



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

“Mejoramiento genético de *Solanum tuberosum*  
mediante edición de genomas”

Tesis que presenta:

**IBT. Mónica Paola Lozada Cruz**

Para obtener el título de Maestra en Ciencias  
con especialidad en Biotecnología

Dirigida por:

Dra. G. Beatriz Xoconostle Cázares

Ciudad de México

Octubre, 2018.

## Agradecimientos

Agradezco a D's por las bendiciones que ha puesto en mi camino, las cuales me han permitido llegar a donde estoy, entre ellas:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible la realización de este posgrado.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, quien me apoyó antes de entrar a la maestría, tanto personal como académicamente. Al Dr. Roberto Ruiz Medrano, cuyas enseñanzas enriquecieron enormemente mi proyecto. Al Dr. Jesús Hinojosa por su amabilidad y disponibilidad.

A mis padres Mónica Cruz y Salvador Lozada, ejemplos, guías y apoyos incondicionales en mi vida entera. A mi hermano mi mayor motivación.

A mi familia por estar siempre pendiente de mí.

A mi novio Iván de la Madrid por ser inspiración y apoyo en cada momento de estos últimos 3 años y no dejarme de desistir en mis proyectos.

A los auxiliares M. en C. Brenda Yazmín Vargas Hernández y Leandro A. Núñez Muñoz, gracias por la guía y el apoyo tanto personal como académico. A mis compañeros del laboratorio 12 y 24 por la buena convivencia y un buen ambiente de trabajo así como consejos y ayuda.

A mis niños de servicio social por su apoyo en el proyecto.

A mis compañeros de maestría con los que viví el desarrollo personal que me faltaba. Anita, Leo, sin ustedes esto hubiera sido mil veces más difícil.

## Contenido

Agradecimientos .....	1
Índice de tablas .....	4
Índice de figuras.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	8
Introducción.....	10
Problemática de los alimentos a nivel Mundial.....	10
<i>Solanum tuberosum</i> L.....	11
Problemáticas de los cultivos de papas .....	12
Trehalosa y trehalasa en plantas contra el estrés hídrico.....	12
Los nemátodos, la plaga de las papas.....	15
Edición de genomas.....	18
Sistema CRISPR/Cas9 .....	18
Mecanismo de reparación de hidrólisis en doble cadena DSB (double-strand breaks).....	20
Transformación de <i>Solanum tuberosum</i> .....	22
Justificación .....	23
Hipótesis .....	23
Objetivos.....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos particulares .....	23
Estrategia Experimental.....	24
Materiales y métodos.....	25
Material biológico .....	25
Condiciones de crecimiento de material vegetal.....	25
Medios de cultivo .....	25

Extracción de DNA genómico mediante CTAB (Doyle & Doyle 19987) .....	26
Revisión de la concentración y calidad del DNA .....	27
Estandarización de PCR para los genes <i>tre1</i> y <i>ccs52</i> .....	28
Purificación de DNA de gel de agarosa .....	29
Diseño de oligos.....	29
Ligación de DNA en vectores bacterianos .....	29
Transformación por choque térmico.....	30
Clonación del gRNA en el vector de edición de genomas .....	31
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	32
Determinación de la concentración mínima letal .....	33
Selección de plantas transformadas .....	35
Identificación de plantas transformadas mediante PCR.....	35
Resultados y discusión .....	36
Análisis <i>in silico</i> para encontrar genes ortólogos <i>tre1</i> y <i>ccs52</i> en <i>Solanum tuberosum</i> .....	36
Obtención la secuencia de los genes <i>ccs52</i> y <i>tre1</i> de papa var. Alpha 690 .....	36
Clonación de los genes trehalasa y <i>ccs52</i> .....	38
Diseño de la estrategia de modificación de los genes <i>ccs52</i> y <i>tre1</i> de <i>Solanum tuberosum</i> a través de edición de genomas .....	38
Diseño del gRNA.....	38
Estandarización de transformación de papa con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	40
Identificación mediante PCR de plantas transformadas .....	42
Pruebas de medios de regeneración .....	43
Identificación de los posibles cambios en la secuencia de los genes. ....	45
Inducción de floración de papa .....	46
Conclusiones .....	48
Referencias.....	49

## Índice de tablas

Tabla 1 Medio de Propagación.....	25
Tabla 2 Medios de cultivo utilizados para los protocolos de transformación, con medio basal MS, y variación en los reguladores de crecimiento vegetal.....	25
Tabla 3 Mezcla de reacción para PCR punto final con enzima Takara.....	28
Tabla 4 Programa para el gradiente utilizado para estandarizar la PCR de los genes ccs52 y tre1 de papa var. Alpha .....	28
Tabla 5 Mezcla de reacción para clonación en el vector pCR8.....	30
Tabla 6 Mezcla de alineamiento.....	31
Tabla 7 Rampa de alineamiento .....	31
Tabla 8 Digestión de pBUN411 .....	31
Tabla 9 Ligación del gRNA al vector.....	32
Tabla 10 Mezcla de reacción para PCR con enzima recombinante utilizando DNA de A. tumefaciens .....	32
Tabla 11 Mezcla de reacción con enzima Takara para amplificación de un fragmento de Cas9 .....	33
Tabla 12 Oligos para los genes ccs52 y tre1 de papa variedad Alpha 690.....	36
Tabla 13 Secuencias de los gRNA utilizados para los genes tre1 y ccs52 de papa var. Alpha 690.....	39
Tabla 14 Conteo de explantes sometidos a diferentes concentraciones de herbicida Glufosinato de Amonio .....	40
Tabla 15 Frecuencia de regeneración de brotes a partir de segmentos de tallos seleccionados en 2mg/l en glufosinato.....	44

## Índice de figuras

Figura 1 Ruta de biosíntesis y degradación de trehalosa más frecuentemente encontrada en bacterias, hongos y plantas (Tang et al., 2017).....	13
Figura 2 Especies de nematodos y sus tipos de infección (sintetizado de Maggenti, 1981) .....	16
Figura 3 Genes involucrados en el mecanismo de infección de patógenos.....	17
Figura 4 Contribución nucleotídica en la actividad de un gRNA (Fuente: Doench et al., 2014) .....	20
Figura 5 estrategia experimental.....	24
Figura 6 Mapa del vector pCR8, empleado para la clonación de los genes tre1 y ccs52 ....	30
Figura 7 Extracción de DNA genómico de Solanum tuberosum (marcador de peso molecular, hoja 1, hoja2) Gel de agarosa al 1%.....	36
Figura 8 PCR del gradiente, tee1 y ccs52.....	37
Figura 9 DNA g de los genes ttre1 y ccs52.....	37
Figura 10 Explantes después de 2 semanas en contacto con herbicida .....	41
Figura 11 Plantas de Solanum tuberosum regeneradas puestas en medio de selección.....	42
Figura 12 PCR zCas9 para primeras plantas regeneradas. C-: gDNA WT, C+: vector cas9 .....	42
Figura 13 PCR zCas9 segundas plantas regeneradas .....	45
Figura 14 secuencias de las líneas independientes transformadas con ccs52 y tre1 .....	46

## Resumen

El mejoramiento de los cultivos ha evolucionado a lo largo de los años para obtener variedades más productivas (Mayex, 2016) y resistentes a condiciones ambientales adversas (Jirtle y Skinner, 2007) y a plagas o enfermedades (Serageldin, 1999). Un cultivo de interés agroindustrial es la papa (*Solanum tuberosum* L.) ya que aporta una valiosa fuente de nutrientes, ocupa el quinto lugar de los vegetales de mayor importancia económica en México y el tercero a nivel mundial (Kapoor et al., 1975). Esta especie ha demostrado una adaptación sustancial a diferentes suelos y estrés biótico (Santos Castellanos et al., 2010); sin embargo, el cambio climático, las plagas y las enfermedades emergentes están reduciendo su productividad, desafiando la estrecha resistencia de los cultivares comerciales (Escalante et al., 2000).

En México los cultivos de papa están amenazados, entre otras plagas, por nemátodos que afectan del 13 al 58% de la producción (Grunewald et al., 2008), siendo *Globodera rostochiensis* la plaga que tiene el mayor impacto en el país. Esta plaga se conoce como el nemátodo dorado y posee una alta tasa de reproducción y una viabilidad en el suelo de hasta tres décadas sin un huésped, por lo que su control y erradicación son costosos e ineficientes (Franco, 1994). Una vez que el nemátodo inicia la infección, la endorreplicación celular de la planta se altera, induciendo la formación de células gigantes conocidas como sincicios, necesarias para la reproducción de estos gusanos (Williamson y Hussey, 1996). Para abordar el control de nemátodos, se propuso inhibir la expresión del gen *ccs52*, a través de la edición del genoma, que codifica como regulador del ciclo celular implicado en la endorreplicación y así evitar desarrollo de sincicios (Jatala, 1986).

Con respecto al estrés abiótico, las variedades modernas de papa son sensibles a la sequía y al frío extremo (Loon, 1981). En este proyecto se propuso facilitar la acumulación de trehalosa modificando el sitio catalítico de la enzima trehalasa, responsable de la hidrólisis de este disacárido.

Se empleó el uso de herramientas CRISPR-Cas9 y se diseñó gRNA para dirigir ambos genes. Ésta nucleasa programable, administrada mediante *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1), escinde los sitios diana cromosómicos de una manera dependiente de la secuencia gRNA, produciendo hidrólisis de doble cadena de DNA específicas del sitio. La reparación de estos DSB por sistemas endógenos da como resultado modificaciones específicas del genoma. El vector de edición utilizado en contiene un promotor de ubiquitina de *Zea mays* que dirige la expresión de Cas9 y un promotor

U6 para la transcripción del gRNA. Dicho vector se introdujo a los explantes de papa utilizando *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.

Fue necesario estandarizar un protocolo de transformación para aumentar la cantidad de plantas regeneradas ya que la variedad Alpha de *Solanum tuberosum*, no reacciona de la misma manera a los métodos empleado para variedades europeas. Se utilizaron regiones internodales de tallo, en un medio de inducción de brotes y regeneración con 1mg/l de los reguladores 2IP y AIA.

De las plantas regeneradas después de la transformación, se obtuvieron 7 plantas con el vector para tre1 y 4 plantas con el vector ccs52. A las once plantas se les realizó una PCR punto final, amplificando una región de Cas9. Todas las plantas dieron positivo a la transformación, sin embargo, en el análisis de sus secuencias, no se encontró ningún cambio.

A pesar de lo anteriormente mencionado, el tener un proceso de transformación exitoso nos permitirá aumentar la cantidad de explantes regenerados y acrecentar las posibilidades de encontrar una línea independiente editada.



## Abstract

The improvement of crops has evolved over the years to obtain more productive varieties (Mayex, 2016) and resistant to adverse environmental conditions (Jirtle and Skinner, 2007) and pests or diseases (Serageldin, 1999). A crop of agroindustrial interest is the potato (*Solanum tuberosum* L.) since it provides a valuable source of nutrients, it occupies the fifth place of the most economically important vegetables in Mexico and the third worldwide (Kapoor et al., 1975). This species has demonstrated a substantial adaptation to different soils and biotic stress (Santos Castellanos et al., 2010); However, climate change, pests and emerging diseases are reducing their productivity, challenging the strong resistance of commercial cultivars (Escalante et al., 2000).

In Mexico, potato crops are threatened, among other pests, by nematodes that affect 13 to 58% of production (Grunewald et al., 2008), with *Globodera rostochiensis* being the plague that has the greatest impact in the country. This pest is known as the golden nematode and has a high reproduction rate and a viability in the soil of up to three decades without a host, so its control and eradication are costly and inefficient (Franco, 1994). Once the nematode starts the infection, the cellular endoreplication of the plant is altered, inducing the formation of giant cells known as syncytia, necessary for the reproduction of these worms (Williamson and Hussey, 1996). To address the control of nematodes, it was proposed to inhibit the expression of the *ccs52* gene, through the editing of the genome, which codes for the cell cycle regulator involved in endoreplication and thus avoid the development of syncytia (Jatala, 1986).

With respect to abiotic stress, modern potato varieties are sensitive to drought and extreme cold (Loon, 1981). In this project it was proposed to facilitate the accumulation of trehalose by modifying the catalytic site of the enzyme trehalase, responsible for the hydrolysis of this disaccharide.

The use of CRISPR-Cas9 tools was used and gRNA was designed to direct both genes. This programmable nuclease, administered by *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1), cleaves the chromosomal target sites in a manner dependent on the gRNA sequence, producing double-strand hydrolysis of site-specific DNA. The repair of these DSB by endogenous systems results in specific modifications of the genome. The editing vector used in contains a ubiquitin promoter from *Zea* mays that directs the expression of Cas9 and a U6 promoter for the transcription of the gRNA. This vector was introduced to potato explants using *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.

It was necessary to standardize a transformation protocol to increase the amount of regenerated plants since the Alpha variety of *Solanum tuberosum* does not react in the same way to the methods used for European varieties. The internodal stem regions were used in a shoot induction medium and regeneration with 1mg / l of the 2IP and AIA regulators.

Of the plants regenerated after transformation, 7 plants were obtained with the vector for *tre1* and 4 plants with the vector *ccs52*. Eleven plants were subjected to a final point PCR, amplifying a Cas9 region. All plants tested positive for transformation, however, in the analysis of their sequences, no change was found.

Despite the aforementioned, having a successful transformation process will allow us to increase the number of regenerated explants and increase the chances of finding an independent line edited.

## Introducción

A lo largo de los milenios, los seres vivos han evolucionado debido a cambios espontáneos inducidos por factores externos o por errores de la maquinaria celular (Mayex, 2016). Dichos cambios han sido aprovechados por el hombre para el desarrollo agrícola, mejorando especies vitales y de interés comercial para el sustento humano (Tolosa, 2015).

Los eventos naturales involucrados en el ciclo de la vida pueden actuar como mutágenos produciendo mutagénesis de forma azarosa en el material genético (Puigdomènech, P., 2014). Los errores en la replicación del DNA, los agentes biológicos como las bacterias, los virus, los bacteriófagos, los transposones y los retrotransposones, son fuentes biológicas que ocasionan cambios genotípicos. La radiación ionizante, la luz UV, el calor, el congelamiento, los agentes intercalantes, modificadores o análogos de bases nitrogenadas, las especies reactivas de oxígeno, etc., son ejemplos de agentes mutagénicos físicos y químicos (Crueger, 1993). En la biotecnología se han empleado estos factores como técnicas de mejoramiento de cultivos, sin embargo, hasta la fecha no es posible dirigirlos para la modificación específica, haciendo inviable su uso para el mejoramiento genético puntual y dificultando su selección (Montaldo, 1984).

Debido a que diversos factores pueden ocasionar cambios, el mejoramiento genético de plantas inició de manera empírica al comienzo de la agricultura con la domesticación de las especies vegetales de interés antropocéntrico. Por miles de años los agricultores han seleccionado las plantas que poseían las mejores características tales como su aspecto, color, sabor, etc. A raíz del surgimiento de la genética moderna, con la publicación de los principios de la herencia de Gregorio Mendel en el siglo XIX, el mejoramiento genético comenzó a sentar sus bases científicas hasta lo que conocemos hoy en día (Mayex, 2016).

## Problemática de los alimentos a nivel Mundial

Mientras la demanda mundial de alimentos aumenta día a día, la disponibilidad de superficie cultivable se mantiene constante. Además, para reducir la inseguridad alimentaria se debe incrementar la producción de alimentos y garantizar el abastecimiento de la población presente y futura. Según las proyecciones de la FAO (2009) es necesario aumentar en un 70% la producción alimentaria para lograr cubrir las demandas poblacionales en el año 2050. Para ello, existen tres estrategias: aumentar la superficie agrícola, incrementar la intensidad de los cultivos, o mejorar el

rendimiento (FAO 2013). Sin embargo, como se mencionó anteriormente la superficie de cultivo no va a aumentar por lo que se atacan las últimas dos estrategias para combatir este problema.

Debido a que las técnicas tradicionales de selección hacen casi imposible superar la crisis alimentaria ocasionada por tener poblaciones más grandes y longevas, esto abrió paso a la aplicación de biotecnología de vanguardia.

Mediante el uso de la biotecnología moderna y la ingeniería genética se ha realizado el mejoramiento de especies de importancia agroeconómica logrando satisfacer la demanda alimentaria, para esto se ha manipulado genéticamente a diversas especies vegetales, con el propósito de obtener variedades más productivas, resistentes a enfermedades y a condiciones ambientales adversas.

### *Solanum tuberosum* L.

Una de las especies de interés agroindustrial es la papa (*Solanum tuberosum* L.), la importancia de este cultivo radica tanto en sus características nutricionales, es decir su contenido de amioácidos, vitaminas, proteína y fibra; como a su capacidad de producir tubérculos durante todo el año (FAO, 2008). Debido a esto ocupa el quinto lugar de las 43 hortalizas de mayor importancia económica de México,

Se ha descrito a la papa como una planta herbácea y anual por su parte aérea, y perenne por sus tubérculos debido a su propagación vegetativa (Montaldo, 1984; Valadez, 1989). Posee tallos de dos tipos: aéreos y subterráneos. Al crecer, las hojas compuestas de la planta de la papa producen almidón, el cual se desplaza hacia la parte final de los tallos subterráneos, también llamados estolones. Estos tallos sufren un engrosamiento y así se producen unos cuantos o hasta 20 tubérculos cerca de la superficie del suelo. El número de tubérculos que llegan a madurar depende de la disponibilidad de humedad y nutrientes del suelo. El tubérculo puede tener formas y tamaños distintos, y por lo general pesa hasta 300 g (Kapoor et al., 1975).

Al terminar el período de crecimiento, las hojas y tallos de la planta se marchitan y los tubérculos se desprenden de los estolones. A partir de este momento, los tubérculos funcionan como depósito de nutrientes que permite a la planta subsistir en el frío y posteriormente reverdecer y reproducirse. Cada tubérculo tiene de 2 hasta 10 brotes laterales, distribuidos en espiral en toda la superficie. De estos brotes emergen las nuevas plantas, cuando las condiciones vuelven a ser favorables (Escalante et al., 1999)

## Problemáticas de los cultivos de papas

Como todos los cultivos la papa tiene requerimientos específicos, uno de ellos es la cantidad de agua que recibe. El suelo debe mantener un contenido de humedad relativamente elevado. Las mejores cosechas, en cultivos de 120 a 150 días, se obtienen con de 500 a 700 mm de agua. La falta de agua disminuye la producción a mitad o fines del período de desarrollo, más que si falta al inicio. En condiciones de clima templado y subtropical de regadío, un cultivo de unos 120 días produce cosechas de 25 a 35 toneladas por hectárea, mientras que en las zonas tropicales son de 15 a 25 toneladas por hectárea.

Sin embargo, la disponibilidad de agua en la agricultura no es sostenible a largo plazo ante la intensa competencia de los usuarios urbanos e industriales y al consumo humano de agua que están poniendo en peligro la eficacia de los ecosistemas de la Tierra (FAO, 2008). En el siglo XX la explotación del agua dulce duplicó con creces la tasa del crecimiento demográfico. Actualmente se extraen alrededor de  $3\,830\,000\,000\,000$  de litros) de agua para el consumo humano, de lo cual el sector agrícola ocupa el 70%. Es por esto que el sector agrícola debe incrementar considerablemente el volumen de producción por unidad de agua utilizada.

Además de los factores abióticos que pueden llegar a afectar las cosechas, la papa es susceptible a plagas y enfermedades. En México los cultivos de papa suelen verse afectados con hongos, plagas de lepidópteros, áfidos y nemátodos (Grageda Grageda et al., 2013). De estas plagas, el control de estos nemátodos es indispensable, ya que al colonizar los tubérculos, su mecanismo de infección consiste en rediferenciar las células de las raíces especializándolas para la alimentación de los adultos, provocando carencia en la calidad comercial debido a que afectan del 13 al 58% de la producción (Sasser y Freckman, 1987).

## Trehalosa y trehalasa en plantas contra el estrés hídrico

La trehalosa, también es conocida como  $\alpha,\alpha$ -trehalosa,  $\alpha$ -D-glucopiranosil,  $\alpha$ -glucopiranosido, es un disacárido no reductor en el que dos moléculas de glucosa están unidas por un enlace glicosídico 1-1 (Figura 1). Este disacárido está ampliamente distribuido en los seres vivos y su presencia en órdenes inferiores del reino vegetal se conoce desde hace muchos años. Su primer reporte tentativo ocurrió en 1832 en el hongo *Claviceps purpurea*, un patógeno productor de una

toxina letal para el humano. Posteriormente, se encontró en pupas del escarabajo *Larinus maculata Gyllenhal*, de nombre común “trehala”, que inspiró al químico Marcellin P.E. Berthelot para designarla como trehalosa (Elbein et al., 2003). Así mismo la trehalosa ha sido aislada tanto de algas, bacterias, hongos, insectos, invertebrados y levaduras, como de plantas no vasculares.

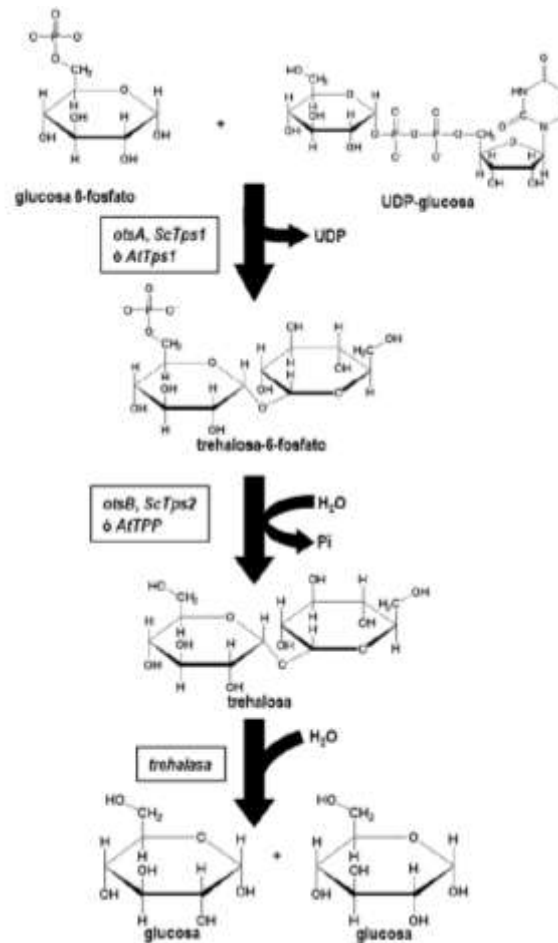


Figura 1 Ruta de biosíntesis y degradación de trehalosa más frecuentemente encontrada en bacterias, hongos y plantas (Tang et al., 2017)

Además de su papel como carbohidrato de reserva, en papas, la trehalosa funciona como regulador esencial en diversas etapas del desarrollo de la planta como formación del embrión y floración (Thevelein, 1987). La trehalosa también parece estar involucrada en la regulación del metabolismo del carbono y en la fotosíntesis, y su acumulación está asociada a una mayor tolerancia al estrés abiótico. Además, se ha demostrado que este azúcar juega un papel importante en la interacción planta-microorganismo (Elbein et al., 2003). Así mismo, la trehalosa actúa en la protección de proteínas y membranas celulares, en la inactivación o desnaturalización ocasionadas

por diversas condiciones de estrés que incluyen deshidratación, calor, frío y salinidad (Rodríguez, 2015).

Adicionalmente la trehalosa ha sido reportada como una molécula osmoprotectora, existen diferentes estudios donde el incrementar la síntesis de trehalosa, mediante una sobreexpresión de sus genes biosintéticos o disminuir la degradación de la misma, conllevó a una mayor tolerancia a sequía (Rodríguez, 2015). En 2015, el grupo de trabajo del laboratorio de Biotecnología Agrícola silenció por RNA antisentido la expresión del gen que codifica para la enzima trehalasa generando plantas con tolerancia a estrés abiótico. Corroborando que dicha estrategia es promisoría para la obtención de variedades resistentes a sequía y por lo tanto que podrían reducir el requerimiento de agua para su cultivo.

El proceso catalítico de la enzima trehalasa se efectúa a través de la hidrólisis del enlace glucosídico, originando una conversión anomérica, mediante el ataque nucleofílico por una molécula de agua (Barraza & Sánchez, 2013). Adicionalmente en plantas, la trehalosa se acumula en presencia de valindamicina A, que es un inhibidor específico para la trehalasa, sugiriendo que la trehalasa es la única vía en plantas para la degradación de la trehalosa. En plantas vasculares, los niveles de expresión de trehalasa son bajos, salvo en algunos órganos o estadios de desarrollo puntuales (Thevelein, 1987).

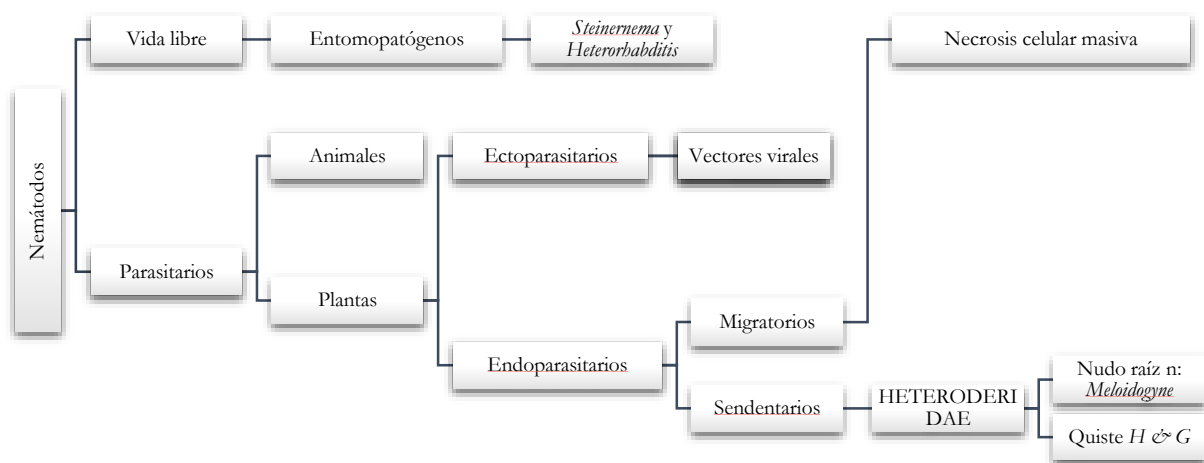
La degradación de la trehalosa se lleva a cabo en la levadura y en bacterias, plantas y animales, mediante la enzima trehalasa que origina dos moléculas de glucosa (Figura 1). En vertebrados y humanos no se ha detectado actividad enzimática de TPS ni de TPP, aunque sí existe una trehalasa que degrada trehalosa y que se expresa en el tracto digestivo y en riñón. Keller *et al.* (1982) describieron que *S. cerevisiae* posee al menos dos trehalasas, una localizada en el citosol y la otra en vacuolas.

En el reino vegetal, aunque la trehalosa ha sido reportada en varios pteridófitos incluyendo *Selaginella lepidophylla* y *Botrychium lunaria*; la presencia del azúcar es raro en las plantas vasculares y se informa sólo en la maduración de los frutos de varios miembros de *Apiaceae* y en las hojas de la desecación tolerante a la angiosperma *Myrothamnus flabellifolius*. Pero, la enzima **trehalasa** es omnipresente en las plantas. Es desconcertante que la trehalasa esté presente en las plantas superiores, aunque su sustrato esté ausente. Debido a esto se ha sugerido que las trehalasas podrían desempeñar un papel involucrado con los mecanismos de defensa

## Los nemátodos, la plaga de las papas

Los nemátodos que infectan papa pertenecen a los siguientes géneros: *Meloidogyne spp.*, *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*, siendo este último es de mayor impacto en el país (Grageda Grageda et al., 2013). Los síntomas ocasionados tras la infección del nematodo se confunden con estrés hídrico o falta de nutrientes, lo que hace difícil identificar la infección y su control es siempre preventivo. Se recomienda usar semillas sanas, rotar los cultivos y generalmente antes de la siembra dejar el terreno barbechado por un tiempo aunado con un control químico que consiste en agregar nematicidas.

A pesar de que los sistemas de mejoramiento genético tradicional son muy activos, se considera que no existen variedades de papa resistentes a nemátodos. Para poder desarrollar una estrategia de combate de nemátodos es necesario conocer la naturaleza de los mismos, estos se encuentran divididos en diferentes tipos como se muestra en la Figura 2. Las especies de *Globodera rostochiensis* y *G. pallida* son nemátodos endoparasitarios de plantas, su vida es sedentaria ya que requieren un sitio de alimentación apropiado para alcanzar el tamaño necesario para su reproducción.





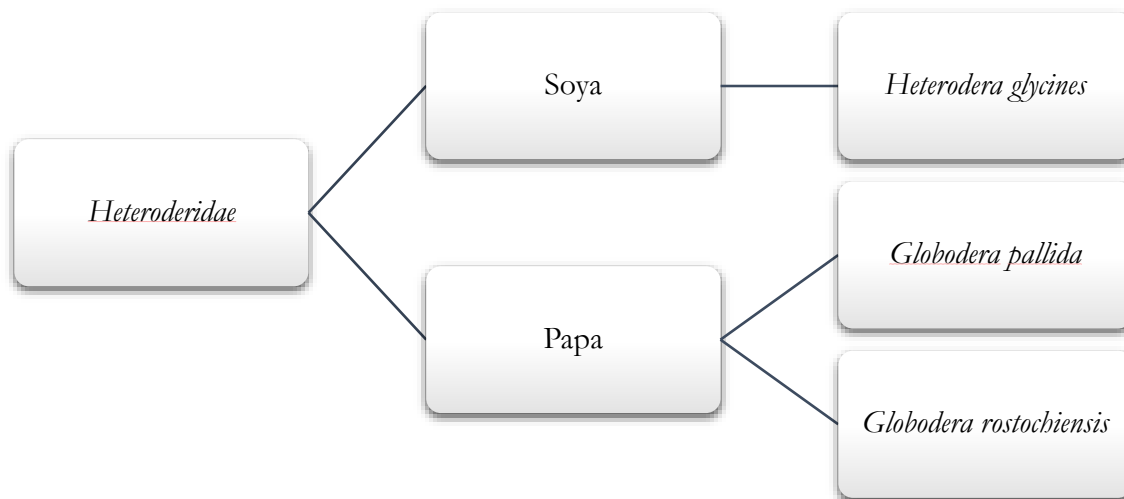


Figura 2 Especies de nemátodos y sus tipos de infección (sintetizado de Maggenti, 1981)

Éste sitio de alimentación se forma cuando los nemátodos infectan células del sistema radical formando agallas o nódulos, de color amarillento localizadas en tejido vascular de raíz cercano a elementos del xilema. Dichas células se caracterizan por tener: citoplasma denso y una gran cantidad de núcleos debido al fenómeno inducido de la endorreplicación.

La endoreplicación es el endociclo controlado por el desarrollo, que consiste en períodos discretos de fase S y fase G que dan como resultado células con un solo núcleo poliploide (Edgar and Orr-Weaver, 2001). Las células endocíclicas no entran en la mitosis y, por lo tanto, no presentan características de mitosis tales como cromosomas condensados y ruptura de la envoltura nuclear.

El endociclo de la planta está controlado por diversos factores o productos genéticos, y los análisis funcionales de mutantes y plantas transgénicas con niveles aberrantes de endo-reduplicación han llevado a la identificación de reguladores clave del endociclo. Por ejemplo, las dos clases de CCS52 identificadas en las plantas: CCS52A (tipo Cdh1 / Fzr / Srw1), que también se encuentra en levaduras y animales; y CCS52B, que se supone que es específico de la planta (Tarayre et al., 2004). La clase CCS52A está representada por dos miembros de la familia (CCS52A1 y CCS52A2), mientras que solo hay un gen CCS52B (Fülöp et al., 2005).

CCS52 es una proteína de cambio de ciclo celular (Figura 3) que se comporta como un adaptador que es importante para la activación del complejo ciclosoma promotor de anafase (APC/C) y participa en la conversión de ciclos mitóticos en endociclos (de Almeida Engler et al., 2012).

En 2012, de Almeida realizó la caracterización funcional de los activadores de endociclo CCS52A, CCS52B, durante dos tipos de desarrollo del sitio de alimentación de nematodos en *Arabidopsis thaliana*. El análisis de hibridación *in situ* mostró que la expresión de CCS52A1 y CCS52B se indujo fuertemente en agallas y sincitios. El silenciamiento y la sobreexpresión de CCS52 afectaron drásticamente el crecimiento de células gigantes y sincitios, lo que resultó en un desarrollo restringido de nematodos, demostrando la necesidad de actividad mitótica y endoreplicación para la maduración del sitio de alimentación. Con los anteriores resultados se propuso explotar el mecanismo de la endoreplicación como una estrategia para controlar los nematodos fitoparásitarios.

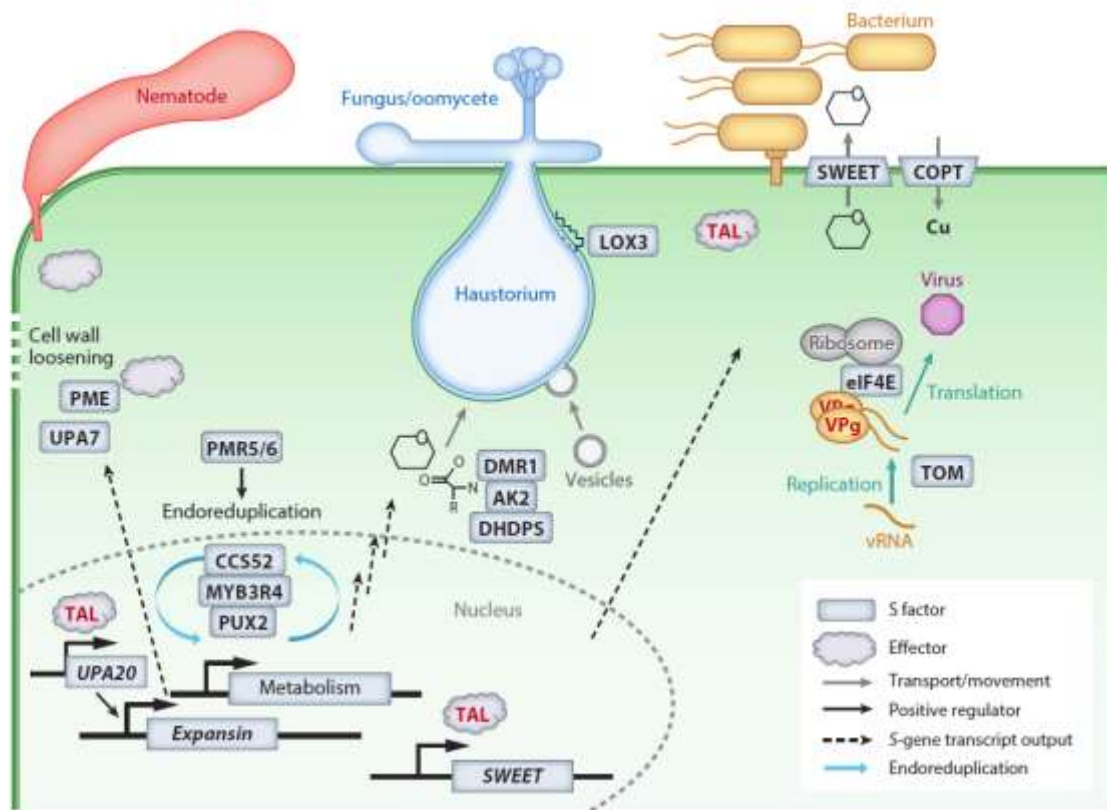


Figura 3 Genes involucrados en el mecanismo de infección de patógenos

Sin embargo, a pesar del enorme potencial de estas modificaciones, el inconveniente de las técnicas se encuentra en el proceso de regulación para su uso y distribución comercial, que es muy complejo, caro y lento.

Haciendo uso de la herramienta CRISPR/Cas9, se puede silenciar la expresión de genes de susceptibilidad (Pavan et al., 2010), lo que permitirá a las plantas transformadas, hacer frente a las infecciones por nemátodos, de diferentes formas dependiendo el tipo de susceptibilidad que causen.

## Edición de genomas.

Se entiende por edición de genomas a las técnicas de la ingeniería genética en la que DNA se inserta, elimina o reemplaza en el genoma de un organismo utilizando enzimas del tipo nucleasas. Las nucleasas producen rupturas de doble cadena (DSB) en lugares precisos del genoma y tales rupturas pueden ser reparadas por mecanismos de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o mediante reparación dirigida por homología (HDR), dando lugar a mutaciones controladas (edición), es decir que todas las mutaciones inducidas por las nucleasas son reparadas por la misma maquinaria del reparación del DNS (Belhaj et al., 2013).

En la actualidad se dispone especialmente de cuatro tipos de nucleasas: meganucleasas, nucleasas de dedo de zinc (ZF nuclease), Talen (Transcription Activator-Like Effector-based Nuclease) y el sistema CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas regularmente agrupadas) y Cas (CRISPR associated, asociada a CRISPR). Este conjunto de técnicas produce modificaciones específicas y dirigidas en secuencias nucleotídicas, permitiendo la modificación de un determinado locus mediante sustituciones, deleciones o inserciones en sitios determinados del genoma.

Las meganucleasas, ZFNs y TALENs han sido empleados para generar ediciones puntuales en genomas vegetales. No obstante, el diseño e implementación de estas técnicas requiere un proceso laborioso, complejo, largo y costoso de ingeniería de proteínas para cada sitio que se desee modificar (Straub & Lahaye, 2013).

## Sistema CRISPR/Cas9

Recientemente ha emergido una nueva tecnología basada en un sistema inmunitario natural presente en un 40% de eubacterias y un 90% de arqueas, que identifica y destruye ácidos nucleicos exógenos (como virus, fagos y plásmidos). Habiéndose ya establecido como un sistema de edición de genomas en especies eucariotas vegetales como arroz, trigo, maíz, tomate, papa, lino, naranja, tomates, tabaco, soya, *N. benthamiana*, *A. thaliana* y otros.

Este sistema, denominado CRISPR/Cas9, se compone de una ribonucleoproteína con actividad nucleasa denominada CRISPR associated protein 9 (Cas9) de *Streptococcus pyogenes* y un RNA guía sintético (gRNA), que dirige a Cas9 a su secuencia blanco, la cual debe estar precedida por un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) cuya secuencia es NGG en el caso de *S. pyogenes* (SpCas9). La especificidad de este sistema es determinada por una secuencia de 17-20 nucleótidos

presentes en gRNA, denominada protoespaciador, y que es idéntica en secuencia a la región en la que se desea que ocurra la ruptura de la doble hebra de DNA, permitiendo una edición simple en comparación con las demás tecnologías para editar genes. Además, este sistema es útil también como herramienta eficiente en la generación de resistencia contra virus de DNA y RNA en plantas (Amitai & Sorek, 2016; Dominguez *et al.*, 2015; Doudna & Charpentier, 2014).

La proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9): es una enzima multifuncional monomérica con un peso de 160 KDa, compuesta por 6 diferentes dominios, de los cuales dos dominios tienen actividad endonucleasa: HNH que es responsable de la digestión de la hebra complementaria tres nucleótidos adyacentes al PAM y el dominio similar a RuvC que rompe la hebra no complementaria en una región de 3 a 8 nucleótidos adyacentes al PAM (Anders *et al.*, 2015; Doudna & Charpentier, 2014)

Los gRNA son moléculas de RNA quimérico que combinan las funciones del CRISPR RNA (cRNA) y del cRNA transactivador (tracrRNA). Este gRNA posee una longitud típica de 20 nucleótidos más 80 nucleótidos del denominado andamio (scaffold), que es una región de unión del gRNA a Cas9 (Zhang *et al.*, 2016).

Wang *et al.*, 2014 determinaron algunos factores importantes que influyen sobre la actividad de gRNAs: 1) gRNAs con un contenido muy alto o muy bajo de GC (<40% o >60%) tienden a ser menos efectivos que aquellos con un contenido promedio de GC, 2) gRNAs dirigidos a la hebra que se transcribe fueron menos activos que los que se dirigen a la hebra no transcrita y 3) Cas9 se une preferencialmente a gRNAs que contienen residuos de purina en las últimas cuatro posiciones de la secuencia espaciadora.

Una de las principales limitaciones del sistema CRISPR/Cas9 es que el complejo puede reconocer y cortar otras secuencias adicionales a la que se desea editar. La detección de potenciales sitios de corte fuera de blanco se puede realizar a través de secuenciación de genomas completos, secuenciación profunda dirigida o a través de inmunoprecipitación de cromatina/dCas9 seguida por secuenciación (ChIP-seq). Otros métodos están basados en la predicción *in silico* e *in vitro* de potenciales cortes fuera de blanco basados en la similitud entre la secuencia de interés y otras secuencias; demostrándose que Cas9 puede cortar en regiones similares con e incluso en secuencias con desajustes de hasta 5 nucleótidos, entre las secuencias del gRNA y el DNA. Estas herramientas han permitido determinar que inclusive PAMs diferentes al canónico 5'-NGG-3', como 5'-NAG-

3', pueden también mediar la unión de Cas9 a otros locus, aunque con actividades endonucleasa inferiores (Choe, 2016).

Doench *et al.* (2014) desarrollaron un algoritmo para la estimación de la actividad en el sitio de interés, así como en otros lugares del genoma, e integrándose a diferentes herramientas web como CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu>), E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>), DESKGEN (<https://www.deskgen.com/landing/>), CRISPR RGEN Tool (<http://www.rgenome.net/>), etc., basadas en genomas completos secuenciados y en las contribuciones individuales de cada nucleótido en la secuencia del espaciador y nucleótidos cercanos (Figura 4).

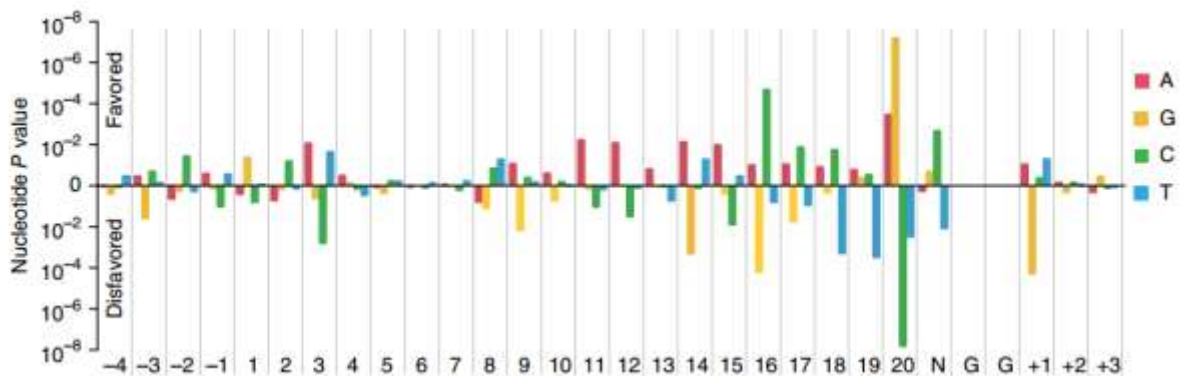


Figura 4 Contribución nucleotídica en la actividad de un gRNA (Fuente: Doench *et al.*, 2014)

### Mecanismo de reparación de hidrólisis en doble cadena DSB (double-strand breaks)

Una vez realizada la actividad de edición, las mutaciones inducidas por las nucleasas son reparadas por la misma maquinaria del reparación del DNS (Belhaj *et al.*, 2013)

Las células contienen toda una maquinaria enzimática encargada de realizar con alta efectividad la reparación de DSB Existen dos vías principales para la reparación de DSB, reparación dirigida por homología (del inglés Homology Direct Repair o HDR) la unión de extremos no homólogos (del inglés Non Homologous End Joining o NHEJ), las cuales son libres y propensas a errores respectivamente (Taufert Cardona *et al.*, 2014).

#### *Reparación por unión de extremos no homólogos*

Ocurre al unir una ruptura previamente generada de la doble hebra del DNA. No requiere de una secuencia complementaria u homóloga para su unión pero genera inserciones o deleciones de algunos nucleótidos (Manova & Gruszka, 2015). Este fenómeno de reparación ocurre más

frecuentemente en plantas que la reparación por recombinación dirigida por homología, probablemente por las actividades enzimáticas involucradas en este proceso (Núñez, 2016). La unión de extremos es usualmente asociada a deleciones de entre 1-1000 bp o a inserciones de hasta 1200 bp. Si la ruptura de la doble hebra ocurre en una región codificante, las inserciones y deleciones originadas pueden ocasionar un corrimiento del marco abierto de lectura, con la posible aparición de un codón de paro prematuro y la consecuente producción de una proteína truncada, usualmente no funcional (Sun et al., 2016).

El sistema NHEJ repara extremos romos o cohesivos de corta longitud, y comienza con el reconocimiento heterodímero de los extremos rotos, por parte del complejo DNA-PK (compuesto por las proteínas KU70, KU80 y la subunidad catalítica DNA-PK). Este complejo protege al DNA de la acción de exonucleasas y mantiene unida la doble cadena. Posteriormente, el heterodímero es asociado por acción catalítica a la cinasa (DNA-Pkcs) que se activa por la interacción de la cadena sencilla con el DSB (64), la ligasa IV y XRCC4 llevan a cabo la unión de las cadenas. Finalmente, el procesamiento de los DSB es realizado por el complejo MRE11-Rad50-NBS1, que tiene actividad de exonucleasa, endonucleasa y helicasa (Tafurt Cardona et al., 2014).

#### *Reparación por recombinación homóloga*

Este sistema detecta y repara daños generados por agentes químicos, físicos y radicales libres derivados de un DSB especialmente en la fase G2 del ciclo celular (Thompson y Schild, 2001). La eficiencia de los reparos se debe a la proximidad entre las cromátidas hermanas que tienen información idéntica, de esta forma es activada una cascada de reacciones junto con las proteínas de reparo que bloquean el ciclo celular (Frankenberg-Schwager et al., 2009)

Posteriormente, la proteína RAD52 protege el ADN de la acción de exonucleasas inespecíficas uniéndose a los extremos de las cadenas (Aylon and Kupiec, 2004). Así, la proteína RAD51 en presencia de ATP sintetiza un filamento nucleoproteico que busca la secuencia homóloga y cataliza el intercambio y apareamiento de las cadenas con la ayuda de RAD52. Durante esta etapa, la proteína RAD54 estimula a RAD51 en el alineamiento de cadenas, de esta forma es sintetizada la cadena, empleando como molde la secuencia homóloga que repara la información perdida durante el DSB. Finalmente, se forma una estructura de cadenas entrecruzadas conocida como el intermediario de Holliday que corta y liga el proceso de reparación de forma adecuada, evitando rearrreglos cromosomales.

En la actualidad se ha aprovechado un evento daño de la doble hebra del DNA, a través del uso de enzimas con actividad sitio específicas, ya sea por interacciones proteína -DNA o RNA-DNA; que se dirigen a secuencias determinadas de DNA.

### Transformación de *Solanum tuberosum*

Existen diferentes estrategias de mejoramiento genético, entre la cuales están la transformación mediada por *Agrobacterium*, biobalística, electroporación, y microinyección, entre otros (Williamson and Hussey, 1996b). Actualmente, el sistema CRISPR/Cas se ha utilizado para la edición de genes y para la regulación génica en varias especies. Al administrar la proteína Cas9 y los ARN guía apropiados a una célula, el genoma de esta puede cortarse en los lugares deseados, lo que permite la eliminación funcional de genes o la introducción de mutaciones y con la enorme ventaja de que, por su naturaleza no transgénica, no está regulada por la ley de bioseguridad que vigila a los organismos genéticamente modificados.

A pesar de que el sistema CRISPR/Cas9 sería una herramienta idónea, es necesario desarrollar una plataforma de vectores que permitan la modificación génica a través de transformación de diferentes especies vegetales con cepas hipervirulentas de *Agrobacterium tumefaciens*. Haciendo uso de esta información se propone transformar genéticamente la planta de la papa, para inducir el silenciamiento de gen *ccs52B* para el control de la plaga.

## Justificación

Debido a la importancia socioeconómica del cultivo de papa y su vulnerabilidad ante los nemátodos y la sequía, es necesario emplear la biotecnología moderna para generar nuevas variedades de *Solanum tuberosum* con edición de genomas y la técnica de CRISPR/Cas9, permitiendo realizar cambios discretos para generar estas nuevas variedades de papa.

## Hipótesis

La edición de genomas como herramienta de mejoramiento genético, permitirá la modificación de los genes *ccs52* y *tre1* de *Solanum tuberosum*, para evitar el desarrollo de nemátodos y aumentar la tolerancia a sequía, respectivamente.

## Objetivos

### Objetivo General

- Transformar genéticamente plantas de *Solanum tuberosum* para obtener líneas independientes tolerantes a nemátodos y a sequía.

### Objetivos particulares

- Analizar *in silico* los genes ortólogos *ccs52* y *tre1* de *Solanum tuberosum*.
- Obtener la secuencia de los genes *ccs52* y *tre1*.
- Diseñar la estrategia de modificación de los genes *ccs52* y *tre1* de *Solanum tuberosum* a través de edición de genomas.
- Estandarizar un protocolo de transformación para de *Solanum tuberosum* variedad Alpha cultivar 690
- Identificar mediante PCR plantas transformadas
- Identificar posibles cambios en la secuencia de los genes.



## Estrategia Experimental

Para la realización del presente trabajo, se diseñó una estrategia dividida en cuatro etapas (Figura 5) que corresponde a cada objetivo planteado. Se partirá de una investigación *in silico* para encontrar los genes de interés y compararlos con los genes particulares de la variedad de papa con la que se va a trabajar. Posteriormente con tal información se realizará la construcción de un vector con los gRNA específicos y se insertará en una cepa especial para la transformación de plantas. Ya obtenidas talas plantas, se realizará su selección e identificación de posibles cambios en la secuencia de los genes de interés.

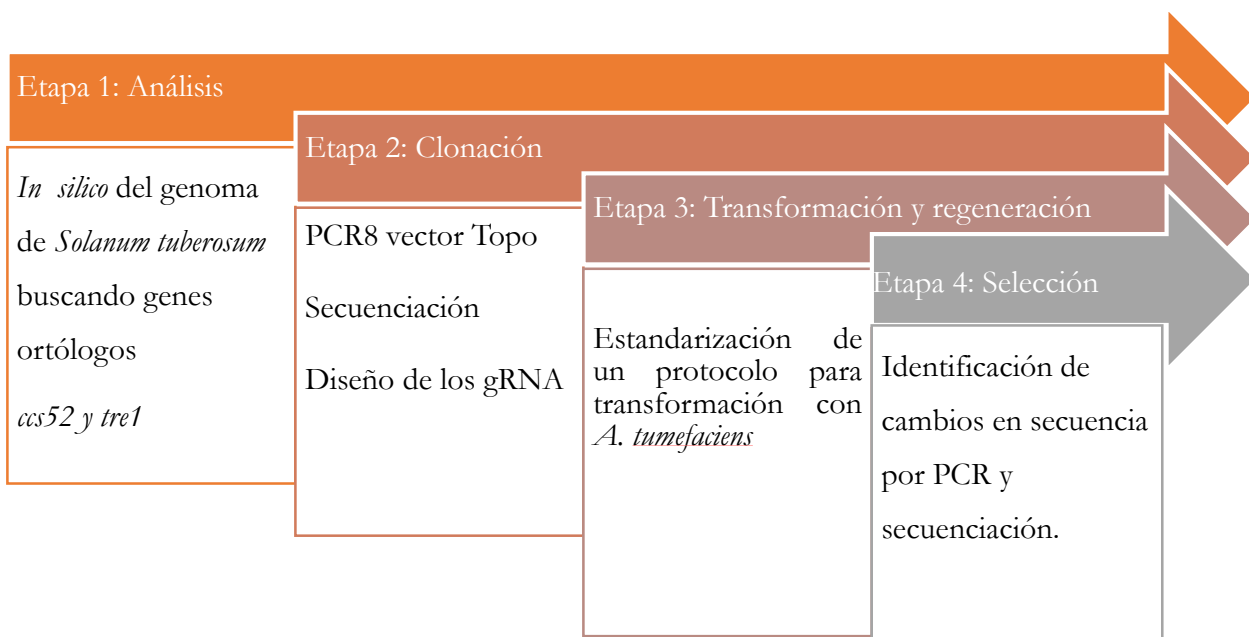


Figura 5 estrategia experimental

## Materiales y métodos

### Material biológico

En este trabajo se utilizaron plantas de *Solanum tuberosum* WT variedad Alpha, cultivar 690. *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 y *Escherichia coli* MACH1<sup>TM</sup>-T1 (Invitrogen).

### Condiciones de crecimiento de material vegetal

Las plantas de papa fueron cultivadas en cámara de crecimiento, con humedad relativa al 70%, a 22°C, fotoperiodo 8 horas luz: 16 horas oscuridad, en condiciones *in vitro*.

### Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo utilizados tuvieron como base las sales MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementados con 30 g/l Sacarosa y pH ajustado a 5.7; con 3.5g/l phytigel.

En las diferentes etapas del cultivo, se variaron los reguladores de crecimiento vegetal para el medio de propagación (Tabla 1) y diferentes combinaciones y concentraciones (Tabla 2) para los protocolos de regeneración.

Tabla 1 Medio de Propagación

Medio	Autor	Composición
1	Dale y Hampson, 1995	BAP 1mg/l
2	Soto, 2007	GA3 0.2mg/l
3	Molla, 2011	IBA 0.5mg/l

Tabla 2 Medios de cultivo utilizados para los protocolos de transformación, con medio basal MS, y variación en los reguladores de crecimiento vegetal

Medio	Autor	Composición
MS0	Soto 2007	3.5 mg/l BAP 0.01 mg/l ANA
MS1	Soto 2007	0.1mg/l ANA 3mg/l Zeatina 0.4mg/lGA <sub>3</sub>
MS2	Molla, 2011	0.01 mg/l AIA 0.2 mg/l GA <sub>3</sub>

<i>MS3</i>	Molla, 2011	5 mg/l Zeatina
<i>MS4</i>	Taghipar, 2015	2 mg/l TDZ
	SRM	0.5 mg/l BAP
		0.5 mg/l ANA
<i>MS5</i>	Cedillo, 2015	1 mg/l AIA
		1 mg/l 2IA

### **Medio LB**

- Triptona 5g
- Extracto de levadura 2.5g
- NaCl 5g
- Agar 7.5g

### **Medio SOC**

- 2% triptona
- 0.5% Extracto de levadura
- 10mM NaCl
- 2.5mM KCl
- 10mM MgCl<sub>2</sub>
- 19mM MgSO<sub>4</sub>
- 20mM Glucosa (Hacer un stock 5mM)

### **Extracción de DNA genómico mediante CTAB (Doyle & Doyle 19987)**

Varios protocolos se basan en la acción del detergente catiónico, bromuro de hexadecil trimetilamonio para eliminar los polisacáridos y polifenoles del material vegetal (Csai et al., 1998). El sobrenadante luego se extrae usando cloroformo, y el DNA se precipita con alcohol.

1. Pesar 100 mg de tejido vegetal (hoja) en un microtubo de 2 ml
2. Congelar en Nitrógeno líquido con un balín

3. Moler en el Tissue Lisser a 500 oscilaciones por minuto por 2 minutos. Repetir hasta obtener un polvo fino.
4. Añadir al tubo 600 $\mu$ l de CTAB previamente calentado a 65°C. Incubar 20 minutos.
5. Añadir 600 $\mu$ l de fenol cloroformo alcohol isoamílico y vortexear un minuto.
6. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos
7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml
8. Añadir 600 $\mu$ l de fenol cloroformo alcohol isoamílico y 0.1 volúmenes de acetato de sodio. Vortexear 1 minuto.
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml
11. Añadir 600 $\mu$ l de cloroformo-isoamílico y mezclar por inversión
12. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos
13. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 1.5ml
14. Añadir 0.7 volúmenes de isopropanol frío. Mezclar por inversión e incubar a -20°C por 10 minutos
15. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos
16. Tirar el sobrenadante y añadir 500 $\mu$ l de etanol al 70%
17. Agitar para lavar la pastilla
18. Centrifugar a 13,000 rpm por un minuto y decantar.
19. Poner a secar la pasitilla a 65°C 10 minutos
20. Resuspender en agua bidestilada estéril (por filtración) con 1 $\mu$ l de RNAsa/100 $\mu$ l de agua

#### Revisión de la concentración y calidad del DNA

1. Realizar la medición de la muestra en el Nanodrop colocando un microlitro de la misma.
2. Hacer la dilución correspondiente para dejar la muestra en 100ng/ $\mu$ l
3. Preparar un gel de acrilamida al 1% en pozos pequeños y cargar 6  $\mu$ l de muestra con 1  $\mu$ l de buffer de carga. Cargar con marcador de peso molecular de 1kb
4. Correr el gel en buffer TBE a 90V por 45 minutos aproximadamente
5. Ver el gel en el fotodocumentador.

## Estandarización de PCR para los genes *tre1* y *ccs52*

Se recibieron los oligos para los genes de *tre1* y *ccs52*. Para su utilización, se realizó previamente un gradiente de temperatura para los oligos

Tabla 3 Mezcla de reacción para PCR punto final con enzima Takara

Reactivo	Vol ( $\mu\text{L}$ )	VT
H <sub>2</sub> O	7.7	53.9
Buffer 10X	1.25	8.75
dNTPs	1	7
Primer F	0.25	1.75
Primer R	0.25	1.75
Enzima Takara	0.05	0.35
DNA (50 ng-)*	2	14
Vf rx	12.5	87.5

\*Para PCR de DNA plasmídico o genómico de *Solanum tuberosum*, ajustar el DNA a concentración de 50 ng/ $\mu\text{L}$ .

### Programa del termociclador

Programa de temperaturas para amplificación de fragmentos por PCR punto final.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min:seg)	
		DNA plasmídico	DNA genómico
Desnaturalización inicial	94.0	03:00	05:00
Desnaturalización	94.0	00:30	00:45
Alineamiento*	50.0-68.0	00:30	00:45
Extensión	72.0	1 kb/min	
Extensión final	72.0	10:00	
Enfriamiento	16.0	$\infty$	

} 30X

\*= La temperatura de alineamiento dependerá de cada PCR en particular y deberá ser optimizada en función de cada par de oligos con base en su *T<sub>m</sub>*.

Tabla 4 Programa para el gradiente utilizado para estandarizar la PCR de los genes *ccs52* y *tre1* de papa var. Alpha

Temperatura	Tiempo
94°C	5 minutos
94°C	30 segundos
TM Gradiente	30 segundos

72°C	30 segundos
72°C	5 minutos
16°C	∞

### Purificación de DNA de gel de agarosa

1. Cortar la banda del gel utilizando una navaja de bisturí
2. Colocarla en un microtubo previamente pesado
3. Pesar el tubo con la banda y añadir 3 volúmenes de ADB por cada volumen de gel
4. Incubar a 50°C de 5 a 10 minutos (hasta que se funda el gel)
5. Cargar la muestra disuelta en una columna
6. Centrifugar a 10,000 rpm por 30 segundos. Repetir con el sobrenadante.
7. Añadir 200µl de buffer de lavado de DNA a la columna y centrifugar por 30 segundos.
8. Colocar la columna en un tubo nuevo de 1.5ml y añadirle 6µl de buffer de elución de DNA o agua (ambos precalentados a 70°C)
9. Centrifugar y diluir con 15µl de agua
10. Cuantificar

### Diseño de oligos

Para obtener una secuencia base para el diseño de los oligos., el diseño se realizó con las siguientes consideraciones:

- El oligo debe ser lo suficientemente largo para que la  $T_m$  identifique sólo a la secuencia blanco.
- $T_m = (A+T)2 + (G+C)4$
- Debe ser de una longitud de 18 a 22 nucleótidos de largo y no diferir en más de 3.
- De preferencia terminar en G o C, para favorecer la estabilidad

### Ligación de DNA en vectores bacterianos

Clonación de genes en vector pcr8

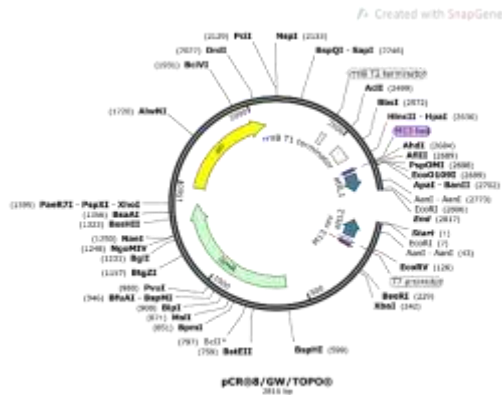


Figura 6 Mapa del vector pCR8, empleado para la clonación de los genes *tre1* y *ccs52*

Tabla 5 Mezcla de reacción para clonación en el vector pCR8

<i>Componente</i>	<i>Volumen (μL)</i>
<i>H2O Milli-Q estéril</i>	1
<i>Producto de PCR</i>	1
<i>Ligation Master Mix (2X)</i>	2.5
<i>pCR8 Cloning Vector (50 ng/μL)</i>	0.5
<b>Volumen final</b>	<b>5.0</b>

Homogeneizar, centrifugar y dejar incubando toda la noche a 22°C

### Transformación por choque térmico

Se utilizaron células competentes comerciales cepa MACH1

1. Sin descongelar añadir 2μl de la ligación
2. Incubar en hielo por 30 minutos con agitaciones leves por rotación hacia ambos lados cada 10 minutos
3. Realizar el choque térmico por 53 segundo a 42°C
4. Añadir 250μl de medio SOC
5. Colocar en hielo 2 minutos
6. Incubar a 37°C una hora a 225 rpm

7. Plaques 20  $\mu$ l y el resto en otra placa de medio LB con Sp

### Clonación del gRNA en el vector de edición de genomas

Primero se alinearon oligos con secuencias codificantes para el protoespaciador del gRNA, en un volumen final de 20  $\mu$ L, añadiendo 1  $\mu$ L de cada oligo a 100  $\mu$ M y 2  $\mu$ L de Buffer de alineamiento 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 500 mM y EDTA 10 mM). La mezcla de alineamiento se incubó a 94 °C durante 5 min, de 94-84°C a razón de -2.0 °C/s y de 84-25 °C a razón de -0.1 °C/s. El producto de alineamiento se visualizó en un gel de agarosa Nusieve al 5% y se cuantificó empleando un NanoDrop.

Tabla 6 Mezcla de alineamiento

Reactivo	Volumen
Oligo Fw	1 $\mu$ l
Oligo Rv	1 $\mu$ l
Buffer de alineamiento 10x	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	16 $\mu$ l

Tabla 7 Rampa de alineamiento

T°C	tiempo	$\Delta T$ °C/s
94°C	00:05:00	3
94-84°C	00:00:10	2
84-25°C	00:00:10	0.2-0.1
16°C	$\infty$	3

Posteriormente, 1  $\mu$ g del vector pBUN4U6SM fue digerido con la enzima BsaI-HF (NEB). De esta digestión se obtuvieron fragmentos 13 y 1.2 Kb purificándose la banda de 13 Kb y ligándose con Rapid DNA Ligation Kit (ThermoFisher Scientific).

Tabla 8 Digestión de pBUN411

Reactivo	Volumen
----------	---------



<i>Plásmido</i>	20 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	15.75 $\mu$ l
<i>Buffer Smart cut</i>	2 $\mu$ l
<i>DNA [1ng/<math>\mu</math>l]</i>	2 $\mu$ l
<i>Enzima BsaI</i>	0.25 $\mu$ l

Para realizar la ligación (Tabla 9) del vector con el inserto, se utilizó 10 veces más alineado que inserto (gRNA linealizado)

Tabla 9 Ligación del gRNA al vector

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
<i>Buffer 5x</i>	4 $\mu$ l
<i>Ligasa T4</i>	0.5 $\mu$ l
<i>Plásmido [~100ng]</i>	3 $\mu$ l
<i>Inserto (1:10)</i>	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	11.5 $\mu$ l

#### Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizaron células competentes de la cepa AGL1 a las cuales se les añadió 3  $\mu$ l de DNA [4000ng/ $\mu$ l] y se procedió a electroporar utilizando una cuveta de 0.1 cm a 1800 V, 15  $\mu$ F 335 R en un equipo electroporador EquiBio EasyJect Optima (Ashford, UK). Tras incubar 3 h a 28°C a 225 rpm, se sembraron 5  $\mu$ L de la mezcla de transformación en placas de LB con carbenicilina (100 mg/L), kanamicina (50 mg/L) y espectinomicina (100 mg/L) durante 2-3 días a 28 °C. Las colonias fueron transferidas a medio LB con carbenicilina (50 mg/L), kanamicina (25 mg/L) y espectinomicina (50 mg/L) e incubadas por 2 días a 28 °C, 180 rpm. Posteriormente las posibles transformantes fueron analizadas mediante PCR. Se procedió a hacer una miniprep a la cual se le realizó una PCR (Tabla 10) utilizando el oligo Fw del vector con el oligo Rv del gRNA. De salir positiva significaría que entró correctamente el gRNA al vector.

Tabla 10 Mezcla de reacción para PCR con enzima recombinante utilizando DNA de *A. tumefaciens*

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
H <sub>2</sub> O	7.7 $\mu$ l

<i>Buffer 10x</i>	1.25
<i>dNTPs 0.25mM</i>	1 $\mu$ l
<i>Oligo Fw 10mM</i>	0.25 $\mu$ l
<i>Oligo Rv 10mM</i>	0.25 $\mu$ l
<i>Taq</i>	0.05
<i>DNA [50ng/<math>\mu</math>l]</i>	2 $\mu$ l

Para el análisis de colonias de *Agrobacterium*, se crecieron 5 posibles colonias transformantes en 3 mL de medio LB con los respectivos antibióticos (carbenicilina 50 mg/L, kanamicina 25 mg/L, espectinomomicina 50 mg/L) por separado, a 28°C durante 2 días a 180 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 13000 g durante 5 min y cada pastilla celular se lavó dos veces con 500  $\mu$ L de agua estéril, centrifugando a 13000 g durante 5 min y desechando el sobrenadante. Cada pastilla celular se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua estéril, se incubó a 94°C durante 10 min y luego en hielo por 10 min. Se realizó una última centrifugación durante 5 min a 13000 g a 4°C y del sobrenadante se tomó 1  $\mu$ L para la realización de PCR punto final

Tabla 11 Mezcla de reacción con enzima Takara para amplificación de un fragmento de *Cas9*

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
$H_2O$	9 $\mu$ l
<i>PCR Buffer –Mg<sup>2+</sup> 10x</i>	1.25 $\mu$ l
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	0.4 $\mu$ l
<i>dNTPs</i>	0.3 $\mu$ l
<i>Oligo Fw</i>	0.25 $\mu$ l
<i>Oligo Rv</i>	0.25 $\mu$ l
<i>Taq platinum</i>	0.05 $\mu$ l
<i>DNA [50ng/<math>\mu</math>l]</i>	2.0 $\mu$ l

### Determinación de la concentración mínima letal

Dentro de la construcción del vector, está incluido el gen BAR, que confiere resistencia a herbicida, lo que nos ayudó a seleccionar las plantas transformadas utilizando medio de cultivo suplementado con glufosinato de amonio.

El Glufosinato de amonio es un compuesto sintetizado químicamente, conocido comercialmente como Basta®, Pestanal® y Finale®. Este compuesto contiene como ingrediente activo fosfotricina, que es un tripéptido natural producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. Este compuesto funciona como un herbicida inhibidor de la **glutamina sintetasa**, enzima que interviene en la asimilación de amonio y en la regulación del nitrógeno en las plantas (Sundar and Sakthivel, 2008).

Varios autores han utilizado el glufosinato de amonio para la selección de plantas transformadas en diferentes cultivos (Yoon et al., 2002; Shu et al., 2005) ya que es un producto fitosanitario que funciona al ser absorbido principalmente a través de las hojas y de otras partes verdes. Como herbicida de contacto, el glufosinato de amonio solamente es efectivo cuando entra en contacto con la planta.

Se realizó una prueba por triplicado en 7 concentraciones diferentes, incluido el control negativo, con 10 explantes en cada caja, para encontrar la concentración mínima letal para la variedad de papa Alpha 690. Se tomó como concentración de referencia 2mg/l como lo reporta Soto para la variedad Désirée. Se añadió cefotaxima (500mg/l) en todos los medios de cultivo para descartar la fitotoxicidad del antibiótico al ser utilizado como control de *A. tumefaciens*.

## Transformación de plantas con AGL1

### Preparación de AGL1

En un matraz de 125ml colocar 50ml de medio LB con los antibióticos (Espectinomicina, Carbenicilina y Kanamicina 50mg/ml, 50mg/ml y 25g/ml respectivamente). Inocular con 200µl de AGL1 e incubar a 28°C en agitación toda la noche.

Revisar que la densidad óptica se encuentre en 0.8 y transferir, en campana, los 50ml a un tubo Falcon.

Centrifugar 10min a 5,000rpm y tirar sobrenadante. Colocar 50ml medio de transformación (MS con 100mg/l de acetosiringona) y homogenizar. Dejar en incubación por 10min a 28°C.

### Transformación

Vaciar en una caja Petri estéril el contenido del tubo anterior y mojar la navaja del bisturí con ello. Con la navaja humedecida se proceden a cortar los segmentos internodales de las papas

silvestres y dejarlas en una sanita estéril para secar el exceso de bacteria (5 minutos). Posteriormente colocar los explantes internodales en medio 5 (SIN ANTIBIOTICO NI HERBICIDA) y guardarlo a 22°C en oscuridad.

Después de dos días lavar los explantes con una solución de Tritón al 0.1% (100µl de tritón por cada L de agua).

Preparar 2 frascos con tritón, 2 con agua destilada estéril y caja Petri con solución de antibióticos. Lavar explantes en el primer frasco con tritón hasta que se torne blanco y transferir al segundo frasco con tritón, lavar hasta que no queden rastros de bacteria. Enjuagar en los frascos con agua destilada estéril, hasta que no salga espuma. Transferir explantes a la solución de antibiótico (cefotaxima 500mg/ml) previamente puesto en una placa Petri, por 10min. Dejar los explantes secar en sanitas estériles por 10 minutos y transferirlos a placas con medio nuevo (medio 5 con 2mg/l de glufocinato y 500mg/l de cefotaxima) etiquetar y sellar con plástico.

### Selección de plantas transformadas

La selección inicial de plantas de *Solanum tuberosum* se realizó colocando los explantes o las plántulas regeneradas, según fuera el caso en medio de cultivo MS de regeneración con una concentración de 2mg/l de glufosinato de amonio.

### Identificación de plantas transformadas mediante PCR

Se realizó amplificando un fragmento de 424 pb correspondiente al gen codificante para Cas9 (Cas9-F: 5'-CGGCCTCGATATTGGGACTAACTCT-3', zCas9-R: 5'-CTTATCTGTGGAGTCCACGAGCTTC-3').

## Resultados y discusión

### Análisis *in silico* para encontrar genes ortólogos *tre1* y *ccs52* en *Solanum tuberosum*

Se buscó en la base Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) los genes *tre1* y *ccs52* en papa y basados en la secuencia para la variedad 4.03 de *Solanum tuberosum*, se diseñaron los oligos para amplificar el gen en la variedad Alpha.

### Obtención la secuencia de los genes *ccs52* y *tre1* de papa var. Alpha 690

Una vez diseñados los oligos, se mandaron sintetizar a SIGMA-ALDRICH con las siguientes secuencias (se muestran en dirección 5'-3'):

Tabla 12 Oligos para los genes *ccs52* y *tre1* de papa variedad Alpha 690

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>
<i>Tre PAPA Direct</i>	GGGATTTCAGTTC AAGATGGATGAG
<i>Tre PAPA Reverse</i>	CTGGTGCAAATCTTCCCATT TATAAATATC
<i>CCS52 papa fw 1.0</i>	ATGGAATCGATAACACAAAGAAGAAAG
<i>CCS52 papa rv 1.0</i>	CTTGTGGGGTGT TTTGGGCAC

Con los oligos de la tabla 5 se realizó la amplificación de los genes *ccs52* y *tre1* mediante PCR, utilizando DNA (Figura 7) extraído de hojas verdaderas de plantas de papa.

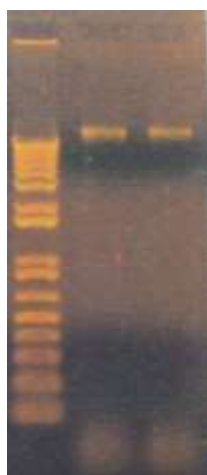


Figura 7 Extracción de DNA genómico de *Solanum tuberosum* (marcador de peso molecular, hoja 1, hoja2) Gel de agarosa al 1%

Se realizó una amplificación con gradiente (Tabla 4) para determinar la mejor temperatura de alineamiento para cada gen. Se escogió 66°C como  $T_M$  para ambas PCR por la intensidad de la

banda (Figura 8), por no tener inespecificidad y para poder utilizar el mismo programa en ambos genes.

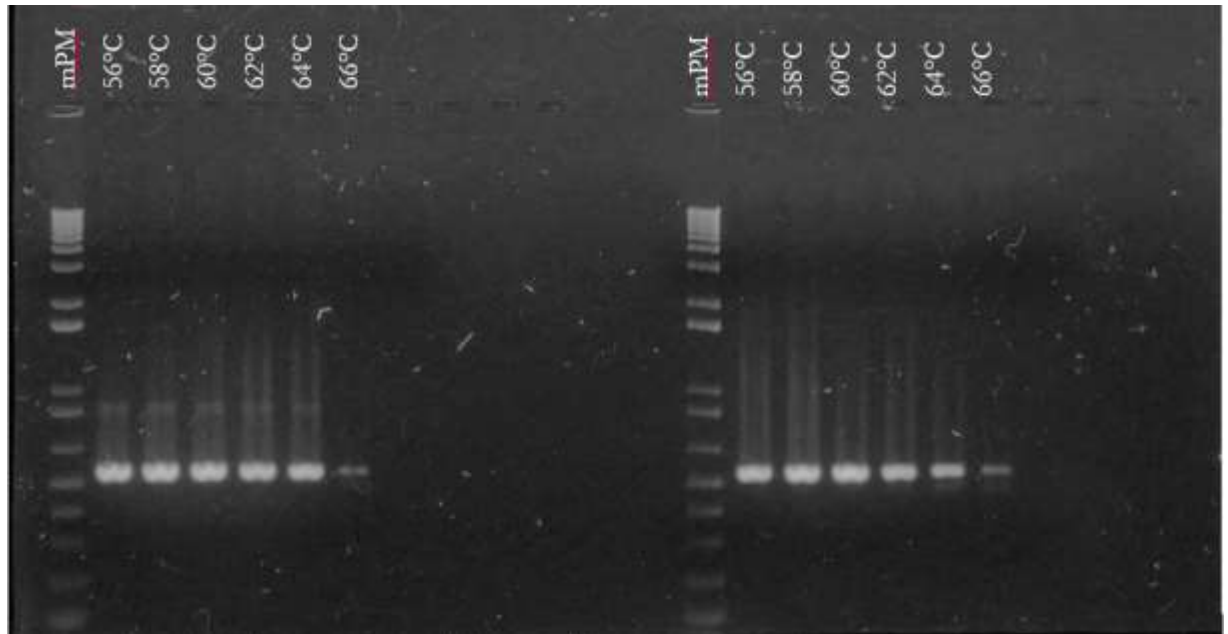


Figura 8 PCR del gradiente, *tee1* y *ccs52*

Como resultado de esta amplificación, se obtuvieron los genes específicos para la variedad de papa con la que se trabajó en el proyecto, Alpha 690. El gen *tre1* con un peso de 509pb y el gen *ccs52* con un peso de 507pb (Figura 9).

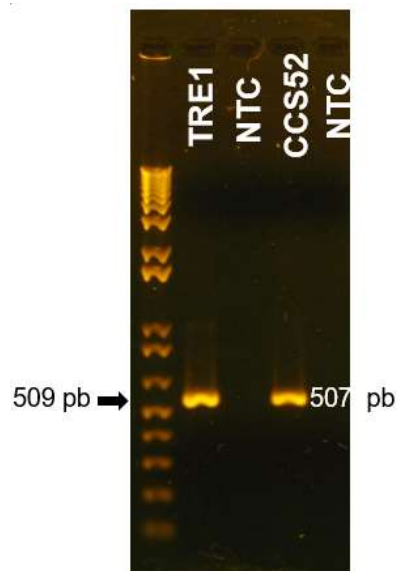


Figura 9 DNA g de los genes *tre1* y *ccs52*

## Clonación de los genes trehalasa y ccs52

Una vez amplificados los fragmentos por PCR punto final y visualizados en gel agarosa al 1% (Figura 9), dichos productos de PCR fueron clonados en el vector PCR8 (Figura 6) siguiendo la mezcla de reacción de la Tabla 5 e incubados a 22°C toda la noche. Dicha mezcla de clonación se empleó para la transformación de células competentes comerciales de *E. coli* MACH1<sup>TM</sup>-T1 (Invitrogen). Las células se inocularon en placas de medio LB suplementado con carbenicilina, espectinomomicina (ambas a 100 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL).

La presencia del inserto, en las colonias obtenidas al plaquear las células MACH1 transformadas por choque térmico, se confirmó por PCR punto final. Estas clonas fueron secuenciadas para determinar su homología en las secuencias nucleotídicas respecto al genoma de referencia a partir de secuenciación por el método de Sanger en el Servicio de Secuenciación de DNA del Laboratorio de Bioquímica Molecular UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM. Las secuencias obtenidas fueron comparadas a través de un alineamiento con BLAST para regiones genómicas de organismos *Solanum tuberosum*.

## Diseño de la estrategia de modificación de los genes *ccs52* y *tre1* de *Solanum tuberosum* a través de edición de genomas

Sabiendo que el mecanismo de alimentación del nemátodo involucra la sobreexpresión de gen *ccs52*, induciendo la endorreplicación de la célula infectada y produciendo una célula gigante de la que se alimenta el nemátodo, se procedió a realizar un gRNA que llevara a la proteína Cas9 a la edición de la secuencia del gen *ccs52*, provocando un desplazamiento en el marco abierto de lectura.

De la misma manera se realizó el diseño de un gRNA para la enzima trealasa, lo que podría provocar una disminución o incluso una anulación de la actividad catalítica sobre la trehalosa, aumentando así la cantidad del dicho osmoprotector derivando en una mayor toleración a sequía.

## Diseño del gRNA

En la secuencia de los genes obtenidos se procedió a buscar un conjunto de nucleótidos de 21 bases de largo que comenzara con NGG. Dichas secuencias son candidatas a funcionar como RNA guía. Se obtuvieron 42 posibles secuencias en ambos genes.

Para elegir el mejor gRNA se hizo un algoritmo en Excel basado en los valores obtenidos por Doench en 2014. En el archivo de Excel se introdujeron las bases de los posibles gRNA y nos entrega el porcentaje de eficiencia que puede tener (target on).

El target off no fue posible calcularlo ya que no se tiene cargado el genoma de la papa en algún programa para hacer edición de genomas, por lo que lo más cercano a ese valor se calculó haciendo un BLAST de los gRNA en la secuencia de NCBI y cuyo resultado fue el gen blanco, por lo que se asumió que el target off es de 0%. Como resultado se obtuvieron los oligos de la Tabla 13.

Tabla 13 Secuencias de los gRNA utilizados para los genes *tre1* y *ccs52* de papa var. Alpha 690

Gen	gRNA	Target on
<b>ccs52</b>	5' GTTGAATCTGAGCTTTTGGGG 3' CAACTTTAGTCTCGAAAACCC	37.5%
<b>tre1</b>	5' GGGAAAGATTTTGCACCAGAAGG 3' CCTTCTGGTGCAAATCTTTCCC	48.22%

Se utilizaron los oligos diseñados y probados de cada gen para la clonación del gRNA en el vector de edición de genomas. Después del alineamiento y ligación de los oligos en el vector, se procedió a transformar células competentes comerciales de *E. coli* MACH1<sup>TM</sup>-T1 (Invitrogen).

Las clonas recombinantes de *E. coli* conteniendo el plásmido de interés se verificaron mediante PCR punto final específica para el promotor AtU6-F con gRNA-R y mediante secuenciación por Sanger. Como resultado, las clonas C1 y T2 fueron las se utilizaron para la producción del plásmido que sería introducido en *A. tumefaciens* AGL1.

Se utilizó 1µg del plásmido la transformación de la bacteria *A. tumefaciens* AGL1 mediante electroporación. Se seleccionaron 5 colonias y se verificaron mediante PCR para U6-F con gRNA-R.

Ya con la verificación, se eligieron las clonas Cc y Td como las células stock para la transformación de *S. tuberosum*.



## Estandarización de transformación de papa con *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de una planta es necesario contar con un método específicamente diseñado para esa especie, ya que por sus características fisiológicas particulares, cada planta reacciona diferente ante los reguladores de crecimiento vegetal y a las condiciones de cultivo.

Así mismo es necesario contar con un método para seleccionar aquellas plantas que estén transformadas.

Para esta selección se procedió a la determinación de la concentración mínima letal requerida para diferenciar las plantas transformadas. Después de 2 semanas en el medio de selección se contaron el número de explantes vivos en cada concentración de herbicida (Tabla 14) y se vio que los resultados coincidieron con la concentración mínima letal requerida para seleccionar plantas de la variedad Désiré, 2mg/l reportada por Soto et. al (2007).

Tabla 14 Conteo de explantes sometidos a diferentes concentraciones de herbicida Glufosinato de Amonio

<b>Glufosinato mg/l</b>	<b>Explantes iniciales</b>	<b>Explantes vivos</b>
0	30	30
1	30	25
2	30	0
3.75	30	0

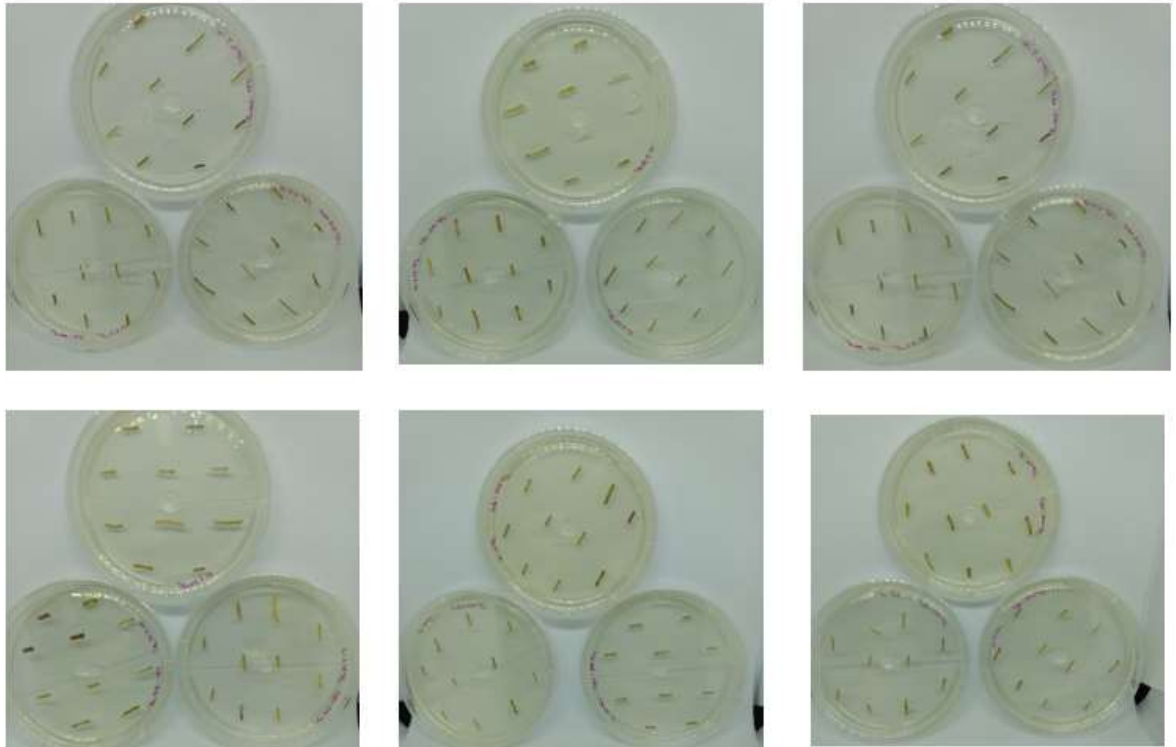


Figura 10 Explantes después de 2 semanas en contacto con herbicida

Ya que se determinó la concentración de herbicida que se utilizaría para seleccionar las plantas transformadas, se procedió a probar diferentes protocolos existentes para la transformación de explantes de papa obtenidos de tallo.

El primer protocolo de transformación que se probó en este trabajo, fue el reportado por Soto en 2007, donde se utilizaron segmentos de tallo de papa de la variedad *Désirée*, utilizando fosfinotricina como marcador de selección. En ese trabajo reportan una eficiencia de transformación del 68%.

Las primeras plantas regeneradas fueron seleccionadas en un con herbicida (Figura 11).



Figura 11 Plantas de *Solanum tuberosum* regeneradas puestas en medio de selección

### Identificación mediante PCR de plantas transformadas

A aquellas plantas que presentaron resistencia al herbicida, se les extrajo DNA y posteriormente se analizaron por PCR punto final amplificando un fragmento del gen codificante para la proteína Cas9. Estos resultados se presentan en la Figura 12.

La PCR punto final se realizó para detectar un fragmento de 424 pb correspondiente al gen codificante para Cas9 (Cas9-F: 5'-CGGCCTCGATATTGGGACTAACTCT-3', zCas9-R: 5'-CTTATCTGTGG AGTCCACGAGCTTC-3').

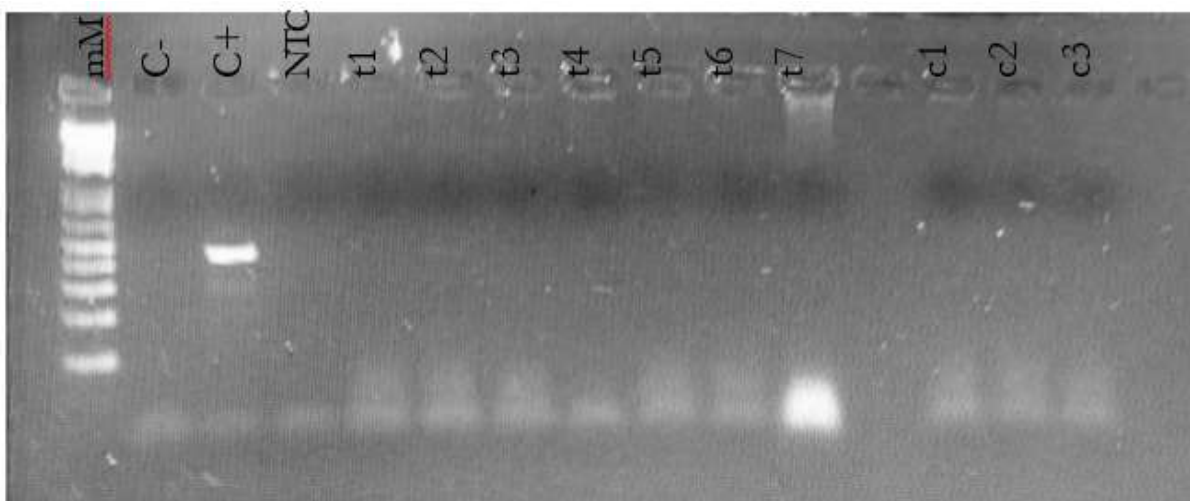


Figura 12 PCR  $\alpha$ Cas9 para primeras plantas regeneradas. C-: gDNA WT, C+: vector cas9

De estas plantas transformadas ninguna resultó ser portadora de Cas9 y el gRNA. Lo más probable es que al ser brotes regenerados por su edad, fueran más resistentes al herbicida y requirieran más tiempo para seleccionarse.

Debido a lo anterior, en el siguiente método de transformación, se pusieron en selección desde la segunda semana a los explantes transformados y se cambió el método de transformación. En vez de sumergir los explantes en una solución bacteriana, sólo se realizarían los cortes internodales con una navaja sumergida en la solución de infección y se probarían distintos medios de regeneración para subir el porcentaje de plantas regeneradas.

#### Pruebas de medios de regeneración

Se utilizaron 15 explantes por cada protocolo, por triplicado más un control sin transformar.

El protocolo MS0 mostró un porcentaje de regeneración de 2.2% con una eficiencia del 0% en la transformación. El método MS1 del mismo autor, tuvo un porcentaje del 4.4% pero con la misma eficiencia de transformación. MS2 y 3, tuvieron un mayor porcentaje de regeneración, ya que los explantes formaban brotes de manera eficiente, sin embargo, tales brotes eran producto de organogénesis directa, lo que probablemente hizo que el éxito en la transformación fuera nulo. En el método MS4, hubo una formación exitosa de tejido no diferenciado (callo) de donde se esperaba que surgieran células transformadas que formaran brotes. Sin embargo, los explantes permanecían en forma de tejido calloso y aunque se traspasaron al medio de inducción de brotes, no hubo formación de ellos (Tabla 15).

Con los resultados anteriores se decidió probar el método ya utilizado en el grupo de trabajo. En la tesis de Cedillo (2015) se describe un método eficiente de transformación, sin embargo, algunas condiciones resultaron ser incongruentes o inespecíficas por lo que se realizaron cambios en el protocolo. Tales modificaciones derivaron en una metodología más eficiente que la reportada en otras variedades.

Tabla 15 Frecuencia de regeneración de brotes a partir de segmentos de tallos seleccionados en 2mg/l en glufosinato

Método de transformación		Transformadas con tre1						Control		
Medio	Autor	No. Explantes iniciales	Brotes regenerados	Plantas transformadas en selección	Eficiencia de regeneración (%)	Eficiencia de transformación	Eficiencia de edición	No. Explantes iniciales	Total de brotes regenerados	Eficiencia de regeneración
MS0	Soto 2007	45	1	0	2.2	0	0	45	1	2.2
MS1	Soto 2007	45	2	0	4.4	0	0	45	2	4.4
MS2	Molla 2011	45	4	0	8.9	0	0	45	4	8.9
MS3	Molla 2011	45	5	0	11.1	0	0	45	6	13.3
MS4	Taghipar, 2015	45	0	0	0.0	0	0	45	0	0.0
MS5	Cedillo, 2015 (modificado)	45	8	3	17.8	6.66666667	0	45	8	17.7777778

Método de transformación		Transformadas con ccs52						Control		
Medio	Autor	No. Explantes iniciales	Brotes regenerados	Plantas transformadas en selección	Eficiencia de regeneración (%)	Eficiencia de transformación	Eficiencia de edición	No. Explantes iniciales	Total de brotes regenerados	Eficiencia de regeneración
MS0	Soto 2007	45	1	0	2.2	0	0	45	2	4.4
MS1	Soto 2007	45	3	0	6.7	0	0	45	2	4.4
MS2	Molla, 2011	45	3	0	6.7	0	0	45	3	6.7
MS3	Molla, 2011	45	4	0	8.9	0	0	45	6	13.3
MS4	Taghipar, 2015	45	0	0	0.0	0	0	45	1	2.2
MS5	Cedillo, 2015 (modificado)	45	10	4	17.8	8.9	0	45	10	22.2222222

Ya establecida la metodología se procedió a realizar transformaciones de aproximadamente 100 explantes cada semana durante 34 semanas. De esas transformaciones se obtuvieron 4 plantas regeneradas transformadas con *ccs52* y 7 con *tre1*.

Una vez más, al desarrollar al menos dos hojas verdaderas, se realizó extracción de DNA y la PCR punto final (Figura 13).

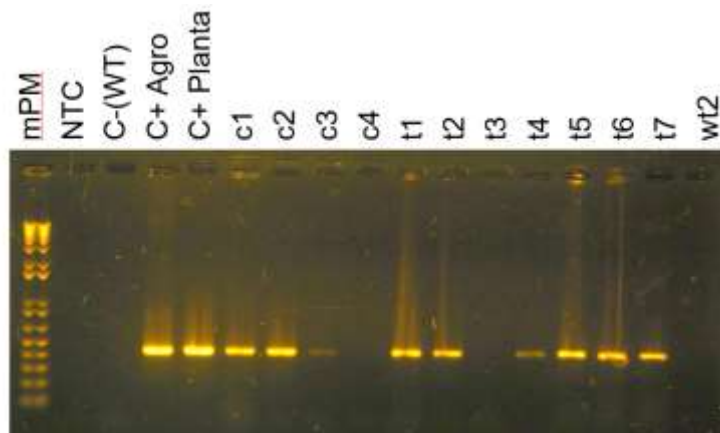


Figura 13 PCR  $\alpha$ Cas9 segundas plantas regeneradas

En esta ocasión salieron positivas 9 plantas, 3 de *ccs52* y 6 de *tre1*. Las plantas positivas se mandaron secuenciar para revisar si el genoma se había editado.

### Identificación de los posibles cambios en la secuencia de los genes.

Una vez obtenidas las líneas transformantes de *S. tuberosum*, de cada una de las líneas obtenidas, se amplificó mediante PCR punto final una región flanqueante al potencial sitio de edición. El amplicón resultante, fue clonado en el vector PCR8/GW/TOPO y al menos 5 clonas provenientes de cada línea fueron secuenciadas. Los resultados de esta secuenciación se presentan en la Figura 14, donde se muestra que de 4 líneas analizadas de la transformación con *ccs52* no hubo un cambio en la secuencia. De igual manera en las 7 secuencias analizadas de las plantas transformadas con *tre1* no mostraron cambios en su secuencia comparada con la planta silvestre. Analizando marco abierto de lectura de la secuencia, se esperaba un corrimiento que podría causar un knockout del gen (Figura 14).

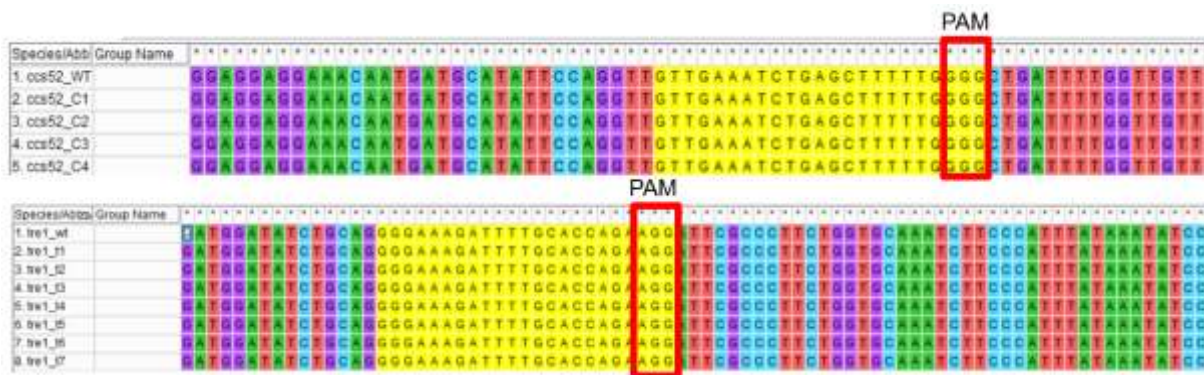


Figura 14 secuencias de las líneas independientes transformadas con *ccs52* y *tre1*

Desafortunadamente, a pesar de una posible transformación confirmada por PCR, no hubo una edición en el genoma de las plantas secuenciadas.

### Inducción de floración de papa

Para el último paso de la transformación, es necesario realizar el cruzamiento de la planta transformada con una silvestre para que se segreguen los genes y así perder el transgen, pero conservando la modificación en la secuencia. Se utilizó Paclobutrazól (PBZ) para inducir la floración de la papa y poder así realizar la reproducción sexual.

Este compuesto retarda el crecimiento vegetal al bloquear la síntesis de giberelinas y en varias especies induce la floración reduciendo el crecimiento y el área foliar sin afectar el rendimiento. Debe ser colocado al inicio de la formación de tubérculos en una concentración de 150 mg/l (MONTANA, S.A., 2015).

Se realizaron 3 aplicaciones a 6 plantas en una mezcla de suelo: turba: agrolita en proporción 2:2:1, en cámaras de crecimiento (Conviron, A1000, Winnipeg, Canadá) con humedad relativa al 70%, a 22°C, fotoperiodo 16 horas luz: 8 horas oscuridad, y riego interdiario con solución nutritiva Miracle Grow® a la concentración especificada por el fabricante.

Otro grupo de 12 plantas se creció en el invernadero en una mezcla de suelo: turba: agrolita en proporción 2:2:1; a 22-32°C con una humedad relativa de 20-40%, con riego interdiario con agua corriente y riego semanal con solución nutritiva Miracle Grow® a la concentración especificada por el fabricante.

Primera aplicación: 31 octubre 2017

Segunda aplicación: 2 febrero 2018

Tercera aplicación 3 marzo 2018

Las plantas de papa llegaron a desarrollar una mayor cantidad de hojas en secciones apicales del tallo, sin embargo, en ninguna de las 18 macetas que se tenían en la cámara de crecimiento, ni en invernadero, hubo presencia de flores.



## Conclusiones

El análisis *in silico* de las secuencias blanco, la comparación de los genes de *tre1* y *ccs25* de una papa secuenciada y la variedad Alpha de *Solanum tuberosum*, mostró una secuencia conservada entre los genes secuenciados y nuestra papa.

Se pudo desarrollar la estrategia de edición de genomas del gen *ccs52* que consiste en la edición del sitio de maduración intrón 5 y se diseñó el gRNA para el posible cambio en el marco de lectura. Así mismo se diseñó un gRNA para el *tre1* esperando una modificación en la enzima trehalasa.

Se estableció un vector para edición de genomas basado en el uso de la cepa hipervirulenta *A. tumefaciens* AGL1 para la transformación de *Solanum tuberosum* que permitió transformar plantas de papa en el gen *tre1* y en el gen *ccs52*.

Los protocolos de regeneración para *Solanum tuberosum* son específicos de la variedad con la que se trate, ya que la variedad Alpha no respondió de igual manera a los protocolos reportados para las variedades Desirée, Susset, Burbunk, Bintje y Mantiqueira.

No hay diferencia significativa en la eficiencia de transformación al utilizar dos construcciones diferentes en AGL1 en el protocolo de Cedillo 2015 modificado.

El mejor protocolo de transformación para *Solanum tuberosum* variedad Alpha con AGL1 fue utilizando los reguladores 2IP y AIA en concentraciones de 1mg/l.

Se identificaron once plantas transformadas mediante la amplificación de una región de Cas9. Ninguna de ellas con cambios en la secuencia de interés.

## Referencias

de Almeida Engler, J., Kyndt, T., Vieira, P., Van Cappelle, E., Boudolf, V., Sanchez, V., Escobar, C., De Veylder, L., Engler, G., Abad, P., et al. (2012). CCS52 and DEL1 genes are key components of the endocycle in nematode-induced feeding sites. *Plant J.* 72, 185–198.

Amitai, G., and Sorek, R. (2016). CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.*

Anders, C., Niewoehner, O., and Jinek, M. (2015). In Vitro Reconstitution and Crystallization of Cas9 Endonuclease Bound to a Guide RNA and a DNA Target. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 515–537.

Aylon, Y., and Kupiec, M. (2004). DSB repair: the yeast paradigm. *BRIDGE BROKEN ENDS - Cell. Response DNA Breaks Health Dis.* 3, 797–815.

Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9, 39.

Choe, S. (2016). Genome editing: a technology in time for plants. 18–21.

Crueger, A. (1993). Mutagenesis. *Biotechnology* 2, 5–46.

Csaikl, U.M., Bastian, H., Brettschneider, R., Gauch, S., Meir, A., Schauerte, M., Scholz, F., Sperisen, C., Vornam, B., and Ziegenhagen, B. (1998). Comparative Analysis of Different DNA Extraction Protocols: A Fast, Universal Maxi-Preparation of High Quality Plant DNA for Genetic Evaluation and Phylogenetic Studies. *Plant Mol. Biol. Report.* 16, 69–86.

Dale, P.J., and Hampson, K.K. (1995). An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica* 85, 101–108.

Doench, J.G., Hartenian, E., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J., and Root, D.E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat. Biotechnol.* 32, 1262–1267.

Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., et al. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* *34*, 184–191.

Dominguez, A.A., Lim, W.A., and Qi, L.S. (2015). Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 5–15.

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* *346*, 1258096–1258096.

Edgar, B.A., and Orr-Weaver, T.L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* *105*, 297–306.

Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* *13*, 17R-27R.

Escalante, F.B., Fernández, J.M., López-B, A., Parga-T, V.M., Soto, M.M.M., and Carvajal-A, A. (1999). Correlación y componentes principales de variación en variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agron. Mesoam.* *10*, 1–6.

Escalante, F.B., Fernández, J.M., López, A., Parga, V.M., Soto, M.M.M., and Carvajal, A. (2000). Análisis de crecimiento en siete variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agron. Mesoam.* *11*, 145–149.

FAO (2008). “la papa: Tesoro enterrado, ¿por qué la papa?”, Revista mensual, claridades agropecuarias,. ASERCA SAGARPA.

Franco, J. (1994). Problemas de nematodos en la producción de papa en climas templados en la región andina. *Nematropica* *24*, 179–195.

Frankenberg-Schwager, M., Gebauer, A., Koppe, C., Wolf, H., Pralle, E., and Frankenberg, D. (2009). Single-Strand Annealing, Conservative Homologous Recombination, Nonhomologous DNA End Joining, and the Cell Cycle-Dependent Repair of DNA Double-Strand Breaks Induced by Sparsely or Densely Ionizing Radiation. *Radiat. Res.* *171*, 265–273.

Fülöp, K., Tarayre, S., Kelemen, Z., Horváth, G., Kevei, Z., Nikovics, K., Bakó, L., Brown, S., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2005). Arabidopsis anaphase-promoting complexes: multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle* 4, 4084–4092.

Grageda Grageda, J., Ruíz Corral, J.A., Félix Valencia, P., Jiménez García, E., and Jiménez Lagunes, A. (2013). Enfermedades importantes de algunos cultivos de México.

Grunewald, W., Karimi, M., Wiczorek, K., Cappelle, E.V. de, Wischnitzki, E., Grundler, F., Inzé, D., Beeckman, T., and Gheysen, G. (2008). A Role for AtWRKY23 in Feeding Site Establishment of Plant-Parasitic Nematodes. *Plant Physiol.* 148, 358–368.

Jatala, P. (1986). Nematodos parásitos de la papa (CIP).

Jia, H., and Wang, N. (2014). Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA. *PLoS ONE* 9, e93806.

Jirtle, R.L., and Skinner, M.K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 8, 253–262.

Kapoor, A.C., Desborough, S.L., and Li, P.H. (1975). Potato tuber proteins and their nutritional quality. *Potato Res.* 18, 469–478.

Loon, C.D. van (1981). The effect of water stress on potato growth, development, and yield. *Am. Potato J.* 58, 51–69.

Maggenti, A. (1981). General Nematology. In *General Nematology*, (Springer New York), pp. 1–8.

Manova, V., and Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants: from models to crops. *Front. Plant Sci.* 6.

Mayex (2016). Bases en Mejoramiento Genético.

Montaldo, A. (1984). Cultivo y mejoramiento de la papa (Iica).

MONTANA, S.A. (2015). Paczol. Regulador de crecimiento.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.

Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., and Bai, Y. (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Mol. Breed.* 25, 1.

Puigdomènech, P. (2014). *La Biotecnología Vegetal en el entorno europeo.*

Rodríguez, R.P., J.C. Suárez (2015). LA TREHALOSA: UN AZÚCAR OSMOPROTECTOR CON CAPACIDAD DE SEÑALIZACIÓN.

Santos Castellanos, M., Segura Abril, M., and Núñez López, C.E. (2010). Análisis de Crecimiento y Relación Fuente-Demanda de Cuatro Variedades de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Municipio de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). *Rev. Fac. Nac. Agron. - Medellín* 63.

Serageldin, I. (1999). Biotechnology and food security in the 21st century. *Science* 285, 387–389.

Sheerman, S., and Bevan, M.W. (1988). A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Rep.* 7, 13–16.

Strauß, A., and Lahaye, T. (2013). Zinc Fingers, TAL Effectors, or Cas9-Based DNA Binding Proteins: What's Best for Targeting Desired Genome Loci? *Mol. Plant* 6, 1384–1387.

Sun, Y., Li, J., and Xia, L. (2016). Precise Genome Modification via Sequence-Specific Nucleases-Mediated Gene Targeting for Crop Improvement. *Front. Plant Sci.* 7.

Sundar, I.K., and Sakthivel, N. (2008). Advances in selectable marker genes for plant transformation. *J. Plant Physiol.* 165, 1698–1716.

Tafurt Cardona, Y., Morales, M., and Aparecida, M. (2014). MAIN REPAIR MECHANISMS FOR DAMAGES IN THE DNA MOLECULE. *Biosalud* 13, 95–110.

Tang, B., Yang, M., Shen, Q., Xu, Y., Wang, H., and Wang, S. (2017). Suppressing the activity of trehalase with validamycin disrupts the trehalose and chitin biosynthesis pathways in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 137, 81–90.

Tarayre, S., Vinardell, J.M., Cebolla, A., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2004). Two Classes of the Cdh1-Type Activators of the Anaphase-Promoting Complex in Plants: Novel Functional Domains and Distinct Regulation. *Plant Cell* 16, 422–434.

Thevelein (1987). Regulation of trehalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transitions in fungi. *Exp. Mycol.* 12.

Thompson, L.H., and Schild, D. (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Anal. Prev. Carcinog. Anim. Models* 477, 131–153.

Tolosa (2015). Evolución de la especie humana: Cambios en el DNA gracias a la introducción de la agricultura.

Upadhyay, S.K., Kumar, J., Alok, A., and Tuli, R. (2013). RNA-Guided Genome Editing for Target Gene Mutations in Wheat. *Genes Genomes Genetics* 3, 2233–2238.

Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., et al. (2003). Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* 15, 2093–2105.

Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., and Lander, E.S. (2014). Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. *Science* 343, 80–84.

Williamson, V.M., and Hussey, R.S. (1996a). Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8, 1735–1745.

Williamson, V.M., and Hussey, R.S. (1996b). Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8, 1735–1745.

Zhang, J.-P., Li, X.-L., Neises, A., Chen, W., Hu, L.-P., Ji, G.-Z., Yu, J.-Y., Xu, J., Yuan, W.-P., Cheng, T., et al. (2016). Different Effects of sgRNA Length on CRISPR-mediated Gene Knockout Efficiency. *Sci. Rep.* 6.

A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants | BMC Plant Biology | Full Text.

