



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio funcional de genes de defensa contra el
chancro bacteriano, mediante vectores virales en
especies silvestres relacionadas al tomate”.**

Tesis que presenta:

M. C. Mayra Janeth Esparza Araiza

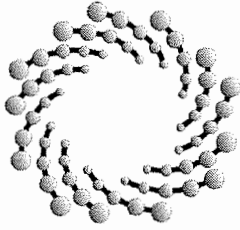
Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

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



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

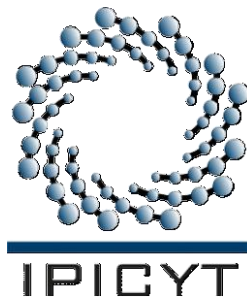
La tesis "*Estudio funcional de genes de defensa contra el chancro bacteriano, mediante vectores virales en especies silvestres relacionadas al tomate*" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mayra Janeth Esparza Araiza** y aprobada el **ocho de abril 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

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial

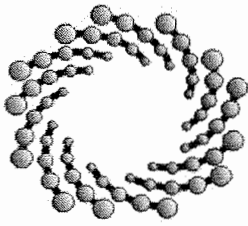
Dra. Dulce Alejandra Rougon Cardoso
Miembro del Comité Tutorial



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 (No. 161730) y se contó con el apoyo de los proyectos: Reconversión de cultivos de alfalfa apoyado por CAED, Control del cáncer bacteriano apoyado por la Fundación Produce-SLP y por el Fordecyt-CONACYT No. 2012-02-193512.



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 084 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de abril del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|--|------------------------|---------------|
| Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga | Presidente | IPICYT |
| Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont | Secretario | IPICYT |
| Dra. Dulce Alejandra Rougon Cardoso | Sinodal externo | UNAM |
| Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís | Sinodal | IPICYT |

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mayra Janeth Esparza Araiza

sobre la Tesis intitulada:

Estudio funcional de genes de defensa contra el chancro bacteriano, mediante vectores virales en especies silvestres relacionadas al tomate

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 13:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de abril de 2016.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatoria

A Jehová Dios por darme la oportunidad de estar aquí y permitirme llegar a donde estoy.

A mi familia, quienes siempre me han mostrado comprensión, apoyo incondicional en cada una de las metas fijadas, por sus consejos y siempre tener una palabra de aliento.

Agradecimientos

Agradezco especialmente al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, tiempo, guía, enseñanzas y apoyo durante todo este tiempo. Por sus consejos, confianza y ejemplo como persona, por permitirme lograr alcanzar esta meta.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por compartir su conocimiento y contribuir en la realización de este trabajo y mi formación académica, por sus consejos y amistad. Por aceptar fungir como mi sinodal.

A la Dra. Dulce Alejandra Rougon Cardoso y al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por contribuir en la realización de mi trabajo y formación académica, mediante sus consejos y aportaciones, por aceptar fungir como mis sinodales.

A la Dra. Olga Aracelí Patrón Soberano por su colaboración al tomar las micrografías del presente trabajo.

A mis amigos y compañeros del IPICYT, especialmente a los miembros del laboratorio 1, quienes se han convertido en una familia y han compartido esos momentos, por estar dispuestos a apoyarme en todo lo posible.

Al CONACYT por la beca otorgada durante la realización de este trabajo.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por la oportunidad que me brindaron y el apoyo para continuar mis estudios.

Al LANBAMA por el apoyo técnico otorgado, sin el cual no se hubieran logrado los resultados obtenidos en el presente trabajo

Al LINAN por el apoyo técnico otorgado, sin el cual no se hubieran logrado los resultados obtenidos en el presente trabajo.

CONTENIDO

| | |
|--|-------------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos Institucionales | iii |
| Acta de examen | iv |
| Dedicatoria | v |
| Agradecimientos | vi |
| Lista de tablas | x |
| Lista de figuras | xi |
| Abreviaturas | xiii |
| Glosario | xiv |
| Resumen | xv |
| Abstract | xvi |
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 <i>Solanum lycopersicum</i> . | 1 |
| 1.2 Factores abióticos y bióticos que afectan al cultivo del tomate. | 3 |
| 1.3 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . | 4 |
| 1.4 Control de <i>Cmm</i> y fuentes de resistencia a <i>Cmm</i> . | 8 |
| 1.5 Interacción planta-patógeno. | 9 |
| 1.6 Defensa basal y mediada por genes R. | 11 |
| 1.7 Inducción de resistencia sistémica. | 17 |
| 1.8 Silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS). | 19 |
| 1.9 Geminivirus como vectores de silenciamiento viral. | 24 |
| 1.10 Sumoilación como un mecanismo de defensa. | 27 |
| 1.11 Transportador <i>PDRI</i> de tipo ABC relacionado con la respuesta innata ante patógenos. | 30 |
| 2 JUSTIFICACIÓN | 33 |
| 3 HIPÓTESIS | 34 |
| 4 OBJETIVO | 34 |
| 4. 1 Objetivos específicos. | 34 |
| 5 Materiales y Métodos | 35 |
| 5.1 Material vegetal, virus, cepas bacterianas y procedimiento de infección. | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2 | Diseño del vector de silenciamiento y clonación de fragmentos a silenciar. | 37 |
| 5.3 | Inoculación de plantas con los VIGS - ToMoV y TRV. | 39 |
| 5.4 | Extracción de ARN de las plantas inoculadas con VIGS. | 40 |
| 5.5 | Cuantificación de la expresión de los genes silenciados por PCR-tiempo real (qRT-PCR). | 40 |
| 5.6 | Detección de ADN de <i>Cmm</i> por PCR en tejido de plantas inoculadas. | 41 |
| 5.7 | Cuantificación de <i>Cmm</i> en tejido de plantas inoculadas con los vectores de silenciamiento, mediante PCR-tiempo real (qRT-PCR). | 42 |
| 5.8 | Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido. | 43 |
| 6 | Resultados | 43 |
| 6.1 | Selección de ToMoV como virus candidato para el diseño de VIGS. | 43 |
| 6.2 | Diseño de ToMoV como VIGS. | 45 |
| 6.3 | Evaluación del funcionamiento de ToMoV como VIGS, mediante el silenciamiento del gen de quelatasa (<i>Chl</i>). | 46 |
| 6.3.1 | Silenciamiento del gen quelatasa <i>Chl</i> en Solanáceas mediante el VIGS ToMoV_ <i>Chl</i> . | 48 |
| 6.4 | Análisis funcional del gen <i>SCEI</i> mediante su silenciamiento con ToMoV_ <i>SCEI</i> en plantas de <i>S. peruvianum</i> LA2172. | 52 |
| 6.4.1 | Silenciamiento del gen <i>SCEI</i> , | 52 |
| 6.4.2 | Fenotipo de las plantas de <i>S. peruvianum</i> LA2172 en las que se silenció el gen <i>SCEI</i> , después del reto con <i>Cmm</i> . | 53 |
| 6.4.3 | Carga bacteriana <i>Cmm</i> en plantas de <i>S. peruvianum</i> inoculadas con el vector de silenciamiento ToMoV. | 57 |
| 6.5 | Análisis funcional del gen <i>PDRI</i> , mediante su silenciamiento con los vectores TRV y ToMoV. | 60 |
| 6.5.1 | Silenciamiento del gen fitoeno desaturasa (<i>PDS</i>) con TRV en <i>S. peruvianum</i> , <i>S. habrochaites</i> y <i>S. lycopersicum</i> cv. Ailsa Craig. | 60 |
| 6.5.2 | Análisis de la función del gen <i>PDRI</i> en la defensa ante patógenos, mediante su silenciamiento con TRV. | 63 |
| 6.6 | Análisis de la función del gen <i>PDRI</i> en la defensa ante patógenos, mediante su silenciamiento con ToMoV. | 65 |
| 6.6.1 | Silenciamiento del gen <i>PDRI</i> . | 66 |
| 6.6.2 | Fenotipo de las plantas de <i>S. habrochaites</i> LA2128 en las que se silenció el gen <i>PDRI</i> , después del reto con <i>Cmm</i> . | 67 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 6.6.3 | Carga bacteriana <i>Cmm</i> en plantas de <i>S. habrochaites</i> inoculadas con el vector de silenciamiento ToMoV_ <i>PDRI</i> . | 71 |
| 7 | Discusión | 72 |
| 7.1 | Especies silvestres como fuentes potenciales de resistencia a <i>Cmm</i> relacionadas con tomate. | 72 |
| 7.2 | VIGS como herramienta para el análisis de la función de genes. | 73 |
| 7.3 | Nivel de supresión del gen <i>ChII</i> en diferentes Solanáceas inducido por VIGS ToMoV_ <i>ChII</i> . | 73 |
| 7.4 | Bajas temperaturas inhiben el silenciamiento inducido por VIGS ToMoV. | 74 |
| 7.5 | Efecto del silenciamiento del gen <i>SCEI</i> en <i>S. peruvianum</i> mediante el vector ToMoV. | 75 |
| 7.6 | Análisis del sistema de silenciamiento con TRV en <i>S. peruvianum</i> y <i>S. habrochaites</i> . | 78 |
| 7.7 | Efecto del silenciamiento del gen <i>PDRI</i> en <i>S. habrochaites</i> mediante el vector ToMoV. | 79 |
| 8 | Resumen de Resultados | 80 |
| 9 | Conclusión | 83 |
| 10 | Referencias | 84 |
| 11 | Anexo I. Artículo publicado | 93 |
| 12 | Protocolos | 104 |
| 12.1 | Extracción de ADN. | 104 |
| 12.2 | Extracción de ARN. | 105 |
| 12.3 | Síntesis de cADN. | 105 |
| 12.4 | Preparación de las balas de tungsteno e inoculación de ToMoV, mediante biobalística. | 106 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Carga bacteriana de <i>Cmm</i> estimada por qRT-PCR-SCEI | 58 |
| Tabla 2. Carga bacteriana de <i>Cmm</i> estimada por qRT-PCR-PDRI | 72 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Producción mundial de tomate. Tomado de http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E . | 2 |
| Figura 2. Producción nacional de tomate (2014). Tomado de www.siap-sagarpa.gob.mx . | 3 |
| Figura 3. PRRs de plantas. | 12 |
| Figura 4. Modelo de evolución de resistencia a patógenos en plantas. | 15 |
| Figura 5. Vías de respuesta Inmune de las plantas. Tomada de Panstruga y col., 2009. | 17 |
| Figura 6. Silenciamiento de genes mediante siARN. Tomada de Meister y Tuschli, 2004. | 23 |
| Figura 7. Virus Moteado del Tomate - ToMoV. Modificado de Gutiérrez, 2002. | 25 |
| Figura 8. Función de señalización-SUMO. Tomada de Verger y col., 2003. | 28 |
| Figura 9. Vía de conjugación de SUMO. Tomada de Verger y col., 2003. | 29 |
| Figura 10. Subfamilias de las proteínas transportadoras ABC. Tomada de van den Brüle y Smart, 2002. | 32 |
| Figura 11. Plantas de <i>Solanum</i> sp. infectadas con ToMoV. | 44 |
| Figura 12. Diseño de VIGS con ToMoV. | 45 |
| Figura 13. Diseño de ToMoV como VIGS. | 46 |
| Figura 14. Diseño de ToMoV_ <i>Chl</i> . | 47 |
| Figura 15. Prueba de restricción del VIGS ToMoV_ <i>Chl</i> . | 47 |
| Figura 16. Fenotipo del silenciamiento del gen quelatasa en diferentes especies de Solanáceas, inducido por la inoculación del VIGS ToMoV_ <i>Chl</i> . | 50 |
| Figura 17. Plantas de <i>S. peruvianum</i> LA2128 y <i>S. habrochaites</i> inoculadas con ToMoV y ToMoVΔCP. | 51 |
| Figura 18. Plantas inoculadas con ToMoV_ <i>Chl</i> en invierno. | 52 |
| Figura 19. Nivel de expresión del gen <i>SCEI</i> en <i>S. peruvianum</i> después del silenciamiento con el vector VIGS_ToMoV. | 53 |
| Figura 20. Fenotipo de las plantas <i>S. peruvianum</i> y <i>S. lycopersicum</i> usadas en la evaluación del gen <i>SCEI</i> mediante su silenciamiento con el VIGS ToMoV. | 55 |
| Figura 21. Porcentaje del daño medido en pixeles, ocasionado por <i>Cmm</i> en plantas de <i>S. peruvianum</i> inoculadas con ToMoVΔCP y ToMoV_ <i>SCEI</i> . | 56 |
| Figura 22. Detección de <i>Cmm</i> en tejido de <i>S. peruvianum</i> mediante PCR. | 57 |
| Figura 23. Imágenes de microscopía electrónica de un corte longitudinal de tallo de <i>Solanum</i> sp. sin inoculación e inoculadas con ToMoVΔCP, ToMoV_ <i>SCEI</i> y no infectadas e infectadas con <i>Cmm</i> . | 59 |
| Figura 24. Organización del genoma de TRV como VIGS. | 61 |
| Figura 25. Análisis funcional del gen <i>PDS</i> con el vector TRV en <i>S. peruvianum</i> y <i>S. habrochaites</i> a 21°C con diferentes concentraciones de <i>Agrobacterium</i> . | 62 |
| Figura 26. Análisis funcional del gen <i>PDS</i> con el vector TRV en <i>S. habrochaites</i> a 14°C posterior a la infiltración. | 62 |
| Figura 27. Fenotipo de plantas de <i>S. peruvianum</i> inoculadas con TRV_ <i>PDRI</i> y TRV_ <i>GFP</i> , retadas con <i>Cmm</i> . | 63 |

| | |
|---|----|
| Figura 28. Área de daño en pixeles en <i>S. peruvianum</i> y <i>S. habrochaites</i> inoculadas con ToMoV_ <i>PDRI</i> y retadas con <i>Cmm</i> . | 64 |
| Figura 29. Síntomas generados por diferentes patógenos en plantas de <i>S. lycopersicum</i> cv. Tiny Tim inoculadas con TRV_ <i>PDRI</i> y TRV_ <i>GFP</i> . | 65 |
| Figura 30. Silenciamiento de quelatasa con ToMoV en <i>S. habrochaites</i> . | 66 |
| Figura 31. Nivel de expresión del gen <i>PDRI</i> en <i>S. habrochaites</i> después de su silenciamiento con el vector VIGS_ToMoV. | 67 |
| Figura 32. Fenotipo de las plantas <i>S. habrochaites</i> y <i>S. lycopersicum</i> usadas en la evaluación del gen <i>PDRI</i> mediante su silenciamiento con VIGS ToMoV. | 68 |
| Figura 33. Porcentaje del daño medido en pixeles, ocasionado por <i>Cmm</i> en plantas de <i>S. habrochaites</i> inoculadas con ToMoV Δ CP y ToMoV_ <i>PDRI</i> . | 69 |
| Figura 34. Imágenes de microscopía electrónica de un corte longitudinal de tallo de <i>Solanum</i> sp. sin inoculaciones e inoculadas con ToMoV Δ CP, ToMoV_ <i>PDRI</i> , infectadas y no infectadas con <i>Cmm</i> . | 70 |

Abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| ABC | Casette de unión a ATP |
| ChI | Quelataasa |
| Cmi | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i> |
| Cmm | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> |
| Cmn | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> |
| Cms | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> |
| Cmt | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i> |
| Cp | Proteína de la cápside |
| EPS | Exopolisacáridos |
| ET | Etileno |
| ETI | Inmunidad disparada por efectores |
| HR | Respuesta hipersensible |
| HRO | Humedad relativa óptima |
| JA | Ácido jasmónico |
| MAPKs | Proteína cinasa activada por mitógenos |
| MEB | Microscopía electrónica de barrido |
| PAMP's | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PDR | Resistencia a drogas pleiotrópicas |
| PR's | Proteínas relacionadas con la patogenicidad |
| PRRs | Receptores de reconocimiento de patrones |
| PTGS | Silenciamiento genético post-transcripcional |
| PTI | Inmunidad disparada por PAMPs |
| QTL | Locus de carácter cuantitativo |
| RdPR | ARN-polimerasa dependiente de ARN |
| RISC | Complejo de silenciamiento inducido por ARN |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SA | Ácido salicílico |
| SAR | Resistencia sistémica inducida |
| SCE | Enzima de conjugación SUMO E2 |
| SUMO | Pequeño modificador relacionado con ubiquitina |
| TGS | Silenciamiento genético transcripcional |
| ToMoV | Virus moteado del tomate |
| TRV | Virus rayado del tabaco |
| TYLCV | Virus del rizado amarillo del tomate |
| VIGS | Silenciamiento inducido por virus |

Glosario

Biotrofos. Patógenos que invaden a su huésped sin causar muerte de manera inmediata, ya que dependen de su metabolismo para su desarrollo.

Crosstalking. Puntos en común y convergencias entre dos o más rutas de transducción de señales

Necrotrofos. Patógenos que invaden a su huésped matando a las células infectadas para extraer los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Sumoilación. Proceso que implica la modificación de proteínas que participan en diferentes vías, mediante la adición de SUMO.

Resumen

Estudio funcional de genes de defensa contra el chancro bacteriano, mediante vectores virales en especies silvestres relacionadas al tomate.

El tomate, *Solanum lycopersicum*, representa uno de los cultivares de mayor consumo a nivel mundial, su producción se ha visto afectada por diversos patógenos, siendo el más importante *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). La enfermedad causada por *Cmm* se conoce como chancro bacteriano, contra la cual no se tiene tratamiento efectivo actualmente; sin embargo, se han identificado especies silvestres relacionadas al tomate, que son resistentes a *Cmm*, estas representan una fuente de genes que podrían transferirse a la especie susceptible. En este trabajo se analizó la función de genes potencialmente involucrados en la resistencia a *Cmm* mediante su silenciamiento inducido por virus (VIGS) y el subsecuente reto con el patógeno. Se analizaron dos genes en particular, uno que codifica a la enzima de conjugación SUMO E2 (*SCEI*), y otro que codifica para un transportador de la familia ABC, que confiere resistencia a drogas pleiotrópicas (*PDRI*). Se diseñó un vector VIGS con base en el Virus Moteado del Tomate (ToMoV), para el análisis funcional. El silenciamiento del gen *SCEI* en *S. peruvianum* no produjo ningún fenotipo aberrante, lo que permitió su análisis subsecuente en experimentos de inoculación con *Cmm*. Las plantas silenciadas y retadas con *Cmm* mostraron un incremento en la susceptibilidad a este patógeno, lo que nos permite sugerir la participación de *SCEI* en el mecanismo de defensa. Por otra parte, el silenciamiento del gen *PDRI* en *S. habrochaites* realizado mediante un vector TRV, no alteró significativamente la respuesta de las plantas al reto con *Cmm*, lo que sugiere que este gen no juega un papel crucial en la resistencia a este patógeno o el silenciamiento no fue eficiente. Sin embargo, el silenciamiento del mismo gen con el vector derivado de ToMoV resultó en un ligero aumento en la susceptibilidad a *Cmm*, aunque el nivel de daño no fue significativo estadísticamente. La sobreexpresión de los genes *SCEI* y *PDRI* en plantas susceptibles puede ser una estrategia de control del cáncer bacteriano.

Palabras clave: Silenciamiento inducido por virus (VIGS), Enzima de conjugación SUMO E2 (*SCEI*), Resistencia a drogas pleiotrópicas (*PDRI*), TRV, ToMoV.

Abstract

Functional study of defense genes against the bacterial canker, via viral vectors in wild species related to tomato

Tomato, *S. lycopersicum*, is one of the crops most consumed worldwide, and its production is affected by several pathogens, among these the most important is the bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). The disease caused by *Cmm* is known as bacterial canker and currently there is no effective treatment, however, there are reports where wild tomato relatives show some resistance to *Cmm*, thus representing a source of genes that could be transferred to susceptible species. In this study, were analyzed the function of genes potentially involved in the resistance to *Cmm* by virus induced gene silencing (VIGS) and the subsequent challenge with the pathogen. Two genes in particular were analyzed, the first one encodes the SUMO E2 conjugating enzyme (*SCEI*); and the second encodes an ABC family transporter that confers, pleiotropic drug resistance (*PDRI*). A VIGS vector was designed based on the Tomato Mottle Virus (ToMoV). *SCEI* gene silencing in *S. peruvianum* did not showed any aberrant phenotype, which allowed its subsequent analysis of inoculation experiments with *Cmm*. Plants that were silenced for *SCEI* gene and then challenged with *Cmm* showed increased susceptibility to this pathogen, suggesting its role in the defense mechanism against *Cmm*. On the other hand, *PDRI* gene silencing in *S. habrochaites* performed by TRV vector, did not alter significantly the response of the plants to the challenge with *Cmm*, which suggests either that this gene is not implicated in the resistance to this pathogen or the silencing with TRV was not efficient. However, the silencing of the same gene with the vector derived from ToMoV resulted in a slight increase on the susceptibility to *Cmm*; however, the level of damage was not statistically significant. Overexpression of the *SCEI* and *PDRI* genes in susceptible plants can be a control strategy against bacterial canker.

Keywords: Silencing, Virus-induced gene silencing (VIGS), SUMO E2-conjugating enzyme (*SCEI*), Pleiotropic drug resistance (*PDRI*), TRV, ToMoV.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Solanum lycopersicum*.

El tomate *Solanum lycopersicum* originario del sureste de América (Sims, 1980), se clasifica en el dominio eucaria, reino Viridiplantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsidae (Asteridae), orden Solanales, familia Solanaceae, género *Solanum*, dentro del cual se encuentran tres especies cultivadas a nivel mundial, la papa (*S. tuberosum*), la berenjena (*S. melongena*) y el tomate (*S. lycopersicum*) (Long, 2001). En lo que se refiere al tipo de alimento, el tomate pertenece al grupo de las hortalizas de mayor importancia a nivel nacional (Ruíz y col., 2012). El cultivo del tomate crece a temperaturas entre 20° y 30°C Escaff (2005). Las temperaturas diurnas entre 21° y 29°C y nocturnas entre 18° y 21°, parecen ser las óptimas para esta hortaliza Jones (2005). La exposición a temperaturas menores a 12°C ocasiona inhibición de la floración, disminución de internodos, entre otros daños fisiológicos en la planta y el fruto; a temperaturas menores de 2°C la planta muere (Ploeg y Heuvelink, 2005). En este cultivo, la humedad relativa óptima (HRO) debe oscilar entre 55% y 80. Escaff (2005) menciona que una HRO mayor a 75% favorece la obtención de frutos de mayor tamaño y con menos defectos; sin embargo, condiciones de alta humedad favorecen el desarrollo de enfermedades causadas por hongos y bacterias (Nuez, 1995; Pérez y col., 2000; www.sagarpa.gob.mx).

El consumo y la producción del tomate es de gran relevancia a nivel mundial, según la FAO (2014), la producción mundial se estimó en 211 millones de toneladas en un año con un rendimiento promedio de 36 ton/ha. Para Diciembre del 2012, los 5 países con mayor producción de tomate fueron: China, India, Estados Unidos de América, Turquía y Egipto, registrando una producción promedio por año de 50,125,050 ton, 17,500,000 ton, 13,206,950 ton, 11,350,000 ton y 8,625,219 ton, respectivamente. México se reportó en el décimo lugar con una producción de 3,433,567 ton. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (Figura 1). Durante el año 2014 a nivel nacional, el principal estado productor de tomate

fue Sinaloa con una producción total de 1,039,367 ton, representando el 37% de la producción nacional, seguido de Baja California con 189,635 ton., Michoacán con 171,038 ton., Jalisco con 156,660 ton., Zacatecas con 139,131 ton., San Luis Potosí con 116,136 ton., Baja California Sur con 106,858 ton y Estado de México con 80,073 ton. Estos estados representan más del 50% de la producción nacional total de este cultivo (Figura 2), sin embargo, su producción se ha visto afectada por una gran cantidad de factores abióticos como bióticos, los cuales se mencionan a continuación (www.siap-sagarpa.gob.mx).

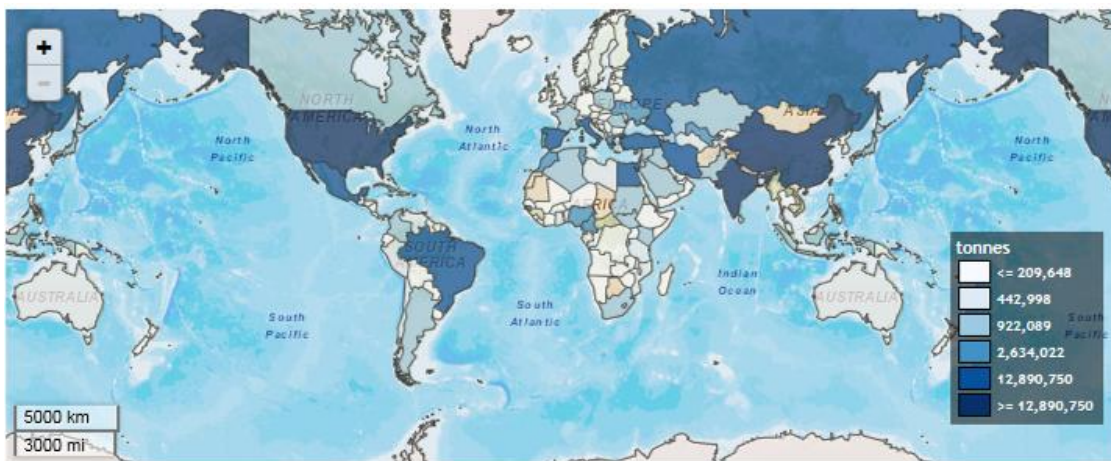


Figura 1. Producción mundial de tomate. Tomado de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.

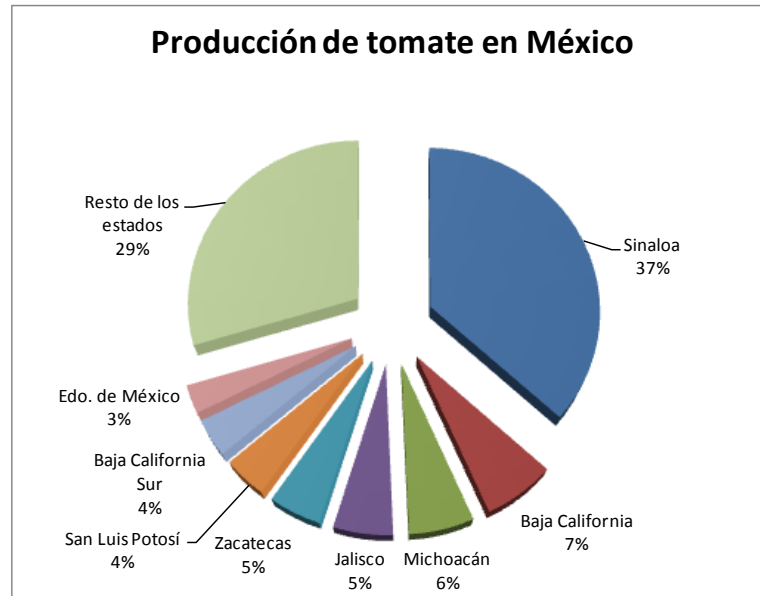


Figura 2. Producción nacional de tomate (2014). Tomado de www.siap-sagarpa.gob.mx.

1.2 Factores abióticos y bióticos que afectan al cultivo del tomate.

Algunos de los principales problemas abióticos que actualmente se presentan en el cultivo del tomate es la salinidad de los suelos, sequía, altas temperaturas y humedad relativa (Nuez, 1995; Escaff y col., 2005; Ploeg y Heuvelink, 2005; Dell Amico y col., 2006). Tales condiciones ambientales, así como el sistema de monocultivo y un mal manejo de cultivo, favorecen el desarrollo de enfermedades causadas por diversos patógenos (Pérez y col., 2000; Escaff y col., 2005). Con respecto a las plagas reportadas para el cultivo del tomate en nuestro país, se encuentran cerca de cuarenta y cinco especies de artrópodos; siendo las plagas más comunes la mosca blanca, *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*, esta última se reporta como la más difundida, el daño que estas ocasionan en este cultivo se debe a la transmisión de diferentes enfermedades virales, principalmente geminivirus, como el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). Para el control de estas plagas se han aplicado técnicas químicas y biológicas, siendo en el mayor de los casos efectivo (Pérez y col., 2000; Escaff y col., 2005; www.sagarpa.gob.mx). Por otro lado, las principales enfermedades fúngicas que

afectan al cultivo del tomate son: la pudrición gris ocasionada por *Botrytis cinerea*, tizón temprano del tomate siendo *Alternaria solani* el agente causal, cladosporiosis siendo su agente causal *Cladosporium fulvum*, mal del talluelo ocasionado por *Fusarium* spp, raíz corchosa ocasionada por *Pyrenochaeta lycopersici* (Pérez y col., 2000). Con respecto a enfermedades de mayor importancia, ocasionadas por bacterias, se reporta la necrosis medular causada por *Pseudomonas corrugata* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), este último es uno de los agentes causales que a ocasionado pérdidas millonarias a nivel nacional, específicamente en los estados de San Luis Potosí, Baja California, Estado de México, Michoacán, Guanajuato, Morelos, Zacatecas y Sinaloa. En este último se reportó la pérdida de 40 millones de dólares a causa de este patógeno (Barboa y col., 2009). A nivel mundial *Cmm* ha ocasionado graves daños que se ha catalogado como especie sujeta a regulaciones de cuarentena internacional por parte de la Unión Europea (Commission Directive 95/4/EC) y de los Estados Unidos (NAPPO) (Jahr y col., 1999); en México se ha catalogado como plaga cuarentenaria grado A1 por la hoja de Requisitos Fitosanitarios y Norma Oficial Mexicana 007 (NOM 007) (Lara-Ávila y col., 2012)

1.3 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Clavibacter pertenece a la familia *Microbacteriaceae*, es un patógeno Gram positivo. El género *Clavibacter* consiste de solo una especie *C. michiganensis* y es subdividida en cinco subespecies de acuerdo a su hospedero específico. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), es el agente causal de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano o chancro bacteriano en tomate (*Solanum lycopersicum*), la cual puede considerarse la enfermedad bacteriana más importante en este cultivo (Dreier y col., 1997; Gartemann y col., 2008), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*), responsable de necrosis bacteriana de papa (*Solanum tuberosum*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (*Cmi*), que ocasiona marchitamiento y retraso de crecimiento en alfalfa (*Medicago sativa*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*), causante de marchitamiento y roya en maíz (*Zea mays*), *Clavibacter*

michiganensis subsp. *tessellarius* (*Cmt*), causa de manchas o pecas en las hojas en trigo (*Triticum esativum*) (Eichenlaub y col., 2006; Balaji y col., 2008; Eichenlaub y Gartemann 2011). *Cmm*, *Cms* y *Cmi* se consideran patógenos de plantas sujetos a cuarentena, como ya se mencionó anteriormente (Jahr y col., 1999; Eichenlaub y col., 2006). Específicamente *Cmm* llega a ser devastador en el cultivo de tomate debido al movimiento sistémico de la bacteria en el tejido vascular, lo cual fue demostrado por Xu y col., (2010) mediante la generación de una cepa bioluminiscente de *Cmm*; este patógeno invade a la planta a través de heridas, o aperturas naturales como estomas e hidátodos (Carlton y col., 1998; Kaup y col., 2005; Balaji y col., 2008; Eichenlaub y Gartemann 2011), o mediante trasplantes (Dreier y col., 1997), sin embargo, el mayor modo de contaminación es mediante semillas enfermas (Eichenlaub y col., 2006). Una vez que la bacteria invade al tejido vegetal, esta ingresa a los vasos del xilema, causando una infección sistémica vascular, después de un tiempo la planta desarrolla síntomas, como marchitamiento unilateral en las hojas, necrosis (Balaji y col. 2008), y si la planta se encuentra en un estadio joven, ésta puede morir, más si la infección ocurre en una planta adulta esta puede sobrevivir, pero se desarrollaran heridas en tallo conocidas como chancros y los frutos presentaran manchas oscuras redondas conocidas como ojos de pájaro y las semillas resultan infectadas con *Cmm* (Jahr y col., 1999; Gartemann y col., 2008; Balaji y col., 2010; Calis y col., 2012). *Cmm* se considera un organismo biotrófico; sin embargo, se ha reportado que puede sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo, por al menos dos años, cuando se encuentra en contacto con residuos vegetales (van-Heusden y col. 1999; Jahr y col. 1999; Balaji y col., 2010), lo cual representa una fuente de infección para los próximos cultivos de tomate.

La secuencia del genoma de *Cmm* NCPPB382 determinó la presencia de un único cromosoma circular de 3.298Mb y dos plásmidos circulares, los cuales llevan genes esenciales relacionados con su virulencia (Gartemann y col., 2008); sin embargo, poco es conocido acerca de la estrategia de virulencia que usa *Cmm* durante la infección. Varias hipótesis se han propuesto tratando de explicar el

mecanismo por el cual *Cmm* induce el chancro y el marchitamiento en jitomate (Balaji y col., 2008). Una de las explicaciones es que *Cmm* se encuentra en el xilema causando una obstrucción física en el transporte de agua, lo que puede resultar en estrés hídrico severo y de esta forma causando el marchitamiento característico del cáncer bacteriano (Calis y col., 2012); otra explicación se relaciona con la producción de exopolisacáridos (EPS) y glicoproteínas, con base en un estudio *in vitro* en plántulas de tomate, en el cual se infirió que estos interrumpen el transporte de agua ocasionando taponamiento en los vasos de xilema induciendo estrés hídrico y marchitamiento. Sin embargo, mutantes creadas por mutagénesis química de *Cmm* deficientes en la producción de EPS son aún virulentas, ocasionando marchitamiento (Berpohl y col., 1996; Dreier y col., 1997; Eichenlaub y Gartemann, 2011). Por otro lado, en la cepa NCPB382 de *Cmm* se demostró que algunos factores determinantes esenciales de patogenicidad se encuentran en dos plásmidos endógenos denominados pCM1 y pCM2 con un tamaño de 27.5 Kb y 72 Kb respectivamente (Jahr y col., 1999). En el primer plásmido se encuentra el gen *celA* que codifica para una endo- β -1,4 glucanasa, y el pCM2 lleva el gen *pat-1* que codifica para una posible serin proteasa. La proteína codificada por *celA*, presenta un dominio catalítico seguido por un dominio de unión a celulosa y un tercer dominio con similitud a una α -expansina de planta, por lo que se cree que *celA* podría estar participando en la degradación de la pared celular de la planta hospedera. Se ha demostrado que la pérdida de uno de los plásmidos, pCM1 con *celA* o pCM2 con *pat-1* reduce la virulencia, más la pérdida de ambos plásmidos ocasiona la pérdida total de la virulencia, es decir que no se presenta marchitamiento, aunque la bacteria sea capaz de colonizar la planta hospedera. Demostrando que *celA* y *pat-1* son factores importantes de patogenicidad, pero que los genes necesarios para la colonización del hospedero se encuentran codificados en el cromosoma (Stork y col., 2008). Además de estos factores de patogenicidad se han identificado otros, los cuales pueden estar involucrados en la interacción de *Cmm* con la planta hospedera. La ubicación de los genes que codifican para estos factores de patogenicidad se encuentra en el cromosoma y son *chpC* y *tomA*. El gen *chpC*

codifica para una posible serin-proteasa con homología a *pat-1* y *tomA* para una β -glicosidasa (Kaup y col., 2005; Gartemann y col. 2008; Stor y col., 2008; Eichenlaub y Gartemann 2011). Adicionalmente, en el análisis del genoma de *Cmm* se encontró una región de 129Kb localizada entre los genes *chpC/tomA*, la cual se caracteriza por un bajo contenido de G + C necesaria para la patogenicidad, ya que contiene genes involucrados en el metabolismo de azúcares y algunas serin proteasas que pueden interferir con la señalización de las respuestas de defensa y están involucradas en la colonización de la planta (Gartemann y col., 2008).

Recientemente se estudió la interacción molecular entre *Cmm* y tomate, evaluando la expresión de genes de virulencia de la bacteria y de defensa de la planta durante etapas tempranas de la infección; en este estudio se identificaron factores de virulencia como *celA* y *pat-1*, así como *chpC* y *ppaA* localizados en la isla de patogenicidad *chp/tomA* (Chalupowicz y col., 2010). Se demostró que existe interdependencia entre los niveles de expresión de genes cromosomales y los plásmidicos que codifican serin-proteasas y enzimas que degradan la pared celular, es decir, los niveles de expresión de los genes plásmidicos *celA* y *pat-1* fueron reducidos significativamente en ausencia de la isla de patogenicidad *chp/tomA*, de igual forma los niveles de expresión de homólogos de serin-proteasas, *chpC* y *ppaA*, también se redujeron en ausencia de pCM1 y pCM2, donde se encuentran *celA* y *pat-1*, respectivamente. Con base en estos resultados y estudios anteriores (Burger y col., 2005; Gartemann y col., 2008), se sugiere que la evolución de *Cmm* de un estado endofítico a uno patogénico se logró por la adquisición horizontal de genes plasmidicos, por un lado, y de cromosomales, como de la isla de patogenicidad, por otro. Sin embargo, estos plásmidos al ser de conjugación pueden perderse, por lo que una cepa patogénica puede pasar a un estado endofítico. Por lo tanto la pérdida y ganancia de estos plásmidos de virulencia es un proceso continuo en la infección *Cmm*-tomate (Chalupowicz y col., 2010).

1.4 Control de *Cmm* y fuentes de resistencia a *Cmm*.

El cultivo del tomate se ha visto ampliamente afectado por el ataque de patógenos, lo que ha llevado a la búsqueda de un método eficaz para el control de los mismos. Específicamente, para *Cmm*, se ha logrado limitar su dispersión mediante el uso de semillas certificadas, así como mediante la aplicación de medidas de higiene, removiendo y destruyendo las plantas infectadas, además del uso de biofumigación con composta, ya que la supervivencia de *Cmm* requiere la asociación con material vegetal (Gartemann y col., 2003).

Con respecto al control químico, este se ha basado en el uso de antibióticos como streptomina y oxitetraciclina, además del uso de compuestos cúpricos, los cuales previenen la multiplicación bacteriana y demás infecciones. Desafortunadamente, los antibióticos han dado lugar a la selección de poblaciones bacterianas resistentes, además de que estas estrategias de control implican costo económico y ambiental (Madriz, 2002). En los últimos años se ha usado terapia con bacteriófagos en el campo de la agricultura, resultando en el control exitoso de varias enfermedades. Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias, en las cuales ocurren lisis bacteriana mediante enzimas como virolisinas, lisosimas, endolisinas; sin embargo, para la aplicación de esta terapia con bacteriófagos, es necesaria una alta eficiencia de lisis bacteriana patógena, además de especificidad del hospedero (Parisien y col., 2007; Fischetti, 2008). Wittman y col., (2010) reportan una endolisina CN77 específica para *Cmm*, se ha determinado que la pared celular de *Cm* presenta peptidoglicano tipo $\beta_2\gamma$ y que esto hace que la lisis se limite a la subespecie de *Cmm*; sin embargo, aún se requieren más estudios para su aplicación en campo.

Por otro lado, se han reportado cultivares comerciales de tomate resistentes a diversos patógenos, como virus, bacterias, hongos y nemátodos. Estas variedades resistentes se han obtenido por mejoramiento genético tradicional. En estos estudios se han usado especies silvestres relacionadas al tomate para transferir este rasgo al cultivar comercial (*S. lycopersicum*) (Arie y col., 2007). Desafortunadamente no se ha logrado obtener cultivares comerciales resistentes a

Cmm. Sin embargo, se han reportado fuentes potenciales de resistencia en especies silvestres relacionadas al tomate, más no se ha logrado la introgresión de genes responsables de la resistencia de estas especies a la susceptible. van-Heusden y col., (1999) reportan que esto se puede deber a la herencia poligenética ya que los entrecruzamientos entre las variedades silvestres y la comercial (*S. lycopersicum*) han sido ineficientes.

El primer reporte de una variedad silvestre tolerante a *Cmm* fue *S. pimpinellifolium* en 1934 (Sen y col., 2013), otras son *S. habrochaites* LA407 (Kabelka y col., 2002; Francis y col., 2010), y *S. peruvianaum* LA 2157 (van-Heusden y col., 1999), siendo esta última la mejor caracterizada como fuente de resistencia. Diversos estudios han demostrado que loci de un carácter cuantitativo (QTL – quantitative trait locus) contribuyen a la resistencia del cáncer bacteriano en tomate usado por *Cmm* (Kabelka y col., 2002). Diversos estudios muestran que *S. habrochaites* y *S. peruvianum* revelan 2 y 3 loci respectivamente, asociados con resistencia, sin embargo, no se ha logrado caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en los eventos de resistencia que presentan estas variedades silvestres (Kabelba y col., 2002, Francis y col., 2010).

1.5 Interacción planta-patógeno.

Las plantas son una fuente de nutrientes y agua para los microorganismos, de tal forma que estas se encuentran en continuo contacto con un gran número de microorganismos potencialmente patógenos, por lo que plantas y patógenos se encuentran en un continuo proceso de co-evolución, esto lleva a que las barreras de defensa de una planta pueden ser sobrepasadas por un patógeno, ocasionando desarrollo de la enfermedad en la planta (interacción compatible) pero para otro, los mecanismos de defensa de la planta pueden ser eficaces y bloquear la invasión de este con éxito, evitando la enfermedad (interacción-incompatible) (Baker y col., 1997; Bishop y col., 2000).

Debido a que las plantas carecen de un mecanismo de inmunidad adaptativo, estas dependen de la respuesta inmune innata para su defensa. Sin embargo,

para que el microorganismo patógeno llegue a enfrentarse a este tipo de defensa, primero debe pasar por una serie de barreras físicas y químicas (Chisholm, 2006; Zipfel, 2008). Siendo la barrera física el primer mecanismo de defensa a la que se enfrentan los microorganismos, conocida como defensa estructural, esta consiste en la presencia de tricomas, cutícula cerosa, la cual además de prevenir la desecación de las plantas actúa como una barrera cerosa que evita la entrada de patógenos, por lo que, aquellos que no pueden atravesar esta barrera, deben entrar por heridas o aberturas naturales, tales como estomas o lenticelas. Si logran atravesar esta primera barrera deben enfrentarse a la pared celular, la cual puede ser traspasada por la acción de enzimas que excretan los patógenos, tales como celulasas, poligalacturonidasas y xilanasas (Jiménez, 1992). Si los microorganismos patógenos logran atravesar estas barreras mecánicas, las plantas cuentan con un mecanismo de defensa químico, basado en compuestos antimicrobianos, como compuestos tóxicos, tales como ac. cianhídrico, compuestos fenólicos, fitoalexinas y saponinas (Madriz, 2002; Mysore y Ryu 2004), estas últimas se reportan como una defensa contra el ataque de *Cmm* en las plantas de tomate, este compuesto consiste principalmente de α -tomatina y dehidrotomatina (Arwiyanto y col., 1994). El contenido de α -tomatina se incrementa con el reconocimiento de patógenos por parte de la planta (Roldan-Arjona y col., 1999). Se ha observado que el alcaloide α -tomatina inhibe el crecimiento bacteriano y de hongos, en estos últimos su efecto tóxico es causado por la formación de poros en la membrana de los hongos (Kaup y col., 2005); sin embargo, Eichenlaub y Gartemann (2011), reportan la presencia del gen *TomA* en *Cmm*, ubicado en la isla de patogenicidad, cuyo producto es una tomatinasa semejante a la de hongos patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Streptomyces turgidiscabies*, *S. acidiscabies* y *S. scabies*, implicada en la degradación de α -tomatina. De tal forma que el nivel de α -tomatina que se produzca en el cultivar del tomate puede tener un efecto protector, pero la detoxificación de α -tomatina por la bacteria puede tener un papel en la supresión del mecanismo de defensa de la planta. Los mecanismos de defensa de la planta pueden ser evadidos debido a la acción de enzimas o moléculas efectoras entregadas a la célula vegetal del

hospedero mediante diversas estructuras como estiletes, haustorios o pilis (Abramovitch y col., 2006; Jones y Dangl, 2006).

1.6 Defensa basal y mediada por genes R.

Una vez que el patógeno ha evadido las barreras mecánicas y químicas constitutivas, este se encuentra con la inmunidad de la planta, la cual puede diferenciarse en dos, “basal o innata” y la “mediada por genes R”. La respuesta basal se caracteriza por ser una respuesta temprana, que ocurre después de 10 - 40 minutos de la interacción planta-patógeno. En cambio la defensa mediada por genes R, suele darse tardíamente, de 2 a 3 horas después de que efectores del sistema de secreción tipo III bacteriano han sido introducidos a la célula huésped (Abramovitch y col., 2006).

La inmunidad basal o innata de las plantas es activada por la percepción de moléculas específicas de microorganismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs), tales como lipopolisacaridos o factores de elongación, flagelina bacteriana y quitina de hongos, heptaglicósidos de oomicetos. Estas se caracterizan por ser moléculas conservadas debido a que forman parte de una estructura útil para el patógeno (Jones y Dangl, 2006; Bent y Mackey, 2007; Boller y Yang-He, 2009). El reconocimiento de PAMPs o MAMPs se realiza a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores se caracterizan por presentar dominios repetidos ricos en leucinas (LRR), como receptores – quinasas: LRR-RLK, FLS2, BAK1, EFR; estos receptores en particular están compuestos por proteínas transmembranales de un solo paso. Otros receptores se caracterizan por estar constituidos de proteínas de unión a membrana con peptidoglicanos unidos a LysM (CEBiP y CERK1). Existen otros receptores de los cuales se tiene escasa información, como por ejemplo en leguminosas, el receptor para heptaglicanos en oomicetos, se sabe que la unión del receptor se lleva a cabo directamente con la proteína soluble de glucano del heptaglicano, pero no se sabe la estructura del receptor (Figura 3) (Zipfel, 2008).

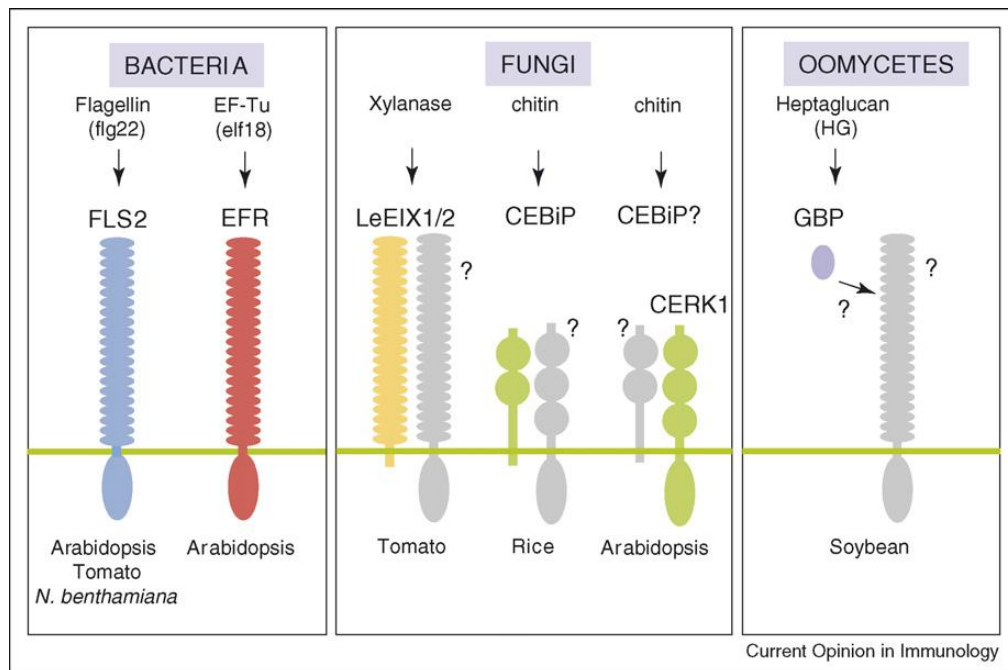


Figura 3. PRRs de plantas.

Flagelina bacteriana (flg22) y EF-Tu (elf-18) son reconocidos por LRR-RLKs FLS2 y EFR, respectivamente. En tomate xylanasa es reconocida por RLPs LeEIX1 y LeEIX2. Aunque ambos pueden unir a xylanasa, solamente LeEIX2 es capaz de desencadenar señalización. En arroz, el sitio de unión de la quitina de alta afinidad corresponde a CEBiP, una proteína transmembranal con dos dominios extracelulares de LysM. En leguminosas, la unión de la proteína soluble de unión a glucano (GBP) se une directamente al heptaglukan en oomicetos. En *Arabidopsis* el LRR-RLK CERK1 se requiere para la detección a quitina. Tomada de Zipfel, 2008.

Este primer nivel de reconocimiento o percepción del patógeno en la superficie celular mediante PAMPs o MAMPs a través de PRRs, activa la inmunidad disparada por PAMPs (PTI, por sus siglas en inglés *PAPM triggered immunity*), esta respuesta intracelular induce un flujo rápido de iones a través de la membrana plasmática, activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), producción de especies reactivas de oxígeno, rápido cambio en la expresión de genes y reforzamiento de la pared celular (Zipfel, 2008). La activación de señalización de la cascada en MAPKs, resulta en la activación transcripcional de genes de defensa mediante reguladores transcripcionales específicos de plantas, incluyendo a los factores de la familia WRKY. Sin embargo, es evidente un proceso de evolución en el sistema planta-patógeno, los patógenos exitosos han desarrollado estrategias para evadir o suprimir la defensa del hospedero, logrando su objetivo, la infección. La primera fase de evasión de la defensa del hospedero es la supresión de PTI, mediante la secreción de efectores de virulencia por parte del patógeno. En una co-evolución dinámica entre la planta y el patógeno, las plantas han evolucionando, mediante genes *R*, cuyo producto es capaz de reconocer a estos efectores de virulencia, esta respuesta es conocida como inmunidad disparada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés *effector triggered immunity*). Esta respuesta es regularmente acompañada de la muerte celular localizada, conocida como respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés *hypersensitive response*). Por su parte, los patógenos exitosos han evolucionado con efectores capaces de suprimir este tipo de respuesta, logrando la infección del hospedero (Bent y Mackey, 2007; Zipfel, 2008; Boller y Yang-He, 2009).

Haciendo un breve resumen del sistema inmune de las plantas, se ha propuesto un “dogma central” de la patología en las plantas, el cual esta dividido en 4 partes. En la primera sección se puede ver el sistema inmune de las plantas, en el que se detectan componentes conservados de diversos microorganismos y se activa la inmunidad de tipo PTI. En el segundo bloque se hace evidente el proceso de

evolución en el sistema planta-patógeno, el microorganismo patógeno es capaz de evadir la respuesta de defensa de la planta hospedero, mediante la producción de efectores que son capaces de suprimir la defensa PTI. En el tercer bloque, se hace evidente el proceso de evolución por parte del hospedero, ya que se evade la respuesta que tiene el patógeno al suprimir PTI, esta respuesta involucra genes *R*, donde los productos de éstos son capaces de detectar la supresión de defensa por parte de los efectores de virulencia, restaurando la resistencia mediante la inmunidad ETI. Finalmente, es evidente la evolución del patógeno a la respuesta del hospedero, por lo que el patógeno escapa de la detección dada por el producto de los genes *R*, mediante la modificación de sus efectores o suprimiendo este tipo de defensa (Figura 4) (Bent y Mackey, 2007).

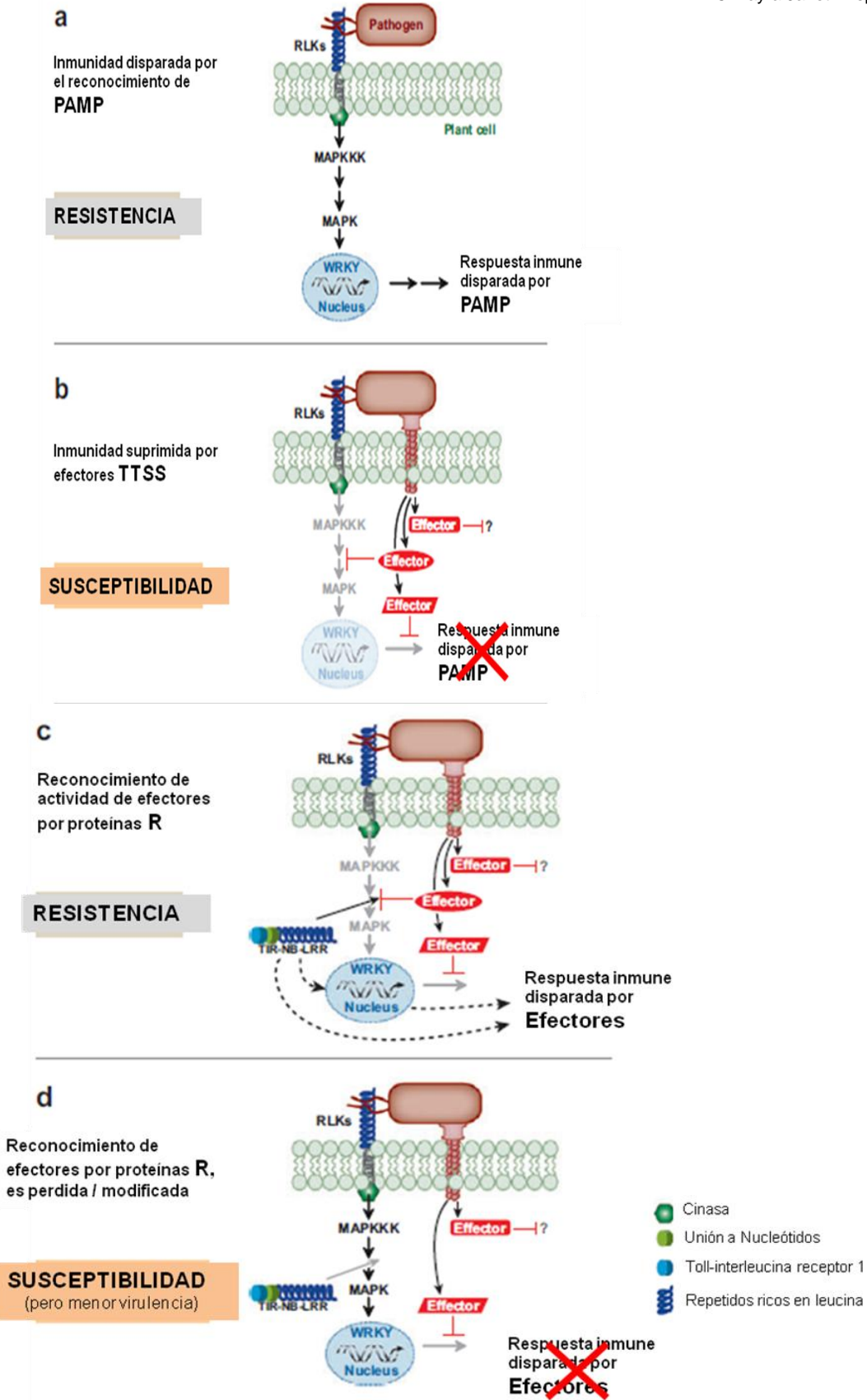


Figura 4. Modelo de evolución de resistencia a patógenos en plantas.

a) Reconocimiento de PAMPs por receptores extracelulares, activando inmunidad. b) Bacteria patogénica usa el sistema de secreción tipo III, disparando efectores al interior del hospedero, suprimiendo la respuesta inmune de la planta. c) Proteínas R de la planta reconocen la actividad de efectores, restableciendo la resistencia mediante la inmunidad disparada por efectores. d) Patógenos evaden la defensa mediada por los genes R por modificación o eliminación de efectores que disparan la defensa en el hospedero. Tomada de Bent y Mackey, 2007.

En la inmunidad de tipo PTI, también se ve involucrada la exocitosis de vesículas y proteínas relacionada con la defensa, como proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs). Por otro lado, una carga tóxica, como compuestos antimicrobianos, pueden ser translocados al espacio extracelular por miembros de las proteínas transportadoras ABC. Confirmando lo mencionado anteriormente, otra respuesta temprana activada por PAMPs, es la producción extracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y peróxido de hidrogeno mediante RbohD, la cual es una NADPH oxidasa localizada en membranas. Como una respuesta tardía, se induce la biosíntesis y depósito de poliglucanos, como calosa, hacia el espacio extracelular, mediante el complejo de membrana GSLs/PMR4. Con respecto a la defensa mediada por el producto de los genes *R*, estas proteínas se caracterizan por tener dominios repetidos ricos en leucina (LRR), algunos de estos presentan proteínas de unión a nucleótidos (NB). Estos a su vez se pueden dividir en diversos grupos de acuerdo a su estructura, como coiled-coiled (CC), receptores Toll-interleucina (TIR), proteínas LRR-extracelulares, que a su vez se subdividen en tres subclases: RLP, con un dominio transmembranal (TM) y un LRR extracelular; RLK, con un LRR extracelular, TM y una quinasa citoplásmica; y RGIP, con un LRR extracelular y proteínas inhibidoras de poligalacturonasas. Adicionalmente, se sabe que muchas proteínas R requieren para su función chaperonas citosólicas como HSP90 y HSC70 o co-chaperonas. También se ha reportado la translocación de proteínas R intracelulares dentro del núcleo, lo cual se requiere para la activación de la respuesta inmune, dirigiendo una reprogramación transcripcional de las células del hospedero para activar la respuesta inmune (Figura 5) (Panstruga y col., 2009; Francis y col., 2010).

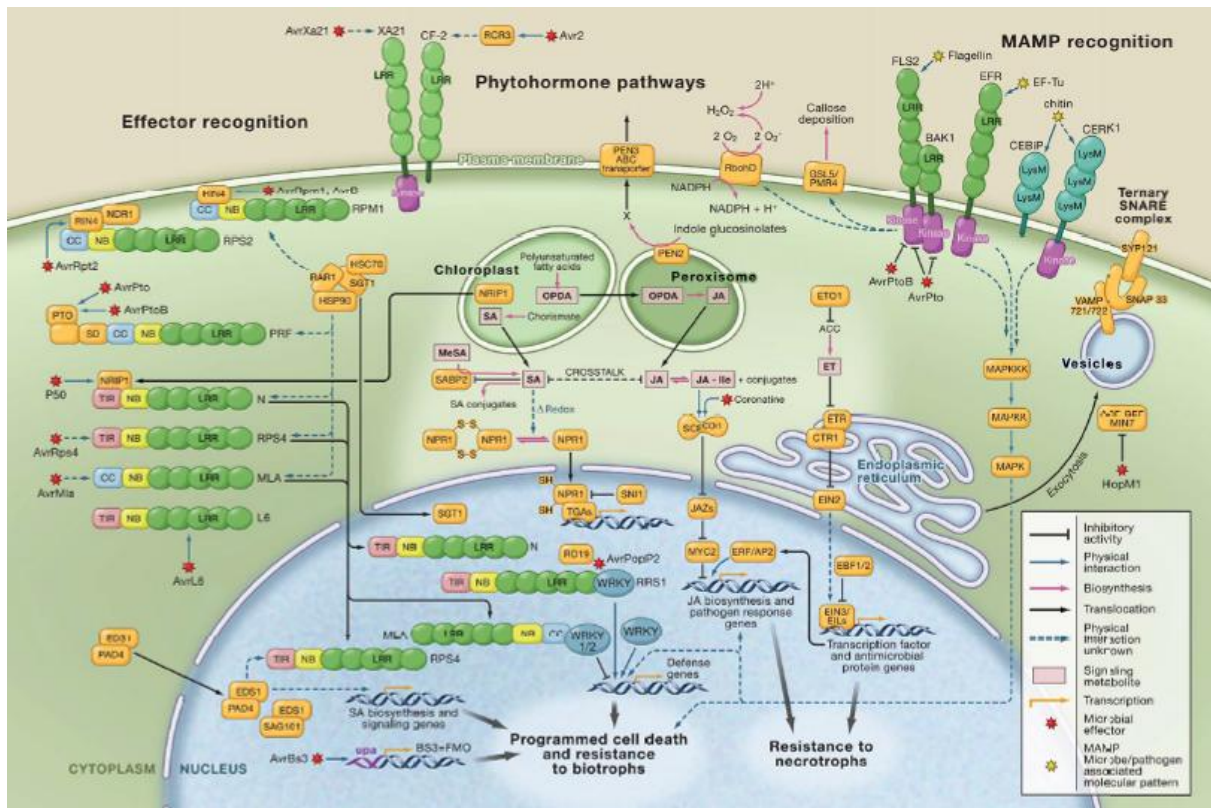


Figura 5. Vías de respuesta inmune de las plantas. Tomada de Panstruga y col., 2009.

1.7 Inducción de resistencia sistémica.

Las plantas producen una gran cantidad de hormonas, como auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citosinas, ácido salicílico (SA), etileno (ET), jasmonato (JA), entre otras. Estas hormonas vegetales juegan un papel importante en el desarrollo de la planta, así como en la respuesta a diferentes tipos de estreses, bióticos y abióticos. La infección por parte de diversos microorganismos resulta en cambios en el nivel de varias fitohormonas, específicamente, tres hormonas, estas llevan a cabo la regulación en la respuesta de defensa contra el ataque de patógenos, estrés abiótico, heridas, etc., estas son SA, ET y JA. El SA tiene un papel importante en la respuesta de defensa contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos, este tipo de patógenos, activan receptores intracelulares TIR_NB_LRR, estimulando la biosíntesis de SA y señalización a través de los reguladores núcleo citoplasmáticos EDS1 y PAD4. Esta hormona es detectada por el co-factor de transcripción NPRI, el cual cambia el estado redox celular,

llegando a modular la expresión de genes de defensa y las rutas de secreción necesarias para el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual se caracteriza principalmente por el incremento de SA, incremento en los niveles de proteínas relacionadas a patogénesis (PRP), además del establecimiento temprano de estrés oxidativo, por parte de especies reactivas de oxígeno (ROS), resultando en una defensa de mayor espectro contra patógenos. Por contraste JA y ET están relacionados en la defensa contra patógenos necrotrofos e insectos herbívoros, estas hormonas también se relacionan con el establecimiento de la resistencia sistémica inducida (ISR), este tipo de resistencia también se establece después de la colonización de la raíz por cepas no patogénicas (Vallad y Goodman, 2004; Bari y Jones 2009; Panstruga y col., 2009).

Con lo anterior se puede deducir que la infección por un patógeno puede desencadenar respuestas de defensa en tejidos proximales como distales; ambos tipos de resistencia, adquirida e inducida, son respuestas de defensa sistémicas, con diferencias relacionadas con las hormonas involucradas y el tipo de señal que indujo la respuesta de defensa. Este tipo de respuesta sistémica potencian los mecanismos de defensa, de tal forma que ante alguna infección subsiguiente por el mismo o por diferente patógeno, las respuestas de defensa son activadas rápidamente haciendo que la planta tenga una mayor defensa (Vallad y Goodman, 2004).

Aunque las rutas de defensa moduladas por las hormonas JA/ET y SA son mutuamente antagonistas, evidencias de interacciones sinergistas han sido reportadas (Lorenzo y Solano, 2005), lo que sugiere que la red de señalización de defensa activada y utilizada por las plantas es dependiente de la naturaleza del patógeno y su patogenicidad. Adicionalmente, el estilo de vida de diferentes patógenos, a menudo no son fácilmente clasificables como solo organismos biotróficos o necrotrofos. Por lo tanto el cross-talk positivo o negativo entre las vías SA y JA/ET puede ser regulado dependiendo del patógeno específico, de tal forma que la planta es capaz de enfrentar el ataque de diversos patógenos

empleando complejos mecanismos de regulación que desencadena la respuesta de defensa efectiva contra diversos patógenos (Bari y Jones, 2009).

1.8 Silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS).

Los virus se encuentran entre los patógenos más dañinos en las plantas, y una vez que estos infectan a su hospedero, provocan una variedad de respuestas por parte de la planta. Estas respuestas se han estudiado con el objetivo de generar cultivos resistentes a virus, reduciendo las pérdidas causadas por estos patógenos. La primera observación que se hizo, fue que las plantas infectadas con virus resultaron ser subsecuentemente resistentes a la infección con el mismo virus o virus estrechamente relacionados, lo que se denominó como “protección cruzada”, de aquí que los primeros intentos de dar resistencia a las plantas se basó en la introducción de material genético viral al genoma de la planta, una técnica descrita como resistencia derivada del patógeno, este mecanismo fue reconocido a principios de 1920 (McKinney, 1929; Vaucheret y col., 2001, Waterhouse y col., 2001).

El mecanismo que desencadena la degradación de una secuencia específica de ARNm, se describió por primera vez en petunias transgénicas, en las que se pretendía mejorar el color de las flores, para lo que se introdujeron copias adicionales de un gen que codificaba para una enzima clave (chalcona sintasa) en la biosíntesis de flavonoides, siendo una de sus funciones el de dar color púrpura a las flores. Los resultados obtenidos en las flores de estas plantas modificadas, fue un dramático rango de pigmentación, incluyendo un púrpura intenso, patrones de púrpura con blanco y flores completamente blancas. Este resultado reveló que en algunas líneas de plantas, el gen introducido como el gen endógeno fueron apagados o silenciados en diferente grado, en un fenómeno denominado “co-supresión” (Napoli y col., 1990; Eamens y Waterhouse, 2011).

Continuando con los estudios dirigidos en la identificación de las bases moleculares de “protección cruzada” y con el objetivo de generar plantas resistentes a virus, se insertaron secuencias cortas de genes de la planta en el

genoma de virus, posterior a la infección con el virus modificado, se observó que la expresión de ese gen en la planta era suprimido, a este mecanismo se le llamó: silenciamiento genético inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés “*Virus Induced Gene Silencing*”) (Matzke y Matzke 2004). Adicionalmente se elucidó que estos resultados se deben al silenciamiento genético post-transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés *post-transcriptional gene silencing*) (Vaucheret y col., 2001; Waterhouse y col., 2001; Burch-Smith y col., 2004).

La introducción de transgenes o RNA de doble cadena (RNA_{dc}), en hospederos puede disparar PTGS de todos los genes homólogos del hospedero del hospedero y/o transgenes. El PTGS inducido por transgenes ha sido detectado en plantas, denominado como “co-supresión”, en hongos es llamado “quelling”, en animales este proceso es llamado “interferencia de ARN”. En plantas, PTGS puede ser inducido por virus que expresan genes del hospedero, en un proceso llamado silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS), los virus por si mismos pueden disparar la maquinaria de PTGS (Chicas y Macino, 2001; Horiguchi, 2004).

Después del descubrimiento del silenciamiento de transgenes, se realizaron diversas investigaciones sobre los mecanismos de silenciamiento que controlan secuencias exógenas y endógenas. El término “silenciamiento de ARN” se creó para referirse a rutas de inhibición de secuencia específica de nucleótidos, mediada por ARNs pequeños. El silenciamiento de ARN, se lleva a cabo a nivel transcripcional, a lo que se le llama silenciamiento genético transcripcional (TGS, por sus siglas en inglés, *transcriptional gene silencing*), evitando el proceso de transcripción mediante la metilación de ADN y modificaciones de la cromatina; y a nivel post-transcripcional (PTGS), a través de la interrupción o escisión del ARN o represión de la traducción. Sin embargo, se han reportado otros mecanismos mediados por ARNs pequeños, incluyendo la eliminación de ADN en protistas o reparación de ADN en plantas y hongos (Martínez de Alba y col., 2013). En plantas se reportan tres mecanismos de silenciamiento génico: a) Silenciamiento de ARN citoplásmico, este mecanismo funciona en plantas transgénicas e infectadas con virus y está asociado con la producción de ARNs de interferencia

pequeños (siARN), este es el mecanismo responsable de la co-supresión de transgenes. b) Silenciamiento endógeno de ARNm asociado con microARNm (miARN) pequeños de doble cadena, en este mecanismo, la traducción celular del ARNm es suprimida por el apareamiento complementario de esta cadena con miARN; esta interacción induce degradación del ARNm blanco. c) Metilación de ADN y supresión transcripcional. En este mecanismo regiones codificantes y promotores son densamente metiladas, también se propone que el incremento de ADN metilado posiblemente induce la formación de heterocromatina. También se reporta que la metilación de ADN promueve la unión de proteínas que reconocen citocinas metiladas, dirigiendo la remodelación de la cromatina, evitando la unión de factores de transcripción y con ello la expresión de genes (Dorokhov, 2007; De Souza y col., 2007).

El silenciamiento genético se puede resumir en tres etapas: iniciación, efectora y de mantenimiento. Cabe mencionar que la producción de miARN, ocurre en el núcleo de la célula a partir de un pre-miARN transcrito, cuya longitud es de aproximadamente 100 nucleótidos, los cuales conforman horquillas complementarias. En el citoplasma convergen los mecanismos de silenciamiento para miARN y siARN endógenos y exógenos, comenzando la etapa de iniciación con la presencia de un ARN de doble cadena, que es reconocido y digerido por una endoribonucleasa clase III, llamada DICER, la cual posee dominios estructurales, helicasa y PAZ, cuya función principal es la de procesar los precursores de ARN de interferencia, los cuales se alinean con los ARN de doble cadena; por otro lado metabolizan ATP, usado en la translocación de la misma, permitiendo así la generación de un gran número de secuencias. Cabe mencionar que el dominio PAZ reconoce el extremo 3' del ARN y que además se anclan al extremo 5' fosforilado cuya posición de corte es reconocida a una distancia de 22 nucleótidos de éste. En esta etapa las cadenas de ARN de doble cadena son procesadas en ARN de doble cadena de 21 a 26 nucleótidos de longitud, a los que se les llama pequeños ARN de interferencia (siARN). En la etapa efectora, los siARN de cadena doble se unen a la proteína denominada Argonauta, la cual

forma parte del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés *RNA-induced silencing complex*). Este complejo tiene actividad de endonucleasa, cuya principal función es la degradación del ARNm blanco, siendo este la secuencia complementaria al siARN. La actividad helicasa de RISC separa las dos cadenas de siARN, y solo una de las cadenas permanece unida al complejo. Una vez activado el complejo RISC se reconoce el ARNm complementario a la secuencia siARN, mediante un dominio PAZ presente en el complejo proteínico Argonau, cortando el ARNm e inhibiendo su traducción. La última etapa del silenciamiento que tiene lugar en las plantas es la amplificación, la cual ocurre mediante la generación de copias de del ARN de doble cadena que originó el silenciamiento, o directamente mediante la replicación de los siARNs, generando mas moléculas de este tipo. Este mecanismo de replicación se lleva a cabo mediante una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdPR, por sus siglas en inglés *RNA-dependent RNA polymerase*) (Figura 6) (Meister y Tuschli, 2004; Cenic y col., 2011; Pattanayak y col., 2013). Otra importante forma con la que se puede generar RNA de doble cadena, es mediante la infección viral y participación de la enzima RdPR; el ARN de doble cadena se genera como intermediario durante la replicación del virus, disparando el mecanismo de silenciamiento en el hospedero, de tal forma que si una secuencia específica del hospedero se inserta en el genoma del virus, el gen endógeno correspondiente a la secuencia insertada también será silenciada (Horiguchi, 2004).

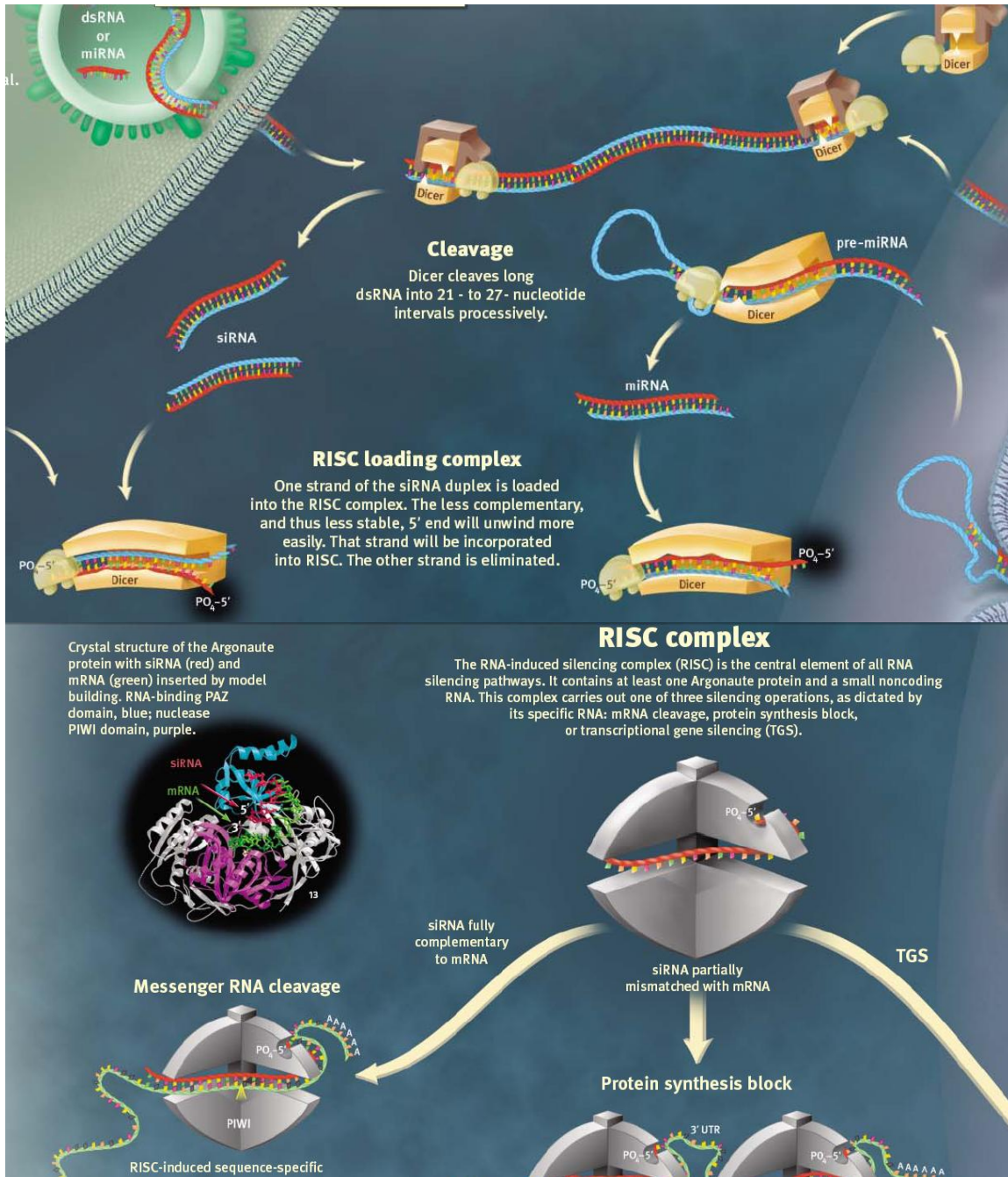


Figura 6. Silenciamiento de genes mediante siARN. Tomada de Meister y Tuschli, 2004.

Actualmente, el VIGS representa una herramienta genómica funcional ampliamente usada en las plantas. Rutas metabólicas clave y genes regulatorios que son requeridos para la supervivencia de la planta, no pueden ser estudiados por análisis de mutantes, lo que sí puede realizarse fácilmente mediante VIGS.

Algunas de las ventajas de usar VIGS en el estudio de la función de un gen, es que es fácil y rápido, comparado con la transformación realizada con *Agrobacterium* sp., ya que para el análisis de la función de un gen, con el uso de VIGS, no se requiere de una transformación estable. Otra de las ventajas, es que con solo la información de la secuencia parcial es suficiente para silenciar un gen. El uso de VIGS nos permite silenciar genes con múltiples copias o varios miembros de una familia de genes. Otra ventaja es que el VIGS se puede utilizar para evaluar la función de los genes cuya mutación es letal (Senthil-Kumar y Mysore, 2011). Hasta ahora el VIGS se ha usado para caracterizar genes implicados en el desarrollo de las plantas (Zhu y col., 2010), resistencia a patógenos (van der-Linde y col., 2011) y en el estudio de genes relacionados con la resistencia a estrés abiótico (Senthil-Kumar y col., 2008).

1.9 Geminivirus como vectores de silenciamiento viral.

La familia Geminiviridae se divide en siete géneros; Mastrevirus, Curtovirus, Becurtovirus, Turncurtovirus, Eragrovirus Topocuvirus y Begomovirus. Estos se clasifican de acuerdo a la organización de su genoma, el insecto vector y su hospedero (Varsani y col., 2014). El virus moteado del tomate (ToMoV, por sus siglas en inglés Tomato Mottle Virus) es transmitido por la mosquita blanca *Bemisia tabaci*, pertenece al género Begomovirus y consta de dos moléculas de ADN circulares de cadena sencilla llamadas componentes A y B, cada uno de aproximadamente de 2.5Kb. Presenta genes tanto en las cadenas virales como en las cadenas complementarias, producto de la duplicación (Zuñiga-Vega y Ramírez, 2002). En la molécula de ADN-A se localizan cinco genes (*Rep*, *TrAP*, *REn*, *CP* y *C4*) y en la molécula de ADN-B dos genes, *BC1* y *BV1* (Figura 7). Ambos componentes presentan una región intergénica u origen de replicación (CR) que se caracteriza por la presencia de una secuencia con el potencial para formar una estructura tallo-asa, en el ápndice de la cual se encuentra una secuencia invariante de 9 nucleótidos TAATATT´AC, donde la endonucleasa *Rep* hace un corte generando el sustrato para la ADN polimerasa del huésped. El componente A codifica para las proteínas necesarias para la multiplicación viral, la

interferencia de algunas respuestas antivirales de la planta y la encapsidación. El gen *Rep* codifica para la proteína encargada de la replicación, dirige el complejo enzimático de duplicación hacia el origen de replicación, y corta el ADN para iniciar la replicación mediante un mecanismo de círculo rodante. El gen *TrAP* codifica para la proteína activadora transcripcional necesaria para la expresión de los genes tardíos, *BV1*, *BC1* y *CP*; este último codifica para la proteína de la cápside. El gen *AC4* está relacionado con el movimiento del virus y la supresión del silenciamiento. El componente B codifica para las funciones asociadas con el movimiento viral. El gen *BC1* está relacionado con el movimiento de célula a célula a través de los plasmodesmos, en tanto que el gen *BV1* está relacionado con el movimiento del virus hacia afuera del núcleo. Ambas proteínas actúan en conjunto para hacer posible la salida del ADN viral hacia las células del floema, puesto que el movimiento del virus se da principalmente entre las células del floema y prefieren replicarse en las células completamente diferenciadas (Shimada-Beltrán y Rivera-Bustamante, 2007).

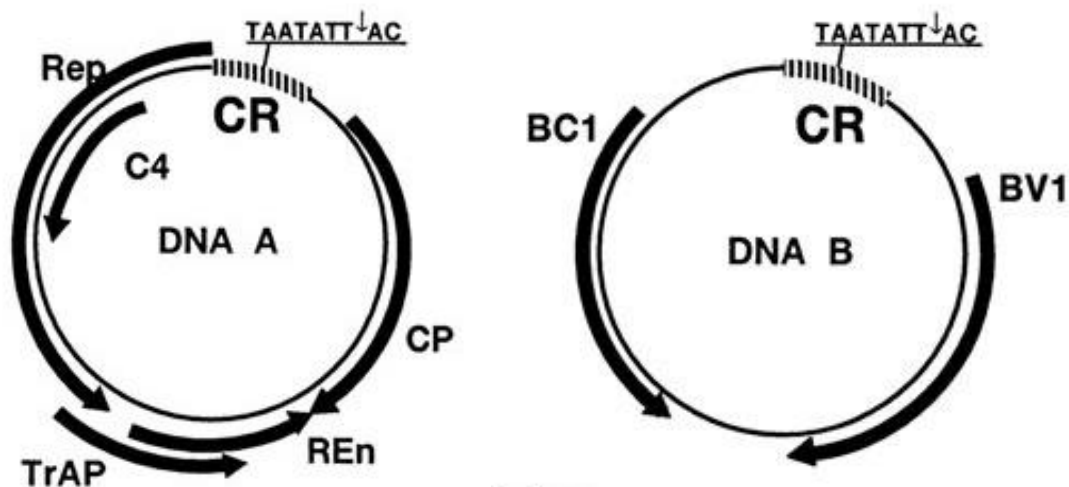


Figura 7. Virus Moteado del Tomate - ToMoV. Modificado de Gutiérrez, 2002.

El sistema de VIGS derivado de geminivirus se basa en el uso del mecanismo de defensa antiviral de la planta. El virus recombinante que lleva una secuencia parcial del gen del hospedero es inoculado en la planta y una vez que el vector viral se replica o sus genes son transcritos, los transcritos del gen endógeno

blanco son degradados por silenciamiento genético post-transcripcional o silenciamiento genético transcripcional.

Se ha reportado el uso de begomovirus para el diseño de VIGS como el virus del moteado dorado del chile (PepGMV, por sus siglas en inglés *Pepper golden mosaic virus*) en plantas de chile (Rodríguez-Negrete y col., 2009), el virus del mosaico dorado del tomate (TGMV, por sus siglas en inglés *Tomato golden mosaic virus*) en *N. benthamiana* (Hamilton y col., 1984), el virus de la hoja rizada de la col (CaLCuV, por sus siglas en inglés *Cabbage leaf curl virus*) (Hill y col., 1998; Robertson 2004; Tuttle y col., 2008). Siendo ToMoV un begomovirus, en este trabajo se propuso el objetivo de diseñar un vector de silenciamiento para analizar la función de genes en plantas de tomate, ya que la producción de plantas transgénicas de tomate es un proceso que toma mucho tiempo y no es tan eficiente (Keddie y col., 1996). Tomando en cuenta lo reportado por Robertson (2004) con respecto a que los vectores de silenciamiento derivados de geminivirus, son capaces de moverse sistemáticamente aún sin un gen CP funcional, en el cual puede ser insertado el gen foráneo que se desea silenciar para su estudio funcional, se considero esta estrategia para el diseño de ToMoV como VIGS.

Se han reportado diferentes vectores de silenciamiento en plantas pertenecientes a la familia *Solanacea* para el estudio de la función de genes (Liu y col., 2002b; Brigneti y col., 2004; Fu y col., 2005; Cai y col., 2007), siendo estos vectores exitosos a temperaturas menores a los 22°C, sin embargo, solo se ha reportado el uso de TRV (*Tobacco rattle virus*, un virus de RNA) como VIGS en especies silvestres relacionadas con el tomate (*S. peruvianum*) pero de igual forma sólo es exitoso a temperaturas por debajo de los 22°C (Senthil-Kumar y col., 2007). Por esa razón se propuso diseñar un VIGS que pueda usarse en especies silvestres relacionadas al tomate, como *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, y otras especies como *Nicotiana benthamiana*, y que funcione a temperaturas por encima de los 22°C, lo que permitiría el análisis funcional de genes en especies silvestres sin la

necesidad de grandes requerimientos de infraestructura que mantengan una temperatura menor a 22°C para que el VIGS sea funcional.

1.10 Sumoilación como un mecanismo de defensa.

La modificación post-traducciona de proteínas juega un papel importante en de diversos procesos biológicos, como diferenciación celular, desarrollo y respuestas a estímulos endógenos y exógenos. Las modificaciones post-traduccionales pueden darse mediante mecanismos como fosforilación, glicosilación, acetilación, metilación, ubiquitinación y sumoilación (Boggio y Chiocca, 2006). La modificación post-traducciona puede darse por la adición o remoción de grupos químicos, uno de estos son proteínas como ubiquitinas (Ubls, por sus siglas en inglés, *ubiquitin-like proteins*) así como pequeño modificador relacionado con ubiquitina (SUMO, por sus siglas en inglés, *small ubiquitin-related modifier*). Las proteínas SUMO son estructuralmente relacionadas con Ubls, ya que son de tamaño similar, de 11 y 9 kDa, respectivamente, además ambas, Ubls y SUMO son covalente y reversiblemente conjugadas a residuos de lisina en proteínas blanco (Verger y col., 2003). Sin embargo, la sumoilación no dirige a sus proteínas blanco hacia la degradación proteasomal, de hecho puede estabilizar la proteína blanco mediante el bloqueo de ubiquitinación por la adición de SUMO en el mismo residuo de lisina (Anckar y Sistonen, 2007).

La sumoilación es un proceso en el cual se implica la modificación de proteínas que participan en diferentes vías, las consecuencias de estas modificaciones son tan diversas como las proteínas blanco. Este proceso esta implicado en la interacción proteína-proteína, localización nuclear subcelular, interacción proteína-ADN, actividad enzimática, también se ha reportado que puede actuar como antagonista de ubiquitina (Verger y col., 2003) (Figura 8).

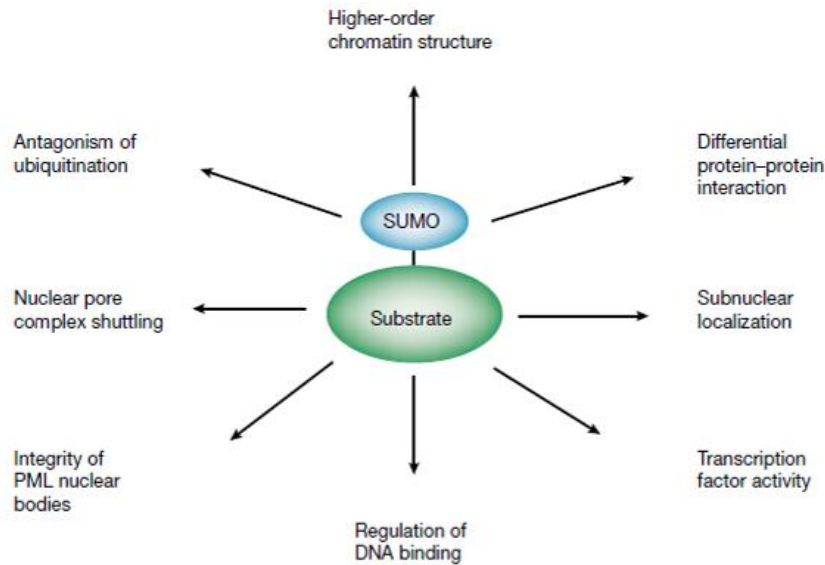


Figura 8. Función de señalización-SUMO. Tomada de Verger y col., 2003.

Algunas de las funciones conocidas de sumoilación son indicadas con respecto a regulación transcripcional.

La sumoilación consiste en la modificación post-traduccional, donde se conjuga covalentemente proteínas SUMO a residuos de lisina de proteínas blanco. Este proceso ocurre de manera gradual, mediante tres eventos bioquímicos, denominados: Activación por la enzima E1 (*SAE1/SAE2*), Conjugación por la enzima E2 (*SCE1*) y Ligación mediada por la enzima E3 (*SIZ1*) (Soo-Park y Soo-Seo, 2008; Berndsen y Wolberger, 2014). La sumoilación comienza con la maduración de SUMO, la cual se encuentra como una pre-proteína que necesita ser procesada o madurada por SUMO-peptidasas, ésta reconocen un motivo diglicina (GG) en el carboxilo terminal y deleta cerca de 10 aminoácidos después del motivo GG, posteriormente la activación de SUMO es llevada a cabo en dos pasos, por la enzima heterodimérica *SAE1*, enzima de activación 1 de SUMO y *SAE2*, enzima de activación 2 de SUMO (*SAE1/SAE2*), que cataliza la hidrólisis del ATP para formar SUMO-AMP en una glicina del carboxilo terminal, posteriormente se libera el AMP y se forma un enlace tioéster entre el grupo sulfidrílo de un residuo catalítico de cisteína (C) de *SAE2* y el grupo carboxilo de

Glicina (G). Después de la activación SUMO es transferida de *SAE2* a un residuo de C de *SCE1*, formando un complejo tioéster SUMO-*SCE1*, por último SUMO es transferido a la proteína blanco a través de la enzima de conjugación *SCE1*, generando un enlace peptídico entre la G del carbono terminal de SUMO y el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la proteína blanco. *SCE1* reconoce un tetrapéptido consenso “ ψ -Lys-X-Glu/Asp”, donde ψ es un aminoácido largo hidrofóbico, comúnmente isoleucina o valina, seguido de la lisina aceptor, X es cualquier aminoácido, por último se encuentra un residuo de glutamato o aspartato, la unión de SUMO es inducida por la enzima E3 (Figura 9) (Verger y col., 2003; Soo-Park y Soo-Seo, 2008; Novatchkova y col., 2012).

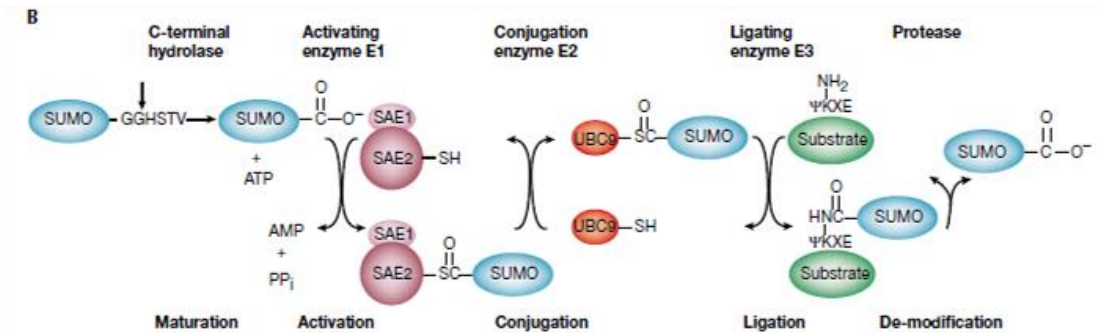


Figura 9. Vía de conjugación de SUMO. Tomada de Verger y col., 2003.

SUMO se sintetiza como un precursor y es procesada por hidrolasas para generar el motivo de Glicina doble en el extremo carboxilo terminal disponible para la conjugación (flecha vertical). Posteriormente es conjugado a proteínas blanco por acción de las enzimas de activación *SAE1/SAE2*, la enzima de conjugación E2 (*SCE1*, *UBC9*) y la enzima de ligación E3. La proteína E3 puede servir para aumentar la afinidad entre *UBC9* y los sustratos poniéndolos en estrecha proximidad en orientaciones favorables catalíticamente, permitiendo que se produzca la sumoilación a una velocidad máxima.

El proceso de sumoilación se ha reportado en respuesta a estrés biótico y abiótico, como estrés por choque térmico, sequía (Kurepa y col., 2003; Saracco y col.,

2007) y ataque por patógenos (Xia, 2004; Soo-Park y Soo-Seo, 2008). Una de las respuestas inducida por estrés en el contexto de la modificación de proteínas por sumoilación es la activación o represión de factores de transcripción, tales como WRKY's (Saracco y col., 2007). Este proceso también se ha reportado durante la infección viral en plantas de tabaco, en donde se observa que la sumoilación puede reprimir factores necesarios en la replicación del virus, ya que al sobreexpresa la proteína SUMO1, se ve reducida la replicación viral de TGMV (Castillo y col., 2004). Adicionalmente, se ha reportado este proceso de sumoilación relacionado con la regulación de la inmunidad innata, pues se ha visto que algunos patógenos como *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria* emite efectores que de-sumoilan proteínas relacionadas con la activación de este tipo de inmunidad, eliminando la defensa por parte de la planta (Xia, 2004). Específicamente, se encontró que la expresión de *SCEI* se ve incrementada en plantas de tomate durante la infección de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (pst), junto con varias hormonas como ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), siendo estas moléculas clave en la señalización de la inmunidad innata (Miura y Hasegawa, 2010; van den Burg y col., 2010; Park y col., 2011). También se conoce que el gen *SCEI* podría estar implicado en la respuesta temprana al ataque de patógenos, generando regulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que se ha visto que el proceso de conjugación de SUMO esta relacionado con ROS, se ha reportado que los altos niveles de ROS inhiben la actividad de las proteasas de SUMO, lo que resulta en la acumulación de conjugados SUMO que proporcionarían protección contra la infección de un patógeno (Miura y Hasegawa, 2010).

1.11 Transportador *PDRI* de tipo ABC relacionado con la respuesta innata ante patógenos.

Los receptores de inmunidad innata en plantas detectan la presencia de patógenos y disparan una respuesta de defensa restringiendo el crecimiento del patógeno. En la membrana celular se encuentran proteínas relacionadas con la secreción de cocteles de proteínas antimicrobiales y pequeñas moléculas que

formarían bloques en la pared celular dentro del espacio apoplástico, algunas de estas proteínas transportadoras de membrana forman parte de la superfamilia ABC (cassette de unión a ATP, por sus siglas en inglés, *ATP-binding cassette*), estos actúan de forma paralela a las vías de defensa como bombas de eflujo que liberan compuestos antimicrobiales a la superficie celular (Kwon y col., 2008). Las proteínas transportadoras ABC se designan con base en los dobleces de uniones a nucleótidos (NBFs, por sus siglas en inglés, *nucleotide-binding folds*) o dominios de uniones a nucleótidos (NBDs, por sus siglas en inglés, *nucleotide-binding domains*). Los dominios ABD son ampliamente conservados y se caracteriza por tener un sitio de unión a ATP que consiste en una caja Walker A y una caja Walker B separados por aproximadamente 120 aminoácidos y entre las dos cajas se encuentra una secuencia consenso específica de transportadores ABC conocida como firma ABC (van den Brûle y Smart, 2002; Rea, 2007). Esta gran familia de proteínas puede ser subdividida en trece subfamilias: MDR (Multidrug resistance) Resistencia a multidrogas, MRP (MDR-associated protein), proteína asociada a resistencia a multidrogas, ABCI (AOH), PDR (Pleiotropic drug resistance), resistencia a drogas pleiotrópicas, PMP (peroxisomal membrane protein), proteína de membrana peroxisomal, WBC (White-brown complex), complejo blanco-café, ATH (ABC2), ATM (ABC transporter of the mitochondrion), transportador ABC de mitocondria, TAP (transporter associated with antigen processing), transportador asociado con el procesamiento de antígenos, GCN (yeast GCN20, general control non repressible), levadura GCN20, control general no represible, SMC (Structural maintenance of chromosomes), mantenimiento estructural del cromosoma, NAP (nonintrinsic ABC protein), proteína ABC no intrínseca, PGP (P-glycoprotein) (Figura 10). La familia PDR no solo se distingue por su configuración molecular específica de sus miembros, sino también por su asociación con el transporte de agentes anti-fúngicos y en plantas se ha mostrado tienen un papel necesario en la patogenicidad (van den Brûle y Smart, 2002).

| Subfamily/Domains | Gene name | Localization | Function/Activity |
|--|---|---|--|
| MDR multidrug resistance | <i>AtPGP1</i> <i>AtMDR1</i> <i>AtPGP4</i> <i>BR2</i> <i>DWF3</i> <i>QMDR1</i> | Plasma membrane Plasma membrane Plasma membrane Plasma membrane Plasma membrane Plasma membrane | Auxin export (24, 84, 93) Auxin export (84, 93) Auxin import (123) Auxin export (84) Auxin export (84) Berberine import (117) |
| MRP multidrug resistance-associated protein | <i>AtMRP1</i> <i>AtMRP2</i> <i>AtMRP3</i> <i>AtMRP4</i> <i>AtMRP5</i> <i>ZmMRP3</i> <i>ZmMRP4</i> | Vacuolar membrane Vacuolar membrane Vacuolar membrane Plasma membrane Plasma membrane Vacuolar membrane Vacuolar membrane | GS-conjugate, glucuronide and folate transport (70, 71, 100) GS-conjugate, glucuronide and chlorophyll catabolite transport (69, 71) GS-conjugate and chlorophyll catabolite transport (126) GS-conjugate and folate transport; stomatal regulation (49, 100) Stomatal regulation (25, 52) Anthocyanin transport (30) Anthocyanin transport (30) |
| PDR pleiotropic drug resistance | <i>AtPDR12</i> <i>NpPDR1</i> <i>SpTUR2</i> | Unknown Plasma membrane Plasma membrane | Lead tolerance (60) Sclareolide export and resistance to <i>Botyris chereis</i> (41, 121) Sclareol export (124) |
| PMP peroxisomal membrane protein | <i>AtPMP2</i> | Peroxisomal membrane | Peroxisomal uptake of IBA, 2,4-DB, LCFAs and/or their LCF acyl-CoAs; JA biosynthesis; seed germination (24, 36, 124, 125, 142) |
| AOH ABC1 homolog | <i>AtAOH1</i> | Unknown | Unknown |
| WBC white-brown complex homolog | <i>AtWBC12</i> <i>AtWBC19</i> <i>GhWBC1</i> <i>NtWBC1</i> | Plasma membrane Vacuolar membrane Plasma membrane Unknown | Epidermal wax deposition (94) Kanamycin resistance (78) Cotton fiber maturation (141) Lipid export (92) |
| ATH ABC2 homolog | <i>AtATH</i> <i>OaATH</i> | Unknown Unknown | Unknown Unknown |
| ATM ABC transporter of the mitochondrion | <i>AtATM1</i> <i>AtATM2</i> <i>AtATM3</i> <i>CcCDS1</i> | Mitochondria Punctate inclusions Mitochondria Mitochondria | Mitochondrial export of Fe/S clusters ^a (37) Unknown ^a Mitochondrial export of Fe/S clusters; cadmium and lead tolerance ^a (37, 46) Mitochondrial export of Fe/S clusters; cadmium tolerance (33) |
| TAP transporter associated with antigen processing | <i>AtTAP1</i> <i>AtTAP2</i> | Punctate inclusions Punctate inclusions | Unknown ^b Unknown ^b |
| NAP nonintrinsic ABC protein | <i>AtNAP1</i> <i>AtNAP6</i> <i>AtNAP7</i> | Plastids Plastids Plastids | Fe/S cluster maintenance and responses to far-red light (136, 137) Fe/S cluster maintenance; embryogenesis (137) Fe/S cluster maintenance; embryogenesis (137) |

Figura 10. Subfamilias de las proteínas transportadoras ABC. Tomada de van den Brùle y Smart, 2002.

En plantas la expresión del gen *PDRI* está sujeta a nivel hormonal y regulación medio ambiental. Se ha reportado que al adicionar hormonas como ácido abscísico (ABA), se induce una rápida acumulación del ARNm del gen *PDRI*, a demás un número de factores relacionados con estrés (van den Brûle y Smart, 2002). Por otro lado, también se ha relacionado con el transporte de compuestos antifúngicos como el diterpeno sclerol (Vermeulen y col., 2001; Stukkens y col., 2005). También se ha demostrado la inducción de este gen tras la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, observando a demás la inducción de ácido jasmónico, por otro lado en plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* donde la expresión del gen *PDRI* fue impedida por su silenciamiento, se observó mayor susceptibilidad a *Botrytis cinerea*, lo que demostró que este gen pudiera estar relacionado con la resistencia a patógenos, mostrando una nueva función de este gen (Stukkens y col., 2005).

2 JUSTIFICACIÓN

El cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) tiene gran relevancia a nivel mundial. Su producción según la FAO (2014), se estimó en 211 millones de toneladas. México se encuentra dentro de los principales países productores de esta hortaliza. Sin embargo, se han visto ampliamente afectado por el ataque de patógenos, siendo uno de los principales problemas en este cultivo el cáncer bacteriano, causado por la bacteria Gram positiva, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. La cual ha ocasionado pérdidas millonarias a nivel en diferentes estados, como San Luis Potosí, Baja California, Estado de México, Michoacán, Guanajuato, Morelos, Zacatecas y Sinaloa. En este último se ha reporto la pérdida de 40 millones de dólares a causa de este patógeno (Barboa y col., 2009). A nivel mundial a ocasionado graves daños que se ha catalogado como especie sujeta a regulaciones de cuarentena internacional por parte de la Unión Europea (Commission Directive 95/4/EC) y de los Estados Unidos (NAPPO) (Jahr y col., 1999). En México es ha catalogado como plaga cuarentenaria grado A1 (plaga de importancia económica potencial para el área en peligro por la misma

y dónde aún no se encuentra presente) por la hoja de Requisitos Fitosanitarios y Norma Oficial Mexicana 007 (NOM 007).

Esta problemática ha llevado a los agricultores a buscar otras alternativas de cultivo ya que una vez infectada la planta con esta bacteria es muy difícil controlarla. El control de la enfermedad, que hasta la fecha se ha llevado a cabo se basa en el uso de compuestos derivados de cobre, sales cuaternarias de amonio y el uso de antibióticos, pero que no han sido eficientes en el manejo de la enfermedad (Gartemann y col., 2003; Madriz, 2002).

Actualmente no existen variedades comerciales de tomates resistentes a la enfermedad, pero existen variedades silvestres que han mostrado tolerancia, a éste patógeno, representando ser una fuente de genes que pueden conferir protección a especies comerciales aunque no se ha identificado con precisión los genes responsables. El estudio de genes candidatos en plantas silvestres mediante su silenciamiento mediado por virus (VIGS) y posterior reto con *Cmm*, pueden dar la pauta si se observa un fenotipo correspondiente a la pérdida de la función del gen silenciado. Por lo que podremos inferir si un gen candidato es importante en la defensa de esta enfermedad del tomate o no.

3 HIPÓTESIS

El silenciamiento de genes que están involucrados en la resistencia de tomates silvestres a la infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* dará como resultado un aumento en la susceptibilidad a este patógeno en las plantas silenciadas.

4 OBJETIVO

Evaluar la función de genes potencialmente involucrados en la defensa del jitomate contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

4.1 Objetivos específicos.

- Diseñar y generar un vector viral de silenciamiento basado en el begomovirus ToMoV.

- Probar el sistema de silenciamiento viral en especies silvestres de tomate, mediada por vectores de ARN y ADN.
- Inducir el silenciamiento de genes candidatos en las especies silvestres, mediante los vectores VIGS, generados.
- Retar las plantas de jitomate silenciadas con diferentes patógenos.

5 Materiales y Métodos

5.1 Material vegetal, virus, cepas bacterianas y procedimiento de infección.

Todos los experimentos se llevaron en condiciones controladas, los desechos de plantas infectadas con patógenos fueron esterilizados. Las semillas de *S. habrochaites* LA2128 y *S. peruvianum* LA2172 se solicitaron al TGRC (Tomato Genetics Resource Center, University of California, Davis), las semillas de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig se obtuvieron de la Universidad de Nottingham, UK, las semillas de *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim fueron donadas por el Dr. Paul Goodwin de School of Environmental Sciences, Universidad de Guelph, Ontario, Ca., las semillas de *S. lycopersicum* cv. Micro Tom y de *Nicotiana benthamiana* fueron donadas por el Dr. Gerardo Argüello-Astorga del IPICYT, San Luis Potosí, S.L.P. México. Para la germinación de las semillas, se colocaron en una mezcla de suelo comercial (Sunshine Mix #6, Sun Grow Horticulture, Vancouver, BC, CA), en maceta individual, las cuales se colocaron en cámara de crecimiento con temperatura de 25°C, con un periodo de luz y oscuridad de 16h/8h, respectivamente, posteriormente fueron transferidas a un invernadero con temperatura controlada de 28°C y humedad de 60%. La secuencia del begomovirus ToMoV fue obtenida de una cepa aislada de hojas de tomate en Florida USA en el 2003 (acceso de GenBank NC_00193). *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, se creció en medio King-B (Mezcla de peptona 20g/L, Fosfato de potasio 1.5g/L, Sulfato de magnesio 1.5g/L, Agar 15g/L) a una temperatura de 25°C durante 48h, para su inoculación se ajustó a una absorbancia equivalente a 10⁶ células/mL con una absorbancia de 600nm. La infección se realizó mediante aspersión. *Botrytis cinerea* pv. Bo5-10 y *Alternaria solani* se crecieron en medio

PDA (Dextrosa 20g/L, Infusión papa 4g/L, Agar 15g/L) a una temperatura de 25°C durante 48h en oscuridad para *B. cinerea* y durante 5 días para *A. solani*. Para la inoculación de *B. cinerea* se ajustó la densidad a 1×10^5 células/mL en cámara de Neubauer. Para la inoculación de *A. solani* se ajustó el número de esporas en cámara de Neubauer a una densidad de 5×10^3 células/mL. *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, *Botrytis cinerea* pv. Bo5-10 y *Alternaria solani* fueron donadas por el Dr. Paul Goodwin de School of Environmental Sciences, Universidad de Guelph, Ontario, Ca.

La cepa bacteriana 1387 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fue aislada de un cultivo de tomate comercial cercana a Querétaro, México en el 2012 por el Dr. Lara-Ávila. Esta bacteria se creció en medio 802 (polipeptona 1g/L, extracto de levadura 2g/L, sulfato de magnesio 0.92g/L) a una temperatura de 28°C por 24h, en agitación continua. Para realizar los retos con esta bacteria, se ajustó a una absorbancia de 0.2 (aprox. 5×10^7 UFC) a una longitud de onda de 620nm. La infección se realizó mediante inyección de 0.5mL con aguja de insulina entre el tallo y la primera hoja verdadera de las plantas de tomate de 2 meses después de germinadas y 60 días post-inoculadas con el VIGS correspondiente, ya que es el periodo de tiempo que se observa el silenciamiento del gen de quelatasa (usado como control de silenciamiento) en toda la planta, deduciendo que el gen de interés también ha sido silenciado en toda la planta. Cabe mencionar que el vector ToMoV_SCEI se inoculó en plantas de *S. peruvianum* LA2172, ToMoV_PDRI en plantas de tomate *S. habrochaites* LA2128, en ambas especies de tomate también se inoculó como control ToMoVΔCP. Los síntomas presentes en las hojas, marchitamiento y necrosis, después del reto con *Cmm* se midieron mediante el escaneo de estas hojas, creando un archivo TIF, el cual se usó para medir píxeles del tejido dañado con el programa Image Processing and Analysis in Java (ImageJ) (MD, USA).

5.2 Diseño del vector de silenciamiento y clonación de fragmentos a silenciar.

El ADN de los componentes A y B del Virus Moteado del Tomate (ToMoV), fue amablemente proporcionado por el Dr. Rivera Bustamante, CINVESTAV, IPN, México. Ambos componentes fueron clonados de forma individual en el plásmido Bluescript (pBS II SK+/-) (Stratagene, La Jolla, CA, USA), mediante el sitio *Apal*. Estas construcciones fueron nombradas pBS_ToMoV_A y pBS_ToMoV_B. pBS_ToMoV_A fue modificada por la eliminación del sitio múltiple de clonación de pBS, con el objetivo de evitar la interferencia de estos sitios de restricción en las posteriores clonaciones usadas para insertar en ToMoV los fragmentos de los genes que se desean silenciar. Esta modificación consistió en la escisión de 51pb, entre el sitio *XhoI* (posición de 668pb) y *BamHI* (posición de 719pb). Posteriormente, en este mismo vector, se removieron 657pb de la cápside del virus, mediante PCR, con los siguientes oligos, Forward 5'-CTGAATTCAGCTT TGCATCATGCGTCTAACCTG- 3' y Reverse 5'-TCGAATTCGATATC CCATGGCAAATCACGCTTAGGC- 3', el oligo forward se diseñó con los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII* y el reverse con los sitios *EcoRI* y *EcoRV*, denominados ToMoV Δ CP-F y ToMoV Δ CP-R respectivamente, estos oligos flanquean el gen de la cápside, de tal forma que estos sitios se usen para clonar los fragmentos de los genes que se desean silenciar. Las condiciones de PCR fueron: 7min. para desnaturalización inicial a 95°C, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1min, 72°C por 5.5min y 72°C por 10min como extensión final. El producto de PCR fue purificado y digerido con la enzima *EcoRI* y ligado subsecuentemente, esta construcción fue nombrada ToMoV Δ CP.

Para el VIGS de silenciamiento del gen que codifica para la enzima quelatasa (*ChII*), un fragmento de 249pb del gen quelatasa fue amplificado, usando como molde ADN genómico de *S. peruvianum*, se usaron los oligos Forward: 5'-CTGCAGGAATTCCTCCAGAGCCAAATCACCTC-3' y Reverse 5'-AAGCTT AGATTCCAACGGATCCTTCC-3', los oligos Forward y Reverse fueron diseñados con los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. Los oligos fueron

diseñados con base en la secuencia del gen de quelatasa de *S. lycopersicum* (XM_004248092.1). Las condiciones de PCR fueron: 5min para desnaturalización inicial a 94°C, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 50s, 60°C por 40s, 72°C por 50s y 72°C por 5min como extensión final. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y subsecuentemente clonado en ToMoVΔCP, este vector se nombró ToMoV_*ChII*.

Para el VIGS de silenciamiento que codifica para la enzima de conjugación SUMO (SCEI), se usó ADN genómico de *S. peruvianum* L2172 para amplificar un fragmento de 169pb, usando el siguiente par de oligos: Forward 5'-CTCGAATTCTCCTCAATGAAGACAGTGGTTGG-3' y Reverse 5'-ATAAAGCTTCACCCTCTTTCGGTACTCCA-3', estos oligos se diseñaron con base a la secuencia aislada por Lara-Ávila y col. (2012), (emb|CAE45567.1|). El programa de amplificación fue el mismo que se uso para el fragmento de quelatasa. El producto de PCR se digirió con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y subsecuentemente clonado en ToMoVΔCP, este vector se nombró ToMoV_*SCEI*.

Para el VIGS de silenciamiento del gen que codifica para la una proteína pleiotrópica de resistencia (*PDRI*), se amplificó un fragmento de 192pb, usando como molde ADN genómico de *S. peruvianum*, la amplificación se realizó con los oligos: Forward 5'-TCGAATTC ATCCCATTTGACAGGGGCTA-3' y Reverse 5'-TCAAGCTTTCGGAAAAAGAGGGTCATTG-3', los oligos Forward y Reverse fueron diseñados con los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente, además se diseñó un oligo Reverse, extra, con el sitio de clonación *SmaI*, con el objetivo de clonar el mismo fragmento en el vector de silenciamiento TRV, este es un vector diseñado con el virus "Tobacco Rattle Virus" (TRV), cabe mencionar que el oligo Forward se utilizó para ambas construcciones. El producto de PCR obtenido con el primer par de oligos se digirió con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para su clonación en ToMoVΔCP, este vector se nombró ToMoV_*PDRI*. El producto de PCR obtenido con el segundo par de oligos se digirió con *EcoRI* y *SmaI* para clonarlo en TRV_2. El diseño de los oligos se basó en la secuencia aislada por Lara-Ávila y col. (2012) (sp|Q76CU2.1|), a este vector se le nombró

TRV_PDRI. Este VIGS-vector (TRV_PDRI), fue clonado en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. La identidad de todas las construcciones se verificaron por restricción de las enzimas correspondientes y secuenciación.

5.3 Inoculación de plantas con los VIGS - ToMoV y TRV.

Para la inoculación de las plantas con ToMoV-VIGS, se realizó la liberación de ambos componentes del virus ToMoV A y B de pBS, mediante su digestión con la enzima *ApaI*, posteriormente se mezclaron ambos componentes en relación 1:1, es decir 1µg del componente B por 1µg de cada componente A, de las construcciones que se realizaron con el componente A de ToMoV (ToMoVΔCP, ToMoV_ChII, ToMoV_SCEI, ToMoV_PDRI). La mezcla de los componentes se realizó de manera independiente, es decir ToMoV_A + ToMoV_B, ToMoVΔCP + ToMoV_B, etc. Veintidós días después de la germinación de las plantas se inocularon con ToMoV_VIGS, mediante biobalística, con pistola de helio a baja presión ® (PDS-1000 – He BioRad, Hercules, CA, USA), usando balas de tungsteno con una presión de 600 psi. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en invernadero bajo un temperatura de 25°C – 34°C.

En colaboración con el Dr. Paul Goodwin, en la Universidad de Guelph, Ontario, CA., se realizó la inoculación con TRV, se realizó la mezcla de los cultivos de *Agrobacterium* que contenían las construcciones TRV1 y TRV2, en proporciones de 1:1. La inoculación con TRV, se realizó en plantas de *N. benthamiana* de dos semanas post-germinación y en plantas de *Solanum* sp. de tres semanas post-germinación. Cada experimento se realizó por triplicado con 18 plantas. La inoculación se realizó en buffer MgCl₂ 10mM, mediante infiltración de *Agrobacterium* ajustando a una absorbancia de 1.5-1.6 (aproximadamente 2.0 x 10⁹ cel/mL) a una longitud de onda de de 620nm, aplicando vacío 20Kp por un periodo de 10 minutos. Después de la infiltración las plantas se mantuvieron en cámara bioclimática a 21°C.

5.4 Extracción de ARN de las plantas inoculadas con VIGS.

La extracción de ARN total de las plantas de tomate inoculadas con los diferentes VIGS_ToMoV, se realizó con TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se tomaron 50-100mg de hojas de las plantas, 40 días después de la inoculación con los diferentes vectores de silenciamiento, se homogenizó el tejido en nitrógeno líquido y se paso a un tubo Eppendor, se adicionó 1mL de TRizol, se mezcló suavemente y se incubó por 5min a temperatura ambiente, permitiendo la completa disociación de complejos proteicos. Se adicionó 0.2mL de cloroformo por cada mL de TRizol utilizado, se agitó en vórtex por aproximadamente 15 segundos, se incubo a temperatura ambiente por 2-3 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000rpm 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación la fase inferior se transfirió a un tubo nuevo, conteniendo el ARN total. Para precipitar el ARN de la fase acuosa se adicionó 500µL de Isopropanol, se mezcló y se incubo por 10min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugo a 12,000rpm por 10 min a 4°C. Por último se lavó la pastilla con etanol-DEPC al 75% al adicionar 1mL y centrifugar a 7500rpm por 5 minutos a 4°C, se seco la pastilla y se resuspendió en 30µL con agua DEPC. El ARN se trató con ADNasal (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

5.5 Cuantificación de la expresión de los genes silenciados por PCR-tiempo real (qRT-PCR).

Para la cuantificación de la expresión de los genes silenciados, se sintetizó cADN, para lo que se cuantificó el ARN que se extrajo de las plantas inoculadas con los vectores de silenciamiento, ajustado una concentración de 100ng de ARN con NanoDrop ND-1000-UV-Vis-spectofotómetro (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA), se usó el kit- iScript™ One-Step RT_PCR SYBR ® Green (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). La reacción usada contenía 12.5µL de mix SYBR Green RT-PCR 2X, 1µL de iScript MMIV reversa transcriptasa, 200nM de cada par de oligo específico para el gen que se cuantificó, en un volumen total de 20µL. La cuantificación se basó en el valor CT del nivel de expresión del gen de

interés normalizado con el gen de actina (No. de acceso FJ532351). Los oligos usados para actina fueron: Forward 5'- CCTCACCGAGAGAGGTTACATGT-3', Reverse 5'-CATGTCGCGGACAATTTCC-3'. Los oligos usados para evaluar el nivel de expresión de los genes silenciados se diseñaron en una región diferente a la que se usó en la construcción de los vectores de silenciamiento, con el objetivo de detectar el ARNm y exciliar el fragmento insertado en el VIGS. Para el gen *SCEI* los oligos usados fueron: Forward 5'-TTGCTAAGCCGGAGACACTT-3', Reverse 5'- ACACTTTGGCGGTTTACTCG-3', para el gen *PDRI* los oligos usados fueron: Forward 5'- AAATGCTTGTGGACCATC-3' y Reverse 5'-AGGCTGCAACAGAGAAATAA-3'. Las condiciones de qRT-PCR fueron: 10min a 50°C para síntesis de cADN, 5 min a 95°C, para desactivar la transcriptasa reversa iScript MMLV, seguido de 40 ciclos de 10s a 95°C y 30s a 60°C. La curva Melt, o de disociación se realizó por 80 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 55°C y 10 s. a 55°C, incrementando la temperatura en intervalos de 0.5°C por ciclos de 10 s. cada uno. La ausencia de contaminación por ADN genómico fue confirmada por reacciones de PCR donde se usó como molde ARN, sin síntesis de cADN. La qRT-PCR se realizó en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time, versión 2.0. Se analizaron tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas. El análisis estadístico se basó en la prueba T-student, datos no apareados, con el programa Graph Pad Prism ® V.5 (San Diego, CA, USA), se consideró una $p < 0.01$ para establecer una diferencia estadísticamente significativa.

5.6 Detección de ADN de *Cmm* por PCR en tejido de plantas inoculadas.

El ADN total de las plantas de tomate (*S. peruvianum* LA2172, *S. habrochaites* LA2128) se aisló a partir de hojas, 10 y 20 días después del reto con *Cmm* de plantas inoculadas previamente con ToMoV Δ CP, ToMoV_*SCEI* y ToMoV_*PDRI*. La extracción se realizó usando el protocolo de Dellaporta y col. (1983) modificado, el ADN se cuantificó usando ND-1000-UV-Vis-spectofotómetro (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). Se amplificó un fragmento de 233pb del gen que codifica para una endo-1-4-beta glucosidasa, *Cel-A* (HQ636581; Lara-Ávila, sin publicar). La amplificación se realizó usando 100ng

como ADN molde y los oligos usados fueron: Forward 5'-ATCAAGCAGATGGGGTTCAC-3' y Reverse: 5'-TCCGGATACTGCGATGTGTA-3'. Las condiciones de PCR fueron 5min. a 94°C, seguido de 35 ciclos, por 50 s. a 94°C, 40s a 60°C, 50 s a 72°C, seguido de 5 min a 72°C.

5.7 Cuantificación de *Cmm* en tejido de plantas inoculadas con los vectores de silenciamiento, mediante PCR-tiempo real (qRT-PCR).

El aislamiento de ADN total se realizó a partir de tallo de las plantas de tomate *S. peruvianum* LA2172, inoculadas con ToMoV Δ CP y ToMoV_SCEI, *S. habrochaites* LA2128 inoculadas con ToMoV Δ CP y ToMoV_PDRI y de *S. lycopersicum* a los 10 y 20 días después del reto con *Cmm*. La extracción se realizó usando el protocolo de Dellaporta y col (1983) modificado, el ADN se cuantificó usando ND-1000-UV-Vis-spectofotómetro (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). Se usaron 100ng de ADN de las muestras a analizar en una reacción de 20 μ L, a esta reacción se le adicionó 10 μ L de SYBER Green (mezcla maestra de RT_PCR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) y 200nM de cada uno de los oligos. Los oligos se diseñaron con base en un factor de patogenicidad que se encuentra en el cromosoma de *Cmm*, denominado *tomA*, este gen codifica para una endo-1,4- β -glicosidas (AF393183.1; Flügel y col., 2012), el fragmento que se esperaba amplificar es de 219pb. Oligo forward: 5'-GAGCCAAGCCACTGATCTTC-3', Reverse: 5'-CGTTCTCGTAGAGGCGGTAG-3'. Las condiciones de RT-PCR fueron 95°C por 20 s seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 s y 60°C por 30 s. La curva Melt o de disociación se realizó por 80 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min, 95°C por 30 s y 60°C 15 s. La RT-PCR se realizó en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time, versión 2.0. Se realizó una curva estándar con base en las concentraciones de una versión de pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) en el cual se clonó el fragmento de 219pb de *tomA* que se amplifica con los oligos mencionados anteriormente. Los valores de la curva correspondieron a 2.86×10^2 a 2.86×10^8 copias/ng. El coeficiente de correlación entre el valor del ciclo umbral y la concentración de *tomA* clonado en pGEM-T Easy fue de 0.999 para ambos genes analizados. El análisis estadístico para esta prueba se basó en

un análisis de correlación con datos no apareados con Graph Pad Prism ® V.5 (San Diego, CA, USA), con una $p < 0.01$ para establecer una diferencia estadísticamente significativa.

5.8 Preparación de muestras para microscopia electrónica de barrido.

Se cortaron segmentos de tallo de 0.5cm por la mitad de manera horizontal y vertical, fijados con glutaraldehído al 3% en buffer Sörensen (Fosfato de sodio 100mM, pH 7.4). Después se lavaron tres veces en buffer, las muestras fueron inmersas en tetraóxido de osmio al 1% en buffer de Sörensen por 2 h, posteriormente se lavaron tres veces en buffer Sörensen, se procedió a la deshidratación de los segmentos de tallo con etanol al 30, 50, 70, 90, 95% y etanol absoluto por 15 minutos en cada uno, seguido de dos incubaciones en etanol absoluto por 15 min cada uno. El punto crítico de secado se realizó en Tousimis Samdri-PVT-3D (Tousimis Research, Rockville, MA) posteriormente se realizó la pulverización catódica con oro recubriendo la muestra en Cressington modelo 180auto (Cressington Scientific Instruments, Watford, UK), las fotos se tomaron y analizaron en FEI modelo Quanta 200 SEM (FEI, Brno, Czech Republic).

6 Resultados

6.1 Selección de ToMoV como virus candidato para el diseño de VIGS.

Para la selección del virus adecuado para el silenciamiento, se escogieron tres virus que se han reportado infectan el cultivo de tomate (Cordero y col., 2003; Hernández-Zepeda y col., 2007), y que se encontraban disponibles en el laboratorio. Los virus que se analizaron fueron los siguientes: Virus del mosaico de Euforbia (EuMV, por sus siglas en inglés, *Euphorbia Mosaic Virus*), aislado por Gregorio-Jorge y col., (2010), Virus taino del moteado del tomate, (ToMoTV, por sus siglas en inglés, *Tomato Taino Mottle Virus*), Virus moteado del tomate (ToMoV), ambos donados por el Dr. Rivera-Bustamante, CINVESTAV, IPN,

México. La selección del virus se basó en el criterio de que la infección fuera sistémica y que los síntomas ocasionados en las plantas no fueran severos. La infección se realizó en plantas de *S. peruvianum* LA2172 y *S. habrochaites* LA2128, mediante biobalística con pistola de helio a baja presión (PDS-1000 – He BioRad, Hercules, CA, USA), usando balas de tungsteno con una presión de 600 psi. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron a un temperatura de 25°C – 34°C. La infección con EuMV fue muy severa, y las plantas murieron; las plantas infectadas con ToMoTV presentaron lesiones severas, y con ToMoV, las plantas mostraron sintomatología mínima. Para identificar que la infección con ToMoV fuera sistémica se tomaron muestras a partir de hojas de diferentes lugares de las plantas infectadas y se extrajo ADN con el método de Dellaporta y col. (1983), con el objetivo de identificar el ADN viral mediante oligos universales para *Begomovirus* que flanquean la región de CP del virus, generando un amplicón de 1,395pb, el oligo usado como Forward es el YMAC-F: 5'-TTGTAYATGGCATGNGTACATGCCA-3' y DgrsR 5'-CCTCCTCTAGCASWTCTNCCGTC-3' (Figura 11) indicando de ese modo que ToMoV no causa síntomas severos y que la infección es sistémica, por lo que se seleccionó a ToMoV como el virus ideal para el diseño de VIGS.



Figura 11. Plantas de *Solanum* sp. infectadas con ToMoV.

A) *S. peruvianum* LA2172. B) *S. habrochaites* LA2128. C) Detección del ADN de ToMoV, mediante PCR, M: Marcador de peso molecular, 1: Producto de PCR partiendo de ADN extraído de *S. peruvianum* LA2172, 2: Producto de PCR partiendo de ADN extraído de *S. habrochaites* LA2128.

6.2 Diseño de ToMoV como VIGS.

La estrategia se basó en la subclonación de los componentes A y B de ToMoV (de manera independiente) en el sitio *ApaI* del plásmido Bluescript (pBS II SK+/-) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) (Figura 12A). Este vector se modificó deletando los sitios de restricción del sitio múltiple de clonación a partir de los sitios *XhoI* a *BamHI* (Figura 12B). Estas construcciones fueron nombradas pBS_ToMoV_A y pBS_ToMoV_B. Posteriormente, en pBS_ToMoV_A se removieron 657pb del gen de la cápside del virus, mediante PCR, y se generaron los sitios de restricción *EcoRI*, *HindIII* y *EcoRV*, flanqueando el gen *CP*, de tal forma que estos sitios puedan utilizarse para clonar los fragmentos de los genes que se desean silenciar. El producto de PCR fue purificado y digerido con la enzima *EcoRI* y ligado subsecuentemente; esta construcción fue denominada ToMoVΔCP (Figura 13).

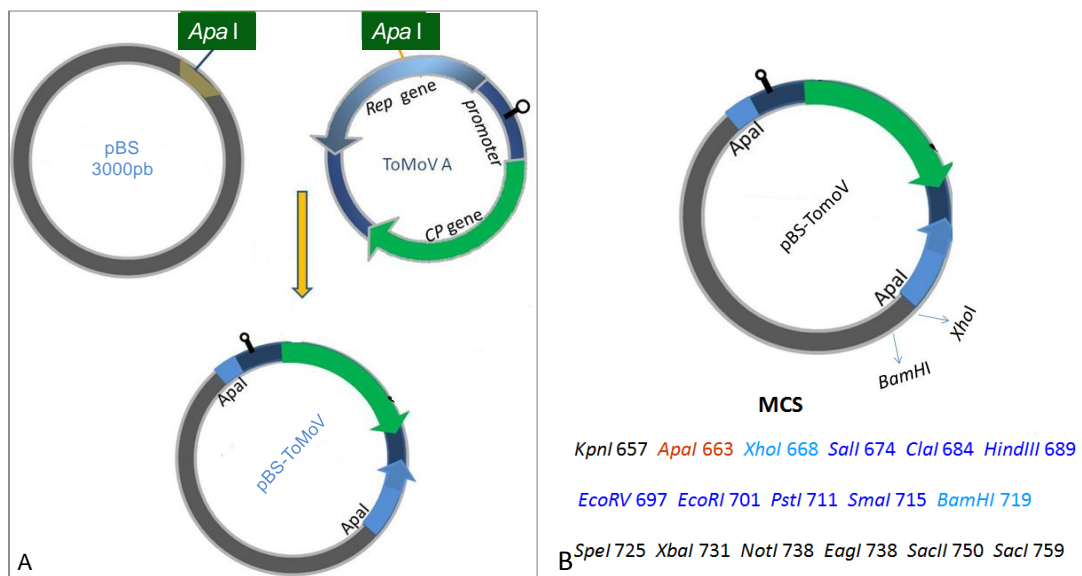


Figura 12. Diseño de VIGS con ToMoV.

A) Inserción de ToMoV en pBS con *ApaI*. B) Delección de sitios de restricción del sitio múltiple de clonación de pBS_ToMoV digerido con *XhoI* y *BamHI*.

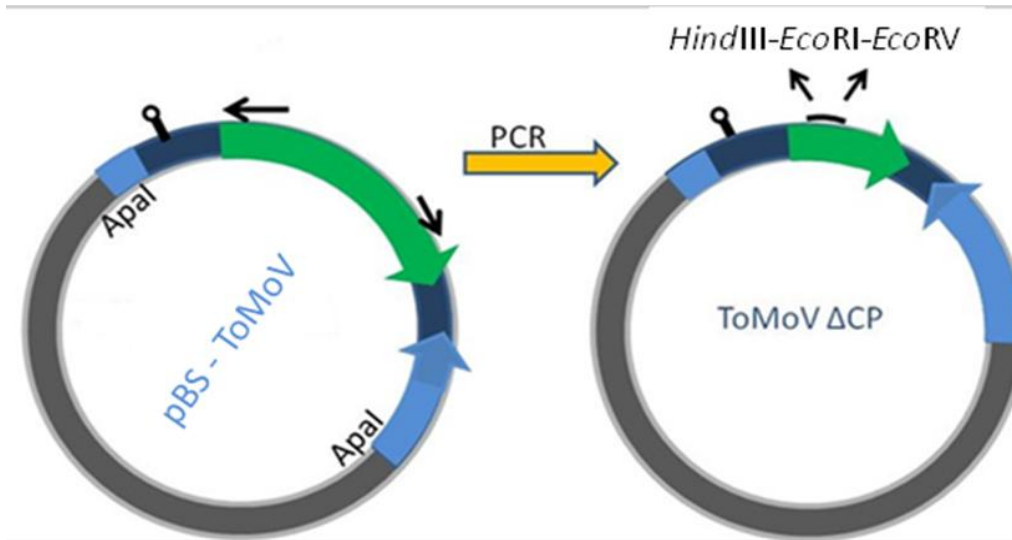


Figura 13. Diseño de ToMoV como VIGS.
Eliminación de 657 pb del gen *CP* de pBS_ToMoV por PCR

6.3 Evaluación del funcionamiento de ToMoV como VIGS, mediante el silenciamiento del gen de quelatasa (*Chl*).

Para analizar el ToMoV Δ CP como VIGS en plantas de la familia *Solanaceae*, se evaluó la capacidad de este vector de suprimir la expresión del gen endógeno quelatasa (*Chl*). En la ruta de la síntesis de clorofila la inserción del magnesio en la estructura de la porfirina como primer paso de la biosíntesis de este pigmento, es catalizada por la enzima magnesio quelatasa. El gen codifica para la enzima quelatasa (*Chl*), un componente del complejo de magnesio quelatasa, es necesario para la producción de clorofila, por lo que el silenciamiento del gen *Chl* bloquea la producción de ese pigmento, haciendo que el tejido se torne inicialmente de un color amarillento y más tarde el tejido se torna de color blanco (Robertson, 2004).

ToMoV Δ CP fue digerido con *EcoRI* y *HindIII*, y el vector digerido fue usado para clonar un fragmento del gen de *Chl* de 249pb que previamente se amplificó con oligos específicos para este gen, el ADN molde se extrajo de una planta de *S. peruvianum*. El producto de PCR fue digerido con las mismas enzimas que el vector, con el objetivo de ligar este fragmento en ToMoV Δ CP, el vector resultante

que lleva el fragmento de quelatasa se le nombró ToMoV_*ChII* (Figura 14). Para verificar la clonación del fragmento de quelatasa en ToMoV Δ CP, se realizó una prueba de restricción con las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, liberando así el fragmento de quelatasa de 249pb de ToMoV_*ChII*.

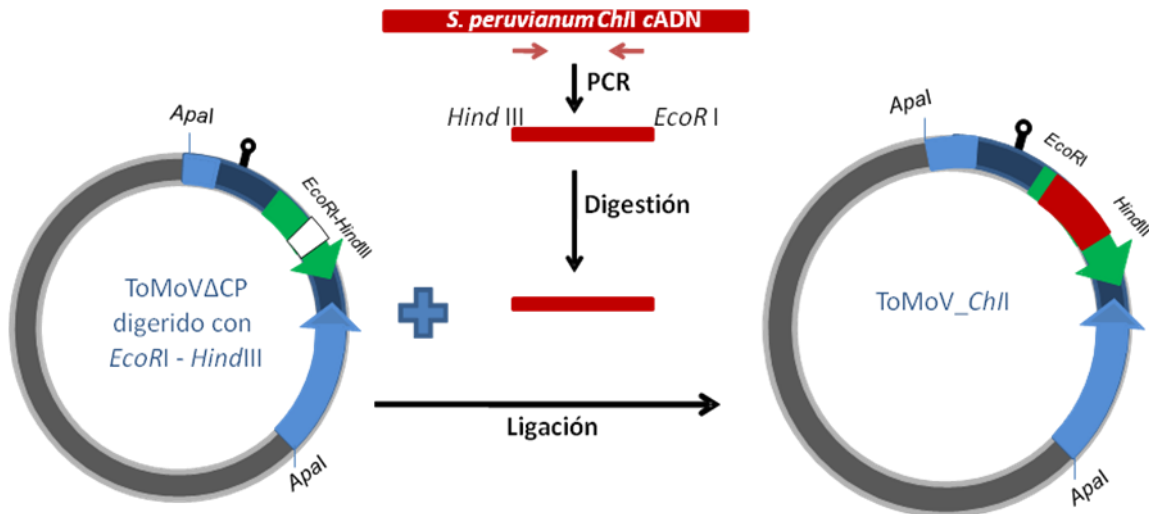


Figura 14. Diseño de ToMoV_*ChII*.

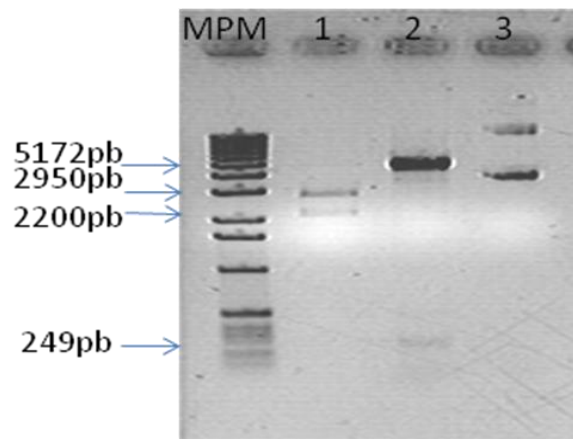


Figura 15. Prueba de restricción del VIGS ToMoV_*ChII*.

Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. MPM: Marcador de peso molecular, 1: vector digerido con *Apal*, Carril 2: Vector digerido con *EcoRI* y *HindIII*

6.3.1 Silenciamiento del gen quelatasa *Chl* en Solanáceas mediante el VIGS ToMoV_*Chl*.

El silenciamiento del gen quelatasa fue reportado previamente en *S. lycopersicum* usando como VIGS al Virus chino de la hoja del rizado amarillo del tomate (TYLCCNV, por sus siglas en inglés, *Tomato yellow leaf curl China Virus*) (Cai y col., 2007). En el presente trabajo se usaron las siguientes especies de plantas: *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, *S. lycopersicum* cv. Micro Tom, *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim y *N. benthamiana*. Para analizar la capacidad del ToMoV_*Chl*, éste se mezcló con el componente B de ToMoV que se requiere para su movilización, y como control se inoculó también el vector vacío, ToMoV Δ CP, el cual también se mezcló con el componente B del virus. La inoculación se realizó en plantas de 3 semanas de germinación mediante biobalística de manera independiente cada construcción. Las plantas que fueron inoculadas con ToMoV_*Chl* comenzaron a mostrar un blanqueamiento en las hojas a los 10 días post-inoculación, extendiéndose posteriormente a toda la planta. En *S. habrochaites* LA2128 y *N. benthamiana* las hojas completas se tornaron blancas. En el caso de *S. peruvianum* y *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig aproximadamente la mitad de las hojas mostraron el fenotipo de silenciamiento del gen *Chl* y en *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim y *S. lycopersicum* cv. Micro Tom solo mostraron pequeñas áreas blancas, debido al silenciamiento; cabe mencionar que en particular para estos cultivares el fenotipo tardó aproximadamente 10 días más que en el resto de las demás Solanáceas (Figura 16). El fenotipo permaneció en las plantas *S. habrochaites* y *N. benthamiana* por al menos tres meses, ya que estas comenzaron a marchitarse y en el resto de las plantas el fenotipo permaneció por al menos 6 meses. Las plantas inoculadas con ToMoV Δ CP no mostraron ningún síntoma evidente de silenciamiento, además se observó que en *S. peruvianum* LA2172 y en *S. habrochaites* LA2128 los síntomas se minimizaron en comparación con el ToMoV sin modificar (Figura 17).

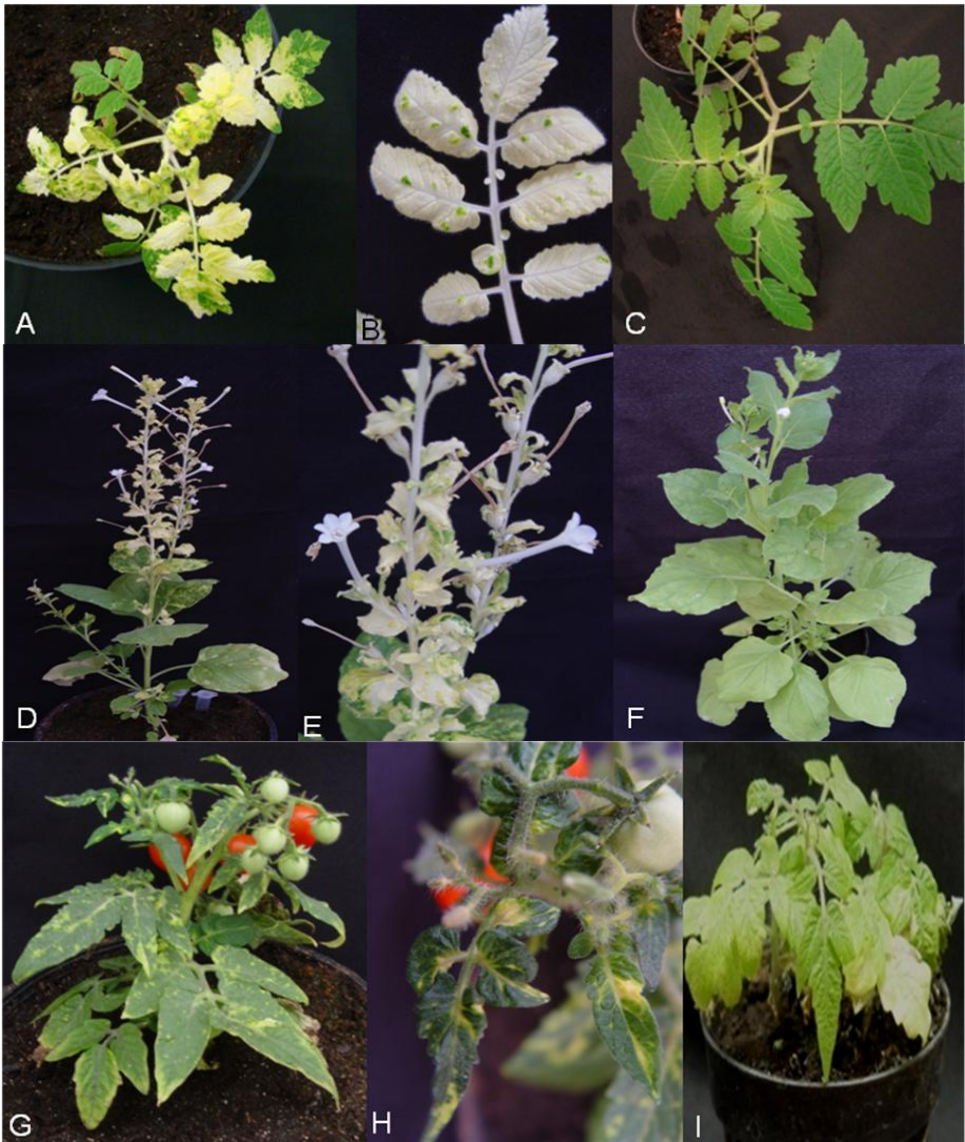




Figura 16. Fenotipo del silenciamiento del gen quelatasa en diferentes especies de Solanáceas, inducido por la inoculación del VIGS ToMoV_ChII.

A) *S. habrochaites* inoculada con ToMoV_ChII. B) Acercamiento de una hoja de *S. habrochaites* de planta inoculada con ToMoV_ChII. C) *S. habrochaites* inoculada con ToMoV Δ CP. D) *N. benthamiana* inoculada con ToMoV_ChII. E) Hojas de *N. benthamiana* inoculada con ToMoV_ChII. F) *N. benthamiana* inoculada con ToMoV Δ CP. G) *S. lycopersicum* cv. Micro Tom inoculada con ToMoV_ChII. H) Hojas de *S. lycopersicum* cv. Micro Tom inoculada con ToMoV_ChII. I) *S. lycopersicum* cv. Micro Tom inoculada con ToMoV Δ CP. J) *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim inoculada con ToMoV_ChII. K) Hojas de *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim inoculada con ToMoV_ChII. L) *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim inoculada con

ToMoV Δ CP. M) *S. peruvianum* LA2172 inoculada con ToMoV_*ChII*. N) Hojas de *S. peruvianum* LA2172 inoculada con ToMoV_*ChII*. Ñ) *S. peruvianum* LA2172 inoculada con ToMoV Δ CP. O) *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig inoculada con ToMoV_*ChII*. P) Hojas de *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig inoculada con ToMoV_*ChII*. Q) *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig inoculada con ToMoV Δ CP.

S. peruvianum

S. habrochaites

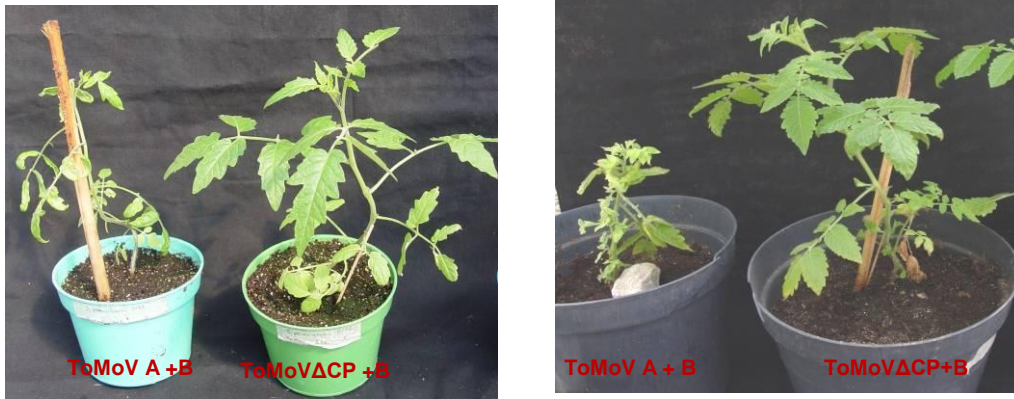


Figura 17. Plantas de *S. peruvianum* LA2128 y *S. habrochaites* inoculadas con ToMoV y ToMoV Δ CP.

El silenciamiento del gen quelatasa se realizó en un espacio aislado sin necesidad de regular la temperatura y humedad, lo cual es un requerimiento cuando se usan VIGS basados en virus de ARN. La temperatura en la que se llevo acabo el silenciamiento osciló entre 22 y 36°C, por lo que el vector VIGS basado en ToMoV es insensible a altas temperaturas; sin embargo a bajas temperaturas este vector VIGS no es funcional, ya que las plantas Solanáceas inoculadas con ToMoV_*ChII* en invierno no mostraron fotoblanqueamiento, sugiriendo que el sistema de silenciamiento no fue activado; no obstante, si se logró detectar el virus en las hojas nuevas de las planta inoculadas, confirmando la capacidad de replicación sistemática de este VIGS basado en ToMoV. De las plantas que no mostraron blanqueamiento, se extrajo ADN, el cual se usó como molde para detectar el virus mediante PCR, la muetsra se tomo a partir de hojas treinta días después de la inoculación con el vector ToMoV. Los oligos que se usaron fueron DgrsF y ToMoV Δ CP-R, el producto de PCR es un amplicón de 720pb, el cual se encontró en todas las plantas inoculadas con el VIGS ToMoV_*ChII* (Figura 18). Estos resultados demuestran que el VIGS ToMoV se replica eficientemente y de forma sistemática.

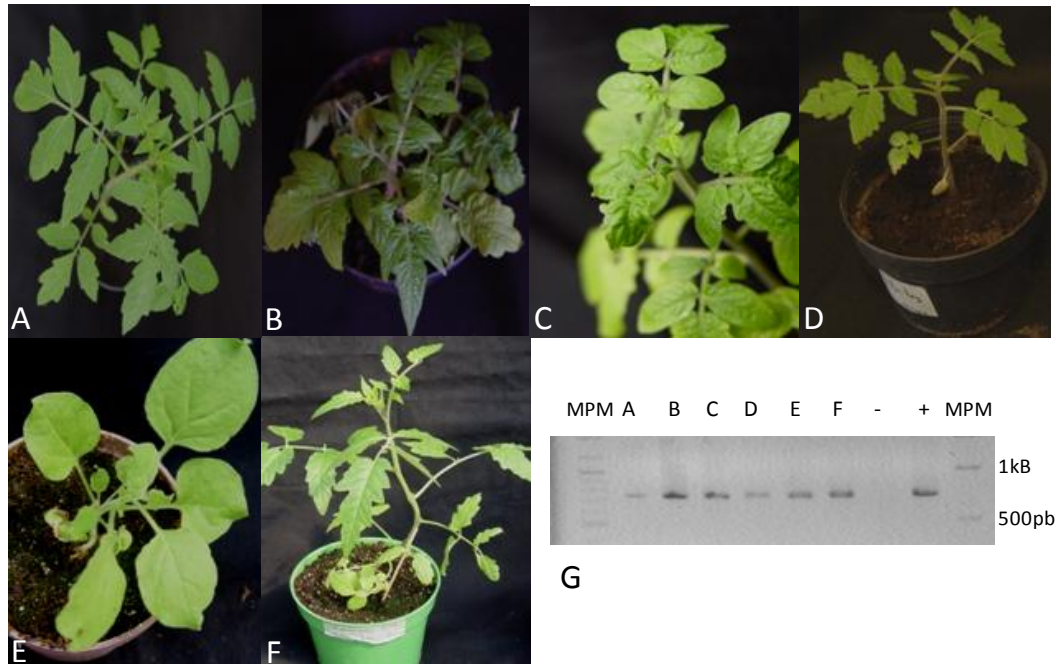


Figura 18. Plantas inoculadas con ToMoV_*ChI* en invierno.

A) *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig. B) *S. lycopersicum* cv. Micro Tom. C) *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim. D) *S. habrochaites*. E) *N. benthamiana* LA2128. F) *S. peruvianum* LA2172. G) Amplicón de 720pb, producto de PCR del ADN del VIGS ToMoV, a partir de las plantas Solanáceas inoculadas con el VIGS.

6.4 Análisis funcional del gen *SCEI* mediante su silenciamiento con ToMoV_*SCEI* en plantas de *S. peruvianum* LA2172.

6.4.1 Silenciamiento del gen *SCEI*,

Para el análisis de la función del gen *SCEI*, se amplificó un fragmento de 269pb, partiendo de cADN de *S. peruvianum* post infección con *Cmm*. El amplicón se clonó en ToMoV Δ CP, generando el VIGS ToMoV_*SCEI*. Se inocularon plantas de 3 semanas de germinación con este VIGS y su correspondiente componente B del virus, además se inocularon otro grupo de plantas con el vector vacío, ToMoV Δ CP, el cual también se mezcló con el componente B del virus. La inoculación se realizó mediante biobalística de manera independiente cada construcción. Cuarenta días post-inoculación de los vectores de silenciamiento basados en ToMoV, se tomaron muestras de ARN de las plantas inoculadas con

el objetivo de evaluar la expresión del gen *SCEI*, verificando su silenciamiento, mediante qRT-PCR, para lo cual se normalizó con el gen de actina. El nivel de expresión del gen *SCEI* en las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_ *SCEI* fue de 0.61, mientras que en las plantas inoculadas con ToMoVΔCP fue de 1.0 indicando el silenciamiento del gen en estudio (Figura 19). La morfología que presentan las plantas inoculadas con el vector ToMoV_ *SCEI* es similar a la de las plantas inoculadas con ToMoVΔCP, lo que nos indica que el silenciamiento del gen *SCEI* no tiene un efecto aparente en el fenotipo de plantas sanas (Figura 20A y B).

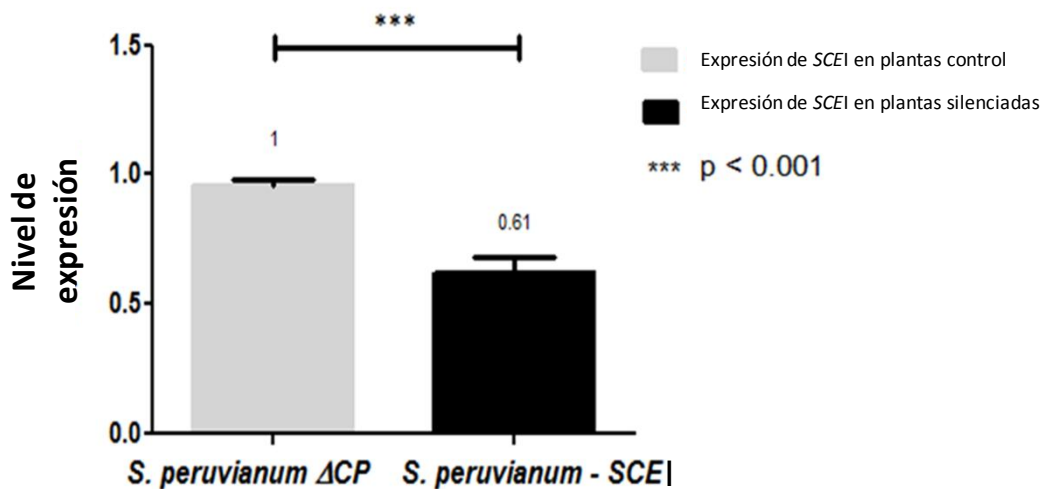


Figura 19. Nivel de expresión del gen *SCEI* en *S. peruvianum* después del silenciamiento con el vector VIGS_ToMoV.

6.4.2 Fenotipo de las plantas de *S. peruvianum* LA2172 en las que se silenció el gen *SCEI*, después del reto con *Cmm*.

El reto con *Cmm* de las plantas de *S. peruvianum* LA2172 en las que se silenció el gen *SCEI* se realizó cuarenta días post-inoculación de ToMoV_ *SCEI*. También se retaron las plantas inoculadas con el vector ToMoVΔCP, además de retar como control, plantas de tomate susceptibles a este patógeno (*S. lycopersicum* cv. Ailsa Criag). La inoculación se realizó entre el tallo y el peciolo de la primera hoja. El primer síntoma observado en las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoVΔCP fue el marchitamiento unilateral de la hoja en la que se inoculó (Figura 20F), terminando en marchitamiento de la misma, el resto de la planta permaneció

sana, sin mostrar daños ocasionados por *Cmm*, esto 20 días después del reto (Figura 20D, G). Por el contrario, en las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_SCEI y retadas, mostraron como primer síntoma marchitamiento unilateral en la hoja que se inoculó (Figura 20H, I), seguido del marchitamiento de las hojas superiores, terminando en muerte de la planta (Figura 20E). Con respecto al cultivar susceptible *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, también se observó marchitamiento unilateral de las hojas y el marchitamiento se disperso en el resto de las plantas (Figura 20C). El daño se evaluó midiendo el área de las hojas con marchitamiento y el área de las hojas sanas. La cantidad del área con marchitamiento a causa de *Cmm*, consistió de entre 12.57% y 25% en las plantas inoculadas con ToMoVΔCP, mientras que en las plantas en las que se silenció el gen SCEI el área con marchitamiento osciló entre el 70.53% al 100% (Figura 21). El porcentaje de necrosis fue de aproximadamente 5 veces menor en las plantas inoculadas con el vector vacío que en las que se silenció el gen SCEI.



Figura 20. Fenotipo de las plantas *S. peruvianum* y *S. lycopersicum* usadas en la evaluación del gen *SCEI* mediante su silenciamiento con el VIGS ToMoV.

A) Plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_ *SCEI* (gen *SCEI* silenciado) sin retar con *Cmm*. B) Plantas de *S. peruvianum* sin silenciamiento del gen *SCEI* y sin reto con *Cmm*. C) Planta de *S. lycopersicum* sin inoculación de vectores de silenciamiento ToMoV y retada con *Cmm*. D) Plantas de *S. peruvianum* inoculadas con el vector de silenciamiento vacío (ToMoV Δ CP), retadas con *Cmm*. E) Plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_ *SCEI* y retadas con *Cmm*. F) Hoja en la cual se inyectó *Cmm*, en una planta de *S. peruvianum* previamente inoculadas con ToMoV Δ CP. G) Hoja localizada arriba de la hoja del sitio de infección con *Cmm* en

una planta de *S. peruvianum* previamente inoculada con ToMoV Δ CP. H) Hoja en la cual se inyectó *Cmm*, en una planta de *S. peruvianum* previamente inoculada con ToMo_SCEI. I) Hoja localizada arriba de la hoja del sitio de infección con *Cmm* en una planta de *S. peruvianum* previamente inoculada con ToMo_SCEI, en la cual se observa marchitamiento unilateral.

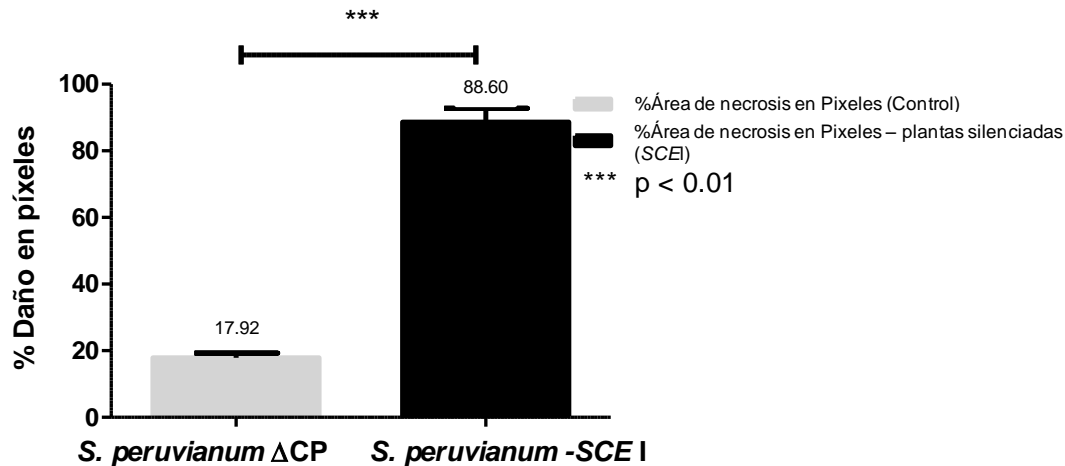


Figura 21. Porcentaje del daño medido en pixeles, ocasionado por *Cmm* en plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV Δ CP y ToMoV_SCEI.

La presencia de *Cmm* en las plantas de *S. peruvianum* retadas, se confirmó mediante la amplificación de un fragmento de 233pb del gen *CeIA*, presente en el plásmido pCM1 de *Cmm*, para lo cual se tomó muestra del tallo de las plantas, aproximadamente 3 cm por encima del sitio de infección, usada para extracción de ADN, confirmando la presencia de este patógeno (Figura 22). Adicionalmente se confirmó la presencia de esta bacteria mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), donde se observa el parénquima de las plantas *S. peruvianum* y *S. lycopersicum* libre de bacterias (Figura 23A y B); sin embargo, en plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV Δ CP y retadas con *Cmm* si se observaron algunas bacterias (Figura 23C, E), en contraste con las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_SCEI y retadas con *Cmm* se observa un incremento en la cantidad de bacterias presentes en el tejido (Figura 23F); no obstante, la mayor cantidad de bacterias encontradas fue en la planta de tomate susceptible, *S. lycopersicum* (Figura 23D). Los resultados observados en las imágenes obtenidas por MEB se correlacionan con la presencia de síntomas ocasionados por *Cmm* en las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con el VIGS de ToMoV_SCEI.

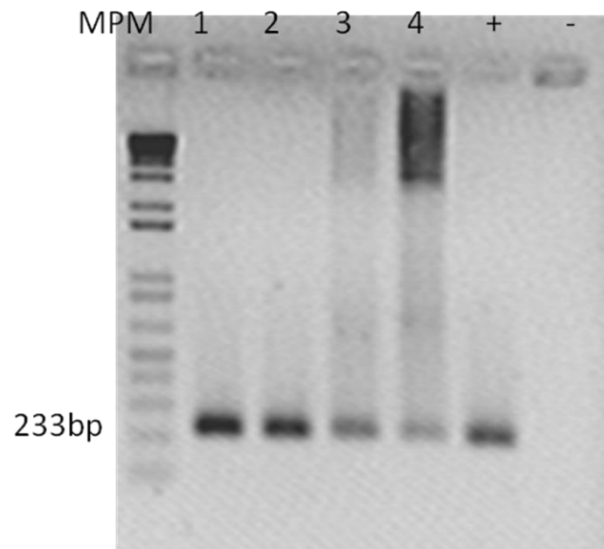


Figura 22. Detección de *Cmm* en tejido de *S. peruvianum* mediante PCR.

Un amplicón de 233pb se obtuvo con oligos específicos para *CelA*. Las muestras de ADN se tomaron a los 10 y 20 días post-Infección con *Cmm*. MPM: Marcador de peso molecular. 1) Producto de PCR de ADN de tejido de *S. peruvianum* silenciado el gen *SCEI*. 10 días post-infección. 2) Producto de PCR de ADN de tejido de *S. peruvianum* silenciado el gen *SCEI*. 20 días post-infección. 3) Producto de PCR de ADN de tejido de *S. peruvianum* inoculado con ToMoV Δ CP 10 días post-infección, 4) Producto de PCR de ADN de tejido de *S. peruvianum* inoculado con ToMoV Δ CP 20 días post-inoculación. +: ADN de *Cmm* -: control negativo.

6.4.3 Carga bacteriana *Cmm* en plantas de *S. peruvianum* inoculadas con el vector de silenciamiento ToMoV.

La carga bacteriana de *Cmm* se obtuvo mediante qRT-PCR con oligos específicos de un gen constitutivo *tomA* del cromosoma de este patógeno. Las muestras de ADN se tomaron a los 10 y 20 días post-infección con el patógeno. La carga bacteriana a los 10 días post-inoculación en las plantas de *S. peruvianum* en las que se silenció el gen *SCEI* fue de 3.77×10^8 UFC/g de tejido, mientras que la población bacteriana de *Cmm*, encontrada en las plantas inoculadas con el vector vacío fue de 6.80×10^7 UFC/g de tejido. A los 20 días post-inoculación, la carga bacteriana incrementó a 1.23×10^9 UFC/g en las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_*SCEI*, y en las plantas inoculadas con el vector vacío fue

de 1.11×10^8 , resultando significativamente más alta la carga bacteriana encontrada en las plantas en las que se silenció el gen *SCEI* (de 5 a 10 veces mayor) que en las que solo se inoculó el vector vacío. Con respecto a la especie susceptible, *S. lycopersicum*, la carga bacteriana encontrada a los 10 días post-reto con *Cmm* fue la más alta, la cual fue de 4.63×10^8 UFC/g de tejido, y a los 20 días post-infección la carga bacteriana resultó ser de 3×10^{10} UFC/g de tejido, valor que fue significativamente más alto que en las plantas de *S. peruvianum* (Tabla 1).

La carga bacteriana de *Cmm* tuvo correlación con los síntomas ocasionado por la infección y con el nivel de expresión del gen *SCEI* en las plantas de *S. peruvianum* y *S. lycopersicum*.

Tabla 1. Carga bacteriana de *Cmm* estimada por qRT-PCR-*SCEI*

| Plantas | Días post inoculación | UFC/g± DS |
|------------------------------------|-----------------------|---|
| <i>S. peruvianum</i> Δcp | 10 | $6.80 \times 10^7 \pm 4.8 \times 10^6$ |
| <i>S. peruvianum</i> Δcp | 20 | $1.11 \times 10^8 \pm 9.4 \times 10^6$ |
| <i>S. peruvianum</i> - <i>SCEI</i> | 10 | $3.77 \times 10^8 \pm 4.7 \times 10^6$ |
| <i>S. peruvianum</i> - <i>SCEI</i> | 20 | $1.23 \times 10^9 \pm 2.0 \times 10^7$ |
| <i>S. lycopersicum</i> | 10 | $4.63 \times 10^8 \pm 3.4 \times 10^7$ |
| <i>S. lycopersicum</i> | 20 | $3.00 \times 10^{10} \pm 6.2 \times 10^8$ |

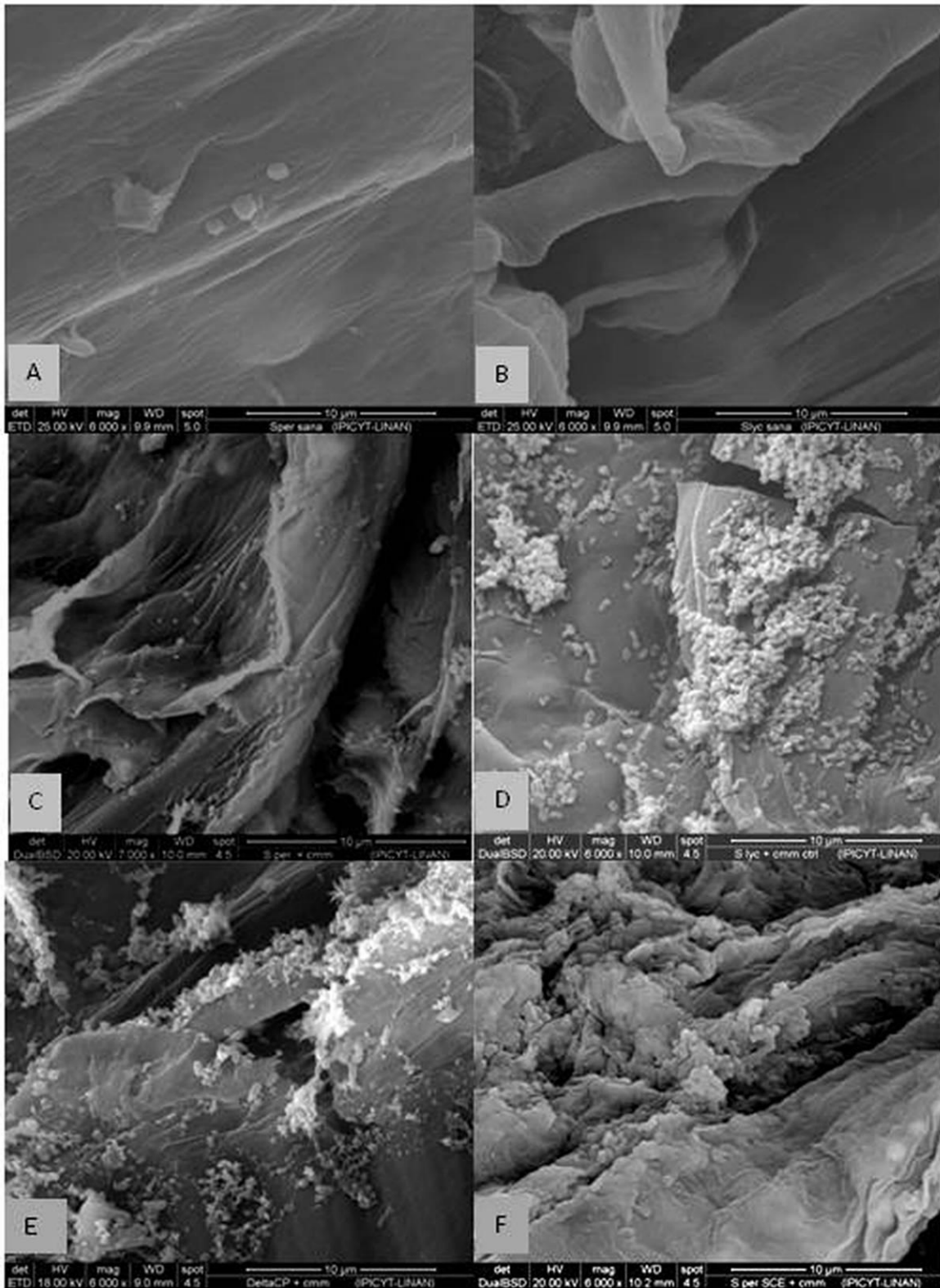


Figura 23. Imágenes de microscopía electrónica de un corte longitudinal de tallo de *Solanum* sp. sin inoculación e inoculadas con ToMoVACP, ToMoV_SCEI y no infectadas e infectadas con *Cmm*.

A) *S. peruvianum* sin infección con *Cmm*, ausencia de bacteria. B) *S. lycopersicum* sin infección con *Cmm*, ausencia de bacteria. C) *S. peruvianum* sin inoculación con el vector de silenciamiento ToMoV, 10 días post-reto con *Cmm*, presencia de algunas bacterias. D) *S. lycopersicum* 10 días post-infección con *Cmm*, presencia de una gran cantidad de bacterias. E) *S. peruvianum* inoculada con ToMoV Δ CP, 10 días post-reto con *Cmm*, presencia de algunas bacterias. F) *S. peruvianum* inoculada con ToMoV_SCEI, 10 días post-reto con *Cmm*. se observa incremento en la cantidad de bacterias con respecto a la inoculada con el ToMoV Δ CP.

6.5 Análisis funcional del gen *PDRI*, mediante su silenciamiento con los vectores TRV y ToMoV.

6.5.1 Silenciamiento del gen fitoeno desaturasa (*PDS*) con TRV en *S. peruvianum*, *S. habrochaites* y *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig.

Se han reportado una gran cantidad de vectores de silenciamiento usados con el fin de estudiar la función de genes en plantas (Liu y col., 2002b). Uno de los vectores ampliamente usado con este objetivo es el basado en el virus rayado del tabaco (TRV, por sus siglas en inglés *Tobacco rattle virus*), el cual se reporta como eficiente en tomate (Liu y col., 2002a; Cai y col., 2007). A la par que se desarrollaba el vector VIGS basado en un begomovirus, se adquirieron vectores VIGS basados en virus de ARN y se realizó una estancia con el Dr. Goodwin en la Universidad de Guelph, Canadá para probarlos, ya que solo requieren de agroinfiltración y se elimina el uso de balística.

EL TRV_ARN1 codifica para proteínas esenciales de replicación y movimiento del virus dentro de la planta. TRV_ARN2 codifica para la proteína de la cápside y proteínas no estructurales. TRV_ARN1 puede replicarse y moverse sistemáticamente sin ARN2. El VIGS-TRV, se construyó de tal forma que ambos cADNs de los dos ARNs correspondientes a TRV, se insertaron entre los promotores duplicados CaMV 35S y el terminador de Nopalina sintasa (NOS) en un vector T-ADN. El TRV1 codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), proteína de movimiento (MP), y proteína rica en cisteína. El TRV2 codifica para la proteína de la cápside y posterior a este presenta un sitio múltiple de clonación, además se incluyó una secuencia de ribozima auto-escisión en el extremo 3' en ambos componentes (Figura 24).

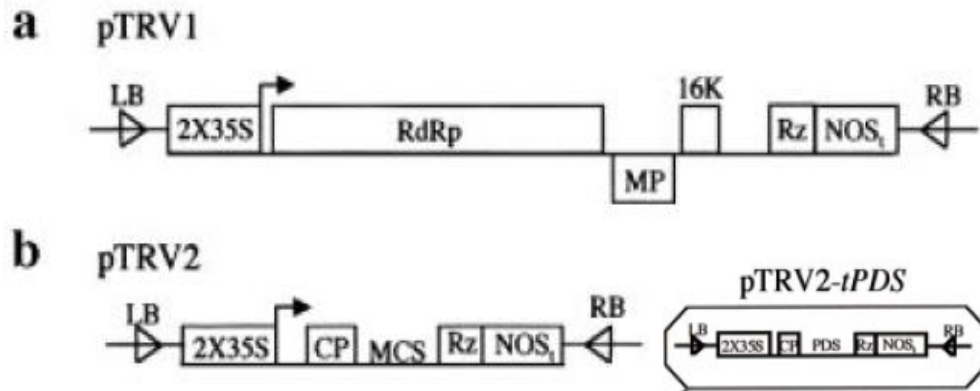


Figura 24. Organización del genoma de TRV como VIGS.

A, B) El cADN de TRV clonado entre un promotor doble de 35S y terminador nopalina sintasa (NOS) en un vector T-ADN. RdRp, RNA polimerasa dependiente de ARN; 16K, 16KDa proteína rica en cisteína; MP, proteína de movimiento; CP, proteína de la cápside; LB y RB, borde izquierdo y derecho del T-ADN resp.; MCS, Sitio múltiple de clonación (Liu y col., 2002a).

Con el fin de evaluar la función de genes de interés, en colaboración con el Dr. Paul Goodwin, en la Universidad de Guelph, Ontario, CA, se evaluó el sistema de silenciamiento con TRV en plantas silvestres relacionadas al tomate, para lo cual se infiltraron las plantas con *A. tumefaciens*, mediante vacío por 10 minutos a 10Kp, evaluando tres concentraciones, 2×10^7 células/mL, 2×10^9 células/mL y 2×10^{11} células/mL, después de la infiltración las plantas se colocaron a 21°C, logrando el silenciamiento de PDS, en *S. peruvianum*, en el cual se observó un fenotipo de silenciamiento de PDS, caracterizado por el blanqueamiento de las hojas, ya que en ausencia de carotenos la clorofila se inactiva, siendo la mejor concentración 2×10^9 células/mL, sin obtener fenotipo de silenciamiento en la menor concentración. Sin embargo, no se logró observar el silenciamiento del gen PDS en *S. habrochaites* (Figura 25). Con el objetivo de obtener silenciamiento en *S. habrochaites* se infiltraron nuevamente plántulas de tres semanas post-germinación de esta especie, las cuales después de la infiltración se colocaron a 14°C toda la noche y posteriormente se mantuvieron a 21°C, logrando el silenciamiento del gen *PDS* únicamente en la una concentración de 2×10^9 células/mL en esta especie (Figura 26). Esto nos permitió realizar el estudio de la función de los genes de interés con posible función en la defensa contra *Cmm*.

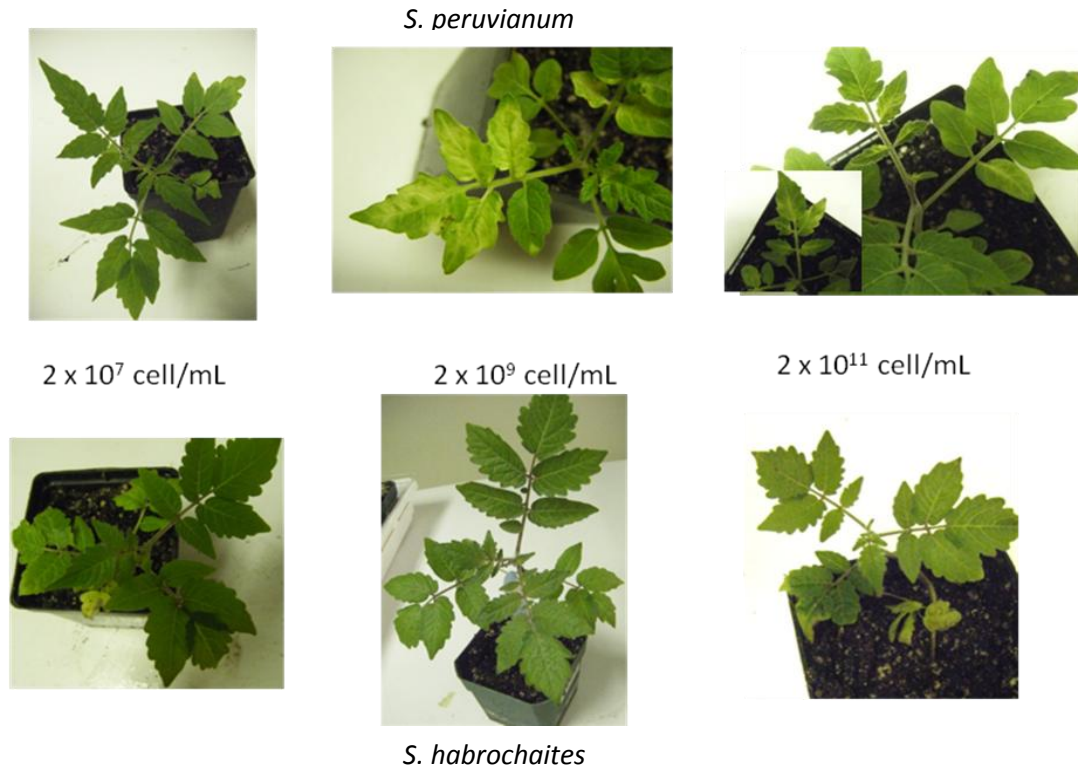


Figura 25. Análisis funcional del gen *PDS* con el vector TRV en *S. peruvianum* y *S. habrochaites* a 21°C con diferentes concentraciones de *Agrobacterium*.

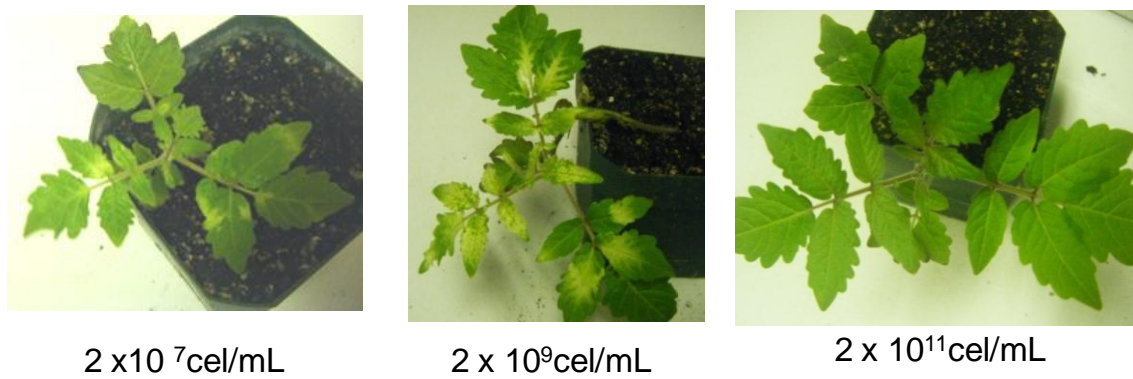


Figura 26. Análisis funcional del gen *PDS* con el vector TRV en *S. habrochaites* a 14°C posterior a la infiltración.

6.5.2 Análisis de la función del gen *PDRI* en la defensa ante patógenos, mediante su silenciamiento con TRV.

Una vez comprobado el funcionamiento del TRV como vector de silenciamiento usando el gen *PDS* en las plantas de *Solanum* sp, se evaluó la función del gen *PDRI* que pudiera tener en papel en la defensa contra patógenos. En las plantas de *S. peruvianum* y *S. habrochaites* se evaluó el papel en la resistencia a *Cmm*. En las plantas de *S. peruvianum* silenciadas con TRV_*PDRI*, 25 días después del reto con *Cmm* se observa debilitamiento del tallo y marchitamiento en algunas regiones de las hojas (Figura 27). Al analizar el daño basado en el marchitamiento de las hojas, mediante pixeles, se obtuvo una mayor área comparada con la obtenida con las plantas en las que se inoculó el TRV_*GFP*. Lo que nos muestra la posible función en defensa del gen *PDRI* (Figura 28).

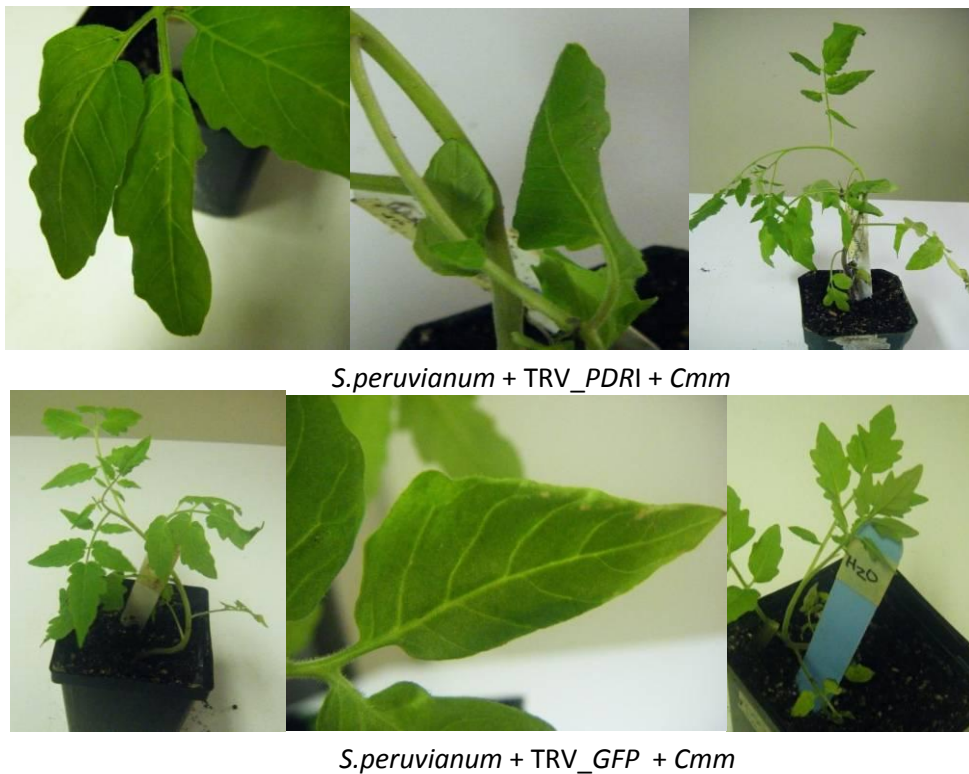


Figura 27. Fenotipo de plantas de *S. peruvianum* inoculadas con TRV_*PDRI* y TRV_*GFP*, retadas con *Cmm*.

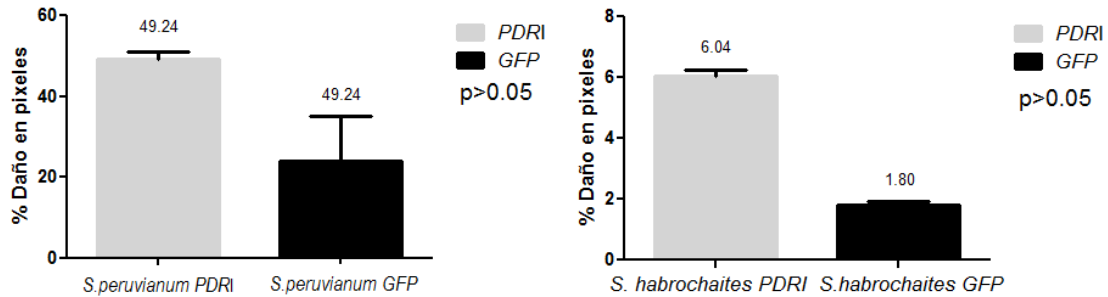


Figura 28. Área de daño en píxeles en *S. peruvianum* y *S. habrochaites* inoculadas con ToMoV_PDRI y retadas con Cmm.

El análisis del gen *PDR*, también se evaluó mediante el silenciamiento en plantas de *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim retadas diferentes patógenos, como la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, se inocularon plantas con el vector TRV_PDRI, tres semanas después de la inoculación se reto con el patógeno, mediante aspersión por bomba con una presión de 25Kp. Siete días después del reto se observaron manchas necróticas en las hojas de las plantas de tomate, sin embargo, se presentaron en cantidad muy semejante a las presentes en las plantas inoculadas con TRV_GFP (Figuras 29A y D). Adicionalmente se evaluó la función de este gen ante el hongo *Alternaria solani*, la cual también se inoculo mediante aspersión por bomba a una presión de 25Kpa (Figs. 29 B y E). Por último se evaluó la función de este gen ante el hongo *Botrytis cinera* (Figs. 29 C y F), este se inoculó mediante contacto, al colocar directamente la suspensión del hongo sobre la hoja, después del reto las plantas se mantuvieron cubiertas y se tomaron datos cada tercer día. No se logró ver diferencia estadística en los síntomas ocasionados por *A. solani* y *B. cinerea* en las plantas inoculadas con TRV_PDRI respecto a las silenciadas con TRV_GFP (Figuras 29 B, C comparadas con E y F).

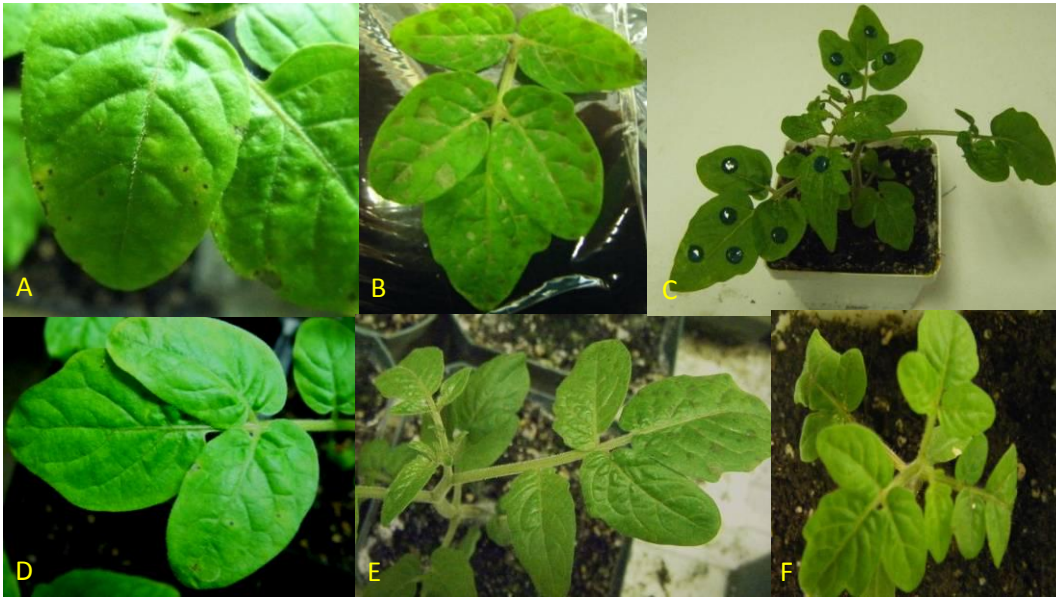


Figura 29. Síntomas generados por diferentes patógenos en plantas de *S. lycopersicum* cv. Tiny Tim inoculadas con TRV_PDRI y TRV_GFP.

A) Planta inoculada con TRV_PDRI y retada con *P. syringae* pv. *tomato*. B) Planta inoculada con TRV_PDRI y retada con *A. solani*. C) Planta inoculada con TRV_PDRI y retada con *B. cinerea*. D) Planta inoculada con TRV_GFP y retada con *P. syringae* pv. *tomato*. E) Planta inoculada con TRV_GFP y retada con *A. solani*. F) Planta inoculada con TRV_GFP y retada con *B. cinerea*.

6.6 Análisis de la función del gen PDRI en la defensa ante patógenos, mediante su silenciamiento con ToMoV.

En la sección 6.3.1 (Fig. 16) se mostró que el vector ToMoV_ChII silenció adecuadamente el gen de la quelatasa en varias solanáceas, y repetimos el experimento en *S. habrochaites* hasta 60 dpi, y se observó en casi toda la planta el fenotipo del silenciamiento de este gen (Figura 30), por lo que se decidió usar este vector para el análisis del funcionamiento del gen PDRI, ya que al analizar este gen con TRV, no se obtuvieron resultado que nos pudieran dar evidencia de la función en la defensa que pudiera tener este gen.



15 días post-inoculación

40 días post-inoculación

60 días post-inoculación

Figura 30. Silenciamiento de quelatasa con ToMoV en *S. habrochaites*.

6.6.1 Silenciamiento del gen *PDRI*.

Para el análisis de la función del gen *PDRI*, se amplificó un fragmento de 192pb, partiendo de ADNc de *S. habrochaites* post infección con *Cmm*. El amplicón se clonó en ToMoVΔCP, generando el VIGS ToMoV_*PDRI*. Se inocularon plantas de 3 semanas de germinación con este VIGS y su correspondiente componente B del virus, además se inocularon otro grupo de plantas con el vector vacío, ToMoVΔCP, el cual también se mezcló con el componente B. La inoculación se realizó mediante biobalística de manera independiente cada construcción. Cuarenta días post-inoculación de los vectores de silenciamiento basados en ToMoV, se tomaron muestras de ARN de las plantas inoculadas con el objetivo de evaluar la expresión del gen *PDRI*, verificando su silenciamiento, mediante q-RT-PCR, para lo cual se normalizó con el gen de actina. El nivel de expresión del gen *PDRI* en las plantas de *S. habrochaites* inoculadas con ToMoV_*PDRI* fue de 0.16, mientras que en las plantas inoculadas con ToMoVΔCP fue de 1.0 indicando el silenciamiento del gen en estudio (Figura 31). La morfología que presentan las plantas inoculadas con el vector ToMoV_*PDRI* es similar a la de las plantas inoculadas con ToMoVΔCP, lo que nos indica que el silenciamiento del gen *PDRI* no tiene un efecto aparente en el fenotipo de plantas sanas (Figuras 32 A y B)

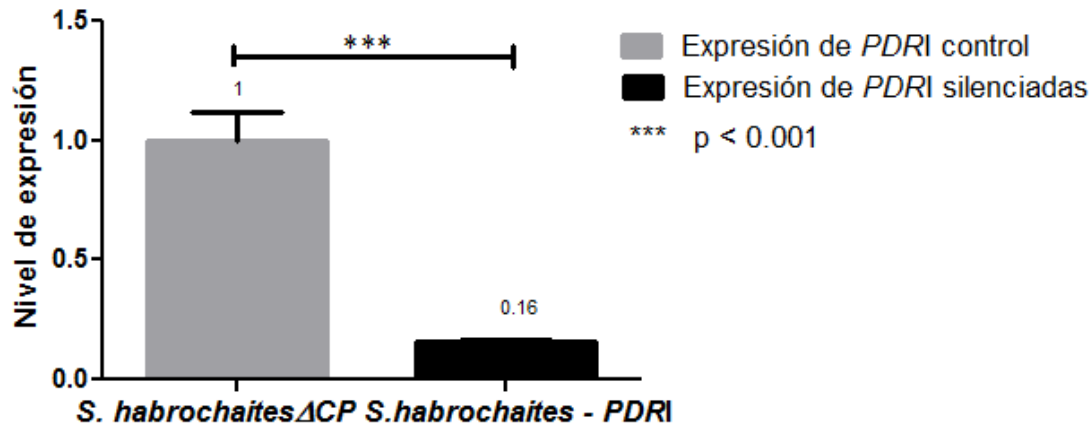


Figura 31. Nivel de expresión del gen *PDRI* en *S. habrochaites* después de su silenciamiento con el vector VIGS_ToMoV.

6.6.2 Fenotipo de las plantas de *S. habrochaites* LA2128 en las que se silenció el gen *PDRI*, después del reto con *Cmm*.

El reto con *Cmm* de las plantas de *S. habrochaites* LA2128 en las que se silenció el gen *PDRI* se realizó de igual forma en la que se realizó el análisis del gen *SCEI*. El reto de las plantas se realizó cuarenta días post-inoculación con ToMoV, también se retaron las plantas inoculadas con el vector ToMoVΔCP, y plantas de tomate susceptibles a este patógeno (*S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig). La inoculación se realizó entre el tallo y el peciolo de la primera hoja. El primer síntoma observado en las plantas de *S. habrochaites* inoculadas con ToMoVΔCP y retadas con *Cmm* fue el marchitamiento de la región del tallo en donde se infectó, lo que podría ser una respuesta hipersensible, cabe mencionar que esta lesión no se extendió mas allá de la región de infección, permaneciendo sana el resto de la planta (Figura 32 C). Por lo contrario en las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_*PDRI* y retadas, se observó chancro en el tallo, el cual se fue extendiendo en el tallo y se observó marchitamiento de las hojas mas cercanas al sitio de infección (Figura 32 E, F, I y J). Con respecto al cultivar susceptible *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, también se observó chancro en el tallo y marchitamiento en las hojas (Figura 32 D, H). El daño se evaluó midiendo el área de las hojas con marchitamiento y el área de las hojas sanas. La cantidad del

área con marchitamiento a causa de *Cmm*, consistió del 15.33% en las plantas inoculadas con ToMoV Δ CP, mientras que en las plantas en las que se silenció el gen *PDRI* el área con marchitamiento resultó ser del 25.56% (Figura 33). El porcentaje de necrosis no fue estadísticamente significativo entre las plantas retadas con el ToMoV_ Δ CP y ToMoV_*PDRI*.



Figura 32. Fenotipo de las plantas *S. habrochaites* y *S. lycopersicum* usadas en la evaluación del gen *PDRI* mediante su silenciamiento con VIGS ToMoV.

A) Planta de *S. habrochaites* sin inocular el vector de silenciamiento ToMoV. B) Planta de *S. habrochaites* inoculadas con ToMoV_*PDRI* sin retar con *Cmm*. C) Planta de *S. habrochaites* inoculada con ToMoV_ Δ CP y retada con *Cmm*. D)

Planta de *S. lycopersicum* sin inoculación de vectores de silenciamiento ToMoV y retada con *Cmm*. E, F) Plantas de *S. habrochaites* inoculadas con el vector ToMoV_PDRI y retadas con *Cmm*. G, K) Sitio de infección con *Cmm*, en el tallo de *S. habrochaites* previamente inoculado con ToMoVΔCP. H) Sitio de infección con *Cmm*, en el tallo de *S. lycopersicum*. I, J) Sitio de infección con *Cmm*, en el tallo de *S. habrochaites* inoculadas con el vector ToMoV_PDRI. L) Planta de *S. lycopersicum* sin inoculación con ToMoV ni reto con *Cmm*.

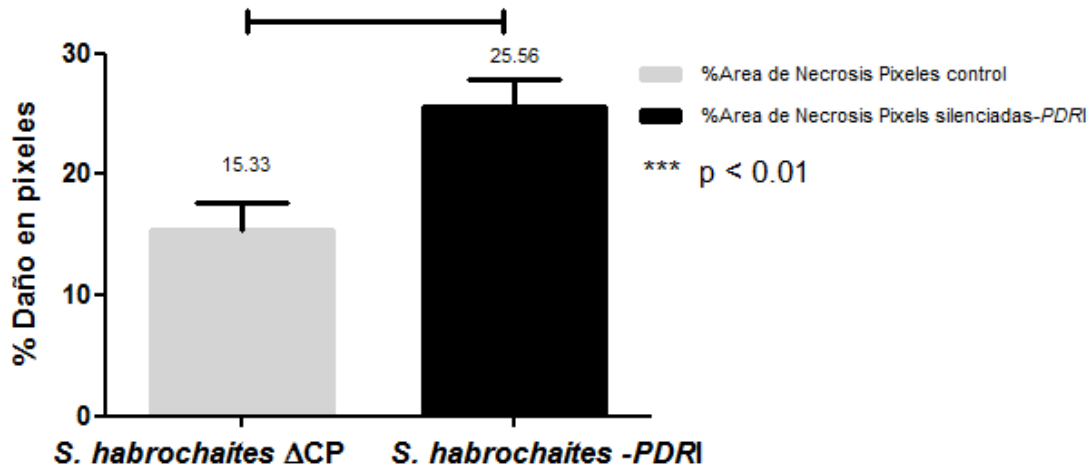


Figura 33. Porcentaje del daño medido en píxeles, ocasionado por *Cmm* en plantas de *S. habrochaites* inoculadas con ToMoVΔCP y ToMoV_PDRI.

A a pesar que el nivel de mensajero las plantas silenciadas con ToMoV_PDRI se redujo más que en ToMoV_SCEI, el grado de susceptibilidad a *Cmm* al silenciar PDRI fue menor que cuando se silenció el gen SCEI, lo que sugiere una menor importancia en el papel de defensa para el gen PDRI.

Se confirmó la presencia de *Cmm* mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), donde se observa el parénquima de las plantas *S. habrochaites* y *S. lycopersicum* libre de bacterias (Figura 34A, B); sin embargo, en plantas de *S. habrochaites* inoculadas con ToMoVΔCP y retadas con *Cmm*, si se observaron algunas bacterias (Figura 34C, E), en las plantas inoculadas con ToMoV_PDRI y retadas con *Cmm*, se observó un incremento en la cantidad de bacterias presentes en el tejido (Figura 34F); no obstante, la mayor cantidad de bacterias encontradas fue en la planta de tomate susceptible, *S. lycopersicum* (Figura 34 D).

Los resultados observados en las imágenes obtenidas por MEB se correlacionan con la presencia de chancro, ocasionado por *Cmm*, en los tallos de las plantas en las que se silenció el gen *PDRI*.

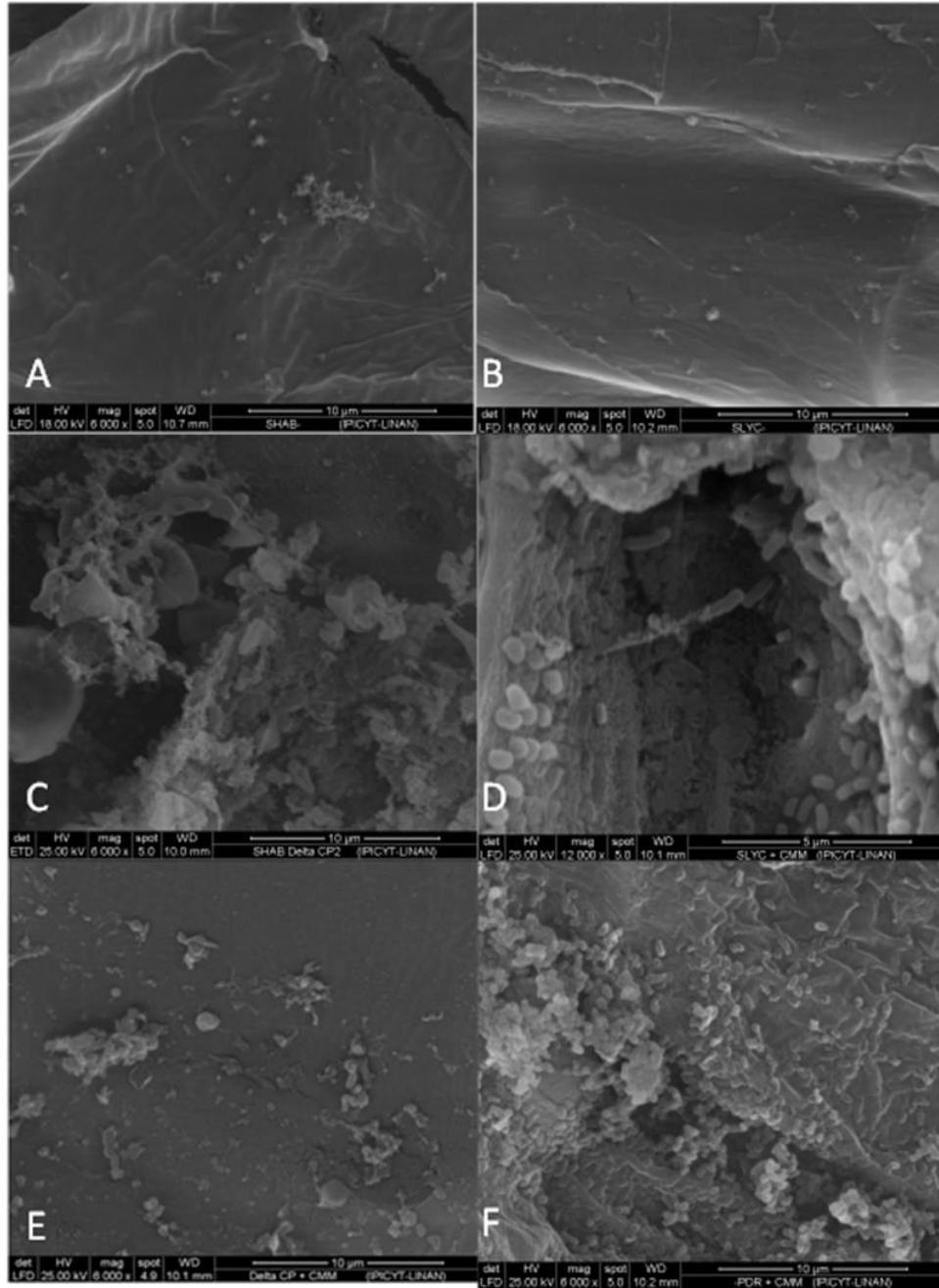


Figura 34. Imágenes de microscopía electrónica de un corte longitudinal de tallo de *Solanum* sp. sin inoculaciones e inoculadas con ToMoVΔCP, ToMoV_PDRI, infectadas y no infectadas con *Cmm*.

A) *S. habrochaites* sin infección con *Cmm*, muestra ausencia de bacteria. B) *S. lycopersicum* sin infección con *Cmm*, muestra ausencia de bacteria. C) *S. habrochaites* sin inoculación con el vector de silenciamiento ToMoV, 10 días post-reto con *Cmm*, presencia de algunas bacterias. D) *S. lycopersicum* 10 días post-infección con *Cmm*, presencia de una gran cantidad de bacterias. E) *S. habrochaites* inoculada con ToMoV Δ CP, 10 días post-reto con *Cmm*, presencia de algunas bacterias. F) *S. habrochaites* inoculada con ToMoV_PDRI, 10 días post-reto con *Cmm*. se observa incremento en la cantidad de bacterias con respecto a la inoculada con el ToMoV Δ CP.

6.6.3 Carga bacteriana *Cmm* en plantas de *S. habrochaites* inoculadas con el vector de silenciamiento ToMoV_PDRI.

Para determinar la carga bacteriana de *Cmm* en las plantas inoculadas con el vector de silenciamiento ToMoV_PDRI, se usó qRT-PCR con oligos específicos de un gen constitutivo *TomA* del cromosoma de este patógeno. Las muestras de ADN se tomaron a los 10 y 20 días post-infección con el patógeno. Diez días post-infección, la carga bacteriana en las plantas de *S. habrochaites* en las que se silenció el gen PDRI resultó ser de 2.69×10^8 UFC/g de tejido, mientras que la población bacteriana de *Cmm*, encontrada en las plantas inoculadas con el vector vacío fue de 1.80×10^7 UFC/g de tejido. A los 20 días post-inoculación, la carga bacteriana incrementó a 3.23×10^9 UFC/g en las plantas de *S. habrochaites* inoculadas con ToMoV_PDRI. En las plantas inoculadas con el vector vacío, el aumento no fue relevante, ya que se obtuvo una carga bacteriana de 3.34×10^7 UFC/g. Observando un incremento significativo entre la carga bacteriana encontrada en las plantas en las que se silenció el gen PDRI con respecto a las que solo se inoculó el vector vacío. Sin embargo, sigue siendo mas alta la cantidad de bacteria encontrada en la especie susceptible, *S. lycopersicum*, la carga bacteriana encontrada a los 10 días post-reto con *Cmm* fue la más alta, siendo esta de 3.14×10^8 UFC/g de tejido, y a los 20 días post-infección la carga bacteriana resultó ser de 4.09×10^9 UFC/g de tejido, el cual es semejante a la plantas de *S. habrochaites* silenciadas (Tabla 2).

Tabla 2. Carga bacteriana de *Cmm* estimada por qRT-PCR-PDRI

| Plantas | Días post inoculación | UFC/g± DS |
|------------------------------|-----------------------|--|
| <i>S. habrochaites</i> Δcp | 10 | 1.80x10 ⁷ ±1.4 x10 ³ |
| <i>S. habrochaites</i> Δcp | 20 | 3.34x10 ⁷ ±2.8x10 ⁴ |
| <i>S. habrochaites</i> -PDRI | 10 | 2.69x10 ⁸ ±1.7x10 ³ |
| <i>S. habrochaites</i> -PDRI | 20 | 3.23x10 ⁹ ±1.7x10 ⁴ |
| <i>S. lycopersicum</i> | 10 | 3.14x10 ⁸ ±2.9x10 ⁴ |
| <i>S. lycopersicum</i> | 20 | 4.09x10 ⁹ ±6.2x10 ⁶ |

7 Discusión

7.1 Especies silvestres como fuentes potenciales de resistencia a *Cmm* relacionadas con tomate.

Se han reportado especies silvestres relacionadas al tomate, las cuales muestran cierto grado de resistencia ante *Cmm*. Algunas de las especies reportadas son *S. peruvianum* LA2172 y *S. habrochaites* LA2128, las cuales representan una fuente de genes que podrían ofrecer resistencia al cultivo del tomate comercial, el cual actualmente es susceptible a *Cmm*, siendo esta bacteria uno de los patógenos más agresivos en este cultivo, y actualmente no hay un método eficiente de eliminación de *Cmm* (van Heusden y col., 1999). Las especies seleccionadas para analizar los genes con posible función de resistencia ante *Cmm*, fueron *S. peruvianum* y *S. habrochaites*. Hasta la fecha no se ha logrado obtener un cultivar de tomate resistente a *Cmm*, más se han identificado genes de resistencia en especies silvestres los cuales podrían dar la pauta para generar plantas transgénicas de tomate, *S. lycopersicum*, resistentes a *Cmm*.

7.2 VIGS como herramienta para el análisis de la función de genes.

El uso de VIGS representa una herramienta para el análisis de la función genética, aplicada en el estudio de rutas metabólicas, desarrollo, defensa o genes involucrados en el metabolismo primario y secundario (Martínez-de Alba y col., 2013). La aplicación de esta herramienta ha hecho que el análisis de la función de un gen sea más fácil y rápido, comparado con la transformación que se hace mediante *Agrobacterium*, ya que no se tienen que esperar a lograr obtener la generación de plantas adultas, pero principalmente porque no se requiere de una transformación estable. Otra de las ventajas, es que con solo la información de la secuencia parcial es suficiente para silenciar un gen. Esta ventaja es de gran interés en nuestro trabajo, ya que se está asegurando el silenciamiento del gen sin importar el número de copias presente en especies silvestres, de las cuales aún no se ha reportado el genoma, como es el caso de *S. peruvianum* y *S. habrochaites*, puesto que el uso de VIGS nos permite silenciar genes con múltiples copias o varios miembros de una familia de genes. Otra ventaja es que VIGS se puede utilizar para evaluar la función de los genes cuya mutación es letal (Senthil-Kumar y Mysore, 2011). En el presente trabajo se desarrolló un vector de silenciamiento viral con base en el begomovirus ToMoV, el cual es funcional en plantas silvestres y además funciona a temperaturas mayores a 22°C, sin tener que mantenerlas a una temperatura estable, como ocurre con otros vectores usados para VIGS basados en virus de ARN, para que estos sean capaces de ser usados en el análisis de la función de genes (Szittyá y col., 2003).

7.3 Nivel de supresión del gen *Chl* en diferentes Solanáceas inducido por VIGS ToMoV_ *Chl*.

El análisis de genes mediante el uso de VIGS ha sido ampliamente usado en una gran diversidad de especies de plantas (Robertson, 2004); sin embargo, solo se ha reportado el uso de un vector VIGS basado en un virus de ARN (TRV) en especies silvestres relacionadas con tomate como *S. peruvianum* (Senthil-Kumar y col., 2007). En este trabajo un nuevo VIGS se desarrolló con base en el virus ToMoV, el cual se seleccionó debido a que la infección fue sistemática y los

síntomas que se observaron en *S. peruvianum* y *S. habrochaites* fueron mínimos, lo cual permite analizar los efectos en el fenotipo de una posterior infección con otro patógeno, estas son características que se buscan en un virus que se desea usar como VIGS (Turnage y col., 2002). El diseño del VIGS con base en ToMoV, consistió en la eliminación de la mayor parte de CP, en donde además se generaron sitios de restricción con el objetivo de clonar el gen que se desea analizar su función. La infección con este vector, ToMoV Δ CP, se caracterizó por reducir o incluso no producir síntomas en las diferentes plantas de la familia Solanaceae. Se ha reportado que con la ausencia de el gen que codifica a CP en algunos virus, como CaLCuV y TGMV, ya no son infectivos (Robertson, 2004), lo que podría estar reduciendo la sintomatología causada por ToMoV Δ CP, ya que la modificación de la cápside afecta la producción de síntomas (Dawson y col., 1988). Adicionalmente, una de las ventajas que se tiene con la eliminación de la mayor parte del gen que codifica para CP, en un VIGS, es que éste virus ya no puede ser transmisible por su vector, en este caso la mosquita blanca (Robertson 2004), lo que confirma algunas de las funciones de la cápside, como la diseminación a través de su vector biológico (Callaway y col., 2001).

7.4 Bajas temperaturas inhiben el silenciamiento inducido por VIGS ToMoV.

El mecanismo de silenciamiento mediante siARN juega un papel importante en la defensa contra virus en plantas (Voinnet, 2001); sin embargo, este mecanismo se puede ver afectado por factores ambientales, ya que las interacciones planta-virus son fuertemente modificadas por estos factores, especialmente la temperatura (Hull, 2002). Por otro lado, también se ha reportado que el mecanismo de defensa a través del silenciamiento mediante ARN en plantas es temperatura dependiente. Donde a bajas temperaturas el silenciamiento es inhibido y la susceptibilidad al virus es incrementada, y en contraste el silenciamiento es activado al incrementar la temperatura, lo que explica el resultado que se obtuvo con las plantas inoculadas con ToMoV_*ChI* en invierno, sin embargo, se logró detectar la replicación del virus en hojas nuevas de las plantas, a pesar de que también se

reporta disminución dramática del nivel de virus a bajas temperaturas (Szittyta y col., 2003).

7.5 Efecto del silenciamiento del gen *SCEI* en *S. peruvianum* mediante el vector ToMoV.

El gen *SCEI* se seleccionó para su análisis funcional mediante VIGS, debido a que se ha reportado que la sumoilación juega un papel importante en la defensa y a que tuvo una sobre expresión ocho horas después de la infección con *Cmm* en *S. peruvianum* comparando con un nivel basal, sin mostrar cambio en la especie susceptible (*S. lycopersicum*), lo que sugiere un papel de respuesta de defensa temprana (Lara-Ávila y col., 2012). Los genotipos de *S. lycopersicum* son susceptibles a *Cmm*, contrariamente *S. peruvianum*, el cual muestra un nivel de resistencia alto a esta bacteria patógena (van Ooijen y col., 1994), por lo que es relevante el estudio de los genes que muestran una expresión diferencial ante la infección de un patógeno, entre especies susceptibles y resistentes, como lo son *S. lycopersicum* y *S. peruvianum*, respectivamente, ya que la especie resistente, representa una fuente de genes que podrían dar resistencia al tomate comercial, evitando las pérdidas ocasionadas por este patógeno. En las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con el vector de silenciamiento vacío, ToMoV Δ CP y retadas con *Cmm*, se observó únicamente muerte celular localizada, lo que se conoce como respuesta hipersensible, que se caracteriza por la muerte localizada en el sitio de infección, evitando la dispersión del patógeno (Zipfel, 2008; Boller y Yang He, 2009). Contrariamente plantas de la especie susceptible retadas con *Cmm* y las plantas de *S. peruvianum* inoculadas con ToMoV_*SCEI* y retadas con *Cmm* mostraron marchitamiento en la mayoría de sus hojas, incluso en algunos casos, el marchitamiento se mostró en la totalidad de la planta, representando un área del 70 al 100% de tejido dañado por la infección del patógeno. Esto nos puede sugerir que *SCEI* tiene un papel importante en la defensa contra patógenos. Adicionalmente, se observó correlación entre la carga bacteriana y los síntomas, ya que en las plantas inoculadas con el vector ToMoV Δ CP, la carga bacteriana fue mucho menor que la que se obtuvo en las plantas en las que se silenció el gen

SCEI y sobre todo en *S. lycopersicum*, siendo esta última la que presentó mayor carga bacteriana, obteniendo valores semejantes a los reportados para otros cultivares de *S. lycopersicum*, como cv. Moneymaker y *S. lycopersicum* cv. Jet Star. (Carlton y col., 1998; Sen y col., 2013).

La inmunidad innata de las plantas comienza con el reconocimiento del patógeno a través de PAMP's, lo que dispara la PTI (Schwessinger y Zipfel, 2008) o bien a través del reconocimiento de efectores secretados por el patógeno al interior de las células vegetales, disparando ETI. Esta última se relaciona con la respuesta hipersensible (HR) en el sitio de infección (Tsuda y Katagiri, 2010; Meng y Zhang, 2013). Los dos tipos de reconocimiento, PTI y ETI, inician vías de señalización comunes que difieren en longitud y amplitud, tales como la liberación de especies reactivas de oxígeno, mediante un estallido oxidativo, activación de factores de transcripción y MAPK cinasas, y la producción de hormonas vegetales (Chisholm y col., 2006). La necrosis localizada en el sitio de infección con *Cmm* en *S. peruvianum* sugiere que la HR y la ETI pueden estar involucradas como respuesta de defensa ante *Cmm*. Además en este estudio, las plantas de *S. peruvianum* en las que se silenció el gen SCEI, no mostraron muerte celular localizada en el sitio de infección con *Cmm*, observando un incremento de la carga bacteriana en comparación con las plantas no silenciadas, lo que sugiere que ETI podría estar comprometida por la disminución de la expresión del gen SCEI.

La sumoilación es un proceso clave en las plantas, ya que es una de las vías por las cuales se lleva a cabo la modificación de diversas proteínas, estas pueden estar implicadas en el transporte nuclear-citosólico, regulación transcripcional, apoptosis, estabilidad de proteínas, respuesta a estrés, entre otras (Yang y Sharrocks, 2006; Enserink, 2015). La importancia de sumoilación en ETI, se puede deducir a partir de estudios de efectores de determinados patógenos. Hotson y col., (2003) reportan que el efector XopD de *Xanthomonas campestris* pathovar *cesicatoria* (*Xcv*) funciona como una cistein-protesa con especificidad a sustratos-SUMO de plantas. Por otro lado, Roden y col. (2004), reportaron que el efector AvrXv4 de *Xcv* posee actividad SUMO isopeptidasa, sugiriendo que el sistema de

SUMO conjugación puede ser un objetivo clave para efectores de patógenos de plantas, por lo que algunos efectores de patógenos actúan hidrolizando proteínas SUMO conjugadas, alterando los eventos de señalización de defensa de la planta, permitiendo la infección por parte del patógeno (Hotson y col., 2003).

Varios estudios han sugerido que SUMO tienen un papel importante en las respuestas de defensa contra patógenos (Lois y col., 2003; Saracco y col., 2007; van den Burg y col., 2010). *SCEI* se ha reportado como uno de los genes de defensa temprana, ya que se ha visto el incremento de su expresión en varios trabajos (Pitzschke y col., 2009; van den Burg y Takken, 2010; Lara-Ávila y col., 2012). El aumento de la expresión del gen *SCEI* puede ser necesario en la inmunidad innata, ya que la señalización de MAP-cinasa y la sumoilación parecen converger para regular el mismo blanco, el cual participa en la señalización que controla la expresión de genes relacionados con defensa en la planta (Yang y Sharrocks, 2006; Miller y col., 2010). Las vías de señalización de defensa implican una serie de factores de transcripción tipo WRKY, muchos de los cuales han sido identificados como blancos de sumoilación después de su fosforilación por MAPK-cinasas, tales como WRKY3, WRKY4, WRKY6, WRKY33, WRKY72, entre otros. Estos factores de transcripción actúan en *Arabidopsis* como activadores o represores de la expresión de genes de defensa. Lo que nos sugiere que la conjugación de SUMO en estos factores de transcripción es relevante para la activación de la defensa en las plantas (Bethke y col., 2009; Popesco y col., 2009; Bhattarai y col., 2010; Miller y col., 2010; van den Burg y Takken, 2010). El silenciamiento del gen *SCEI* en *S. peruvianum* mediante el VIGS ToMoV, pudo haber alterado la sumoilación en factores de transcripción WRKY y otros blancos que participan en la señalización de defensa, permitiendo así la presencia de síntomas ocasionados por la infección con *Cmm*, lo cual no ocurre en las plantas inoculadas con el vector vacío, ToMoVΔCP.

Una de las primeras repuestas a infecciones bacterianas es la explosión oxidativa, mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo además, el proceso de sumoilación regulado por ROS (Zipfel y Robatzek, 2010; Park y col.,

2011). Por otro lado, la sobreexpresión de un gen SUMO en *Arabidopsis* resulta en la activación la señalización mediante ácido salicílico (SA) después de la infección con *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000, resultando en el incremento de la resistencia a este patógeno (Panstruga y col., 2009; van den Burg y col., 2010; Xiong y Wang, 2013). Por lo que el silenciamiento del gen *SCEI* en *S. peruvianum* podría haber interrumpido el mecanismo de sumoilación, lo que podría afectar el nivel de SA en respuesta a ROS, resultando en una disminución en la respuesta de defensa ante la infección de *Cmm*.

La susceptibilidad de *S. lycopersicum* a *Cmm*, no se debe a la ausencia del gen *SCEI*, sino probablemente a diferencia en las secuencias de regiones reguladoras que están presentes en especies resistentes. Algunas de las secuencias parciales de *S. peruvianum* tienen el 100% de identidad de nucleótidos con una secuencia de *S. lycopersicum* (Solyc02g093110) y una identidad menor con otros genes *SCEI* de *S. lycopersicum*. A pesar de la elevada identidad en regiones codificantes que presentan los genes de *SCEI*, Lara-Ávila muestra que son regulados de manera diferente después de la inoculación con *Cmm*, observando un incremento en el nivel de expresión de este gen en tiempos tempranos después de la infección en *S. peruvianum*, en contraste con la expresión observada en *S. lycopersicum*, donde no se observó ningún cambio en la expresión de este gen después de la infección. De tal forma que la regulación del gen *SCEI*, podría ser clave en la resistencia ante la infección con *Cmm* en plantas de tomate.

7.6 Análisis del sistema de silenciamiento con TRV en *S. peruvianum* y *S. habrochaites*.

El silenciamiento inducido por virus en plantas de tomate se ha logrado exitosamente en diferentes tejidos, como en hojas, raíz y fruto (Cai y col., 2007). El vector que más se ha reportado como VIGS en solanáceas es TRV (Liu, Schif y Kumar 2002; Liu y col., 2002a). Este vector se ha reportado como funcional en *S. peruvianum* (Cai y col., 2007), sin embargo, no se ha reportado el silenciamiento de *S. habrochaites*. Por lo que en este trabajo se evaluaron diferentes

concentraciones de *Agrobacterium* y diferentes temperaturas, logrando observar el silenciamiento del gen *PDS* en *S. peruvianum* bajo una temperatura de 21°C, pero no se logró el silenciamiento de este gen bajo las mismas condiciones en *S. habrochaites*; esto puede deberse a que dependiendo de la especie, existe una relación dependiente del tipo de silenciamiento que se este activando, pues se han demostrado dos tipos de silenciamiento ASGS (silenciamiento genético mediante antisentido), donde uno es inhibido a bajas temperaturas y otro es activado, también a bajas temperaturas, donde la primera comparte componentes con VIGS y PTGS, los cuales son sensibles a temperatura, mientras que el segundo, puede compartir elementos de la vía miRNA, lo cuales no son afectados por la temperatura (Sós-Hegedüs y col., 2005). Lo que puede explicar por qué después de someter a 14°C por toda la noche, plantas de *S. habrochaites* mostraron silenciamiento inducido por TRV, pues pudo haberse activado el mecanismo de silenciamiento ante estas condiciones.

Los resultados obtenidos en las plantas de tomate inoculadas con TRV_*PDRI* y retadas con *P. syringae* pv. *tomato* no mostraron alguna evidencia clara de que el gen en estudio esté involucrado con la defensa ante estos patógenos, sin embargo, esto pudo deberse al nivel de silenciamiento inducido por este vector (Robertson, 2004). De tal forma que se decidió usar ToMoV como vector de silenciamiento para el estudio del funcionamiento del gen *PDRI* en *S. habrochaites*.

7.7 Efecto del silenciamiento del gen *PDRI* en *S. habrochaites* mediante el vector ToMoV.

En las plantas de *S. habrochaites* inoculadas con el vector de silenciamiento vacío, ToMoV Δ CP y retadas con *Cmm*, se observó muerte celular localizada en el sitio donde se llevó acabo la infección con *Cmm*. Lo que se conoce como respuesta hipersensible, esta misma respuesta se observó en las plantas de *S. peruvianum* en las que se silenció el gen *SCEI* (Zipfel, 2008; Boller y Yang He, 2009). Sin embargo, en las plantas en las que se silenció el gen *PDRI* y las

plantas susceptibles, retadas con *Cmm* mostraron chancro en el tallo, el cual se extendió mas allá del sitio de infección, seguido además del marchitamiento en las hojas cercanas al sitio de infección. Este es uno de los síntomas ocasionados por *Cmm* (Eichenlaub y Gartemann, 2011). Sin embargo, no se obtuvo diferencia significativa entre el daño presente en las plantas silenciadas y las usadas como control, las cuales se inocularon con el vector vacío, esto nos podría sugerir que se requieren otros factores junto con el gen *PDR1*, para poder tener una respuesta de defensa eficiente ante patógenos.

El incremento en la carga bacteriana y el incremento en el área de daño, aunque esta última no es significativa estadísticamente, sugiere que el gen *PDR1* podría estar interviniendo en la defensa, pues se ha mostrado que después de la infección con patógenos como *Pseudomonas syringar* pv. se observa un incremento en la expresión de este gen (van den Brûle y Smart, 2002; Stukkens y col., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que este gen está relacionado con la inducción del ácido jasmónico, por lo que al silenciar este gen se estaría afectando la producción eficiente de esta hormona y con ello se estaría afectando los mecanismos de regulación que desencadena la respuesta de defensa efectiva (Bari y Jones, 2009).

En plantas transgénicas de *Nicotiana plumbaginifolia*, se observó que al interrumpir la expresión del gen *PDR1*, mediante su silenciamiento, la susceptibilidad a *B. cinerea*, fue mayor, lo que demostró que este gen pudiera estar relacionado con la resistencia a este patógeno, sin embargo, en este trabajo, los resultados que se obtuvieron en las plantas de *S. lycopersicum* cv Tiny Tim, no se logró ver mayor susceptibilidad ante este mismo patógeno, después del silenciamiento con TRV, lo que pudiera deberse al nivel de silenciamiento en esta especie que se tienen con este vector (Stukkens y col., 2005).

8 Resumen de Resultados

Especies silvestres como *S. peruvianum* y *S. habrochaites* relacionadas al tomate comercial, presentan resistencia a *Cmm*; sin embargo esta se ve reducida al

silenciar genes presuntamente involucrados en la defensa contra patógenos, lo que nos permite plantear perspectivas relacionadas a la obtención de un cultivo de tomate que presente resistencia a éste patógeno.

El silenciamiento de genes mediante VIGS es una alternativa rápida y eficiente para el análisis de la función de genes. En este trabajo se demostró que ToMoV es un virus capaz de infectar diferentes especies de la familia Solanaceae y que puede ser usado como VIGS, incluso en especies silvestres relacionadas con el tomate, que no habían sido reportadas con anterioridad en el estudio de la función de genes mediante VIGS. La funcionalidad de este virus como VIGS se demostró con el fenotipo de blanqueamiento observado al silenciar el gen de quelatasa. Una ventaja de este vector es que es funcional a temperaturas mayores a 22°C, incluso a 36°C, por lo que es posible el análisis de genes en lugares donde aun no se tiene la infraestructura de regular la temperatura, sin embargo no lo es a temperaturas menores a los 17°C. Otra ventaja de este vector es que al eliminar la mayor parte de CP los síntomas que pudiera ocasionar ToMoV son ampliamente reducidos o incluso nulos, por lo que al analizar la función de un gen en la planta, el efecto que se observe será resultado de la ausencia de la función del gen de interés.

El silenciamiento del gen *SCEI* fue de 0.61 comparado con las plantas inoculadas con ToMoV Δ CP, en donde la expresión del gen en estas plantas, fue normalizada a 1. El silenciamiento de este gen en plantas de *S. peruvianum* no mostro un fenotipo aberrante comparado con la planta usada como control, esto nos permite asumir que este gen no es esencial. Por otro lado, las plantas de *S. peruvianum* en las que solo se inoculo ToMoV Δ CP y se retaron con *Cmm*, muestran una respuesta de defensa HR. Sin embargo en las plantas en las que se silenció el gen y posteriormente se retó con *Cmm*, mostraron síntomas relacionados con el patógeno, el área de daños observados resultaron ser de alrededor del 88% del total del área de las plantas, comparado con el 18% del área de las plantas inoculadas con el vector vacio, lo que nos sugiere la posible función de este gen en la defensa contra *Cmm*. Es posible que el proceso de sumoilación este

participando en la modificación de factores de transcripción tipo WRKY, involucrados en la activación de genes de defensa; sin embargo es relevante mencionar que la regulación de este gen es un punto clave para la función de defensa que podría tener este gen en *S. lycopersicum* ante la infección con *Cmm*.

El vector TRV es funcional en *S. peruvianum* usando una concentración de 2×10^9 células/mL, al mantener las plantas infiltradas a 21°C, sin embargo el silenciamiento con este vector en *S. habrochaites* solo es eficiente, si las plantas se someten a 14°C después de la infiltración por toda la noche y posteriormente se mantienen a 21°C. Pero a pesar de que este vector es funcional en *S. habrochaites*, el silenciamiento obtenido con ToMoV en esta especie es más intenso, por lo que el análisis de la función de un gen podría ser mas eficiente usando ToMoV, tal como se realizo en este trabajo para el gen *PDRI*.

El silenciamiento del gen *PDRI* con el vector de silenciamiento ToMoV, fue de 0.16, comparadas con las plantas inoculadas con el vector vacio en plantas de *S. habrochaites*, en donde la expresión del gen en estas plantas, fue normalizada a 1; sin embargo el daño observado en las plantas, después del reto con *Cmm*, solo fue de un área de 25% de las plantas inoculadas con ToMoV_*PDRI* contra el 15% del área de la plantas inoculadas con ToMoV Δ CP.

Los resultados obtenidos en las plantas de tomate inoculadas con TRV_*PDRI* y retadas con *P. syringae* pv. *tomato*, *B.cinerea* y *A. solani* no mostraron evidencia de que el silenciamiento de este gen pudiera estar relacionado con un incremento en la susceptibilidad ante este patógeno, por lo que esto puede deberse al nivel de silenciamiento inducido por este vector.

9 Conclusión

El silenciamiento de genes mediante VIGS es una alternativa rápida y eficiente para el análisis de la función de genes

El virus moteado del tomate, ToMoV, puede ser usado como vector de silenciamiento para el análisis de la función de genes, a temperaturas mayores a 22°C en diferentes Solanáceas.

El nivel de silenciamiento del gen a analizar depende de la especie en la que se evalúa el gen.

El silenciamiento del gen *SCEI* en *S. peruvianum* no genera un fenotipo aberrante al compararlo con las plantas control.

La disminución de la expresión del gen *SCEI* en *S. peruvianum* LA2172, incrementa la severidad de los síntomas característicos de *Cmm*, posterior a la infección con este patógeno. Lo que nos sugiere la posible función de defensa, de éste gen, ante *Cmm*.

Es posible que el proceso de sumoilación participe en la modificación de factores de transcripción tipo WRKY, involucrados en la activación de genes de defensa.

El uso del vector TRV funciona como vector de silenciamiento para el análisis de la función de genes en *S. peruvianum* y *S. habrochaites* dependiendo de la concentración de *Agrobacterium* y de la temperatura de incubación posterior a la infiltración.

El silenciamiento del gen *PDRI* en *S. peruvianum* y *S. habrochaites*, resultó en un leve incremento en el grado de susceptibilidad a *Cmm*, sin tener un valor estadístico significativo.

10 Referencias

- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 601-611.
- Anckar J, Sistonen L (2007). SUMO: getting it on. *Biochem Soc. T.* 35: 1409-1413.
- Arie T, Takahashi H, Kodama M, Teraoka T (2007). Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnol.* 24: 135-147.
- Arwiyanto T, Sakata K, Goto M, Tsuyumo S, Takikawa Y (1994). Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60:288-294.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science.* 276: 726-733.
- Balaji V, Mayrose M, Sherf O, Jacob-Hirsch J, Eichenlaub R, Iraki N, Manulis-Sasson S, Rechavi G, Barash I, Sessa G (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol.* 146: 1797-1809.
- Balaji V, Sessa G, Smart C.D (2010). Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana bethamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology.* 101:349-357.
- Barboa F, Rueda P, Acedo F, Ponce J F, Cruz F, Grimaldo J, García O (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (4) 319-326.
- Bari R y Jones J (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69:473-488.
- Bent AF y Mackey D (2007) Elicitors, Effectors, and R genes: The new paradigm and a life time supply of Questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 399-436.
- Bermpohl A, Dreier J, Bahro R, Eichenlaub R (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol Res.* 151: 391-399.
- Berndsen CE y Wolberger C (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol Biol.* 21(4): 301-307.
- Bethke G, Unthan T, Uhrig JF, Pöschl Y, Gust AA, Scheel D, Lee J (2009). FLg22 regulates the release of ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 16: 8067-8072.
- Bhattarai KK, Atamian HS, Kaloshian I, Eugelm T (2010). WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. *Plant J.* 63:229-240.

- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T (2000). Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *P. Nat. Acad Sci.* 97: 5322-5327.
- Boggio R y Chiocca S (2006). Viruses and Sumoylation: recent highlights. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:430-436.
- Boller T y Yang He S (2009). Innate Immunity in Plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants end effectors in microbial pathognes. *MPMI.* 324: 742-743. DOI: 10.1126
- Brigneti G, Martín-Hernandez A, Jin H, Chen J, Baulcombe D, Baker B, Jones J (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* 39:264-272.
- Burch-Smith T, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.* 39: 734-746.
- Burger A, Gräfen I, Engemann J, Niermann E, Pieper M, Kirchner O, Gartemann K-H, Eichenlaub R (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol Res.* 160:417-427.
- Cai X, Wang C, Xu Y, Xu Q, Zheng Z, Zhou X (2007). Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Res.* 125:169-175.
- Calis Ö, Bayan Y, Celik D (2012). Characterization of resistant tomato mutants to bacterial canker disease. *Afr.J. Biotechnol.* 11: 8070-8075.
- Callaway A, Giesman-Cookmeyer D, Gillock E T, Sit T L, Lommel S A (2001). The multifunctional capsid protein of plant RNA Virus. *Annu. Rev. Phytophatol* 39: 419-460.
- Carlton W M, Braun E J, Gleason M L (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Tomato leaves through hydathodes. *Phytopathol.* 88:525- 529.
- Castillo AG, Kong LJ, Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER (2004). Interaction between a Geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J. Virol* 78(6): 2758-2769.
- Canik ES, Fukunaga R, Lu G, Dutcher R, Wang Y, Tanaka Hall TM, Zamore PD (2011). Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven rinobuclease. *Mol Cell.* 42: 172-184.
- Chalupowicz L, Cohen-Kandli M, Dror O, Eichenlaub R, Gartemann KH, Sessa G, Barash I, Manulis-Sasson S (2010). Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 3:252-261.
- Chicas A y Macino G (2001). Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO Rep.* 2: 992-996.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006). Host-Microbe interactions: Shaping the evolution of he plant immune response. *Cell.* 124: 803-814.
- Cordero M, Ramos P, Hernández L, Fernández A, Echemendía A, Peral R, González G, García D, Valdés S, Estevéz A, Hernández K (2003). Identification of *Tomato Mottle Taino Begomovirus* Strains in Cuban Potato Fields. *Phytoparasitica.* 31 (5): 478-489.

- Dawson W O, Bubrick P, Grantham G L (1988). Modifications of Tobacco Mosaic Virus coat protein gene affecting replication, movement and symptomatology. *Mol. Plant Pathol.* 78: 783-789.
- De Souza AJ, Januzzi BM, Alves FA, Filho M (2007). Gene Silencing: Concepts, applications and perspectives in woodyplants. *Sci Agric* 64(6): 645-656.
- Dell Amico JM, Morales D, Polón R, Fernández F (2006). Respuestas adaptativas a la sequía en el tomate inducidas por osmocondicionamiento de plántulas. *Cult Trop.*27 (4): 33-38.
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J (1983). A plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Dorokhov YL (2007). Gene silencing in Plant. *Mol. Biol.* 41 (4):579-592.
- Dreier J, Meletzus D, Eichenlaub R (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *MPMI.* 10: 195-206.
- Eamens AL y Watwhouse PM (2011). Vectors and methods for hairpin RNA and artificial microRNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Mol. Biol.* 701: 179-197.
- Eichenlaub R, Gartemann K.-H, Burger A (2006). *Clavibacter michiganensis*, a group Gram-positive phytopathogenic bacteria. *Plant-Associated Bacteria.* 385-421.
- Eichenlaub R y Gartemann KH (2011). The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu.Rev. Phytopathol* 49:445-464.
- Enserink JM (2015). SUMO and the cellular stress response. *Cell. Div.* 10:4.
- Escaff M, Gil P, Ferreyra R, Estay P, Bruna A, Maldonado P, Barrera C (2005). Cultivo del tomate bajo invernadero. *Boletín INIA No 128.* Chile. 79 Pp.
- Fischetti VA (2008). Bacteriophages lysins as effective antibacterials. *Curr. Opin Microbiol* 11:393-400.
- Flügel M, Becker A, Gartemann K-H, Eichenlaub R (2012). Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *J. Biotechnology.* 160: 42-54.
- Francis I, Holsters M, Vereecke D (2010). The gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environ Microbiol* 12: 1-12.
- Fu D, Zhu B, Zhu H, Jiang W, Luo Y (2005). Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J.* 43:299-308.
- Gartemann K-H, Abt B, Bekel T, Burger A, Engemann J, Flügel M, Gaigalat L, Goesmann A, Graffen I, Kalinowski J, Kaup O, Kirchner O, Krause L, Linke B, McHardy A, Meyer F, Phole S, Rückert C, Chneiker S, Zellermann E-M, Pühler A, Eichenlaub R, Kaiser O, Bartels D (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 Reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol.* 190: 2138-2149.

- Gartemann K-H, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R, Burger A (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.* 106: 179-191.
- Gregorio-Jorge J, Bernal-Alcocer A, Bañuelos-Hernández B, Alpuche-Solís AG, Hernández-Zepeda C, Moreno-Valenzuela O, Frías-Treviño G, Argürillo-Astorga GR (2010). Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomovirus with short Rep sequences in DNA-B intergenic region. *Virology J.* 7:275-290.
- Gutierrez C (2002). Strategies of geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiol Mol Plant P.* 60(5): 219-230.
- Hamilton WDO, Stein VE, Coutts RHA, Buck KW (1984). Complete nucleotide sequence of the infectious cloned DNA components of tomato golden mosaic virus: Potential coding regions and regulatory sequence. *EMBO J.* 3:2197-205.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK, Moreno-Valenzuela OA (2007). Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathol.* 56: 763-770.
- Hill JE, Strandberg JO, Hiebert E, Lazarowitz SG (1998). Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: implications for bipartite geminivirus evolution and movement. *Virology.* 250:283-92.
- Horiguchi G (2004). RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. *Differentiation.* 72: 65-73.
- Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett M B (2003). *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in plant. *Mol. Microbiol.* 50: 377-389.
- Hull R. (2002). Matthews' Plant Virology. Academic Press, San Diego, CA.
- Jahr H, Bahro R, Burger A, Ahlemeyer J, Eichenlaub R(1999). Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environ Microbiol.* 1: 113-118.
- Jiménez RM (1992). Conceptos actuales sobre la resistencia a las enfermedades de las plantas. *Phytoma.* 38: 51-54.
- Jones JB (2005). Tomato plant culture: The field, greenhouse and home garden. *CRC Press.* U.S.A. 224 Pp.
- Jones JDG y Dangl JL (2006). The plant Immune system. *Nat. Rev.* 444-16: 323-329. doi:10.1038
- Kabelka E, Franchino B, Francis DM (2002). Two loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 confer resistance to strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopatology.* 92:504-510.
- Kaup O, Gräfen I, Zellermann E-M, Eichenlaub R, Gartemann K-H (2005). Identification of tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibactermichiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *MPMI.*, 18: 1090-1098.

- Keddie JS, Carroll B, Jones JDG, Gruissem W (1996). The DCL gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO J.* 15:4208-4217.
- Kurepa J, Walker J M, Smalle J, Gosink M M, Davis S J, Durham T L, Sung D-Y, Vierstra R D (2003). The small Ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 278: 6862-6872.
- Kwon C, Bednarek P, Schulze-Lefert P (2008). Secretory Pathways in Plant Immune responses. *Plant Physiol.* 147: 1575-1583.
- Lara-Ávila P, Isordia-Jasso I, Castillo-Collazo R, Simpson J, Alpuche-Solis A (2012). Gene expression analysis during Interaction of Tomato and Related Wild Species with *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30:498-511.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar S P (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31: 777-786.
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* 30(4):415-429.
- Lois ML, Lima CD, Chua NH (2003). Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 15: 1347-1359.
- Long J (2001). Una semblanza de las Solanaceae. *EtnoBiol.* 1:18-24.
- Lorenzo O y Solano R (2005). Señalización de ácido jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal. net.*1: 1-16.
- Madriz K (2002): Mecanismos de defensas interacciones planta-patógeno. *Mejora integrado de plagas*, 63: 22-32.
- Martínez de Alba AE, Elvira-Matlot E, Vauvheret H (2013). Gene silencing in plants: A diversity of pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 1829: 1300-1308.
- Matzke MA y Matzke AJM (2004). Planting the seeds of a New Paradigm. *PLoS Biology* 2:0583-0586.
- McKinney H (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands. *J. Agric. Reserch.* 39. 557-578.
- Meister G y Tuschl T (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Publishing Group.*43:343-349.
- Meng X y Zhang S (2013). MAPK cascades in plant in disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol.* 51: 245-266.
- Miller MJ, Barrett-Wilt GA, Hua Z, Vierstra RD (2010). Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 16512-16517.
- Miura K y Hasegawa PM (2010). Sumoylation and other ubiquitin-like post-translation modifications in plants. *Cell.* 20: 223-232.
- Mysore KS y Ryu CM (2004). Nonhost resistance: how much do we know?. *Trends Plant Sci.* 9:97-104.

- Napoli C, Lemieux Ch, Jorgensen R (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*. *Plant Cell*. 2: 279-289.
- Novatchkova M, Tomanov K, Hoffman K, Stubble H P, Bachmair A (2012). Update on sumoylation: defining core components of the plant SUMO conjugation system by phylogenetic comparison. *New Phytologist*. 195:23-31.
- Nuez F (1995). El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa GRAFO S.A-Bilbao. Españ. 797pp.
- Panstruga R, Parker J, Schulze-Lefert. P (2009). Snap-Shot: Plant Immune Response Pathways. *Cell*. Germany. 136Pp.
- Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CO (2007). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol* 104: 1-13.
- Park H J, Kim W Y, Park H C, Lee S Y, Bohnert H J, Yun D J (2011). SUMO and SUMOylation in plants. *Mol. Cell*. 32: 305-316.
- Pattanayak D, Solanke AU, Kumar PA (2013). Plant RNA interference pathways: Diversity in function, similarity in action. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 31:493-506.
- Pérez J, Hurtado G, Aparicio V, Argueta Q, Larín M. A (2000). Guía Técnica Cultivo de tomate. *CENTA*. El Salvador. 48 Pp.
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H (2009). MAPK cascade signaling networks in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:421-426.
- Ploeg V. D y Heuvelink E (2005). Influence of sub-optimal temperature on tomato growth and yield: a review. *J. Hortic SCI Biot.* 80: 652-659.
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2009). MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* 23:80-92.
- Rea P (2007). Plant ATP-Binding Cassette Transporters. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 58:347-375.
- Robertson D (2004). VIGS Vector for gene silencing: many targets, many tools. *Annu Rev Plant Biol.* 55:495-519.
- Roden J, Eardley L, Hotson A, Cao Y, Mudgett M B (2004). Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector a SUMO protease translocated into plant cells. *MPMI*. 7: 633-643.
- Rodríguez-Negrete E, Carrillo-Trip J, Rivera-Bustamante R (2009). RNA Silencing against Geminivirus: Complementary action of Posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host Recovery. *J Virol.* 83:1332-1340.
- Roldan-Arjona T, Pérez-Espinosa A, Ruíz-Rubio M (1999). Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Mol Plant-Microbe Interact.*12: 852-861.
- Ruiz J, Vicente A, Montáñez J C, Rodríguez R, Aguilar (2012). Un tesoro percedero en México: el tomate, tecnologías para prolongar su vida en anaquel. *Invest. Cien.* 54: 57-63.

- Saracco S A, Miller M J, Kurepa J, Vierstra R D (2007). Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol.* 145:119-134.
- Schwessinger B, Zipfel C (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 389-395.
- Sen Y, Feng Z, Vandenbroucke H, Van der Wolf J, Visser RGF, Van-Heusden AW (2013). Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica* 190: 309-317.
- Senthil-Kumar M y Mysore KS (2011). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sc* 16 (12): 1360-1385.
- Senthil-Kumar M, Hema R, Anand A, Kang L, Udayakumar M, Mysore K S (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.
- Senthil-Kumar M, Rame-Gowda HV, Hema R, Mysore KS, Udayakumar M (2008). Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance. *J.Plant Physiol.* 165 (13): 1404-1421.
- Shimada-Beltrán H y Rivera-Bustamante RF (2007). Early and late gene expression in pepper huasteco yellow vein virus. *J. Gen Virol.* 88:3145-53.
- Sims WL (1980). History of tomato production for industry around the world. *Acta Hortic.* 100: 25.
- Soo-Park B, Soo-Seo H (2008). Roles of SUMO in plants. *J. Crop. Sci. Biotech.* 11(1) : 1-6.
- Sós-Hegedüs A, Lovas Á, Kondrák M, Kovács G, Bánfalvi Z (2005). Active RNA silencing at low temperature indicates distinct pathways for antisense-mediated gene-silencing in potato. *Plan Mol. Biol.* 59:595-602.
- Stork I, Gartemann K-H, Burger A, Eichenlaub R (2008). A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: *chpC* plays a role in colonization of the host plant tomato. *Mol Plant Pathol.* 9: 599-608.
- Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M. (2005). NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol.* 139(1):341-352.
- Szittyá G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyán J (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* 22(3):633-640.
- Tsuda K, Katagiri F (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 495-465.
- Turnage MA, Muangsan N, Peele CG, Robertson D (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30(1):107-114.

- Tuttle JR, Idris AM, Brown JK, Haigler CH, Robertson D (2008). Geminivirus-mediated gene silencing from Cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiol* 148: 41-50.
- Vallad GE y Goodman RM (2004). Systematic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44: 1920-1934.
- van den Brûle S y Smart C (2002). The Plant PDR family of ABC transporters. *Planta.* 216: 95-106.
- van den Burg HA, Kini RK, Schuurink RC, Takken FL (2010). *Arabidopsis* Small ubiquitin-like modifier paralogs have distinct functions in development and defense. *Plant Cell.* 22:1998-2016
- van den Burg HA y Takken FLW (2010). SUMO-MAPK and resistance protein-signaling converge at transcription complex that regulate plant innate immunity. *Plant. Signal. Behav. Add.* 5:1597-1601.
- van der-Linde K, Kastner C, Kumlehn J, Kahmann R, Doehlemann G (2011). Systemic virus-induced gene silencing allows functional characterization of maize gene during biotrophic interaction with *Ustilago maydis*. *New Phytol.* 198:471-483.
- van-Heusden AW, Koornneef M, Voorrips RE, Brüggemann W, Pet G, Vrieling-van Ginkel R, ChenX, Lindhout P (1999). Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibactermichiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor Appl Genet.* 99: 1068-1074.
- Van Ooijen JW, Sandbrink JM, Vrieling M, Verker R, Zabel P, Lindhout P (1994). An RFLP linkage map of *Lycopersicon peruvianum*. *Theor Appl Genet.* 89: 1007-1013.
- Varsani A, Navas-Castillo J, Moriones E, Hernández-Zepeda C, Idris A, Brown JK, Murilo Zerbini F, Martin DP (2014) Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch Virol.* 159(8):2193-203.
- Vaucheret H, Béclin C, FAgard M (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sc,* 114: 3083-3091.
- Verger A, Perdonomo J, Crossley M (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO* 4: 137-142.
- Vermeulen T, Schoonbeek H, De Waard MA (2001). The ABC transporter Bcatr B from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Pest Manage Sci.* 57: 393-402.
- Voinnet O (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends. Genet.* 17:449-459.
- Waterhouse PM, Wang M, Lough T (2001). Gene silencing as an adaptative defense against viruses. *Insight Review art.* 411: 834- 842.
- Wittmann J, Eichenlaub R, Dreiseikelmanr B (2010). The endolysins of bacteriophages CMP1 and CN77 are specific for the lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. *Microbiology.* 156: 2366-2373.
- Xia Y (2004). Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cell. Microbiol.* 6:905-913.

- Xiong R, Wang A (2013). SCEI, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with NIb, the RNA-dependent RNA polymerase of turnip mosaic virus, is required for viral infection. *J. Virol.* 87: 4704-4715.
- Xu X, Miller S A, Baysal-Gurel F, Gartemann KH, Eichenlaub R, Rajashekara G (2010). Bioluminescent imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds in plants. *Appl Environ Microbiol.* 12: 3978-88.
- Yang SH, Sharrocks AD (2006). "Interplay of the SUMO and MAPK kinase pathways" in The Histone code and beyond. Ed. Berger SL, Nakanishi O, Haendler B (Grenoble, France:ESRF press), pp.193-209.
- Zhu X, Pattathil S, Mazumder K, Brehm A, Hahn MG, Dinesh-Kumar SP, Chandrashekhar PJ, (2010). Virus-induced gene silencing offers a functional genomics platform for studying plant cell wall formation. *Mol. Plant* 3:818-833.
- Zipfel C (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol* 20: 10-16.
- Zipfel C y Robatzek S (2010). Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: Veni, Vidi...?. *Plant. Physiol.* 154:551-554.
- Zuñiga-Vega C y Ramírez P (2002). Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica) 64:25-33.

11 Anexo I. Artículo publicado



ORIGINAL RESEARCH
published: 17 December 2015
doi: 10.3389/fpls.2015.01019



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

OPEN ACCESS

Mayra J. Esparza-Araiza¹, Bernardo Bañuelos-Hernández¹, Gerardo R. Argüello-Astorga¹, José P. Lara-Ávila², Paul H. Goodwin³, María I. Isordia-Jasso¹, Rosalba Castillo-Collazo¹, Alejandra Rougon-Cardoso⁴ and Ángel G. Alpuche-Solis^{1*}

Edited by:
Libo Shan,
Texas A&M University, USA

Reviewed by:
Ramesh Raina,
Syracuse University, USA

Lei Zhang,
North Carolina State University, USA

*Correspondence:
Ángel G. Alpuche-Solis
alpuche@ipicyt.edu.mx

Specialty section:
This article was submitted to
Plant-Beet Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 09 August 2015
Accepted: 04 November 2015
Published: 17 December 2015

Citation:
Esparza-Araiza MJ,
Bañuelos-Hernández B,
Argüello-Astorga GR, Lara-Ávila JP,
Goodwin PH, Isordia-Jasso MI,
Castillo-Collazo R, Rougon-Cardoso A
and Alpuche-Solis 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. 6:1019.
doi: 10.3389/fpls.2015.01019

¹División Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis Potosí, México, ²Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis, San Luis Potosí, México, ³School of Environmental Sciences, University of Guelph, Guelph, ON, Canada, ⁴Laboratory of Agrogenomic Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, ENES-León, León, México

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) causes bacterial wilt and canker of tomato. Currently, no *Solanum lycopersicum* resistant varieties are commercially available, but some degree of Cmm resistance has been identified in *Solanum peruvianum*. Previous research showed up-regulation of a SUMO E2 conjugating enzyme (SCEI) transcript in *S. peruvianum* compared to *S. lycopersicum* following infection with Cmm. In order to test the role of SCEI in resistance to Cmm, a fragment of SCEI from *S. peruvianum* was cloned into a novel virus-induced gene-silencing (VIGS) vector based on the geminivirus, Tomato Mottle Virus (ToMoV). Using biolistic inoculation, the ToMoV-based VIGS vector was shown to be effective in *S. peruvianum* by silencing the magnesium chelatase gene, resulting in leaf bleaching. VIGS with the ToMoV_SCEI construct resulted in ~61% silencing of SCEI in leaves of *S. peruvianum* as determined by quantitative RT-PCR. The SCEI-silenced plants showed unilateral wilting (15 dpi) and subsequent death (20 dpi) of the entire plant after Cmm inoculation, whereas the empty vector-treated plants only showed wilting in the Cmm-inoculated leaf. The SCEI-silenced plants showed higher Cmm colonization and an average of 4.5 times more damaged tissue compared to the empty vector control plants. SCEI appears to play an important role in the innate immunity of *S. peruvianum* against Cmm, perhaps through the regulation of transcription factors, leading to expression of proteins involved in salicylic acid-dependent defense responses.

Keywords: SUMO-conjugating enzyme, virus-induced gene-silencing, Tomato Mottle Virus, bacterial canker, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

El presente artículo fue publicado en la modalidad de acceso abierto en
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.01019>

INTRODUCTION

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) is a Gram-positive plant bacterial pathogen belonging to the order Actinomycetales in family Microbacteraceae (Gartemann et al., 2008). It is the causal agent of bacterial wilt and canker of tomato (*Solanum lycopersicum*), which occurs worldwide (Eichenlaub and Gartemann, 2011). Bacterial wilt and canker has been reported to cause losses of tomato production as high as 84% in the U.S.A. and Canada (Strider, 1969; Gleason et al., 1993). Cmm can infect through wounds entering the xylem vessels producing enzymes, such as, endocellulases, polygalacturonases, pectin methylsterases, xylanases, serine proteases, and endo-1,4-glycosidases, that render the xylem non-functional (Carlton et al., 1998; Jahr et al., 1999, 2000). The symptoms begin as a unilateral wilting of leaves, followed by a generalized wilting of all the leaves and the cankers development on the stem. Cankers on young plants are particularly damaging as they can result in plant death. Cmm also infects fruit, which results in necrotic spots called bird's eyes (Gartemann et al., 2003).

Control of bacterial canker is difficult. Antibiotics are effective but can lead to selection of resistant bacterial populations (Strider, 1969; Gartemann et al., 2003). Cultural control can be achieved using certified disease-free seeds and strict hygienic measures, such as the removal and destruction of infected plants and compost biofumigation with compost (Gartemann et al., 2003). However, resistance is a desirable trait. Although there are no Cmm-resistant tomato cultivars commercially available, resistance has been identified in several wild tomato species, such as *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, and *S. habrochaites* (van Heusden et al., 1999; Kabelka et al., 2002; Coaker and Francis, 2004).

Using cDNA-AFLP analysis, a number of genes were found that were up-regulated in Cmm resistant *S. peruvianum* in comparison to Cmm susceptible *S. lycopersicum* plants following inoculation with Cmm (Lara-Ávila et al., 2012). One of those genes was the SUMO E2 conjugating enzyme SCE1 (SCE1), which encodes an enzyme involved in protein modification through sumoylation, which is a post-translational modification that covalently conjugates the small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein to lysines on target proteins. Proteins labeled with SUMO are then modified by the addition of small chemical groups, such as sugars and lipids or by the covalent attachment of other proteins. Sumoylation is a multistep process mediated by E1 (SUMO activating enzyme), then E2 SCE1 (SUMO conjugating enzyme) and finally E3 (SUMO ligase) (Berndsen and Wolberger, 2014).

SCE1 has been shown to increase during plant-pathogen interactions. Expression of SCE1 increased during *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) infection of tomato plants, along with several hormones, such as salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), which are key signaling molecules in innate immunity (Miura and Hasegawa, 2010; van den Burg et al., 2010; Park et al., 2011). Overexpression of SCE1 in *Arabidopsis* did not have obvious effects on plant development but increased expression of abscisic acid (ABA)-responsive genes following ABA treatment. ABA is also linked to innate immunity through its positive

effects on callose deposition (Lois et al., 2003). In addition, SCE1 promotes SUMO conjugation, which affects innate immunity due to its involvement in SA-dependent resistance to bacterial pathogens (van den Burg et al., 2010; Park et al., 2011). Also some pathogen effectors, which suppress innate immunity, such as AvrBst of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, act as desumoylation enzymes, indicating a link between sumoylation and innate immunity (Xia, 2004).

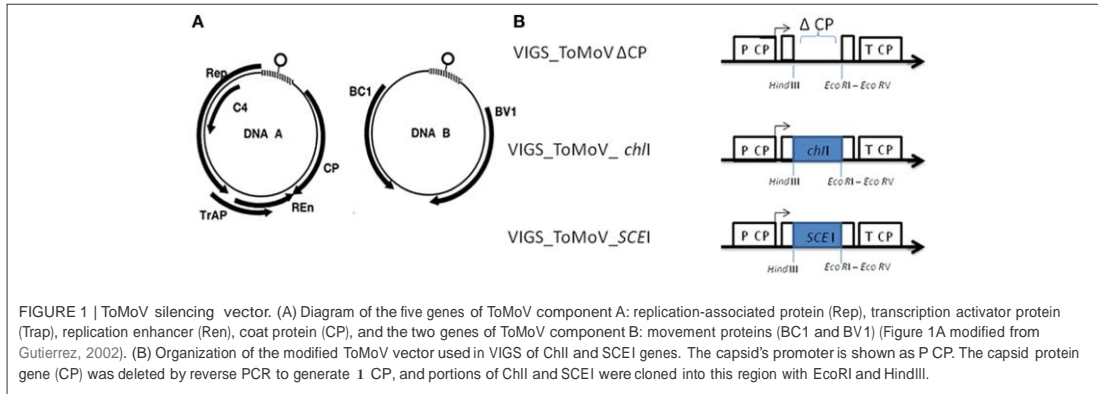
One approach to evaluate the role of SCE1 and sumoylation in plant disease resistance is to down-regulate its expression. Virus-induced gene silencing (VIGS) involves the production of dsRNA that directs DICER complexes for degradation of desired sequences resulting in effective plant gene silencing (Liu et al., 2002; Robertson, 2004; Galun, 2005; Cai et al., 2007). In this study, a novel VIGS vector was developed for wild tomato species by modifying a Tomato Mottle Virus (ToMoV), which is a Begomovirus that infects many wild tomato species, such as *S. peruvianum* (Polston et al., 1993) and *S. habrochaites*, and does not cause a drastic phenotypic effect on either of those species (Esparza-Araiza et al., unpublished). ToMoV contains two single-stranded circular DNAs (DNA A and B). DNA A has the genes Rep for virus replication, C4 for infectivity and suppression of posttranscriptional gene silencing, Trap for transactivation of BC1 and BV1, Ren for increased multiplication efficiency and CP for viral capsid. DNA B has the genes BC1 and BV1 for viral movement (Jeske, 2009) (**Figure 1**).

The goals of this study were to determine the effectiveness of a modified ToMoV vector for VIGS in *S. peruvianum* and to use the modified ToMoV as a vector for VIGS of SCE1. The effectiveness of a modified ToMoV VIGS vector was demonstrated by silencing a magnesium chelatase gene (ChlI) since its silencing causes leaf bleaching due to the suppression of the magnesium chelatase complex which is required for chlorophyll production (Cai et al., 2007). A portion of the SCE1 gene from *S. peruvianum* was cloned into the modified ToMoV vector, introduced into *S. peruvianum* by particle bombardment, and then the SCE1-silenced plants were evaluated for their degree of resistance to Cmm.

MATERIALS AND METHODS

Virus, Bacterial Strain, Plant Material, Inoculum, and Challenge Procedure

The sequence of ToMoV was obtained from a strain isolated from tomato leaves in Florida, USA in 2003 (GenBank accession nos. NC_00193 and NC_001939). Strain 1387 of Cmm was isolated from a commercial tomato field near Queretaro, Mexico in 2012 by J. P. Lara-Avila, Universidad Autonoma de San Luis Potosi, MX. Cmm was grown in 802 medium broth (polypeptone 1 g L⁻¹, yeast extract 2 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.92 g L⁻¹) at 28°C for 48 h shaking at 190 rpm. The bacterial suspension was diluted to 5 × 10⁷ CFU/mL⁻¹ (A₆₂₀ = 0.2), and 0.5 mL was injected with an insulin syringe into the lower side of the first true leaves of 2 month-old of *S. peruvianum*. Seeds of *S. peruvianum* accession LA2172 were obtained from Tomato Genetics Resources Center, Davis, California, and seeds of *S.*



lycopersicum cv. Ailsa Craig were obtained from the University of Nottingham, UK. Plants were grown in a commercial soil mixture substrate (Sunshine Mix #6, Sun Grow Horticulture, Vancouver, BC, CA), in individual pots in growth chambers at 25°C with a 16 h/8 h light/dark regime and then transferred to a greenhouse.

Silencing Vector Design and Cloning of *ChII* and *ScEI* Genes

DNA of ToMoV A and B components were extracted from tomato leaves by R. F. Rivera-Bustamante, CINVESTAV, IPN, Mexico. The complete DNA of the ToMoV A and B components were cloned into pBluescript [pBS II SK (+/-)] (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using ApaI digestion. These constructs were named pBS_ToMoV A and pBSToMoV B. The pBS_ToMoV A construct was modified by removing a 51-bp fragment between a XhoI (668 bp position) and BamHI sites (719 bp position), as it would have interfered with the use of the multiple cloning site of pBS II SK (+/-). The cloned ToMoV A capsid gene was then modified by removing a 657 bp region using PCR with the forward primer 5'-CTGAATTCAAGCTTTGCACTCATGCGTC TAACCCTG-3' and reverse primer 5'-TCGAATTCGATATCCC ATGGCAAATCAGCTTAGGC-3' that flanked the capsid gene. The forward primer was designed with EcoRI and HindIII restriction sites and the reverse primer was designed with EcoRI and EcoRV restriction sites. The PCR conditions were 7 min at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 5.5 min at 72°C, and 10 min at 72°C. The PCR product was purified, digested with EcoRI enzyme and ligated subsequently to pBS II SK(+/-) (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The ligation mix was used to transform E. coli Top 10 strain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). This construct was named ToMoV I CP.

For VIGS of ChII, a 249-bp portion of the chelatase gene was amplified using genomic DNA of *S. peruvianum* LA2172 with the forward primer 5'-CTGCAGGAATTCCTC CAGAGCCAAATCACCTC-3' and reverse primer 5'-AAGC TTAGATTCCAACGGATCCTTCC-3'. The forward and reverse primers were designed with EcoRI and HindIII restriction sites, respectively. These primers were designed based on the *S. lycopersicum*'s chelatase sequence (XM_004248092.1). The PCR

conditions were 5 min at 94°C, 50 s at 94°C, 40 s at 60°C, 50 s at 72°C for 35 cycles, and then 5 min at 72°C. The PCR product was purified and ligated to ToMoV I CP-VIGS following digestion with EcoRI and HindIII. This plasmid was named ToMoV_ChII.

For VIGS of SCEI, genomic DNA of *S. peruvianum* LA2172 was used as a template in PCR with forward primer 5'-CTC GAATTCTCCTCAATGAAGACAGTGGTTGG-3' and reverse primer 5'-ATAAAGCTTACCCTCTTTCGGTACTCCA-3', containing EcoRI and HindIII restriction sites, respectively. These primers were designed based on the sequence (emb|CAE45567.1) Lara-Ávila et al. (2012). The 169-bp PCR product and the ToMoV I CP-VIGS vector were digested with EcoRI and HindIII and then ligated. This plasmid was named ToMoV_SCEI. The identity of all constructs was confirmed by restriction analysis with EcoRI and HindIII and sequencing.

Plant Inoculation with the ToMoV VIGS Vector

ToMoV virus A and B components were mixed in a 1:1 ratio (1 µg of component A: ToMoV I CP, ToMoV_ChII or ToMoV_SCEI and 1 µg of component B: ToMoV B) after their digestion from the pBS II SK vector with ApaI. Twenty-two day-old plants were treated with the virus mixture using the

Biolistic[®] PDS-1000He gun (Bio Rad, Hercules, CA, USA) at low pressure (Carrillo-Tripp et al., 2006). The plants were then maintained for 60 days post-treatment (dpt) in a greenhouse at 25–30°C before inoculation with Cmm. This time period was chosen because ToMoV_ChII inoculated plants showed bleaching of all leaves by 60 days, which indicated that silencing had occurred. By 15 days post inoculation (dpi) with Cmm, symptoms of leaf wilting and necrosis were observed and recorded by scanning excised damaged leaves on a flat-bed scanner. A tif file was created and the number of pixels of damaged tissue was quantified by Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) (Wijekoon et al., 2008). Statistical analysis was based on T-test with unpaired data with Graph Pad Prism[®] V.5 (GraphPad, San Diego, CA, USA), and a statistically significant result was considered to be $P < 0.01$.

RNA Isolation and Quantitative RT-PCR Analysis

In order to quantify SCEI mRNA from silenced and empty vector control plants, total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) from 40 dpi *S. peruvianum* (62 days old plants) inoculated either with ToMoV1CP or ToMoV_SCEI. After treatment with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), RNA was quantified by a NanoDrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis and quantitative real time PCR analysis were performed using the iScript™ One-Step RT-PCR kit with SYBR[®] Green (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The 20 µL reactions contained 100 ng of total RNA, 12.5 µL of 2x SYBR Green RT-PCR reaction mix, 200 nM of each primer listed below and 1 µL of iScript MMIV reverse transcriptase. Quantification was based on a cycle threshold value with expression level of SCEI gene normalized to actin gene (Accession no. FJ532351). The SCEI forward primer 5'-TTGCTAAGCCGGAGACACTT-3' and reverse primer 5'-ACACTTGGCGGTTACTCG-3' were designed outside the targeted region for silencing. For actin, the forward primer was 5'-CCTCACCGAGAGAGGTTACATGT-3' and reverse primer was 5'-CATGTCGCGGACAATTTCC3'. The RT-PCR conditions were 10 min at 50°C (cDNA synthesis), 5 min at 95°C (iScript MMLV reverse transcriptase inactivation), followed by 40 PCR cycles of 10 s at 95°C and 30 s at 60°C. Melting curves were performed by 80 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C, and 10 s at 55°C increasing the temperature by 0.5°C per cycle of 10 s each. Absence of contaminating genomic DNA was confirmed by PCR of RNA samples without cDNA synthesis. PCRs were performed on an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time Real-Time-PCR system version 2.0, and the data was analyzed with the Applied Biosystems 7500 software V.2.0. Three biological replicates were analyzed with three technical replicates per biological replicate. Statistical analysis was based on T-tests with unpaired data with Graph Pad Prism[®] V.5 (GraphPad, San Diego, CA, USA), and a statistically significant result was considered to be $P < 0.01$.

Cmm DNA Detection in Inoculated Plant Tissue by PCR

Total DNA was isolated from *S. peruvianum* plants at 10 and 20 dpi with ToMoV1CP or ToMoV_SCEI based on a modified protocol of Dellaporta et al. (1983), and then quantified with a NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). A 233-bp of the endo-1,4-beta-glucosidase gene, Cel-A (HQ636581; Lara-Ávila et al., unpublished) was amplified using 100 ng of the DNA as template and forward primer 5'-ATCAAGCAGATGGGGTTCAC-3' and reverse primer 5'-TCCGGATACTGCGATGTGTA-3'. The PCR conditions were 5 min at 94°C, and then 50 s at 94°C, 40 s at 60°C, 50 s at 72°C for 35 cycles followed by 5 min at 72°C.

Cmm DNA Quantification in Inoculated Plant Tissue by Quantitative PCR

Total DNA was isolated and quantified as above from *S. peruvianum* plants inoculated either with ToMoV1CP or

ToMoV_SCEI. For a 20 µL reaction, 100 ng of the DNA was added as template to 10 µL SYBR Green RT-PCR master mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and 200 nM each of forward primer 5'-GAGCCAAGCCAAGTATCTTC-3' and reverse primer 5'-CGTTCTCGTAGAGGCGGTAG-3' to generate a 219 bp portion of the tomatinase, endo-1,4-beta-glucosidase constitutive gene, TomA, of *Cmm* (AF393183.1; Flügel et al., 2012). RT-PCR, melting curve, quantification and data analysis were performed as per SCEI described previously. A standard curve was created based on the concentrations of a cloned version of TomA in the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) using 2.86×10^2 to 2.86×10^8 copies/ng. The correlation coefficient between the cycle threshold value and the concentration of the cloned TomA was 0.999. Statistical analysis was based on a correlation test with unpaired data with Graph Pad Prism[®] V.5 (GraphPad, San Diego, CA, USA), and a statistically significant result was considered to be $P < 0.01$.

Scanning Electron Microscopy

One-half centimeter stem samples were excised and fixed with glutaraldehyde 3% in Sörensen buffer (100 mM sodium phosphate pH 7.4). After washing three times in buffer, the samples were immersed in 1% osmium tetroxide (OsO₄) in Sörensen buffer for 2 h, washed three times with Sörensen buffer, and then dehydrated with ethanol 30, 50, 70, 90, 95% and absolute ethanol for 15 min each, and then incubated two additional times in absolute ethanol for 15 min. Critical point dried were done in a Tousimis Samdri-PVT-3D (Tousimis Research, Rockville, MA), mounted and gold coated sputter in Cressington model 108auto (Cressington Scientific Instruments, Watford, UK) and examined in a FEI model Quanta 200 SEM (FEI, Brno, Czech Republic).

RESULTS

Silencing *ChII* Using the ToMoV VIGS Vector in *S. peruvianum*

In order to develop a VIGS vector based on ToMoV, the coat protein contained in component A of ToMoV was removed, and a cloning site was added at the same location (**Figure 1**). A portion of the magnesium chelatase gene from *S. peruvianum* was cloned into the ToMoV VIGS vector (ToMoV_ChII) and introduced by bombardment into 22 day old *S. peruvianum*. Typical leaf bleaching indicating silencing of ChII first appeared at 10 dpi and spread from the bombarded leaf until the whole plant was showing patchy bleaching at 40 dpi (**Figure 2**). Control plants inoculated with an empty ToMoV vector (ToMoV1CP) did not show any bleaching symptoms. Similar results were obtained when ChII was silenced in *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* cv. Micro Tom, *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, and *Nicotiana benthamiana* (data not shown).

Silencing of SCEI Using the ToMoV VIGS Vector in *S. peruvianum*

To silence SCEI, a 269 bp portion of the gene from *S. peruvianum* was amplified and cloned into the ToMoV VIGS vector (**Figure 1B**). Expression of SCEI at 40 dpi for *S. peruvianum* inoculated with ToMoV_SCEI was 0.61 of the value of plants

inoculated with the empty vector (Figure 3) (t-test, $p < 0.001$) indicating silencing. The plant morphology and flowers of *S. peruvianum* inoculated with ToMoV_SCEI was identical to that of empty vector control plants (Figures 4A,B). Thus, silencing of SCEI did not have any apparent effect on the healthy plant phenotype under the conditions used in these experiments.

SCEI Silencing is Associated with Disease Susceptibility and Increased *Cmm* Growth in *S. peruvianum* Plants

Cmm-inoculated *S. peruvianum* silenced for SCEI first showed unilateral wilting of leaves at 15 dpi (Figures 4H,I), and the wilting spread to all leaves at 20 dpi resulting in plant death (Figure 4E). Plants inoculated with the empty vector showed necrosis only in the leaf that was inoculated with Cmm (Figure 4F), and the rest of the plant appeared healthy without any symptoms typical of Cmm infection for up to 20 dpi (Figures 4D,G). In contrast, the susceptible cultivar, *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, showed unilateral wilting of leaves at 15 dpi, and the wilting spread to all leaves at 20 dpi (Figure 4C). The amount of damaged tissue in *S. peruvianum* plants due to

Cmm infection varied between 12.57% to almost 25% in plants inoculated with ToMoV 1 CP, whereas it was between 70.53 and 100% in plants inoculated with ToMoV_SCEI (t-test, $p < 0.01$) (Figure 5). Thus, the percentage of necrosis was approximately five times lower in the empty vector control than in the SCEI-silenced plants.

The presence of Cmm in inoculated plants was confirmed by PCR using specific primers for Cmm Cel-A using DNA obtained from ~3 cm above the inoculation site (Figure 6). SEM of non-infected *S. peruvianum* and *S. lycopersicum* plants showed that the parenchymal tissues appeared intact, healthy and without bacterial cells (Figures 7A,B). However, in *S. peruvianum* inoculated with ToMoV 1 CP and challenged with Cmm, some bacteria were observed in the parenchymal tissue with little to no parenchymal tissue damage (Figures 7C,E). In contrast, *S. peruvianum* inoculated with ToMoV_SCEI and challenged with Cmm had more bacteria in the parenchymal tissue and more parenchymal tissue damage when compared with empty vector-inoculated control plants (Figure 7F). However, the number of bacteria and the level of parenchymal tissue damage were less than in the susceptible *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, where the highest number of Cmm and the most parenchymal tissue damage was visible (Figure 7D). The quantity of bacteria observed by SEM correlated with the visible symptoms observed in empty vector inoculated *S. peruvianum*, SCEI silenced *S. peruvianum*, and susceptible *S. lycopersicum*, cv. Ailsa Craig.

Real time PCR of TomA of Cmm was performed to quantify the Cmm population. At 10 dpi, the Cmm population reached 3.77×10^8 CFU per g of stem in SCEI-silenced *S. peruvianum*, whereas the population only reached 6.80×10^7 CFU per g of stem in the empty vector control *S. peruvianum* (t-test, $p < 0.05$) (Table 1). At 20 dpi, the population in the *S. peruvianum* SCEI-silenced plants increased to 1.23×10^9 CFU per g of stem, which was significantly higher than the 1.11×10^8 CFU per g of stem in the empty vector silenced plants (t-test, $p < 0.05$). Thus, Cmm populations were about 5–10 times higher due to SCEI silencing in *S. peruvianum*. At 10 dpi, the susceptible *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig had a significantly higher population of 4.63×10^8 CFU per g of stem, and at 20 dpi, the Cmm population reached 3.00×10^{10} CFU per g of stem, which as significantly higher than in *S. peruvianum* for both the SCEI-silence and empty vector control. These population differences correlated well with the amount of necrosis observed in the different plants.

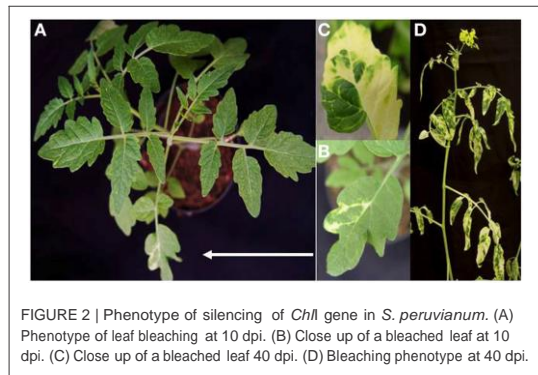


FIGURE 2 | Phenotype of silencing of *Chl* gene in *S. peruvianum*. (A) Phenotype of leaf bleaching at 10 dpi. (B) Close up of a bleached leaf at 10 dpi. (C) Close up of a bleached leaf 40 dpi. (D) Bleaching phenotype at 40 dpi.

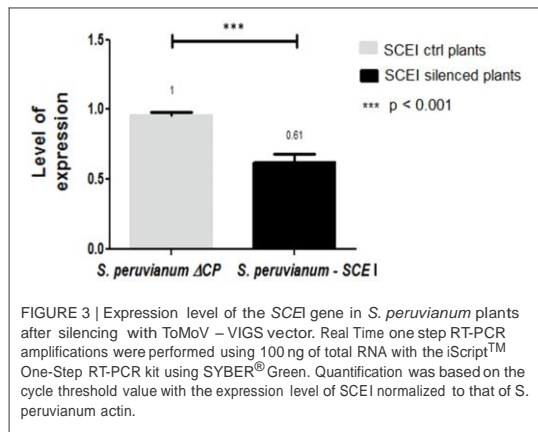


FIGURE 3 | Expression level of the SCEI gene in *S. peruvianum* plants after silencing with ToMoV – VIGS vector. Real Time one step RT-PCR amplifications were performed using 100 ng of total RNA with the iScript™ One-Step RT-PCR kit using SYBER® Green. Quantification was based on the cycle threshold value with the expression level of SCEI normalized to that of *S. peruvianum* actin.

DISCUSSION

VIGS is a tool that has been used successfully for the analysis of gene function without the time-consuming need to generate mutants or transgenic plants (Liu et al., 2002; Burch-Smith et al., 2004). For *S. lycopersicum*, there have been several viruses used for VIGS, such as Potato Virus X (Giliberto et al., 2005) and DNA1 component of tobacco curly shoot virus (TbCSV) (Huang et al., 2009), but the most commonly used VIGS vector has been based on Tobacco Rattle Virus (TRV) (Liu et al., 2002). However, there is one report of VIGS with the wild tomato, *S. peruvianum*, using TRV (Senthil-Kumar et al., 2007). In this work, a new VIGS



FIGURE 4 | Phenotypes of *S. peruvianum* and *S. lycopersicum* plants inoculated with ToMoV VIGS vector prior and 20 days post-infection with *Cmm*. (A) Phenotype of SCEI-silenced *S. peruvianum* plant without *Cmm* inoculation. (B) non-silenced *S. peruvianum* plant without *Cmm* inoculation (negative control). (C) non-silenced *S. lycopersicum* plant inoculated with *Cmm*. (D) empty vector-treated *S. peruvianum* plants inoculated with *Cmm*. (E) SCEI-silenced *S. peruvianum* plant inoculated with *Cmm*. (F) Close up of the *Cmm* infection site on the *S. peruvianum* leaf for an empty vector-treated plant. (G) Close up of the *S. peruvianum* leaf located above the *Cmm* infection site for the same empty vector-treated plant. (H) Close up of the *Cmm* infection site on the *S. peruvianum* leaf for a SCEI-silenced plant. (I) Close up of the *S. peruvianum* leaf located above the *Cmm* infection site for the same SCEI-silenced plant showing unilateral wilting.

vector based in ToMoV was developed, which showed silencing of genes in *S. peruvianum* and other *Solanum* species. The vector produced no or barely any viral symptoms in those *Solanum* species, and was an effective VIGS vector in *S. peruvianum* based on silencing a chelatase gene that blocks chlorophyll production resulted in large areas of yellowed and bleached tissues, similar to the phenotype reported in other plant species with chelatase silencing (Ekengren et al., 2003; Burch-Smith et al., 2004; Cai et al., 2007). An advantage of the ToMoV VIGS vector over TRV vectors is that silencing of genes with ToMoV was effective in *S. peruvianum* and other *Solanum* species at temperatures ranging from 22 to 30°C (data not shown). However, for TRV, slightly higher or lower temperatures from 21°C can greatly affect

VIGS in tomato (Cai et al., 2007). Based on these results, the ToMoV VIGS vector was used to silence our gene of interest in *S. peruvianum* to determine if it may be involved in plant defenses against *Cmm*.

SCEI was selected for VIGS because Lara-Ávila et al. (2012) demonstrated that expression of this gene was highly up-regulated in the early stage of *Cmm* infection in *S. peruvianum*, which was followed by a decline to basal levels later in the infection, suggesting a role in the early defense response. In contrast, *S. lycopersicum* showed no significant change in SCEI expression levels following *Cmm* infection. All *S. lycopersicum* genotypes are relatively susceptible to *Cmm*, but *S. peruvianum* has a high level of resistance to this bacterial pathogen (van

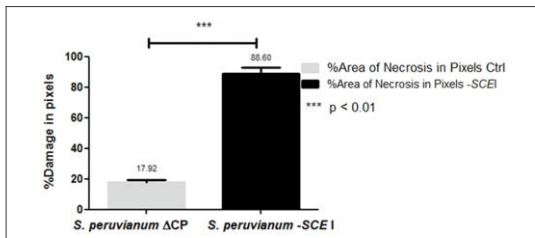


FIGURE 5 | Damaged leaf tissues in empty vector-treated or SCEI-silenced *S. peruvianum* plants at 20 dpi with *Cmm*.

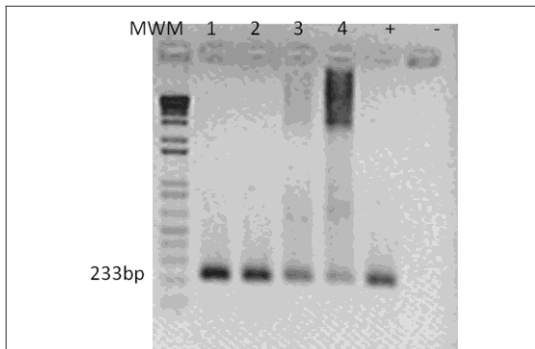


FIGURE 6 | *Cmm* detection in *S. peruvianum* tissues by PCR. An amplicon of 233 bp was obtained using Cel-A primers for *Cmm* detection at 10 and 20 dpi. Lanes show PCR products shown with template of: (1) leaf tissue of SCEI-silenced *S. peruvianum* at 10 dpi, (2) leaf tissue of SCEI-silenced *S. peruvianum* at 20 dpi, (3) leaf tissue of empty vector treated *S. peruvianum* at 10 dpi, (4) leaf tissue of empty vector treated *S. peruvianum* at 20 dpi. Plasmid of pGEM T-Easy with Cel-A fragment. (-) Negative control. 100 ng of DNA were taken for each reaction.

Ooijen et al., 1994). Inoculation of *S. peruvianum*, either on its own or with the empty ToMoV vector, only produced a rapid localized cell death at the inoculation site, whereas susceptible *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig and SCEI-silenced *S. peruvianum* showed a necrotic phenotype of the leaves ranging from 70 to 100%. In addition, the population size of *Cmm* in *S. peruvianum* without treatment or treated with the empty ToMoV vector was much lower than in the SCEI-silenced *S. peruvianum* or *S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig, whose populations reached levels similar to those of *Cmm* reported on susceptible *S. lycopersicum* cv. Moneymaker and *S. lycopersicum* cv. Jet Star by Sen et al. (2013) and Carlton et al. (1998), respectively.

Plant innate immunity is a multi-step process beginning with pathogen recognition. One type of innate immunity is based on recognition of Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), which are invariant epitopes within molecules that are fundamental to the pathogens fitness, widely distributed among different microorganisms (Schwessinger and Zipfel, 2008). Another type of innate immunity is based on recognition

of effectors, which generally are secreted by pathogens to manipulate or reprogram host defenses (Zipfel, 2008). The two types of recognition result in PAMP triggered immunity (PTI) and effector triggered immunity (ETI), which is usually stronger and longer than PTI and is often associated with the hypersensitive response (HR) at the infection site (Tsuda and Katagiri, 2010; Meng and Zhang, 2013). Both ETI and PTI initiate common signaling pathways differing in length and amplitude, such as an oxidative burst, activation of transcription factors, and MAP kinases and the production of plant hormones (Chisholm et al., 2006). Eventually, the plant responds through the expression of defense genes resulting in the production of various PR proteins and antimicrobial compounds and structures that limit pathogen spread and reproduction (Kaup et al., 2005; Saracco et al., 2007; Miura and Hasegawa, 2010; van den Burg et al., 2010; Balaji et al., 2011). The observation of rapid localized necrosis at the *Cmm* inoculation site in *S. peruvianum* indicates that the HR and ETI may be involved in *Cmm* resistance. In this study, SCEI-silenced plants did not have this localized cell death and clearly failed to restrict pathogen growth, similar to the susceptible *S. lycopersicum*, indicating that ETI could be compromised with diminished SCEI.

SUMOylation is a key process in plants as it provides post-translational modification of proteins involved in nuclear-cytoplasmic transport, transcriptional regulation, apoptosis, protein stability, response to stress and progression through the cell cycle and is controlled by SUMO pathway through regulation of transcription (Yang and Sharrocks, 2006; Enserink, 2015). The importance of SUMOylation in ETI can be inferred from studies of certain pathogen effectors. Hotson et al. (2003) found that the XopD effector of *Xanthomonas campestris* pathovar vesicatoria (*Xcv*) functions as cysteine protease with plant-specific SUMO substrate specificity. Roden et al. (2004) showed that the AvrXv4 effector of *Xcv* possesses SUMO isopeptidase activity, suggesting that SUMO conjugation system may be a key target for plant pathogen effectors. Therefore, some pathogen effectors act to hydrolyse SUMO-conjugated proteins to alter host cell signaling events, presumably for the pathogen's benefit (Hotson et al., 2003).

Several studies have suggested that SUMO plays an important role in pathogen defense responses (Lois et al., 2003; Saracco et al., 2007; van den Burg et al., 2010). One of the early defense genes with increased expression is SCEI (Pitzschke et al., 2009; van den Burg and Takken, 2010). Increased SCEI expression may be required in innate immunity because MAP kinase signaling and SUMOylation appear to converge to regulate the same targets that participate in signaling that controls defense gene expression (Yang and Sharrocks, 2006; Miller et al., 2010). Defense signaling involves a number of WRKY transcription factors, many of which have been identified as SUMOylation targets after phosphorylation by MAPKs. For example, WRKY3, WRKY4, WRKY6, WRKY33, WRKY72, and other WRKY transcription factors in Arabidopsis act as activators and/or repressor of defense gene expression and are also SUMO targets (Bethke et al., 2009; Popescu et al., 2009; Bhattarai et al., 2010; Miller et al., 2010; van den Burg and Takken, 2010). Therefore, silencing of the *S. peruvianum* SCEI gene by VIGS in this study may have made

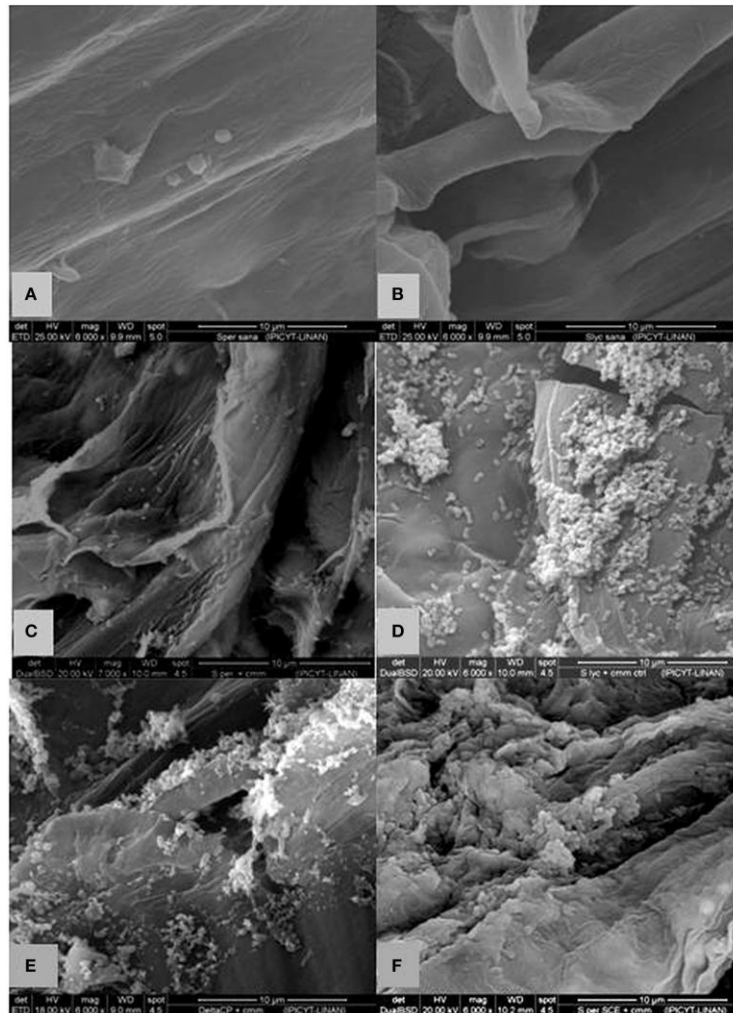


FIGURE 7 | Scanning electron microscopy of longitudinal cut of a stem of non-treated, empty vector and SCEI-silenced *Solanum* plants with and without *Cmm* challenge. (A) *S. peruvianum* without inoculation of *Cmm* showing no bacteria or tissue damage (B) *S. lycopersicum* without inoculation of *Cmm* showing no bacteria or tissue damage (C) non-VIGS treated *S. peruvianum* at 10 dpi with *Cmm* showing some bacterial but limited parenchymal tissue damage. (D) *S. lycopersicum* at 10 dpi with *Cmm* revealing more bacterial structures with greater parenchymal tissue damage. (E) empty-vector treated *S. peruvianum* at 10 dpi with *Cmm* with some bacterial structures and limited parenchymal tissue damage. (F) SCEI-silenced *S. peruvianum* at 10 dpi with *Cmm* revealing considerable bacterial structures and parenchymal tissue damage. Magnification 6000x, scale bar ~10 μ m.

the SUMOylation mechanism on WRKYs or other MAP kinase targets non-functional, allowing for increased multiplication and development of disease symptoms by *Cmm*.

Increased levels of SCEI in plants, also occurs following abiotic stresses, such as salinity, drought, and cold. This was observed following salinity and drought stress in *Spartina alterniflora* (Karan and Subudhi, 2012). Lois et al. (2003) and Kurepa et al.

(2003) also reported that high expression of SCE correlated with ABA mediated stress responses in different tissues of *Arabidopsis*, suggesting that sumoylation by SUMO1/2 played an early role in the plant stress response. ABA is well known for mediating plant stress responses to salinity, drought and cold (Karan and Subudhi, 2012). Thus, SCEI could also be involved in early stress responses following *Cmm* infection. One of the first responses

TABLE 1 | *Cmm* populations estimated by qRT-PCR of the constitutive *Cmm* TomA gene in inoculated stems of *S. peruvianum* inoculated with ToMoV ICP or ToMoV SCEI or *S. lycopersicum* cv.

| Samples | Days post inoculation | CFU/g \pm SD |
|----------------------------|-----------------------|---|
| <i>S. peruvianum</i> I cp | 10 | $6.80 \times 10^7 \pm 4.8 \times 10^6$ |
| <i>S. peruvianum</i> I cp | 20 | $1.11 \times 10^8 \pm 9.4 \times 10^6$ |
| <i>S. peruvianum</i> -SCEI | 10 | $3.77 \times 10^8 \pm 4.7 \times 10^6$ |
| <i>S. peruvianum</i> -SCEI | 20 | $1.23 \times 10^9 \pm 2.0 \times 10^7$ |
| <i>S. lycopersicum</i> | 10 | $4.63 \times 10^8 \pm 3.4 \times 10^7$ |
| <i>S. lycopersicum</i> | 20 | $3.00 \times 10^{10} \pm 6.2 \times 10^8$ |

Ailsa Craig not inoculated with the VIGS vector.

to bacterial infections is a burst of ROS, and sumoylation is regulated by ROS (Zipfel and Robatzek, 2010; Park et al., 2011). On other hand, the overexpression of a SUMO gene in *Arabidopsis* resulted in activation of SA signaling following infections with *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 and enhanced resistance to PstDC3000 (Panstruga et al., 2009; van den Burg et al., 2010; Xiong and Wang, 2013). While SA and ROS are both signals in plant defense response, there is an antagonistic interaction between ROS and SA signaling (Xu and Brosché, 2014). Therefore, silencing SCEI in *S. peruvianum* could have made sumoylation non-functional, which could be affecting SA levels in response to ROS and thus affecting defense responses to *Cmm* infection. Baysal et al. (2003) and Balaji et al. (2008) found that SA is induced by acidbenzolar-S methyl (ASM) increased resistance in *S. lycopersicum* seeds. The best protection against *Cmm* was obtained when the ASM had been applied 3 days before the *Cmm* infection. If the SA response was not sufficiently activated, then *Cmm* may have been able to avoid SA-dependent defenses allowing it to reproduce to higher levels, spreading in the plant and eventually killing it.

Silencing SCEI could also have affected the defense response in *S. peruvianum* to *Cmm* by altering other factors in the plant, such as plant morphology. Null mutations of SCEI in *Arabidopsis* resulted in embryo lethality (Park et al., 2011), but in *Arabidopsis*, mutants with moderately reduced SCEI levels showed a normal phenotype suggesting that partially reduced levels of SCEI can be tolerated under non-stressed conditions (Saracco et al., 2007). Using VIGS to silence SCEI in *S. peruvianum* did not cause visible aberrant developmental effects, and thus this explanation appears unlikely for the loss of *Cmm* resistance in *S. peruvianum* following SCEI silencing.

While *S. lycopersicum* is susceptible to *Cmm*, this is not due to the lack of SCEI genes. The partial sequence of SCEI in *S. peruvianum* had 100% nucleotide identity with a *S. lycopersicum* sequence (Solyc02g093110) and lesser nucleotide identity with other SCEI genes from *S. lycopersicum* (Figure S1). Since sumoylation is involved in many processes other than pathogen resistance, *S. lycopersicum* must have a number of SCEI genes in order to survive. Although the coding region of the SCEI in *S. peruvianum* in this study and Solyc02g093110 may be identical, the results of Lara-Ávila et al. (2012) show that

they are regulated very differently following *Cmm* inoculation. It is unknown at which stage that innate immunity to *Cmm* differs between *S. peruvianum* and *S. lycopersicum*, but SCEI regulation is a possibility. If so, then transgenic *S. lycopersicum* with Solyc02g093110 regulated by the promoter region of the SCEI gene from *S. peruvianum* could result in greater induction following infection leading to greater resistance.

In this work, a novel VIGS-vector with ToMoV was developed, which did not produce severe viral symptoms and was able to silence genes in *S. peruvianum*. With this vector, it was possible to determine that SCEI is important in the defense of *S. peruvianum* against *Cmm*, possibly because SCEI impacted ETI through the effects of sumoylation on transcription factors,

like WRKYs, and/or the production of the defense hormones, like SA. This study only examined silencing of SCEI in *S. peruvianum* in its relationship to innate immunity to *Cmm*, but SCEI may also play roles in resistance to other diseases or pests. For example, *S. peruvianum* has resistance against root-knot nematode (Yaghoobi et al., 2005) and tomato leaf curl virus (Anbinder et al., 2009). Therefore, altering expression of SCEI may be a strategy to increase resistance not only against *Cmm* but also against several other diseases. Based on our findings, one biotechnological approach to improve the *Cmm* resistance on commercial tomato cultivars is the overexpression of SCEI gene either using constitutive promoters or the promoter region of the SCEI gene from *S. peruvianum* which may activate the SA signaling pathway following infection of *Cmm*, resulting in an enhanced resistance to this bacterial disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ME, BB, GA, JL, and AA design the study. ME, BB, and MI collected the data. ME, BB, GA, AA, and BB analyzed the data. ME, BB, GA, AA, PG, and AR interpreted the data. ME wrote the first draft and all co-authors contributed substantially to revisions.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge to Fordecyt-CONACYT 2012-02-193512 and Fundación Produce San Luis Potosí for funding. We are very grateful to Dr. Olga Araceli Patrón Soberano (Div. Biología Molecular IPICYT, San Luis Potosí, MX) for her technical support with the scanning electron microscopy, PG and his laboratory members (University of Guelph, Ontario, CA) for their technical support, and also for CONACYT fellowship 161730 granted to ME for her PhD studies.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.01019>

REFERENCES

- Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., et al. (2009). Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 119, 519–530. doi: 10.1007/s00122-009-1060-z
- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., et al. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol.* 146, 1797–1809. doi: 10.1104/pp.107.115188
- Balaji, V., Sessa, G., and Smart, C. D. (2011). Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 101, 349–357. doi: 10.1094/PHYTO-05-10-0132
- Baysal, O., Soylu, E., and Soylu, S. (2003). Induction of defense-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Physiol.* 52, 747–753. doi: 10.1111/j.1365-3059.2003.00936.x
- Berndsen, C. E., and Wolberger, C. (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 301–307. doi: 10.1038/nsmb.2780
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J. F., Pöschl, Y., Gust, A. A., Scheel, D., et al. (2009). FLG22 regulates the release of ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8067–8072. doi: 10.1073/pnas.0810206106
- Bhattarai, K. K., Atamian, H. S., Kaloshian, I., and Eulgem, T. (2010). Worky72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1. *Plant J.* 63, 229–240. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04232.x
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B., and Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.* 39, 743–746. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02158.x
- Cai, X., Wang, C., Xu, Y., Xu, Q., Zheng, Z., and Zhou, X. (2007). Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Res.* 125, 169–175. doi: 10.1016/j.virusres.2006.12.016
- Carlton, W. M., Braun, E. J., and Gleason, M. L. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology* 88, 525–529. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.6.525
- Carrillo-Tripp, J., Shimada-Beltrán, H., and Rivera-Bustamante, R. (2006). Use of geminiviral vectors for functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 209–215. doi: 10.1016/j.pbi.2006.01.012
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.008
- Coaker, G. L., and Francis, D. M. (2004). Mapping, genetic effects, and epistatic interaction of two bacterial canker resistance QTLs from *Lycopersicon hirsutum*. *Theor. Appl. Genet.* 108, 1047–1055. doi: 10.1007/s00122-003-1531-6
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1, 19–21. doi: 10.1007/BF02712670
- Eichenlaub, R., and Gartemann, K. H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 445–464. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095258
- Ekengren, S. K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P., and Martin, G. B. (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J.* 36, 905–917. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01944.x
- Enserink, J. M. (2015). SUMO and the cellular stress response. *Cell Div.* 10, 4. doi: 10.1186/s13008-015-0010-1
- Flügel, M., Becker, A., Gartemann, K. H., and Eichenlaub, R. (2012). Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *J. Biotechnol.* 160, 42–45. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.01.023
- Galun, E. (2005). RNA silencing in plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 41, 113–123. doi: 10.1079/IVP2004619
- Gartemann, K. H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., et al. (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 190, 2138–2149. doi: 10.1128/JB.01595-07
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., and Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.* 106, 179–191. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.07.011
- Gilberto, L., Perrotta, G., Pallara, P., Weller, J. L., and Fraser, P. D., Bramley, P. M., et al. (2005). Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiol.* 137, 199–208. doi: 10.1104/pp.104.051987
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., and Ricker, M. D. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Dis.* 77, 1069–1076. doi: 10.1094/PD-77-1069
- Gutierrez, C. (2002). Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 20, 219–230. doi: 10.1006/pmpp.2002.0401
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., and Mudgett, M. B. (2003). Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol. Microbiol.* 50, 377–389. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03730.x
- Huang, C., Xie, Y., and Zhou, X. (2009). Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component. *Plant Biotechnol. J.* 7, 254–265. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00395.x
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J., and Eichenlaub, R. (1999). Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environ. Microbiol.* 1, 113–118. doi: 10.1046/j.1462-2920.1999.00011.x
- Jahr, J., Dreier, J., Meletzuz, D., Bahro, R., and Eichenlaub, R. (2000). The endo β -1,4-glucanase Cel-A of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 703–714. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.7.703
- Jeske, H. (2009). *Geminiviruses*. Stuttgart: Springer Verlag. doi: 10.1007/978-3-540-70972-5_11
- Kabelka, E., Franchino, B., and Francis, D. M. (2002). Two loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 confer resistance to strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 92, 504–510. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.5.504
- Karan, R., and Subudhi, P. J. (2012). A stress inducible SUMO conjugating enzyme gene (SaSce9) from a grass halophyte *Spartina alterniflora* enhances salinity and drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 12:187. doi: 10.1186/1471-2229-12-187
- Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E. M., Eichenlaub, R., and Gartemann, K. H. (2005). Identification of tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 1090–1098. doi: 10.1094/MPMI-18-1090
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. J., et al. (2003). The small Ubiquity-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 278, 6862–6872. doi: 10.1074/jbc.M209694200
- Lara-Ávila, P., Isordia-Jasso, I., Castillo-Collazo, R., Simpson, J., and Alpuche-Sols, A. (2012). Gene expression analysis during interaction of tomato and related wild species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 30, 498–511. doi: 10.1007/s11105-011-0348-8
- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31, 777–786. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x
- Lois, M. L., Lima, C. D., and Chua, N. H. (2003). Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1347–1359. doi: 10.1105/tpc.009902
- Meng, X., and Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 245–266. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102314
- Miller, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Hua, Z., and Vierstra, R. D. (2010). Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16512–16517. doi: 10.1073/pnas.1004181107
- Miura, K., and Hasegawa, P. M. (2010). Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *Cell* 20, 223–232. doi: 10.1016/j.tcb.2010.01.007
- Panstruga, R., Parker, J. E., and Schulze-Lefert, P. (2009). SnapShot: plant immune response pathways. *Cell* 136, 978. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.020

- Park, H. J., Kim, W. Y., Park, H. C., Lee, S. Y., Bohnert, H. J., and Yun, D. J. (2011). SUMO and SUMOylation in Plants. *Mol. Cell.* 32, 305–316. doi: 10.1007/s10059-011-0122-7
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. (2009). MAPK cascade signaling networks in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 421–426. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.008
- Polston, J. E., Hiebert, E., McGovern, R. J., Stansly, P. A., and Schuster, D. J. (1993). Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting tomato in Florida. *Plant Dis.* 77, 1181–1184.
- Popescu, S. C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., et al. (2009). MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* 23, 80–92. doi: 10.1101/gad.174009
- Robertson, D. (2004). VIGS Vector for gene silencing: many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 495–519. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141803
- Roden, J., Eardley, L., Htson, A., Cao, Y., and Mudgett, M. B. (2004). Characterization of the *Xanthomonas AvrXv4* effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 633–643. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.6.633
- Saracco, S. A., Miller, M. J., Kurepa, J., and Vierstra, R. D. (2007). Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol.* 145, 119–134. doi: 10.1104/pp.107.102285
- Schwessinger, B., and Zipfel, C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 389–395. doi: 10.1016/j.pbi.2008.06.001
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., van der Wolf, J., Viser, R. G. F., and van Heusden, A. W. (2013). Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica* 190, 309–317. doi: 10.1007/s10681-012-0802-1
- Senthil-Kumar, M., Hema, R., Anand, A., Kang, L., Udayakumar, M., and Mysore, K. S. (2007). A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamina* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytol.* 176, 782–791. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02225.x
- Strider, D. L. (1969). Bacterial Canker of Tomato Caused by *Corynebacterium michiganense*, A Literature Review and Bibliography. Raleigh, NC: North Carolina Agricultural Experiment Station. No. 193.
- Tsuda, K., and Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 459–465. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.006
- van den Burg, H. A., Kini, R. K., Schuurink, R. C., and Takken, F. L. (2010). *Arabidopsis* Small Ubiquitin-like modifier paralogs have distinct functions in development and defense. *Plant Cell* 22, 1998–2016. doi: 10.1105/tpc.109.070961
- van den Burg, H. A., and Takken, F. L. W. (2010). SUMO-MAPK- and resistance protein-signaling converge at transcription complex that regulate plant innate immunity. *Plant Signal. Behav.* 5, 1597–1601. doi: 10.4161/psb.5.12.13913
- van Heusden, A. W., Koorneef, M., Voorrips, R. E., Brüggemann, W., Pet, G., Vrielink-van Ginke, R., et al. (1999). Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Theor. Appl. Genet.* 99, 1068–1074. doi: 10.1007/s001220051416
- van Ooijen, J. W., Sandbrink, J. M., Vrielink, M., Verkerk, R., Zabel, P., and Lindhout, P. (1994). An RFLP linkage map of *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 89, 1007–1013. doi: 10.1007/BF00224531
- Wijekoon, C. P., Goodwin, P. H., and Hsiang, T. (2008). Quantifying fungal infection of plant leaves by digital image analysis using Scion Image software. *J. Microbiol. Methods* 74, 94–101. doi: 10.1016/j.mimet.2008.03.008
- Xia, Y. (2004). Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cell. Microbiol.* 6, 905–913. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00438.x
- Xiong, R., and 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. doi: 10.1128/JVI.02828-12
- Xu, E., and Brosché, M. (2014). Salicylic acid signaling inhibits apoplastic reactive oxygen species signaling. *BMC Plant Biol.* 14:155. doi: 10.1186/1471-2229-14-155
- Yaghoobi, J., Yates, J. L., and Williamson, V. M. (2005). Fine mapping of the nematode resistance gene Mi-3 in *Solanum peruvianum* and construction of a *S. lycopersicum* DNA contig spanning the locus. *Mol. Genet. Genomics* 274, 60–69. doi: 10.1007/s00438-005-1149-2
- Yang, S.-H., and Sharrocks, A. D. (2006). “Interplay of the SUMO and MAPK kinase pathways,” in *The Histone Code and Beyond*, eds S. L. Berger, O. Nakanishi, and B. Haendler (Grenoble: ESRF Press), 193–209.
- Zipfel, C. (2008). Pattern recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 10–16. doi: 10.1016/j.coi.2007.11.003
- Zipfel, C., and Robatzek, S. (2010). Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: Veni, Vidi...? *Plant Physiol.* 154, 551–554. doi: 10.1104/pp.110.161547

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Esparza-Araiza, Bañuelos-Hernández, Argüello-Astorga, Lara-Ávila, Goodwin, Isordia-Jasso, Castillo-Collazo, Rougon-Cardoso and Alpuche-Solis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

12 Protocolos

12.1 Extracción de ADN.

1. Moler en mortero 0.5 g de tejido vegetal con 500 μ L de buffer de extracción.
2. Agregar 500 μ L de buffer de extracción. (En caso de que se forme una masa, se puede centrifugar a 13,000rpm por 12 min y coleccionar el sobrenadante).
3. Coleccionar el líquido en un tubo nuevo de 1.5 mL con pipeta.
4. Incubar a 65°C por 40 min (agitar cada 10 min).
5. Agregar un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar con vórtex y centrifugar 10 min a 12,000rpm.
6. Separar la fase acuosa y pasar a un tubo nuevo de 1.5 mL.
7. Agregar un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar con vórtex y centrifugar 10 min a 12,000 rpm.
8. Separar la fase acuosa y pasar a un tubo nuevo de 1.5 mL.
9. Agregar 8 μ L de RNAsa (10 mg/mL).
10. Incubar 30min a 37°C.
11. Precipitar el ADN con un volumen igual de isopropanol frío y mezclar por inversión.
12. Dejar la muestra en hielo por 10 min.
13. Centrifugar por 10 min a 13,000 rpm, eliminar el sobrenadante.
14. Lavar la pastilla con etanol 70%.
15. Centrifugar 5 min y eliminar el etanol.
16. Secar al aire y resuspender con 50 μ L de agua Milli Q.
17. Almacenar a -20°C.

Solución amortiguadora de extracción de ADN

| | |
|------------|-----------------|
| D-Sorbitol | 0.12 M |
| Tris- HCl | 0.22 M, pH 8.0 |
| EDTA | 0.022 M, pH 8.0 |
| NaCl | 0.8M |

| | |
|-------------------------|------|
| CTAB | 0.8% |
| n-laurylsarcosine | 1% |
| PVP | 1% |
| β -mercaptoetanol | 0.2% |

12.2 Extracción de ARN.

1. Tomar muestra de tejido vegetal (50 a 100 mg) y pasarlo a un tubo Eppendorf, guardar en nitrógeno líquido.
2. Homogenizar el tejido congelado y adicionar 1mL de TRIzol.
3. Incubar el tejido por 5 min a una temperatura de 15-30°C. (homogenizar el tejido con el TRIzol).
4. Adicionar 200 μ L de cloroformo, mezclar vigorosamente con la mano por 15 s e incubar por 2 min en hielo a 4°C.
5. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 min a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y adicionar 0.5 mL de Isopropanol frio, incubar por 15 min en hielo.
7. Centrifugar a 13,000rpm por 10 min a 4°C.
8. Lavar la pastilla con 1mL de etanol-DEPC al 75%, centrifugar a 7,000 rpm por 5 min a 4°C.
9. Dejar secar la pastilla, pero no en su totalidad.
10. Resuspender la pastilla en 30 μ L de agua DEPC.

12.3 Síntesis de cADN.

1. Adicionar a un tubo libre de nucleasas la siguiente mezcla:

| | |
|------------------------|--------------|
| Oligo (dt) | 1 μ L |
| 1 μ g de ARN | x μ L |
| dNTPmix | 1 μ L |
| Agua destilada estéril | a 12 μ L |

2. Incubar la mezcla a 65°C por 5 min y pasar rápidamente a hielo.
3. Adicionar los siguientes reactivos:

| | |
|------------------------|-----|
| 5X First-Strand Buffer | 4µL |
| 0.1M DTT | 2µL |
4. Mezclar el contenido suavemente e incubar a 42°C por 2 min,
5. Adicionar 0.5µL de SuperScriptTMII RT y mezclar con la micropipeta suavemente.
6. Incubar a 42°C por 50 minutos.
7. Inactivar la reacción calentando a 70°C por 15 min.

12.4 Preparación de las balas de tungsteno e inoculación de ToMoV, mediante biobalística.

1. Pesar 60 mg de partículas de tungsteno.
2. Resuspender en 2 mL de HNO₃ 0.1N y sonicar por 20min.
3. Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min.
4. Eliminar el sobrenadante y adicionar 2 mL de etanol absoluto y sonicar brevemente.
5. Centrifugar a 10,000 rpm por 2min.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1mL de agua desionizada estéril.
7. Tomar cuatro alícuotas de tungsteno de 250 mL y resuspender en 0.750 mL con agua desionizada estéril en cada uno de los tubos.
8. La concentración final queda en 15 µg/mL
9. Almacenar a -20°C

Preparación de balas con ADN para su bombardeo (para 6 plantas)

1. Mezclar 1µg del componente A + 1µg del componente B
Adicionar al tubo donde se mezclaron ambos componentes la siguiente mezcla:
50 µL de tungsteno

50 μL de CaCl_2 2.5M

20 μL de espermidina base libre 0.1M

2. Mezclar y sonicar hasta observar que las balas se homogenicen
3. Centrifugar 10 s a 10,000 rpm, eliminar el sobrenadante
4. Adicionar con 400 μL de etanol absoluto y sonicar
5. Centrifugar 10 s a 10,000 rpm, eliminar el sobrenadante
6. Resuspender en 60 μL de etanol absoluto
7. Sonicar y colocar 10 μL sobre las membranas acarreadoras.
8. Bombardear con una presión de 650 psi, con helio.