

IPICYT

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**OBTENCIÓN DE PLANTAS DE TOMATE (*Solanum  
lycopersicum*) SOBREEXPRESANTES DEL GEN SCE1,  
COMO CANDIDATO A CONFERIR RESISTENCIA CONTRA  
*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Tesis que presenta

**Elda Mireya Rodríguez González**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2014



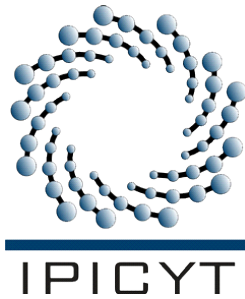
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Obtención de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sobreexpresantes del gen SCE1, como candidato a conferir resistencia contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Elda Mireya Rodríguez González** y aprobada el **seis de agosto del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

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

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**  
Miembro del Comité Tutorial

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



## **Créditos Institucionales**

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-490407) y el apoyo del proyecto Fordecyt 2012-02-193512 y la Fundación Produce, San Luis Potosí A.C. otorgado al Dr. Alpuche.



# 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 119 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 6 días del mes de agosto del año 2014, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Elda Mireya Rodríguez González**

sobre la Tesis intitulada:

*Obtención de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sobreexpresantes del gen *SCE1*, como candidato a conferir resistencia contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis**

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 13:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes de agosto de 2014.

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

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## Dedicatorias

Para mi madre, Dolores González, por su gracia especial con la comida.

A mi padre, José de Jesús Rodríguez que es agrónomo y buena gente.

A mi hermana, Luz Rodríguez, así de sencillo.

A Vladimir, que hizo sitio a mis cosas.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por su confianza y asesoría en la realización de este proyecto.

A la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y el Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga, por sus enriquecedores comentarios.

A todos los integrantes del laboratorio 1 por la convivencia diaria.

A las técnicas Q.F.B Rosalba Castillo y Biol. Salvador Ambriz por su disposición en el trabajo diario.

A LANBAMA por las facilidades otorgadas.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b>ii</b>
<b>Créditos Institucionales</b>	<b>iii</b>
<b>Acta de examen</b>	<b>iv</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>x</b>
<b>Resumen</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract</b>	<b>xii</b>
<b>1.Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2.Metodología</b>	<b>4</b>
2.1 Cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y construcción del vector binario pBI121-5'UTR-SCE1	4
2.2 Transformación nuclear de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> var. Alisa Craig) mediante co-cultivo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
2.3 Extracción de ADN, PCR y Southern blot	7
2.4 Extracción de ARN y análisis por RT-PCR semi-cuantitativa	9
2.5 Confirmación de la sobreexpresión génica de SCE1 por PCR en tiempo real (qRT-PCR)	9
<b>3. Resultados</b>	<b>11</b>
3.1 Construcción pBI121-5'UTR-SCE1	11
3.2 Transformación nuclear de <i>S. lycopersicum</i> mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.3 Southern blot de plantas T0 para la determinación del número de copias	18
3.4 Expresión del gen SCE1 en cuatro líneas transgénicas de tomate T0	18
3.5 Validación de la expresión del gen SCE1 en tres líneas transgénicas de tomate T0	20
<b>4.Discusión</b>	<b>23</b>
<b>5.Bibliografía</b>	<b>26</b>

<b>6.Procedimientos experimentales</b>	<b>29</b>
6.1 Preparación de células químicamente competentes y transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.	29
6.2 Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
6.3 Extracción de ADN plasmídico.	30
6.4 Preparación de soluciones	30
6.4.1 TAE 20X	30
6.4.2 Agarosa 1%	30
6.5 Preparación de antibióticos	31
6.5.1 Kanamicina (Stock de 100 mg/L)	31
6.5.2 Carbenicilina (Stock de 100 mg/L)	31
6.5.3 Cefatoxima (Stock de 250 mg/L)	31
6.6. Reguladores del crecimiento	31
6.6.1 Ácido Naftalenacético (ANA)	31
6.6.2 Benciladenina (BA)	31
6.6.3 Ácido Indol Acético (IAA)	31
6.6.4 Zeatina	31
6.7 Preparación de medios de cultivo	31
6.7.1 Medio de cultivo YM	31
6.7.2 Medio de cultivo LB	32
6.8 Medios MS para el cultivo de plantas <i>in vitro</i>	32
Estrategia general para la preparación	32
Mezcla basal de sales MS	33



## Lista de Tablas

Tabla 1. Características de las cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> empleadas en este trabajo.	5
Tabla 2. Medios para cultivo <i>in vitro</i> de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).	8
Tabla 3. Efecto de diferentes cepas de <i>A. tumefaciens</i> en la transformación y regeneración hipocotilos de tomate var. Ailsa Craig.	17

## Lista de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de la transformación de plantas vía <i>Agrobacterium</i> y regeneración de plantas de tomate.	7
Figura 2. Representación esquemática de la construcción pBI121-5'UTR-SCE1.	12
Figura 3. Análisis de restricción de posible clona conteniendo el gen de interés.	13
Figura 4. Análisis de PCR de la clona E1.	14
Figura 5. Análisis por PCR de plantas de tomate transformadas con la construcción pBI121-TEV5'UTR-SCE1 vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
Figura 6. Análisis de Southern blot de las líneas T0 de tomates transgénicos <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	19
Figura 7. Análisis de la expresión del gen SCE1 en plantas de tomate sobreexpresantes.	20
Figura 8. Validación por qRT-PCR de la sobreexpresión del gen SCE1 en tres líneas transgénicas de tomate.	21

# Resumen

## Obtención de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sobreexpresantes del gen SCE1

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es la hortaliza que se cultiva a mayor escala en el mundo. Sin embargo, enfermedades como el cáncer bacteriano causado por la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), constituyen uno de los factores limitantes más importantes en su producción. El control convencional que se utiliza para enfermedades bacterianas de tomate implica el uso de agroquímicos, como compuestos derivados de cobre, sales cuaternarias de amonio, o antibióticos, que no han sido muy efectivos contra *Cmm*, lo que ha provocado pérdidas económicas importantes en el país y el mundo entero. En este sentido, la obtención de cultivares de tomate resistentes a este patógeno sería una estrategia de control favorable para el ambiente al reducir el uso de agroquímicos.

Este trabajo se enfoca en lograr la sobreexpresión del gen SCE1 en tomate, el cual, de acuerdo a resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo, parece estar involucrado en la resistencia a *Cmm*, ya que su silenciamiento por RNA interferente aumentó la susceptibilidad de las plantas a infecciones por esa bacteria. Para cubrir ese objetivo, se estandarizó un protocolo de transformación en un tomate comercial *S. lycopersicum* var. Ailsa Craig, usando hipocotilos como explante inicial y se evaluó la eficiencia de transformación probando cuatro cepas de *Agrobacterium tumefaciens*: c58, GV3101, LBA4404 y GV3010, que albergan un vector binario para la expresión del gen SCE1 bajo la regulación del promotor 35S CaMV, así como una regeneración eficiente de las plantas transformadas.

La transformación de las plantas fue confirmada mediante la técnica de PCR para el transgén SCE1 y el marcador de selección *nptII*. La cepa de *A. tumefaciens* que presentó un mejor balance entre la eficiencia de transformación (18%) y supervivencia (54%) fue la GV3101. Adicionalmente, se analizaron cuatro de las líneas T0 obtenidas mediante un análisis de RT-PCR semicuantitativo que reveló la sobreexpresión constitutiva del gen SCE1. También se realizó un análisis por Southern blot que mostró la inserción del T-DNA en al menos una de las líneas T0 sobreexpresantes, por lo que concluimos que éste es un método eficiente, y rápido para introducir genes de interés en tomate; el próximo paso es someter a reto con *Cmm* a las plantas sobreexpresantes del gen SCE1.

**PALABRAS CLAVE:** Tomate, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, SUMO

## Abstract

### Obtaining tomato plants (*Solanum lycopersicum*) over-expressing the SCE1 gene

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is the world's most important horticultural crop. However, plant diseases such as the bacterial canker caused by the Gram positive bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) are one of the most important production limiting factors. Conventional control used in bacterial diseases in tomato involves the use of chemicals such as copper derivative compounds, quaternary ammonium salts, or antibiotics, which have not been effective against *Cmm*, resulting in significant economic losses in the country and worldwide. Therefore to obtain tomato cultivars resistant to this pathogen could be a suitable strategy for the environment by reducing the use of chemicals.

This work focuses on the over-expression of SCE1 gene in tomato, which was previously validated in our group by gene silencing, demonstrating its putative role to confer resistance to *Cmm*. For this, a transformation protocol in the commercial tomato *S. lycopersicum* var. Ailsa Craig was standardized using hypocotyls as initial explants, and the transformation efficiency was evaluated by testing four strains of *Agrobacterium tumefaciens* C58, GV3101, LBA4404 and GV3010 harboring a binary vector for the expression of the SCE1 gene driven by the CaMV 35S promoter; efficient regeneration of the transformed plants was also evaluated.

The transformant plants were confirmed by PCR for the transgenes SCE1 and *nptII*. The strain of *A. tumefaciens* that had the best balance between transformation efficiency (18%) and survival (54%) was GV3101. Additionally, four of the T0 lines obtained were analyzed by semi-quantitative RT-PCR assay, and showed constitutive overexpression of SCE1 gene. Also, a Southern blot analysis showed that at least one T0 overexpressing plant had the T-DNA insertion. Therefore we conclude that this is an efficient and fast method to introduce genes into tomato plants, and the next step is the challenge of the SCE1 overexpressing plants against *Cmm*.

**KEY WORDS:** Tomato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, SUMO

## 1. Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es uno de los cultivos más importantes en el mundo, y se consume tanto fresco como procesado, sin embargo, las altas temperaturas y humedades relativas favorecen el desarrollo de enfermedades causadas por diversas entidades biológicas, que constituyen un importante factor limitante en la producción de este cultivo (Pérez *et al.*, 2000; Escaff *et al.*, 2005).

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), un fitopatógeno Gram-positivo, es el agente causal de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano o chancro bacteriano, el cual ha ocasionado pérdidas millonarias a nivel mundial. El cáncer bacteriano es transmitido por semilla, o ingresa a la planta a través de heridas y entradas naturales como estomas, tricomas e hidátodos, y se considera una de las enfermedades vasculares del tomate más importantes a nivel mundial (Ramírez y Sainz, 2006). Los síntomas son marchitez unilateral de las hojas, heridas en el fruto llamadas “ojo de pájaro” y el desarrollo de lesiones en el tallo llamadas chancros (Carlton *et al.*, 1998; Jahr *et al.*, 1999; Balaji *et al.*, 2008). Esta enfermedad afecta al tomate en cualquier etapa fenológica, y puede acabar con todas las plantas en parcelas o invernaderos en cuestión de semanas (EPPO, 2010). En México, en el 2006 se presentaron daños de cáncer bacteriano en 200 hectáreas de sistemas de agricultura protegida a nivel nacional, con pérdidas de comercialización estimadas en 40 millones de dólares (Borboa *et al.*, 2006).

Dos especies silvestres emparentadas al tomate, *S. peruvianum* (Van-Heusden *et al.*, 1999) y *S. habrochaites* (Francis *et al.*, 2001), muestran tolerancia a la enfermedad y cuentan con 3 y 2 Quantitative Trait Loci (QTLs) respectivamente, asociados a resistencia, por lo que representan una alternativa viable al ser una fuente de resistencia genética compatible con la especie susceptible comercial, y mediante el uso de técnicas de la ingeniería genética, se podrían generar plantas de tomate con valor comercial tolerantes a *Cmm*.

Lara-Ávila *et al.* (2011), analizaron la expresión génica de varias especies silvestres relacionadas al tomate que son resistentes a *Cmm*, y mostraron que la expresión del gen que codifica a la enzima de conjugación SUMO E2 SCE1

(SCE1) que participa en el proceso de sumoilación, fue altamente inducida a 8 horas post-infección (hpi) en las especies resistentes, y retornó a niveles basales a las 24 hpi; mientras que en la especie susceptible no hubo cambios; estas observaciones sugieren una posible participación de SCE1 en las etapas tempranas post-infección de *Cmm* como un mecanismo de defensa.

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo Esparza-Araiza usando un análisis funcional mediante vectores virales para silenciamiento (VIGS), encontró que el silenciamiento del ortólogo de SCE1 de tomate en *Solanum peruvianum* aumenta la susceptibilidad a la enfermedad producida por *Cmm* (datos por publicarse), mostrando así un posible papel para el gen SCE1 en el mecanismo de defensa de la planta.

El proceso de sumoilación se ha descrito en respuesta al estrés en plantas. (Kurepa *et al.*, 2003), en el que, en algunos casos, activa o reprime diversos factores de transcripción, tales como WRKYs, lo que resulta en una regulación tanto positiva como negativa en la respuesta al estrés (Xia, 2004; Saracco *et al.*, 2007). Algunos estudios han mostrado la participación del proceso de sumoilación durante la patogénesis. Por ejemplo, cuando se sobreexpresa SUMO en tomate, se reduce la infección por *Trichoderma viridae*. En plantas de tabaco infectadas con el virus TGMV (*Tomato golden mosaic virus*) y que a su vez sobreexpresan SUMO1, se encontró una reducción en la replicación viral, por lo que se sugiere que SUMO reprime factores necesarios para la replicación viral (Castillo *et al.*, 2004; Saracco *et al.*, 2007).

Además se encontró que SCE1 tiene un papel en la respuesta a estrés en el desarrollo de la planta y la producción del ácido salicílico (SA) dependiente de la inmunidad innata (Saracco *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2010; Van den Burg *et al.*, 2010). También se ha encontrado un aumento de conjugados de SUMO 1-2, después de la exposición a un tratamiento de choque térmico, temperaturas altas y bajas, sequía, salinidad y estrés oxidante (Miura *et al.*, 2010; Van den Burg *et al.*, 2010). Existen reportes que indican que aumenta la expresión de SCE1, y se inducen hormonas tales como ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), en respuesta al ataque de patógenos, lo que sugiere un posible papel en la

inmunidad innata ante *Pseudomona psyringae* pv. Tomato (Miura *et al.*, 2010; Van den Burg *et al.*, 2010). También se conoce que el gen SCE1 podría estar implicado en las etapas tempranas de la resistencia a patógenos; esto se da por la regulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), ya que la sumoilación puede ser regulada por ROS, lo que podría resultar en la mejora de la conjugación SUMO. Se ha reportado que altos niveles de ROS inhiben la actividad de las proteasas de SUMO, lo que resulta en la acumulación de conjugados SUMO que proporcionan protección contra la infección (Miura *et al.*, 2010).

En algunos reportes se sugiere que la sumoilación es esencial para numerosos procesos celulares como reparación del ADN, regulación de la transcripción y mantenimiento estructural de la cromatina (Johnson 2004; Hay 2005; Verger *et al.*, 2006). Además, puede estar involucrada en la regulación de múltiples aspectos del desarrollo de la planta, específicamente el heterodímero SAE1/SAE2 y la enzima SCE1 están involucrados en la embriogénesis, ya que se ha mostrado que las mutantes nulas dobles de SCE1 en *Arabidopsis* mueren en la etapa embrionaria (Saracco *et al.*, 2007). Sin embargo, el silenciamiento génico de SCE1 en las líneas de *Arabidopsis* no produjo defectos en el desarrollo (Van den Burg *et al.*, 2010).

Un enfoque para estudiar el papel de SCE1 en la inmunidad innata de la planta es afectando su regulación, por ejemplo, la sobreexpresión de este gen en *Arabidopsis* dio lugar a una mayor resistencia a *Pseudomonas* PstDC3000 y se redujeron los síntomas de la enfermedad, por lo que se concluyó que la sobreexpresión del parálogo de SCE1 resultó en la activación de la respuesta de defensa. Además, las plantas sobre-expresantes mostraron un aumento de los niveles de conjugados SUMO 1-2, lo que indica que la sobreexpresión de SCE1 inhibe la desconjugación de SUMO y/o estimula la conjugación de SUMO (Van den Burg *et al.*, 2010).

En el presente trabajo hemos generado plantas transgénicas de variedades comerciales de tomate que sobreexpresan constitutivamente el gen SCE1, a fin de evaluar su resistencia contra *Cmm*.

## 2. Metodología

### 2.1 Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y construcción del vector binario pBI121-5'UTR-SCE1

El gen SCE1 fue aislado de cDNA de *Solanum peruvianum* utilizando oligonucleótidos específicos SCE1-F (5'- ATGTCGGGAGGGATT -3') y SCE1-R (5'- AAGAATGTTTGTCTAATG -3'); el producto de PCR obtenido (480 pb) fue subclonado en el vector comercial pGEM-T Easy. Para obtener la región TEV5'UTR que proviene de *Tobacco etch virus* (TEV), la cual confiere mayor estabilidad al mensajero, se diseñaron oligonucleótidos especiales que se usaron para amplificar dicha secuencia por PCR a partir del vector pTRL0027, que la contiene (donado por el Dr. James Carrington, Universidad de Oregon).

El vector binario pBI121 fue digerido con las enzimas *Xba*I y *Sac*I para remover el gen reportero GUS; al mismo tiempo se llevó a cabo la digestión de las construcciones pGEM- TEV5'UTR (enzimas *Xba*I y *Apa*I) y pGEM-SCE1 (*Apa*I y *Sac*I), y subsecuentemente los productos de la digestión se resolvieron en un gel de agarosa al 1%; la banda de 480 pb correspondiente al gen SCE1, el producto de 170 pb de la región TEV5'UTR, y el fragmento de 13 Kb del vector pBI121 digerido se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Posteriormente se procedió a la ligación de los tres fragmentos independientes empleando a la T4 ADN ligasa (New England, Biolabs); con el producto de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* Top10 F' y se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina. Las clonas obtenidas fueron confirmadas por análisis de PCR con oligonucleótidos específicos que amplifican el marco de lectura de SCE1, y por digestión con enzimas de restricción; finalmente, la construcción se corroboró por secuenciación.

En este trabajo fueron utilizadas las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* c58, GV3101, GV3010 y LBA4404; transformadas por electroporación con el vector pBI121-TEV5'UTR-SCE1. En la Tabla 1 se describen algunas características de las diferentes cepas de *Agrobacterium*.



**Tabla 1. Características de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* empleadas en este trabajo.**

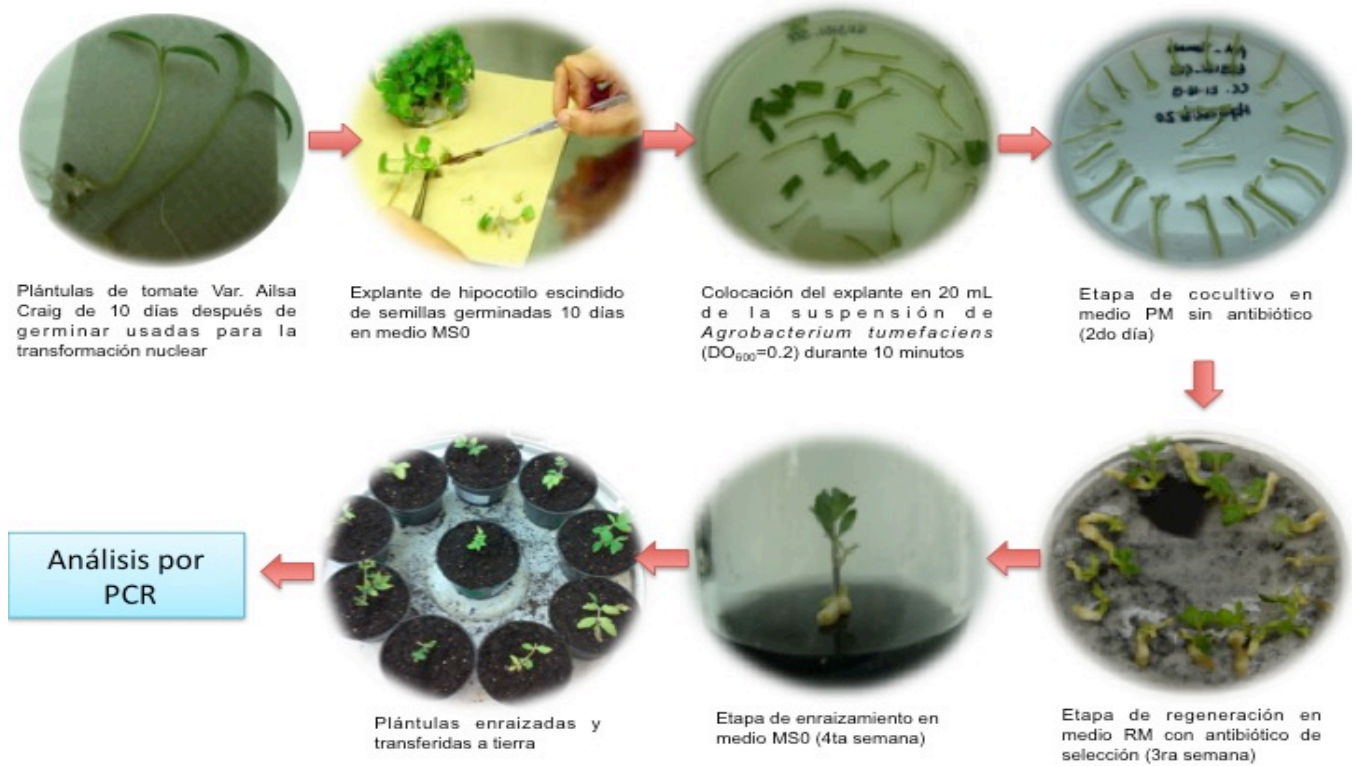
<b>Cepa</b>	<b>Plásmido Ti</b>	<b>Opina</b>	<b>Gen marcador</b>
LBA4404	Curada	Octopina	Rifampicina
GV3101	Curada	Nopalina	Rifampicina
c58	Curada	Nopalina	Rifampicina
GV3010	pMP90	Nopalina	Rifampicina, Gentamicina

## **2.2 Transformación nuclear de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Alisa Craig) mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens***

Para la transformación de plantas de tomate se siguió el protocolo descrito por Soria-Guerra (2007), modificando el tipo de explante. Se utilizó el sistema de co-cultivo de explantes vegetales con *A. tumefaciens*, en la Figura 1 se ilustra el procedimiento que se detalla a continuación.

Se germinaron semillas *in vitro* durante diez días, se retiraron asépticamente los cotiledones y radícula de las plántulas, transfiriendo los hipocotilos a una suspensión de *Agrobacterium* por 10 min para la infección. La suspensión fue obtenida por la inoculación de *Agrobacterium* que alberga la construcción pBI121-TEV5'UTR-SCE1 en 30 mL de medio YM conteniendo 100 mg/L de kanamicina e incubado a 28 °C en agitación constante (250 rpm) durante 48 horas; después se colectaron las células por centrifugación a 3,600 rpm, 15 minutos, y se resuspendieron en 20 mL de medio MS0 ajustando a una DO<sub>600</sub> de 0.2.

Posteriormente, los explantes fueron removidos de la suspensión bacteriana y colocados sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de bacteria y colocados en placas con medio PM (Tabla 2) para co-cultivar durante 2 días en oscuridad a una temperatura de 25 +/- 2°C. Posterior al periodo de co-cultivo, todos los hipocotilos fueron transferidos a placas con medio RM (Tabla 2), adicionado con carbón activado 3 g/L y ácido cítrico 25 mg/L, y los antibióticos cefatoxima (250 mg/L, y kanamicina (100 mg/L). La cefotaxima mata a la agrobacteria y la kanamicina selecciona a los tejidos transformados. Las placas fueron puestas en una cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y a una temperatura de 25 +/- 2°C y resembradas a medio fresco cada 15 días. Cuando las plántulas regeneradas alcanzaron una altura de 3-4 cm se colocaron en medio RTM (Tabla 2), para inducir la formación de raíces. Un mes después las plantas fueron transferidas a tierra estéril, y posteriormente crecidas en un invernadero hasta estado adulto.



**Figura 1. Representación esquemática de la transformación de plantas vía *Agrobacterium* y regeneración de plantas de tomate.**

**Tabla 2. Medios para cultivo *in vitro* de tomate (*Solanum lycopersicum*).**

<b>Componentes</b>	<b>PM</b>	<b>RM</b>	<b>RTM</b>
Sales MS	Si	Si	Si
Vitaminas MS	1 mL	1 mL	1 mL
BA	1 mg/L	-	-
ANA	1 mg/L	-	-
IAA	-	0.5 mg/L	1 mg/L
Zeatina	-	1 mg/L	-
Tiamina	-	0.1 mg/L	-
Sacarosa g/L	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7
Fitigel g/L	3	3	3
Cefatoxima	-	250 mg/L	250 mg/L
Kanamicina	-	100 mg/L	100 mg/L
Carbón activado g/L	2	3	1
Ácido cítrico mg/L	25	25	-

Aforar a un litro con agua destilada estéril. PM: Medio de co-cultivo; RM: Medio de selección; RTM: Medio de enraizamiento.

### **2.3 Extracción de ADN, PCR y Southern blot**

Se extrajo ADN genómico de las plantas que mostraron resistencia al antibiótico de selección y una planta sin transformar usada como control. La presencia del transgén SCE1 fue confirmada por PCR usando el par de oligonucleótidos específicos SCE1-F (5'- ATGTCGGGAGGGATT -3') y SCE1-R (5'- AAGAATGTTTGTCTAATG -3'); mientras que la detección del gen *nptII* se llevó a cabo utilizando el par de oligonucleótidos NPTII-F (5'TATTCGGCTATGACTGGGCA-3') y NPTII-R 5'-GCCAACGCTATGTCCTGAT-3'). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para determinar el número de copias del transgén insertadas en el genoma de la planta se usó el análisis de Southern blot, para lo que se digirieron 70 µg de ADN genómico con las enzimas *HindIII/EcoRI* y el producto de la digestión se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. El ADN se transfirió una membrana de Nylon N+ y se fijó en UV cross-linking. Para el marcaje de la sonda se realizó un PCR con oligonucleótidos específicos para el gen cDNA SCE1 y el producto de 480 pb fue marcado usando el kit de biotina (Thermo scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante. La hibridación se llevó a cabo durante 16 h a 55°C utilizando los buffers suministrados en el kit. La membrana se lavó dos veces en SSC 2X/0.1% SDS durante 15 min cada lavado, seguido de un lavado en SSC 1X /0.1% de SDS durante 30 min; por último se realizó un lavado durante 10 min con SSC 0.1X/0.1%; todos los lavados se llevaron a cabo a 55°C. Los pasos de bloqueo, lavado y de detección de señales se realizaron de acuerdo con el sistema de detección del fabricante (Thermo scientific). La membrana se expuso durante una hora a una película de rayos X (Kodak) para autoradiografía.

### **2.4 Extracción de ARN y análisis por RT-PCR semi-cuantitativa**

Se colectaron hojas de las plantas transformadas positivas que fueron confirmadas por PCR, y una planta no transformada, y fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. La extracción de RNA se llevó a cabo usando el reactivo Trizol® y siguiendo el procedimiento del fabricante, además fueron tratadas con DNasa. Se sintetizó el cDNA a partir de 1 µg de RNA en un volumen de reacción de 20 µL. Para llevar a cabo la RT-PCR se usaron 100 ng/µL del

cDNA sintetizado en un volumen de reacción de 50  $\mu$ L que contienen una unidad de Taq ADN polimerasa,  $MgCl_2$  25mM, Buffer 1X, dNTPs 10 mM, y 10  $\mu$ M de cada oligonucleótido para SCE1. Como control de carga se amplificó una región del gen de actina utilizando los oligonucleótidos específicos para la región. Cada reacción de PCR incluyó una desnaturalización inicial a 94° C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94° C durante 30 s, una temperatura de alineamiento de 60°C durante 30 s (para SCE1 y Actinas) y una extensión final a 72 °C durante 1 min. Un volumen de 10  $\mu$ L de cada mezcla de reacción de PCR se retiró después de 25, 30 y 35 ciclos, los productos se separaron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

## **2.5 Confirmación de la sobreexpresión génica de SCE1 por PCR en tiempo real (qRT-PCR)**

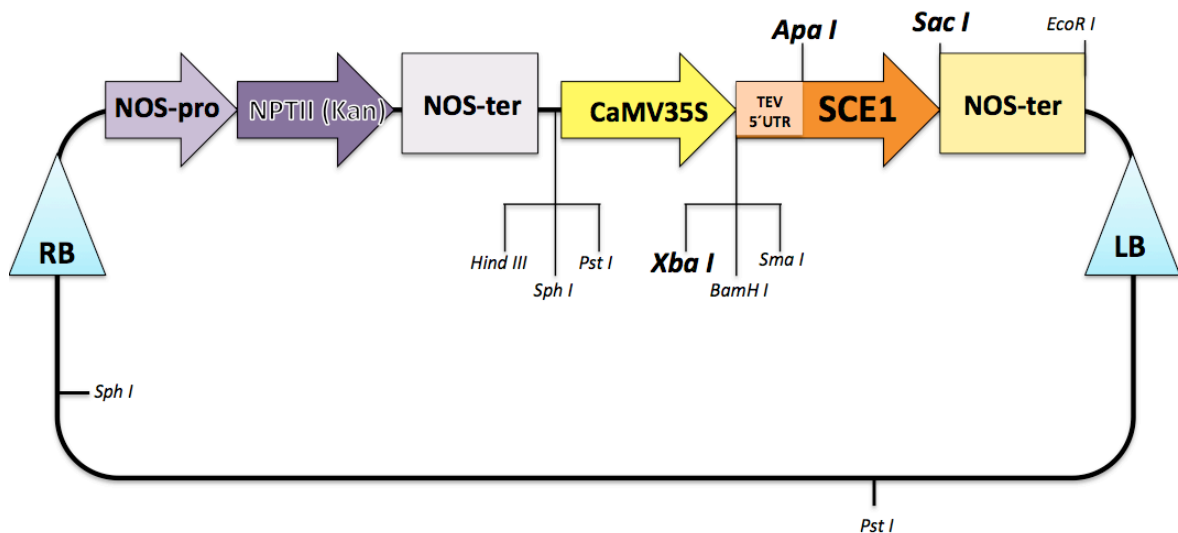
Para la confirmación de los niveles de expresión de SCE1 por PCR tiempo real, se utilizó el mismo cDNA empleado en la sección 2.4. La cuantificación se desarrolló en el equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real time PCR system versión 2.0, en formato de 96 pozos. El programa de ciclado incluyó una desnaturalización inicial 94°C por 5 min; 40 ciclos de 94°C durante 25 s, 60°C por 30 s, los experimentos fueron llevados a cabo con el kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Los niveles de expresión fueron normalizados con el gen de actina y los cambios en los niveles de expresión fueron determinados utilizando el ciclo umbral ( $C_t$ ) con el método de  $\Delta\Delta C_t$  (Livak y Schmittgen, 2001); cada determinación se realizó por triplicado y los valores reportados representan el promedio más la desviación estándar.

### 3. Resultados

#### 3.1 Construcción pBI121-5'UTR-SCE1

Para la transformación nuclear de tomate con el gen que codifica la enzima conjugante de SUMO (SCE1), se utilizó el vector binario pBI121 que contiene el gen reportero GUS el cual puede ser eliminado con enzimas de restricción para insertar en su lugar el gen de interés; la expresión de dicho gen queda bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV), y el vector contiene además un gen de resistencia a kanamicina para la selección del tejido vegetal transformado (Figura 2).

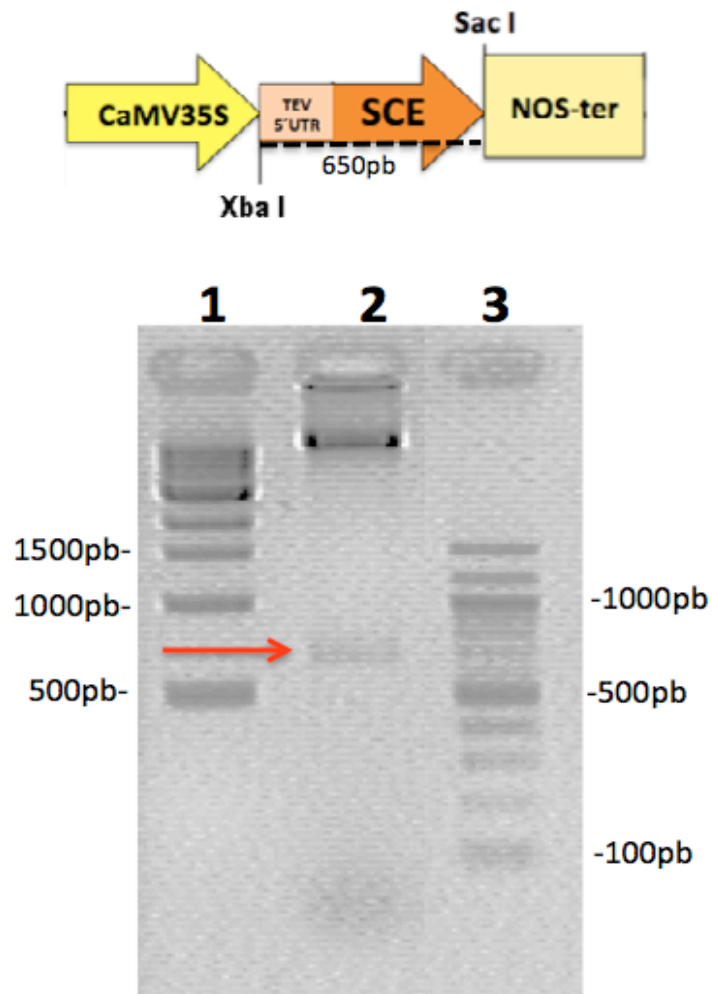
A fin de obtener el cassette de expresión en plantas para el gen SCE1, la secuencia TEV5'UTR y el gen SCE1 fueron clonados río abajo del promotor 35SCaMV en el vector pBI121, reemplazando el gen GUS para la transformación nuclear. La presencia del transgén se confirmó mediante perfil de restricción con las enzimas *Xba*I y *Sac*I, que liberaron un fragmento de 650 pb (Figura 3). Además se realizó PCR con oligonucleótidos que se alinean en el promotor 35SCaMV y en el terminador NOS, obteniendo un producto de 1,050 pb (Figura 4). Finalmente se realizó PCR a la clona E1 con oligonucleótidos específicos diseñados para que alineen y amplifiquen dentro del gen SCE1 y la región TEV5'UTR dando un producto de 480 pb y 170 pb respectivamente (Figura 4). Se obtuvo así la construcción pBI121-TEV5'UTR-SCE1 y se transfirió a las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404, GV3101, c58 y GV3010 por electroporación. Las cepas de *A. tumefaciens* transformadas fueron utilizadas subsecuentemente para la transformación nuclear de tomate.



**Figura 2. Representación esquemática de la construcción pBI121-5'UTR-SCE1.**

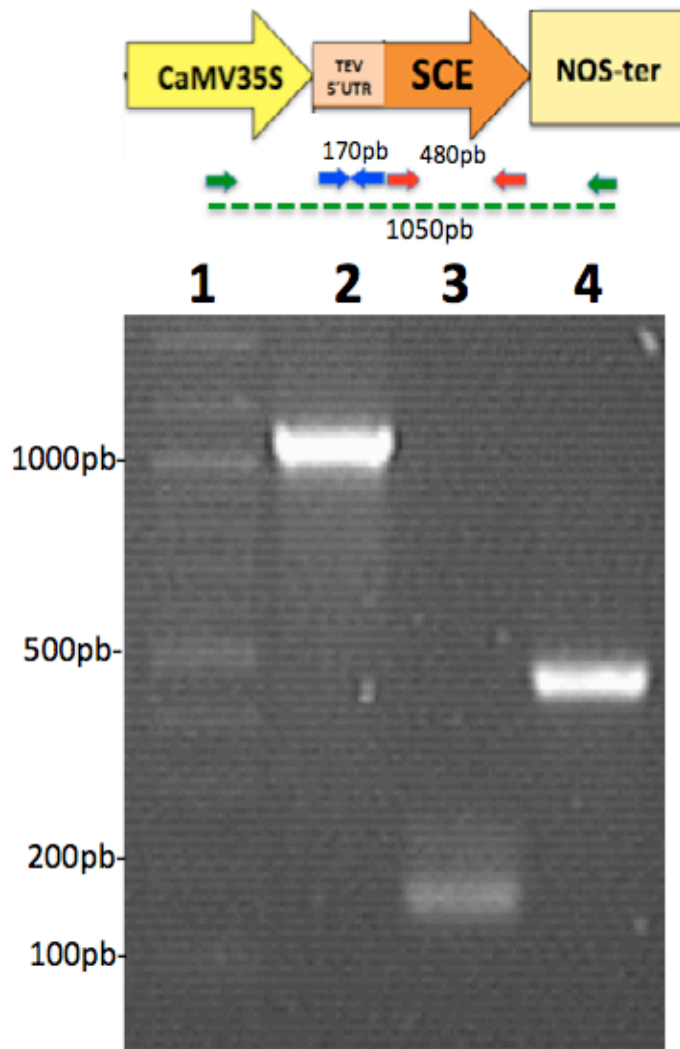
Representación esquemática del vector de expresión binario derivado de pBI121 que contiene el gen SCE1. También se muestra el gen de resistencia a kanamicina para la selección de los explantes transformados y sitios de restricción así como los bordes izquierdo y derecho del T-DNA que delimitan el segmento de DNA que se transfiere al genoma de la planta.





**Figura 3. Análisis de restricción de posible clona que contiene el gen de interés.**

Carril 1: MPM 100pb, carril 2: Patrón de restricción obtenido al digerir el plásmido con las enzimas *Xba*I/*Sac*I, liberando un fragmento de 650pb que corresponde a la región 5'UTR y el gen SCE1 fusionados, carril 3: MPM 1Kb.



**Figura 4. Análisis de PCR de la clona E1.**

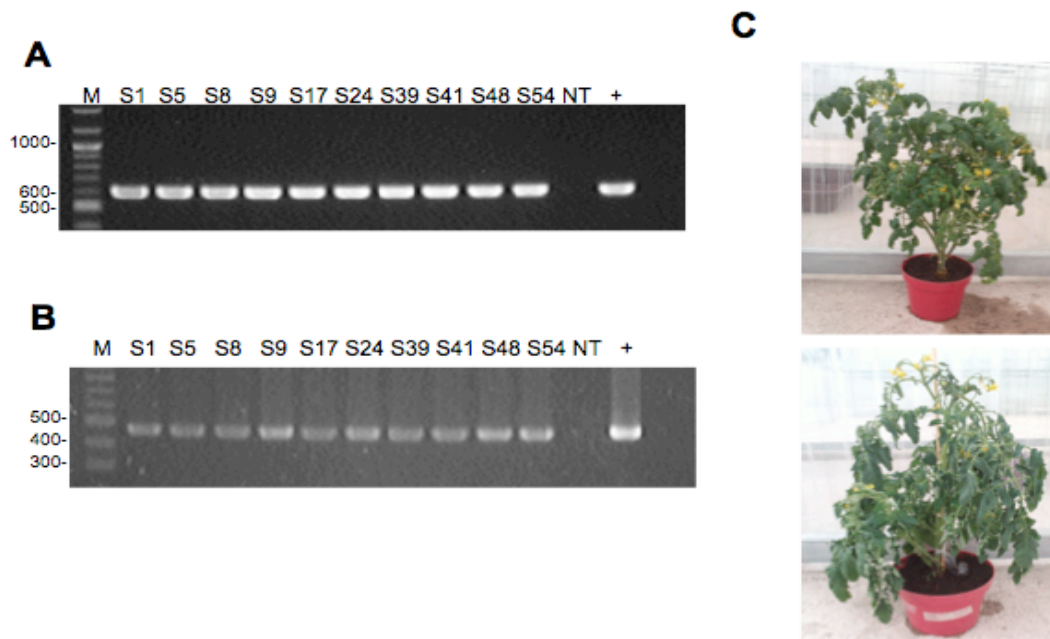
Carril 1: MPM 100pb, carril 2: Amplicón de 1,050pb obtenido con los primers *F* 35S y *R* NOS-ter, carril 3: Amplicón de 170pb obtenido con los primers *F* TEV5'UTR y *R* TEV5'UTR, carril 4: Amplicón de 480pb obtenido con los primers *F* SCE y *R* SCE.

### **3.2 Transformación nuclear de *S. lycopersicum* mediante *Agrobacterium tumefaciens***

Se generaron plantas de tomate transgénicas para probar si la sobreexpresión constitutiva del gen SCE1 conduce a una mayor resistencia a la infección por *Cmm*.

Para determinar la eficiencia de transformación de diversas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* en tomate, se transformaron las cepas LBA4404, GV301, c58 y GV3010 con la construcción pBI121-TEV5'UTR-SCE1. Los brotes resistentes a kanamicina que se obtuvieron a partir de hipocótilos de tomate var. Ailsa Craig de 10 días después de germinar, y se transformaron con las cuatro cepas de *A. tumefaciens*; en total se analizaron 148 plantas por PCR con cebadores que alinean en el promotor y terminador del vector, en *nptII* y cebadores específicos de SCE1 para confirmar la transformación. Los fragmentos esperados eran de 1,050 pb para la región de promotor y terminador de pBI121, de 600 pb para la secuencia codificante de *nptII* y de 480 pb para SCE1. Solo 46 de las 148 plantas analizadas resultaron positivas (Figura 5).

La cepa de *A. tumefaciens* GV3101 fue identificada como la más adecuada para una transformación eficiente al usar hipocótilos de tomate como explantes, ya que la tasa de supervivencia fue mayor y el porcentaje de transformación fue más elevado que en el resto de las cepas. Los detalles de los resultados que se obtuvieron con las cuatro cepas se muestran en la Tabla 3.



**Figura 5. Análisis por PCR de plantas de tomate transformadas con la construcción pBI121-TEV5'UTR-SCE1 vía *Agrobacterium tumefaciens*.**

(A) PCR con oligonucleótidos que amplifican el cassette de NPTII (600pb). Carril 1: Marcador de Peso Molecular 100pb (M): Carril 2-11 Plantas transformadas (S1, S5, S8, S9, S17, S24, S39, S41, S48 y S54); Carril 12: Planta sin transformar (NT); Carril 13: Control positivo (construcción pBI121-TEV5'UTR-SCE1). (B) PCR con oligonucleótidos que amplifican el gen SCE1 (480pb). Carril 1: Marcador de Peso Molecular 100pb (M): Carril 2-11 Plantas transformadas (S1, S5, S8, S9, S17, S24, S39, S41, S48 y S54); Carril 12: Planta sin transformar (NT); Carril 13: Control positivo (construcción pBI121-TEV5'UTR-SCE1). (C) Planta de tomate transformada (superior) y sin transformar (inferior).

**Tabla 3. Efecto de diferentes cepas de *A. tumefaciens* en la transformación y regeneración hipocotilos de tomate var. Ailsa Craig.**

Cepa	Explantos Iniciales <sup>1</sup>	Explantos Analizados <sup>2</sup>	Eficiencia de transformación <sup>3</sup>	Supervivencia <sup>4</sup>
LBA4404	50	39	10%	78%
GV3101	68	37	18%	54%
c58	73	31	30%	42%
GV3010	63	41	11%	65%

<sup>1</sup> Número de explantes que fueron co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens*

<sup>2</sup> Explantes que sobrevivieron después del segundo pase a medio de selección y fueron analizados por PCR

<sup>3</sup> Porcentaje de transformación calculado como explantes positivos/explantos iniciales

<sup>4</sup> Porcentaje de explantes vivos hasta el segundo pase/explantos iniciales

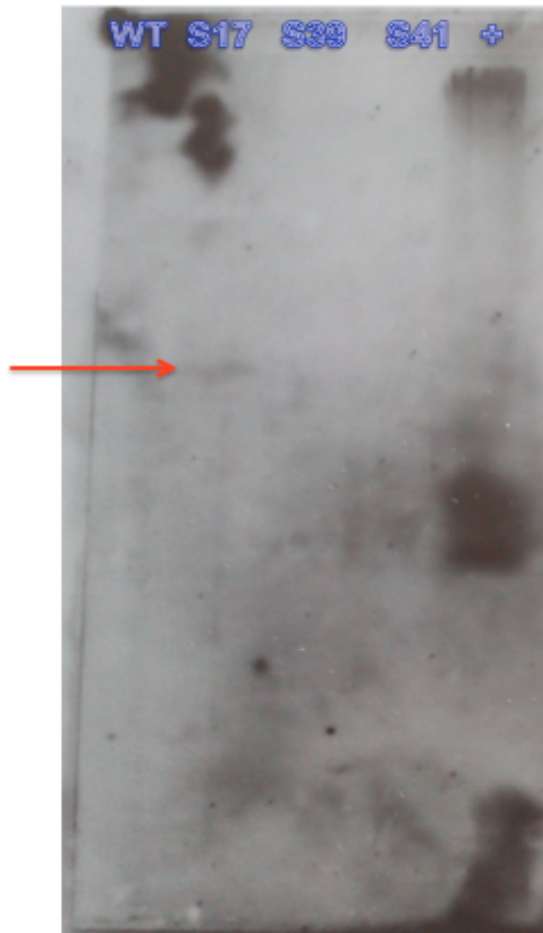
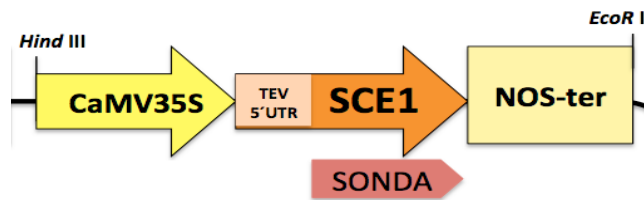
### **3.3 Southern blot de plantas T0 para la determinación del número de copias**

El ADN total extraído de la planta control (WT) y tres sobreexpresantes T0 (SCE17, SCE39 y SCE41) se utilizaron para el análisis por la técnica de Southern para confirmar el número de copias del transgén SCE1. La hibridación con la sonda de SCE1 reveló que la muestra S17 tiene una copia del transgén insertada, mientras que no se detectó señal de hibridación en el tejido de la planta no transformada.

Sin embargo, en las muestras 39 y 41 no fue claro el resultado, por lo que es recomendable repetir este ensayo para determinar el número de copias en las restantes líneas transgénicas. Cabe resaltar que es la primera vez que se usa este kit en el laboratorio y se está optimizando su uso (Figura 6).

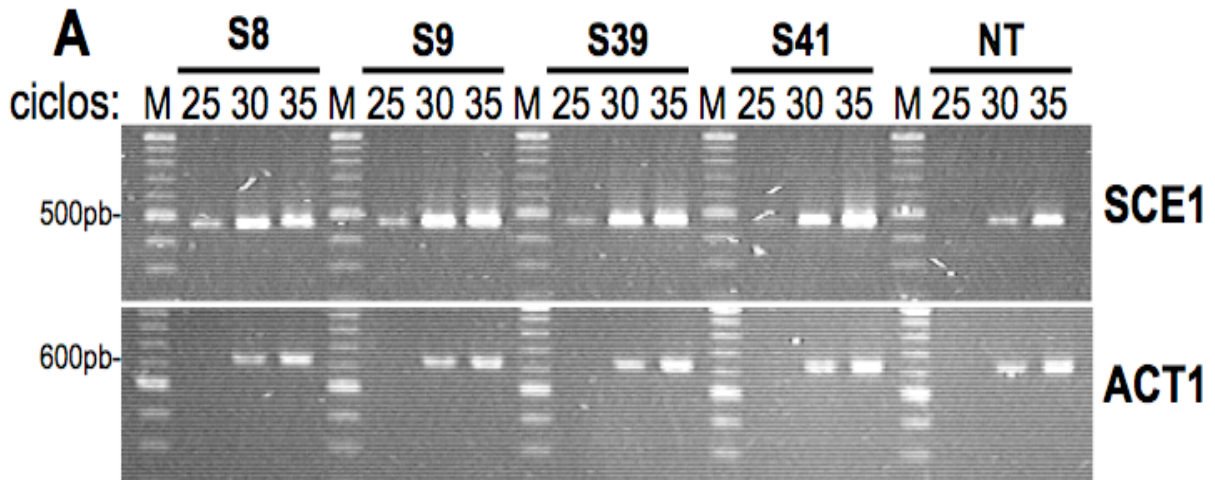
### **3.4 Expresión del gen SCE1 en cuatro líneas transgénicas de tomate T0**

Se confirmó la sobreexpresión del transgén en cuatro líneas transgénicas T0 (S8, S9, S39 y S41). Para este análisis, primero se realizó un RT-PCR semi-cuantitativo para determinar los niveles de transcripción de SCE1 en las plantas resistentes a kanamicina. Se observó un aumento de 2 a 2.5 veces en la expresión del gen en las plantas S8, S9 y S39 en el ciclo 25, respecto a la planta silvestre, mientras que la línea S41 muestra el menor nivel de expresión de todas las transgénicas analizadas en el ciclo 25 pero mayor que la NT en el ciclo 30 (Figura 7).



**Figura 6. Análisis de Southern blot de las líneas T0 de tomates transgénicos.**

El ADN genómico de las plantas transformadas con el gen SCE1 (S17, S39 y S41) y una planta no transformada (WT) fue digerido con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 0.8% y fue transferido a una membrana de Nylon cargada positivamente, la sonda que se usó fue un producto de PCR de cDNA SCE1 marcado con biotina. La membrana fue expuesta en una película de de Rayos X para su análisis.



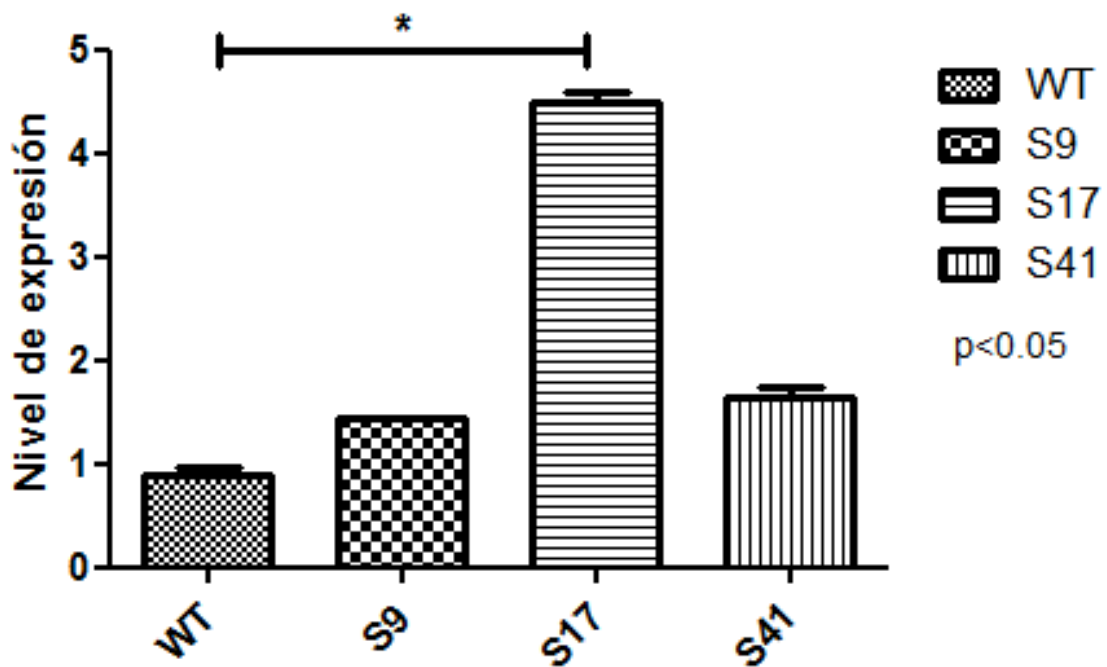
**Figura 7. Análisis de la expresión del gen SCE1 en plantas de tomate sobre-expresadas.**

RT-PCR semi-cuantitativo con cebadores específicos del gen diseñados para amplificar cDNA SCE1 o actinas como control de carga. RT-PCR de las líneas S8, S9, S39, S41 y una planta de tomate no transformada (NT) se incluyó como control. Los productos de PCR fueron monitoreados a los ciclos indicados, se separaron en un gel de agarosa al 1%, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100pb (M). El tamaño de los amplicones para cDNA SCE1 y actinas es de 480pb y 650pb, respectivamente.



### **3.5 Validación de la expresión del gen SCE1 en tres líneas transgénicas de tomate T0**

Se realizó también un análisis cuantitativo qRT-PCR para validar la expresión del transgén SCE1 en las líneas T0 (S9, S17, y S41), utilizando oligonucleótidos específicos. La Figura 8 muestra la cuantificación relativa del gen SCE1 respecto a la planta silvestre y encontramos que la línea transgénica de tomate S17 presenta una diferencia significativa en la expresión del gen SCE1 (4.5 veces) cuando se compara con la planta WT, mientras que las líneas S9 y S41 muestran un ligero incremento en la expresión.



**Figura 8. Validación por qRT-PCR de la sobreexpresión del gen SCE1 en tres líneas transgénicas de tomate.**

La gráfica representa los cambios en los niveles de expresión de las líneas S9, S17, S41 y una planta WT usada como control. Todos los datos fueron normalizados con el nivel de expresión de actina. Se muestra el promedio de tres réplicas y desviación estándar.

#### 4. Discusión

En este estudio, hemos adaptado un método de transformación de tomate para sobre-expresar el gen SCE1, utilizando como explante el hipocotilo y agentes que reducen la oxidación de los callos, de tal forma que se han obtenido plantas T0 en menor tiempo que los protocolos previamente establecidos en el laboratorio. Se incrementó la eficiencia de transformación, llegando a un 18% con la cepa de *Agrobacterium* GV3101, casi el doble que la LB4404 que es la más usada en tomate. Los resultados de este trabajo tienen potencial para el desarrollo de plantas de tomate transgénicas con resistencia a *Cmm*. En este trabajo, se utilizó el método de ganancia de función mediante la sobreexpresión en plantas transgénicas de tomate, ya que se ha reportado que la enzima de conjugación SCE1 ha sido previamente implicada en la resistencia a las enfermedades (Kurepa *et al.*, 2003; Saracco *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2010; Van den Burg *et al.*, 2010). Recientemente en nuestro grupo de trabajo, Esparza-Araiza (trabajo sin publicar) realizó el análisis funcional del gen SCE1 mediante su silenciamiento en especies resistentes a *Cmm* a través de VIGS, atribuyéndole a este gen un papel en la respuesta de defensa contra *Cmm* al observar en las plantas silenciadas un incremento en la susceptibilidad de la enfermedad producida por *Cmm*.

Sin embargo, el análisis funcional por VIGS solo es la primera estrategia para corroborar la función del gen, pero el experimento crucial es la sobre-expresión y el reto con la bacteria patógena. Para ello, se requiere la obtención de plantas transgénicas mediante un sistema de regeneración eficiente, y si bien existen numerosas publicaciones en las que se describe el uso de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación de tomate (van Roekel *et al.*, 1993; Qiu *et al.*, 2007; Dan *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2011; McCormick *et al.*, 1986), su eficacia manifiesta un amplio espectro de variabilidad en función de la variedad, tipo de explante, cepa de *Agrobacterium*, del antibiótico de selección, entre otras cosas. Por ello, se decidió optimizar la regeneración de una variedad comercial de tomate (*S. lycopersicum* var. Ailsa Craig) usando diferentes cepas de *Agrobacterium*, y empleando hipocotilos como explante inicial.

En el presente trabajo encontramos que el sistema de regeneración usando hipocotilos es más eficiente y más rápido para la regeneración de plantas T0 que partir de cotiledones, ya que la obtención de una planta completa en tierra es en tan solo 4 meses desde el co-cultivo con *Agrobacterium*, mientras que otros protocolos que usan otras fuentes de explantes como cotiledones tarda alrededor de un año en obtener plantas completas (Soria-Guerra, 2007).

Como se mencionó anteriormente, la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* es el factor clave durante la transformación nuclear de la planta, ya que se ha reportado que difieren en su capacidad para transferir el T-DNA a varias especies vegetales (Godwin *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1990). Es por eso que en el presente trabajo decidimos evaluar la capacidad infectiva de 4 cepas de *Agrobacterium tumefaciens* usando hipocotilos como explantes. La cepa con mayor porcentaje de transformación fue la c58 con 30% (n=73), sin embargo, presenta bajo índice de supervivencia (10%) debido a que la bacteria es muy virulenta e infecta muy rápido el tejido y es muy difícil eliminarla. La cepa que presenta un mejor balance entre transformación (18%) y supervivencia (54%) es la GV3101 (n=68), por lo que la seleccionamos en este trabajo como la cepa más adecuada para transformar tomate a partir de hipocotilos. Aunque la cepa LBA4404 se ha utilizado con éxito para transformar otras especies vegetales, nosotros obtuvimos un menor porcentaje de transformación (10%) (n=50) respecto a las otras ensayadas. Además, al utilizar el sistema de explantes de hipocotilos con esta cepa, fue difícil regenerar los hipocotilos putativamente transformados y la mayoría no desarrollaron raíz.

La elevada eficacia de transformación obtenida con la cepa c58 (30%) en relación con la LBA4404 podría explicarse por la diferencia en la eficiencia para transferir el T-DNA a las células infectadas. La mayor parte de la literatura que describe la eficiencia de transformación en tomate utiliza c58 y GV3101 (Chetty *et al.*, 2012). Solo en un trabajo, en el que se usa la cepa LBA4404, se informa sobre elevadas proporciones de transformación 70% (Fillatti *et al.*, 1987).

Las plantas de tomate que sobre-expresan el gen SCE1 que se obtuvieron en este trabajo, no exhibieron diferencias fenotípicas respecto a las plantas control (no transformadas), lo que sugiere que la sobreexpresión constitutiva de este gen no altera de manera notable la fisiología vegetal, estos resultados también los observaron por Tomanov *et al.*, 2012, al sobreexpresar dos isoformas de SCE1 en *Arabidopsis*.

Por otro lado, en el análisis RT-PCR semi-cuantitativo observamos que hay mayor acumulación en los niveles de transcrito de SCE1 en las líneas 8, 9, 39 y 41 respecto a la silvestre, comparándolas al ciclo 30. Estos resultados fueron validados mediante qRT-PCR y muestran que la expresión del transgén está por arriba de la expresión que muestra la planta no transformada (control) lo que sugiere que la inserción del transgén fue en un sitio del genoma que permitió su transcripción a partir del promotor constitutivo 35S, que es muy activo y permite una mayor producción de mensajeros de SCE1 que en la planta WT. Está por obtenerse la generación T1, la cual hará factible realizar retos contra la bacteria *Cmm* y corroborar si la sobreexpresión del gen SCE1 confiere tolerancia a esta bacteria.

Este trabajo contribuye a los esfuerzos para hacer uso biotecnológico del gen SCE1 de *S. peruvianum* como candidato para conferir protección contra el patógeno *Cmm* en tomate que causa una enfermedad devastadora. Además, sería muy interesante para determinar los espectros de resistencia de estas plantas transgénicas contra varios agentes patógenos conocidos de tomate.

## 5. Bibliografía

- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis- Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I., and 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.
- Borboa, F. J., Rueda, P. E. O., Acedo, F. E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O., and García, O. A. M. (2006) Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate del estado de Sonora, México. *Rev Fitotecnia Mexicana* 32: 319-32.
- Carlton, W.M., Braun, E.J., and Gleason, M.L. (1998) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology* 88:525-529.
- Castillo, A. G., Kong, L. J., Hanley-Bowdoin, L., and Bejarano, E. R. (2004) Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J Virol* 78:2758-2769.
- Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W., and Orozco-Cárdenas, M. L. (2012) Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Rep* 32:239-247.
- Cruz-Mendivil, A., Rivera-Lopez, J., German-Baez, L. J., Lopez-Meyer, M., Hernandez-Verdugo, S., Lopez-Valenzuela, J. A., Reyes-Moreno, C., and Valdez-Ortiz, A. (2011) A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of Tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. *Hort Sci* 46:1660–1665
- Dan, Y., Yan, H., Munyikwa, T., Dong, J., Zhang, J., and Armstrong, C. L. (2006) Micro-Tom a high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Rep* 25:432–441.
- EPPO. (2010) Data sheets on quarantines Pest. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Escaff, M., Gil, P., Ferreyra, R., Estay, P., Bruna, A., Maldonado, P., and Barrera, C. (2005) Cultivo del tomate bajo invernadero. *Boletín INIA* 128:79.
- Fillati, J. J., Kiser, J., Ronald, R. and Comai, L. (1987) *J Biotechnol.* 5:726-730.
- Francis, D.M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B., and St. Clair, D. (2001) Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis* 85:1171-1176.
- Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B., and Newbury, H. J. (1991) The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium-mediated* transformation vary according to plant species. *Plant Cell Rep.* 9:671-675
- Hay, R. T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18: 1-12

- 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.
- Johnson, E. S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73: 530-540
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D.Y., and Vierstra, R. D. (2003) The small Ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem* 278: 6862-6872.
- Lara-Ávila, P., Isordia-Jasso, I., Castillo-Collazo, R., Simpson, J., and Alpuche-Solís, A. (2011) Gene expression analysis during Interaction of tomato and related wild species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Mol Biol Rep* 30:498-511.
- Liu, W., Parrott, W. A., Hildebrand, D. E., Collins, G. B., and Williams, E. G. (1990) Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports* 9: 362-364.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25: 402– 408.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R. and Fraley, R. (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 5:81–84.
- Miura, K., and Hasegawa, P. (2010). Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *The Cell* 20: 223-232.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Pérez, J., Hurtado, G., Aparicio, V., Argueta, Q., and Larín, M. A. (2000) Guía Técnica Cultivo de Tomate. *CENTA* 48 pp.
- Qiu, D., Diretto, G., Tavarza, R., and Giuliano, G. (2007) Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. *Sci Hort* 112:172–175.
- Ramírez, V. J. and Sáinz, R. R. (2006). Manejo Integrado de las Enfermedades del Tomate. 1ra. Ed. Once Ríos. México. pp. 19-160
- 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.
- Soria-Guerra R.E. (2007) Expresión en tomate de un polipéptido antigénico con epítomos de 3 exotoxinas bacterianas (DPT) codificado por un gen sintético. Tesis de doctorado, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

- Tomanov, K., Hardtke, C., Budhiraja, R., Hermkes, R., Coupland, G., and Bachmair, A. (2012) Small ubiquitin-Like Modifier conjugating enzyme with active site mutation acts as dominant negative inhibitor of SUMO Conjugation in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.* 55: 75-82
- 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. *The Plant Cell* 22: 1998-2016.
- Van Heusden, A.W., Koornneef, M., Voorrips, R. E., Brüggemann, W., Pet, G., Vrieling-van Ginkel, R., Chen, X., and Lindhout, P. (1999) Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor Appl Genet* 99: 1068–1074.
- van Roekel J.S.C., Damm B., Melchers L.S., and Hoekema A (1993) Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep* 12:644–647.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4: 137-142
- Xia, J. (2004). Proteases in pathogenesis and plant defense. *Cell Microbiol* 6: 905-913.



## **6. Procedimientos experimentales**

### **6.1 Preparación de células químicamente competentes y transformación de *E. coli* por choque térmico.**

Se prepararon células competentes a partir de un cultivo de *E. coli* Top 10 F' de 24 h, crecido en caldo LB a 37 °C. De este inóculo se tomaron 500 µL y se añadieron a 50 mL de caldo LB, se incubó por 90 min a 37 °C y agitación de 150 rpm. El cultivo se enfrió sobre hielo y se centrifugó 10 min a 9,000 rpm a 4°C. La pastilla se lavó con 4 mL de cloruro de calcio 0.1M y glicerol al 15%, y se volvió a empacar por centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en 630 µL de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 50 µL. Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron sobre hielo y se añadieron 100 ng del ADN de interés, se mezcló y se incubaron en hielo por 20 minutos. Los tubos se llevaron a un baño a 43 °C por 90 segundos y se regresaron inmediatamente al hielo por 10 minutos. Se añadió 1 mL de medio de cultivo LB y se incubó por 60 minutos a 37 °C y 150 rpm. Después, 100 µL del cultivo se inocularon en agar LB con 100 mg/mL de kanamicina o ampicilina, según el caso.

### **6.2 Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*.**

Se prepararon de acuerdo al protocolo de Cangelosi *et al.* (1991). La cepa de *Agrobacterium* se inoculó en medio de cultivo YM por dos días, de este cultivo ( $DO_{600nm} = 0.04-0.08$ ), se tomaron 5 mL y se les agregó medio YM hasta 100 mL y se incubó a 28 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (aproximadamente 4 h), se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7 y 10% de glicerol. Se centrifugó y se resuspendió la bacteria en 2 mL de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol y finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se resuspendió la pastilla en 400µL de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50µL y se almacenaron a -80 °C.

### **6.3 Extracción de ADN plasmídico.**

Se basó en el método de lisis alcalina de Sambrook *et al.* (1989). Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 16 horas y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos, se eliminó parte del sobrenadante, se resuspendió la pastilla con vórtex y se añadió 150 µL de la solución I de Birnboim (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 10 mM), se mezcló en vórtex y se agregaron 300 µL de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién preparada, se agitó por inversión, se añadieron 225 µL de la solución III de BD (acetato de sodio 3M, pH 4.8), se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa; se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm; se recuperó el sobrenadante y se adicionó un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7 y un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se precipitó a -20 °C por 30 minutos, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 13,000 rpm, se agregó RNAsa (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C por una hora, nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN con acetato de sodio e isopropanol frío, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm y se secó la pastilla a 50-60 °C; se resuspendió en 30 µL de agua milli Q.

### **6.4 Preparación de soluciones**

#### **6.4.1 TAE 20X**

Para preparar un litro se mezclaron 98.8 g de Tris base, 22.84 mL de ácido acético, 40 mL de EDTA 0.5 M pH 8, se aforó con agua destilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

#### **6.4.2 Agarosa 1%**

Para preparar 100 mL se añadió 1 g de agarosa a 100 mL de TAE 1X, se calentó hasta disolver en el microondas y se almacenó a temperatura ambiente.

## **6.5 Preparación de antibióticos**

### **6.5.1 Kanamicina (Stock de 100 mg/mL)**

Se disolvió 0.1 g de sulfato de kanamicina en agua desionizada. Se aforó a 1 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2  $\mu$ m) y se almacenó a -20 °C.

### **6.5.2 Carbenicilina (Stock de 100 mg/mL)**

Se disolvieron 0.1 g de carbenicilina en agua desionizada. Se aforó a 1 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2  $\mu$ m) y se almacenó a -20 °C.

### **6.5.3 Cefatoxima (Stock de 250 mg/mL)**

Se disolvió 1 g de cefatoxima en 4 mL de agua desionizada. Se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2  $\mu$ m) y se almacenó a -20 °C.

## **6.6 Reguladores del crecimiento**

### **6.6.1 Ácido Naftalenacético (ANA; Stock de 1.5 mg/mL)**

Se disolvieron 150 mg de ANA en 1 mL de hidróxido de sodio. Se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

### **6.6.2 Benciladenina (BA; Stock de 0.6 mg/mL)**

Se pesaron 60 mg de BA y se disolvieron en 1 mL de ácido clorhídrico 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a -20 °C.

### **6.6.3 Ácido Indol Acético (IAA; stock de 1 mg/mL)**

Se pesaron 100 mg de IAA y se disolvieron en 1 mL de hidróxido de sodio 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20 °C.

### **6.6.4 Zeatina (stock de 2 mg/mL)**

Se pesaron 25 mg de Zeatina y se disolvieron en 1 mL de hidróxido de sodio 1N, se aforó a 50 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C.

## **6.7 Preparación de medios de cultivo**

### **6.7.1 Medio de cultivo YM**

Para preparar 1 L de medio YM se pesaron 400 mg de extracto de levadura, 10 g de manitol, 100 mg de cloruro de sodio, 200 mg de sulfato de magnesio y 500 mg de fosfato de potasio. Se disolvieron en agua destilada, el pH se ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio 1N, se aforó con agua destilada y se esterilizó.

### **6.7.2 Medio de cultivo LB**

Para preparar 1 L de medio LB se pesaron 10 g de cloruro de sodio, 5 g de extracto de levadura y 10 g de bacto triptona se disolvieron, se aforó con agua destilada y se esterilizó. Cuando fue necesario se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico.

### **6.7.3 Medio de cultivo YM**

Para preparar un litro de medio YM se pesaron 10 g de manitol, 0.2 g de  $MgSO_4$ , 0.5 g  $K_2HPO_4$ , 0.4 g de extracto de levadura y 0.1 g de NaCl se disolvieron, se aforó con agua desionizada y se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 1N. Se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulgada<sup>2</sup> durante 15 min.

## **6.8 Medios MS para el cultivo de plantas *in vitro***

### **Estrategia general para la preparación**

Para preparar 1 L de medio de cultivo, se añadieron 10 mL de la solución de macronutrientes, 5 mL de micronutrientes, 22 mL de Cloruro de calcio y 10 mL de la solución Fe-EDTA MS. Se adicionaron 30 g de sacarosa y, después de añadir reguladores de crecimiento y vitaminas apropiados, el pH fue ajustado a 5.7 con hidróxido de sodio 1N/ácido clorhídrico 1N, finalmente se aforó a un litro con agua destilada estéril. Para los medios semisólidos se añadieron 2 g de fitagel (Phytotech, USA). Los medios se esterilizaron a 15 lb pulgada<sup>2</sup> por 15 minutos. Cuando fue necesario, se añadió el antibiótico previamente filtrado al medio después de esterilizar una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50 °C

**Mezcla basal de sales MS**

<b>Solución</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Nombre</b>	<b>Para aforar a un litro</b>
Stock de Macronutrientes	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Nitrato de Amonio	165 g
	$\text{KNO}_3$	Nitrato de Potasio	190 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnesio Heptahidratado	37 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de Potasio Monobásico	17 g
Stock de Micronutrientes	$\text{H}_3\text{BO}_3$	Ácido Bórico	1.24 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Manganeso Monohidratado	4.46 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Zinc Heptahidratado	1.720 g
	KI	Yoduro de Potasio	166 mg
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de Sodio Dihidratado	50 mg
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Cobre Pentahidratado	5 mg
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de cobalto Hexahidratado	5 mg
Stock de Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de Calcio Dihidratado	20 g
Stock de Fe-EDTA	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso Heptahidratado	2.784 g
	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	Etilendinitrilotetraacetato de Sodio	3.73 g