adulta. Cada fruto representa una línea diferente. La selección de las líneas para los retos de tolerancia a *Cmm* se realizó al azar, comprobando primero la presencia del transgén *SCEI* y del marcador de selección *NPTII* mediante PCR.

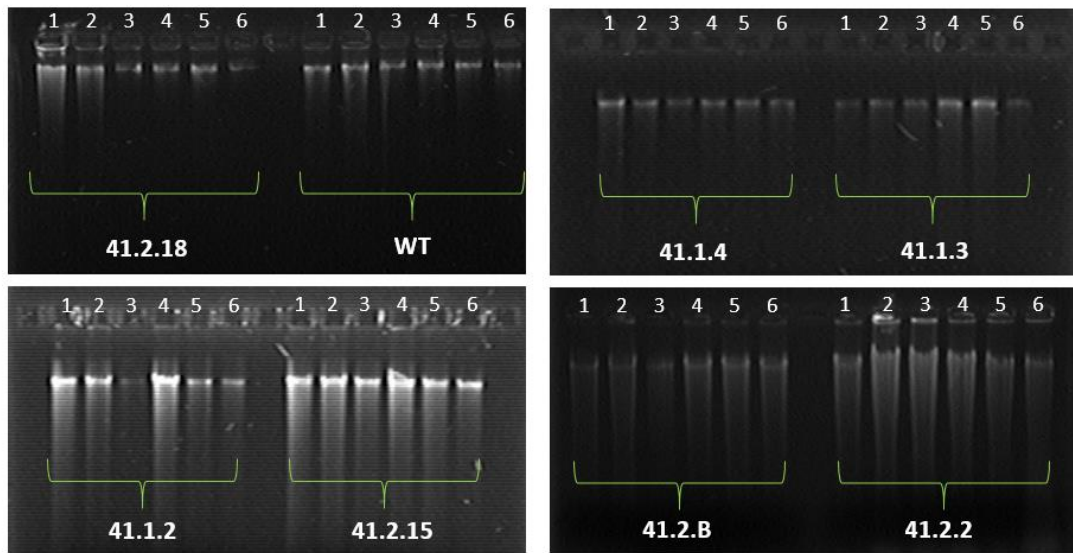


Figura 2. Integridad del ADN de las muestras de plantas sobreexpresantes de la generación T2. Gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN de 7 líneas de plantas para la identificación del transgén *SCEI* y el marcador de selección *NPTII* mediante PCR. 1 μ L de ADN/muestra.

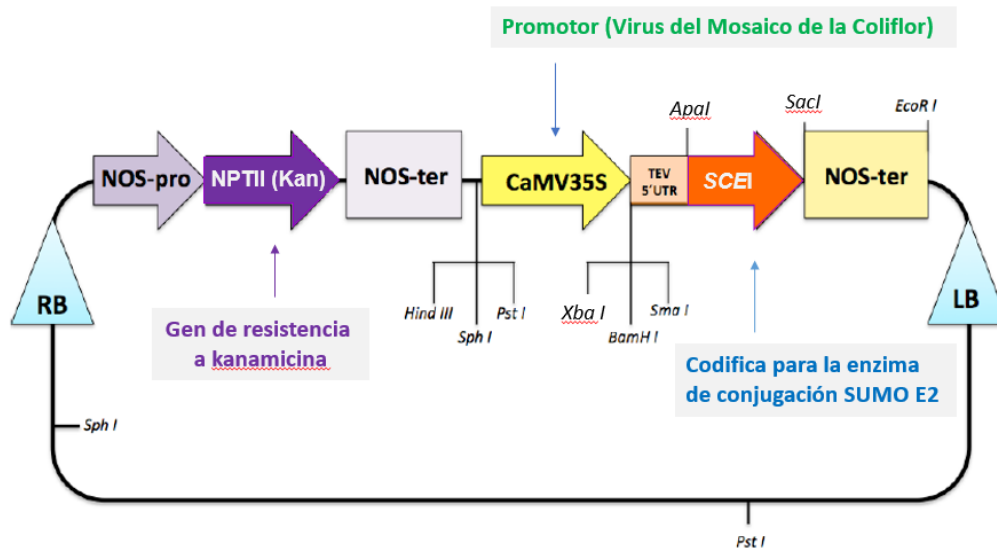


Figura 3. Representación esquemática de la construcción pBI121-5' UTR-SCEI. Representación del vector binario de expresión pBI121, que contiene al gen *SCEI* bajo la regulación del promotor 35S CaMV y al gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina para la selección de los explantes transformados (Rodríguez- González, 2014).

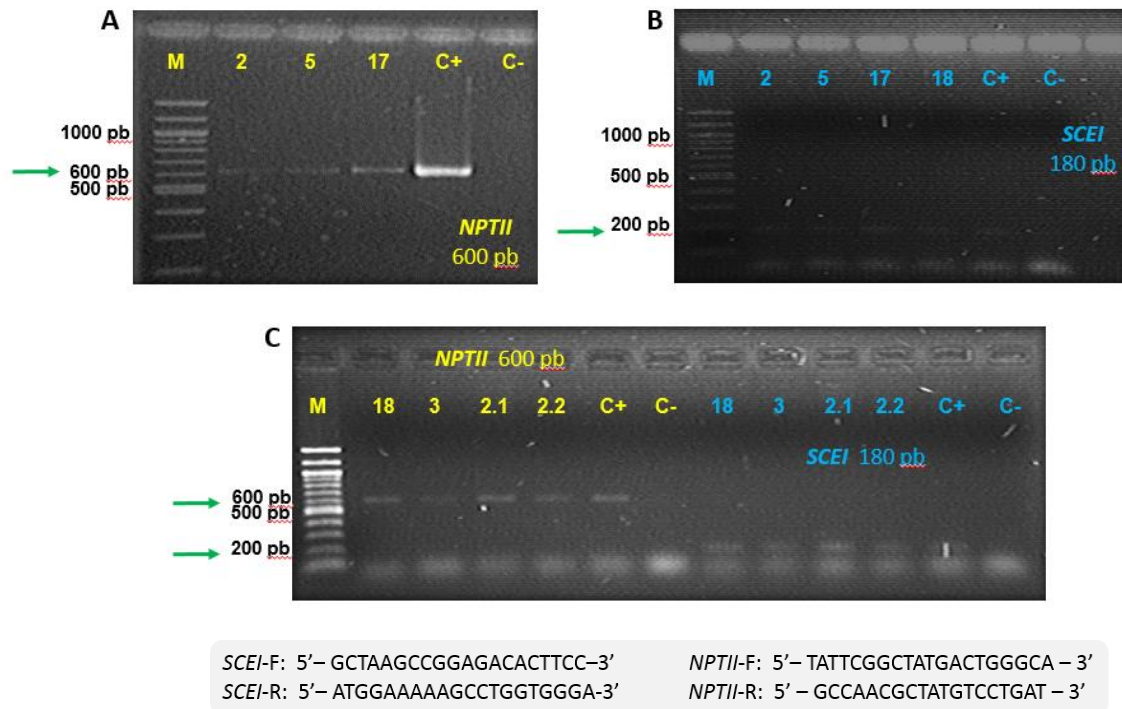
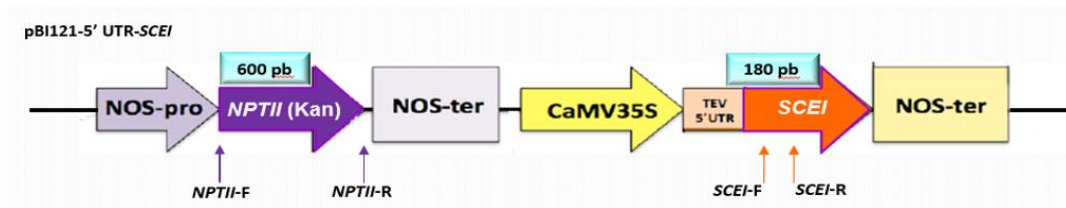


Figura 4. Análisis de PCR de las plantas transformadas para el transgén *SCEI* y el marcador de selección *NPTII*. El producto de PCR se observa en un gel de agarosa al 2%. (A), Fragmento de 600 pb correspondiente a *NPTII* para plantas de la generación T2: 41.2.4, 41.2.5 y 41.2.17. (B), Fragmento de 180 pb correspondiente al transgén *SCEI* para las mismas líneas de la generación T2, 41.2.4, 41.2.5, 41.2.17 y 41.2.18. (C), Fragmento de 600 pb correspondiente a *NPTII* así como el fragmento de 180 pb para *SCEI* de las líneas 41.2.18, 41.1.3, 41.2.2 (1) y 41.2.2 (2). M, marcador de peso molecular de 100 pb. C+, control positivo, pBI121-5'UTR-*SCEI*. C-, control negativo de PCR, agua.

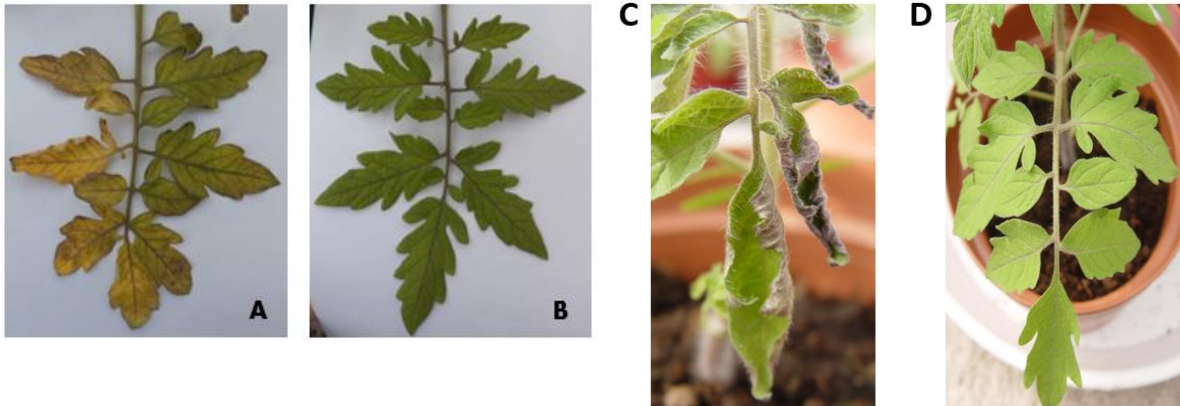


Figura 5. Síntomas característicos del chancro bacteriano a los 19 días post-infección. (A y C), Síntomas de la infección por *Cmm* en plantas control, puede observarse el marchitamiento unilateral de los folíolos que comienza con el amarillamiento de las hojas de un lado y avanza al siguiente progresando tallo arriba, síntoma característico de la enfermedad. (B y D), Plantas transgénicas positivas para *SCEI* y *NPTII* mediante PCR, sin síntomas.

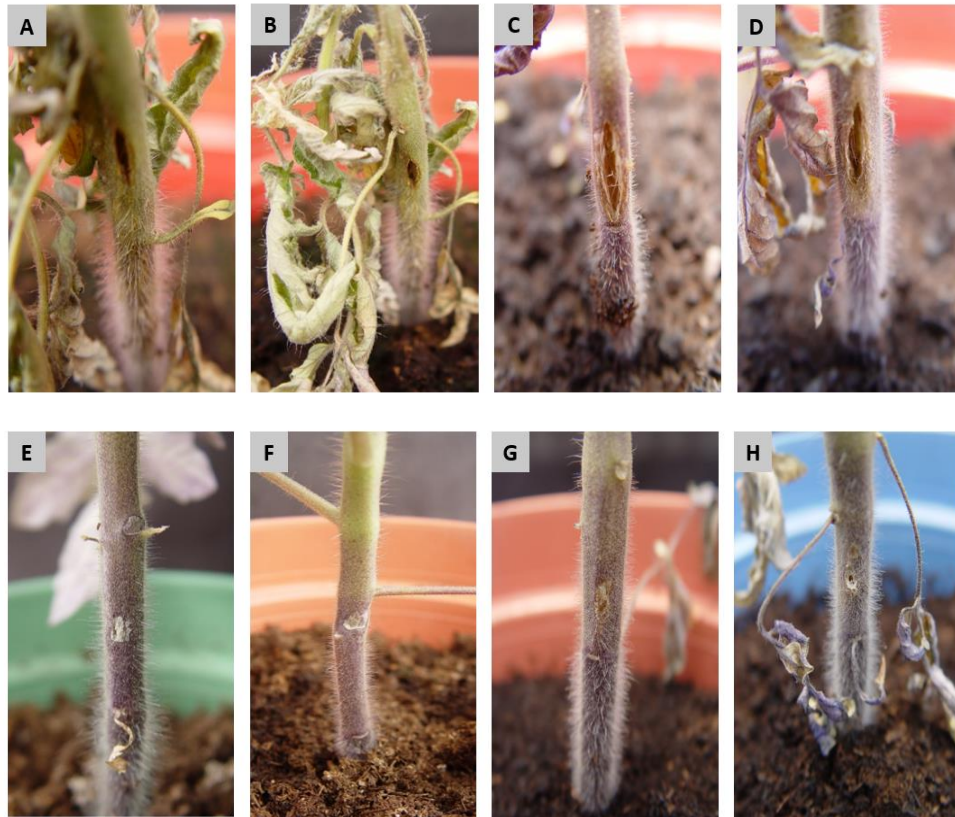


Figura 6. Progresión de los síntomas en el tallo. (A y B), En las plantas control (sin transformar), la enfermedad progresó hasta la aparición de los chancros típicos de la enfermedad en el sitio de inoculación, fotos de ambas condiciones a los 32 días post- infección. (C y D), presencia de los chancros típicos de la enfermedad en tallos de plantas susceptibles, fotos de ambas condiciones a los 40 días. (E y F), los tallos de las plantas putativas transgénicas sanaron en el sitio de inoculación, no se observa la presencia de chancros, 32 días post- infección. (G y H), tallos de plantas putativas transgénicas que sanaron en el sitio de inoculación, 40 días post- infección.

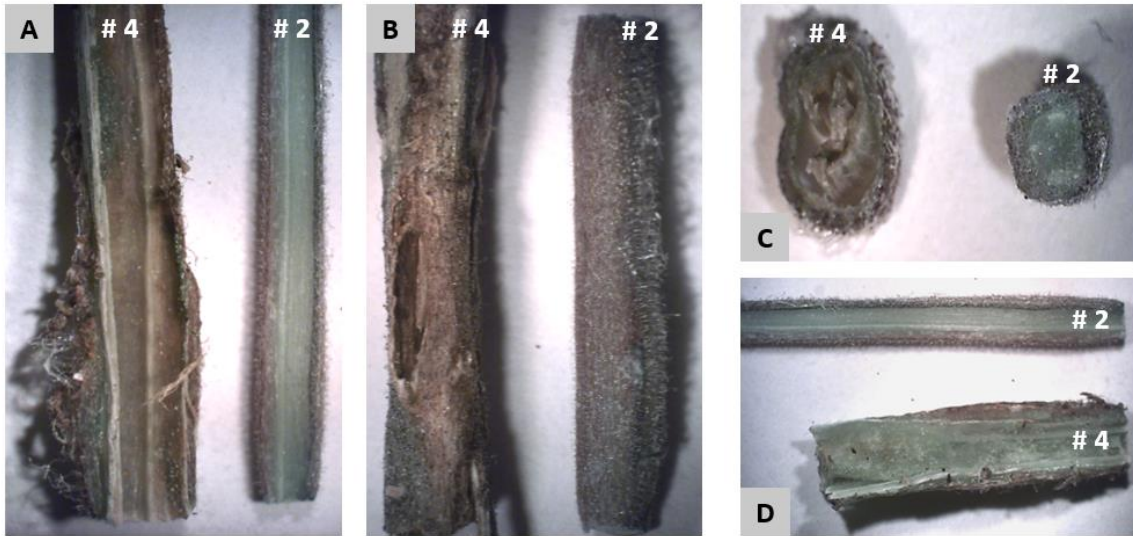


Figura 7. Cortes del tallo que muestran la progresión del chancro bacteriano.

(A y D), Corte longitudinal de un tallo sano y un tallo enfermo. A la izquierda tallo de la planta 4 no transformada de la línea 41.2.5, a la derecha tallo de la planta 2 de la línea 41.2.5. En el tallo sano se observa una estructura y sistema vascular intactos mientras que, en el tallo enfermo, se observa necrosis de las células del sistema vascular debido a la presencia de *Cmm*. La planta enferma es susceptible a la infección mientras que la planta 2 de la línea 41.2.5 muestra tolerancia a *Cmm*. (B), Presencia de chancros característicos en el tallo de las plantas control. A la izquierda, tallo enfermo de una planta control WT, a la derecha tallo sano. (C), corte transversal de un tallo sano y uno enfermo.



Figura 8. Diferencias fenotípicas entre una planta transgénica, una no transgénica y una planta control. Las plantas transgénicas toleran la infección por *Cmm* mientras que en las plantas control y no transgénicas, los síntomas progresan hasta la muerte de la planta. Planta transgénica, positiva para *SCEI* y *NPTII*, inoculada con *Cmm*. Planta no transgénica, positiva solo para *NPTII* pero no para el transgén *SCEI*. Control +, planta WT inoculada con *Cmm*. Control -, planta WT sin *Cmm*.

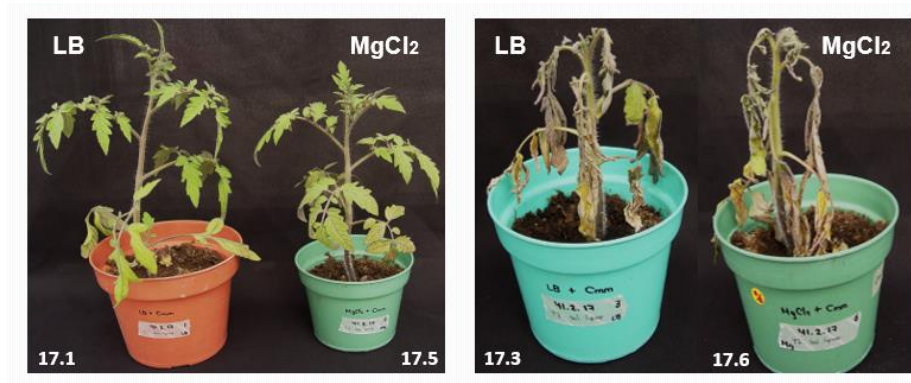
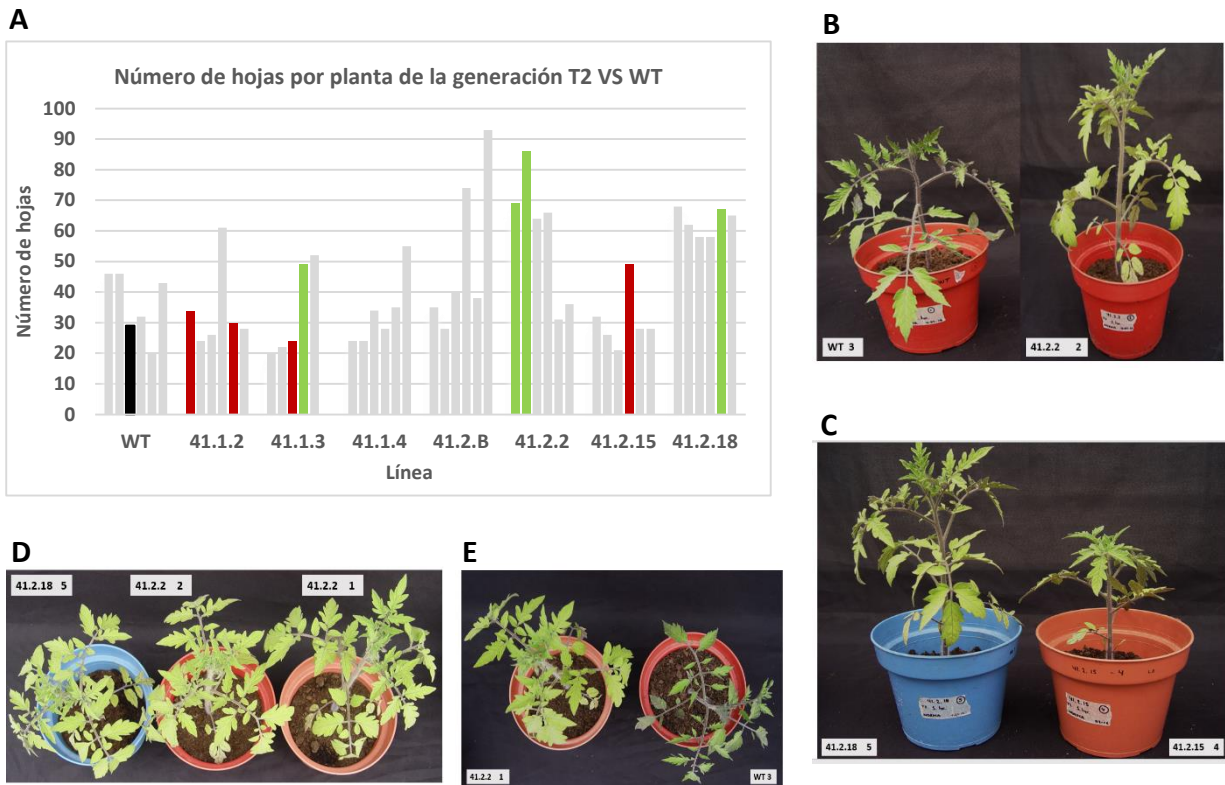


Figura 9. Prueba de inocuidad para la planta de Medio LB o solución de $MgCl_2$.

Tanto el medio LB como el $MgCl_2$ son inocuos para la planta. Cuando ambas soluciones contienen *Cmm* son efectivas para producir la infección. En las plantas WT 17.1 y 17.5 se inoculó el medio LB y $MgCl_2$ sin *Cmm* y no se observaron síntomas de la infección. En las plantas 17.3 y 17.6 se inoculó medio LB y $MgCl_2$ con *Cmm*, la infección ocurrió progresando hasta la muerte de la planta.



652 **Figura 10. Crecimiento diferencial de las plantas de la generación T2 respecto**
653 **a las plantas WT.** (A), Gráfica que muestra el número de hojas en plantas de las
654 diferentes líneas de la generación T2 respecto a la línea WT. Todas las plantas
655 tienen la misma edad, 55 días, y fueron germinadas en medio MS0 bajo las mismas
656 condiciones. Las plantas transgénicas (verde) muestran mayor crecimiento y son
657 más frondosas que las plantas no transgénicas (rojo) y la planta WT (negro). Las
658 barras que se resaltan en color corresponden a las plantas en las fotografías B, C,
659 D y E. Plantas transgénicas, (verde) positivas para el transgén *SCEI* y el marcador
660 de selección *NPTII*: planta 5 línea 41.2.18, planta 5 línea 41.1.3, planta 1 línea
661 41.2.2, planta 2 línea 41.2.2 tolerantes a la infección por *Cmm*. Plantas no

662 transgénicas, (rojo) positivas solo para *NPTII*: planta 1 línea 41.1.2, planta 4 línea
663 41.1.2, planta 4 línea 41.2.15, planta 3 línea 41.1.3 susceptibles a la infección por
664 *Cmm*. Planta WT (negro): planta 3 control silvestre, no transformada. (B), Planta 3
665 de la línea WT y planta transgénica 2 de la línea 41.2.2 (tolerante a *Cmm*) que como
666 se observa en las gráficas, es más grande y frondosa respecto a la WT, ambas
667 plantas de la misma edad (55 días). (C), Frondosidad de la planta transgénica 5 de
668 la línea 41.2.18 respecto a la planta no transgénica 4 de la línea 41.2.15, ambas
669 plantas de la misma edad (55 días). (D), Vista aérea de tres plantas transgénicas
670 tolerantes a *Cmm* que permite observar la frondosidad. Planta 5 línea 41.2.18,
671 planta 1 línea 41.2.2, planta 2 línea 41.2.2. (E), Vista aérea de la frondosidad de la
672 planta transgénica 1 de la línea 41.2.2 respecto a la de la planta 3 WT.

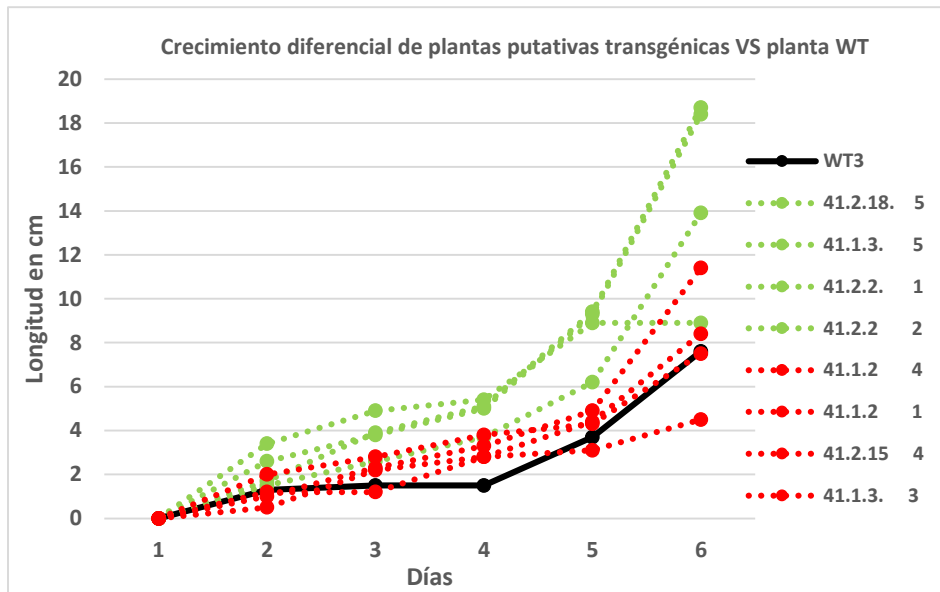


Figura 11. Fenotipo diferencial entre plantas transgénicas respecto a una planta WT. Crecimiento diferencial entre plantas transgénicas (verde), no transgénicas (rojo) y una planta WT (negro). Todas las plantas tienen la misma edad, las medidas comenzaron a tomarse desde los 10 días y hasta los 55 días. La longitud del tallo en las plantas transgénicas es significativamente mayor respecto a la planta WT. Las líneas representadas en el gráfico corresponden a las líneas retadas con *Cmm* en los ensayos de tolerancia bacteriana. Plantas transgénicas, (verde) positivas para el transgén *SCEI* y el marcador de selección *NPTII*. Planta 5 línea 41.2.18, planta 5 línea 41.1.3, planta 1 línea 41.2.2, planta 2 línea 41.2.2 tolerantes a la infección por *Cmm*. Plantas no transgénicas, (rojo) positivas solo para *NPTII*. Planta 1 línea 41.1.2, planta 4 línea 41.1.2, planta 4 línea 41.2.15, planta 3 línea 41.1.3 susceptibles a la infección por *Cmm*. Planta WT, planta 3 control WT, no transformada.

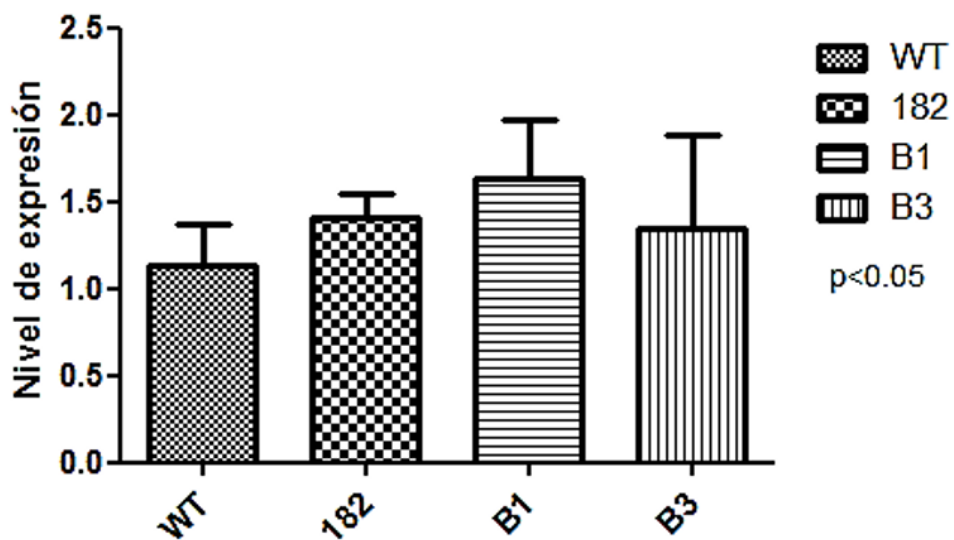


Figura 12. Validación por qRT-PCR de la sobreexpresión del gen *SCEI* en las líneas transgénicas. Diferencia en los niveles de expresión del gen *SCEI* de las líneas transgénicas respecto a la planta control. Los datos fueron normalizados con el nivel de expresión de actina. Se muestra el promedio de las réplicas y desviación estándar. WT, planta control no transformada. 182, planta 5 de la línea 41.2.18, B1, planta 1 de la línea 41.2.2. B3, planta 5 de la línea 41.1.3, todas líneas transgénicas positivas para *SCEI* y *NPTII*, tolerantes a la infección por *Cmm*.

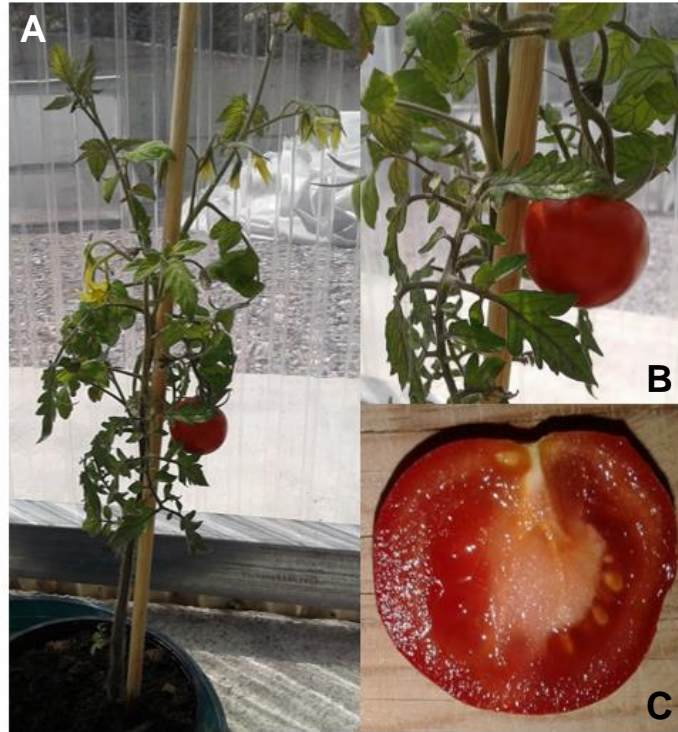


Figura 13. Fruto sano de una planta transgénica tolerante a *Cmm*. Se observa la ausencia de síntomas en el fruto de la planta 2 de la línea 41.2.5 positiva para *SCEI* y tolerante a la infección por *Cmm*. (A y B), Exocarpo (dermis) del fruto sin síntomas, Floración normal del fruto y hojas sanas sin marchitamiento. (C), Pericarpo del fruto sin síntomas, sin decoloración y consistencia normal.