

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Uso de CRISPR/Cas9 en *Solanum lycopersicum* y *Capsicum  
annuum* como estrategia para generar  
resistencia contra el tobamovirus ToBRFV”**

**TESIS**

Que presenta:

**Q.C. Laura Claret Triana Vidal**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de tesis: **Dra. Guadalupe Beatriz Xoconostle Cázares**

**Ciudad de México**

**Agosto, 2023**

“La suerte es lo que ocurre cuando la preparación  
se encuentra con la oportunidad”  
Séneca.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONAHCYT por el apoyo económico otorgado a mi persona a través de la beca número 800168.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y al Dr. Roberto Ruiz Medrano por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por todo el apoyo, atención brindada durante el desarrollo del proyecto y por contagiarme de su pasión por la ciencia.

A la Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas por aceptar formar parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Berenice Calderón Pérez por todos sus consejos, apoyo, conocimiento y buenas frases compartidas; así como por ser una gran persona a la cual admiro.

A los auxiliares del laboratorio 24 y 12 del departamento de Biotecnología y Bioingeniería el M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz y a la M. en C. Brenda Yazmín Vargas Hernández por su apoyo incondicional en el desarrollo técnico realizado durante el proyecto.

Al Dr. José Abrahan Ramírez Pool por su apoyo en el cuidado de las plantas en invernadero y por resolver mis dudas de bioinformática.

A la Biol. Ma. De Lourdes Rojas Morales del LaNSE Cinvestav por su apoyo con los experimentos de Microscopía.

A la Dra. Karina Mondragón Vázquez y al Dr. Jorge Guillermo Domínguez Chávez por su apoyo con el equipo de XRDP y por siempre motivarme a superarme profesionalmente y hacer lo correcto.

A la Srta. Vania secretaria de la coordinación académica del departamento de Biotecnología, muchas gracias por su paciencia y total disponibilidad para resolver mis dudas y por su ayuda en cada uno de los tramites que necesite realizar.

A mis chicos de servicio social Víctor y Luis por su apoyo y dedicación que fueron de gran ayuda para culminar el proyecto.

A todos y a cada uno de mis compañeros que forman parte del laboratorio 24 y 12, muchas gracias por todo su apoyo y por los momentos compartidos.

Y en especial a mis padres, hermanos y amigos que siempre me apoyan y están conmigo a pesar de la distancia; gracias por nunca dejarme sola. Los amo.

Gracias a Dios por permitirme vivir esta experiencia.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	3
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	9
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
1.1 Importancia del tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) y chile ( <i>Capsicum annuum</i> ) .....	12
1.2 Virus fitopatógenos: <i>Tobamovirus</i> .....	13
1.2.1 Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV).....	15
1.3 Resistencia contra virus.....	16
1.3.1 Producto génico ARL8.....	18
1.4 Edición genética.....	20
1.4.1 Sistema CRISPR/Cas9.....	22
1.4.2 Mecanismos de reparación de DNA.....	24
1.4.3 Edición genética en plantas.....	26
1.4.4 Transformación mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	27
1.4.5 Transformación mediante magnetofección de polen.....	30
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	33
4.1 Objetivo General.....	33
4.2 Objetivos Particulares.....	33
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	34
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	35
6.1 Análisis bioinformático para la determinación e identificación de los genes a editar.....	35
6.2 Diseño y evaluación de gRNAs.....	36
6.3 Construcción del vector de edición con gRNAs múltiples.....	36
6.3.1 Alineamiento de gRNAs y oligonucleótidos del polylinker.....	38
6.3.2 Clonación de gRNAs y polylinker.....	39
6.3.3 Transformación de células <i>E.coli</i> Mach1-T1 por choque térmico.....	41
6.4 Identificación de colonias con el vector clonado con gRNA o polylinker.....	41
6.4.1 Miniprep por lisis alcalina.....	41

6.4.2	Corroboración del inserto mediante digestión con enzimas de restricción	42
6.4.3	Corroboración del inserto mediante PCR punto final	43
6.4.4	Corroboración por secuenciación	45
6.5	Ensamblaje de múltiples gRNA en el vector pBUN4U6SM + Poly	45
6.5.1	Reamplificación del casete de gRNA mediante PCR punto final	45
6.5.2	Digestión de los casetes reamplificados para producir extremos cohesivos	47
6.5.3	Ligación de los fragmentos en el vector pBUN4U6SM + Poly	47
6.5.4	Corroboración de los insertos por digestiones enzimáticas	48
6.5.5	Corroboración de los insertos por secuenciación	49
6.6	Transformación genética de tomate	49
6.6.1	Desinfección de semillas	49
6.6.2	Transformación de <i>Agrobacterium</i> por electroporación y su acondicionamiento en medio de infección	50
6.6.3	Obtención de explantes e infección con <i>Agrobacterium</i>	51
6.6.4	Regeneración de explantes	52
6.6.5	Enraizamiento y aclimatación en invernadero	52
6.6.6	Extracción de DNA genómico vegetal con CTAB	52
6.6.7	Identificación de las plantas transformadas mediante PCR punto final	54
6.6.8	Determinación de la DL <sub>50</sub> para el glufosinato de amonio en tomate	54
6.7	Transformación genética de chile	55
6.7.1	Germinación de semillas y su mantenimiento en invernadero para producción de polen	55
6.7.2	Síntesis de nanopartículas magnéticas (MNPs)	55
6.7.3	Funcionalización del PEI a las MNPs	57
6.7.4	Caracterización y corroboración del funcionamiento de las nanopartículas	57
6.7.4.1	Caracterización de las MNPs con difracción de rayos X para polvos (DRXP)	57
6.7.4.2	Caracterización de las MNPs con microscopía electrónica de transmisión (TEM)	58
6.7.4.3	Caracterización del polen con microscopía electrónica de barrido (SEM)	58
6.7.4.4	Caracterización de la interacción MNPs-DNA	59
6.7.4.5	Corroboración del funcionamiento de las MNPs en el proceso de transformación genética	59

6.7.4.6 Extracción de RNA mediante el método de Logemann .....	60
6.7.4.7 Protocolo de síntesis de cDNA.....	60
6.7.5 Magnetofección de polen.....	61
6.7.6 Polinización con polen magnetofectado .....	61
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
7.1 Análisis bioinformático para la determinación e identificación de los genes a editar .....	62
7.2 Diseño y evaluación de gRNAs.....	71
7.3 Construcción del vector de edición con gRNAs múltiples .....	74
7.3.1 Clonación de gRNAs en el vector PBUN4U6SM y del sitio polylinker para formar el vector pBUN4U6SM + Poly .....	74
7.3.2 Ensamble de múltiples gRNA en el vector pBUN4U6SM + Poly .....	81
7.4 Transformación genética de tomate.....	86
7.5 Transformación genética de chile .....	101
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>112</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>113</b>
10.1 Anexo 1 Medios para transformación genética de tomate. ....	113
10.2 Anexo 2 Vector pBGWFS7 e35S .....	115
10.3 Anexo 3 Vector pBGWFS7 .....	116
10.4 Anexo 4. Medio de germinación para polen.....	116
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>117</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales países productores de jitomate en el año 2021. ....	12
<b>Figura 2.</b> Principales países productores de chiles en el año 2021.....	13
<b>Figura 3.</b> Estructura y organización del genoma de los tobamovirus. ....	14
<b>Figura 4.</b> Síntomas generados por el Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV.....	15
<b>Figura 5.</b> Mecanismo general de la función de los genes de resistencia dominantes (R).....	17
<b>Figura 6.</b> Efectos de mutaciones únicas y múltiples en <i>A. thaliana</i> en los genes <i>arl8</i> sobre la replicación viral. ....	20
<b>Figura 7.</b> Endonucleasas sitio dirigidas utilizadas en edición genética.....	22
<b>Figura 8.</b> Variables del sistema CRISPR/Cas 9.....	24
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de reparación de la cadena doble de DNA.....	25
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de transformación utilizado por <i>A. tumefaciens</i> .....	29
<b>Figura 11.</b> Mecanismo de transformación mediante magnetofección de polen.....	31
<b>Figura 12.</b> Estrategia experimental de.....	34
<b>Figura 13.</b> Mapa del vector pBUN4U6SM.....	37
<b>Figura 14.</b> Mapa del vector pBUNAU6SM con el polylinker.....	38
<b>Figura 15.</b> Posición de los primers utilizados para la reamplificación de los casetes de gRNA para el vector a usar en tomate.....	46
<b>Figura 16.</b> Posición de los primers utilizados para la reamplificación de los casetes de gRNA para el vector a usar en Chile.....	47
<b>Figura 17.</b> Sistema utilizado para la síntesis de las MNPs.....	56
<b>Figura 18.</b> Árbol filogenético de ARL8 en las distintas especies de solanáceas.....	65
<b>Figura 19.</b> Estructura de la helicasa viral de ToMV.....	67
<b>Figura 20.</b> Estructura proteica de ARL8 (A1C) de <i>A. thaliana</i> .....	67
<b>Figura 21.</b> Resultados obtenidos con el estudio de <i>docking molecular</i> .....	68
<b>Figura 22.</b> Interacciones intermoleculares entre ARL8 ( <b>Magenta</b> ) y la helicasa viral.....	70
<b>Figura 24.</b> gRNAs diseñados para <i>S. lycopersicum</i> .....	73
<b>Figura 25.</b> Oligos diseñados para los gRNA y el sitio polylinker.....	74
<b>Figura 26.</b> Electroforesis de los oligos directo y reverso alineados de cada gRNA.....	75
<b>Figura 27.</b> Linealización del vector pBUN4U6SM con las enzimas HindIII y BsaI.....	75
<b>Figura 28.</b> Electroforesis de la digestión con HindIII para corroborar la clonación de los gRNAs.....	78
<b>Figura 29.</b> Electroforesis de la PCR punto final para corroborar la clonación de los gRNAs.....	78
<b>Figura 30.</b> Electroforesis de la digestión con SpeI y BsaI.....	79
<b>Figura 31.</b> Electroforesis de las comprobaciones para las colonias con el sitio polylinker ...	79
<b>Figura 32.</b> Electroferogramas obtenidos para la secuenciación de los gRNAs clonados en el vector pBUN4U6SM.....	80
<b>Figura 33.</b> Electroferogramas obtenidos para la secuenciación de las colonias 8 y 14.....	81
<b>Figura 34.</b> Vector pBUN4U6SM-gRNA4-3-2-1-SL.....	82
<b>Figura 35.</b> Vector pBUN4U6SM-GRNA3-2-1-Ca.....	82
<b>Figura 36.</b> Electroforesis confirmatoria de la digestión de cada casete de gRNA amplificado.....	83
<b>Figura 37.</b> Electroforesis de la digestión con HindIII y AgeI.....	84
<b>Figura 38.</b> Electroforesis de las digestiones dobles para corroborar la correcta clonación de los cassettes de gRNA.....	85
<b>Figura 39.</b> Alineamiento de la secuenciación Sanger obtenida para los vectores.....	85

<b>Figura 40.</b> Electroforesis de la digestión doble con HindIII y Agel.....	86
<b>Figura 41.</b> Total de explantes por lote y medio de cultivo .....	87
<b>Figura 42.</b> Porcentaje de semillas no germinadas por concentración de glufosinato .....	88
<b>Figura 43.</b> Plántulas obtenidas del experimento de germinación en glufosinato de amonio. ....	89
<b>Figura 44.</b> Resultados del experimento con explantes en medio de regeneración con glufosinato.....	93
<b>Figura 45.</b> Tamaño de los explantes a las tres semanas en el medio con glufosinato .....	93
<b>Figura 46.</b> Resumen del proceso de regeneración de <i>S. lycopersicum</i> mediante cultivo <i>in vitro</i> . .....	94
<b>Figura 47.</b> Identificación de plantas transformadas.....	96
<b>Figura 48.</b> Electroforesis de la PCR realizada para identificar las plantas transformadas ....	97
<b>Figura 49.</b> Resultados del experimento de resistencia a glufosinato.....	98
<b>Figura 50.</b> Fenotipo de la planta regenerada 6.1. ....	100
<b>Figura 51.</b> Comparación entre los difractogramas de las MNPs sintetizadas.....	102
<b>Figura 52.</b> Micrografías TEM de las MNPs .....	102
<b>Figura 53.</b> Electroforesis de la migración del complejo MNPs-DNA .....	103
<b>Figura 54.</b> Electroforesis de la doble digestión con las enzimas HindIII y AvrI .....	104
<b>Figura 55.</b> Micrografías SEM de los granos de polen de Chile serrano.....	105
<b>Figura 56.</b> Tinción x-gluc de las muestras de polen magnetofectadas .....	106
<b>Figura 57.</b> Electroforesis para verificar la integridad del RNA .....	107
<b>Figura 58.</b> Resultado de la RT-PCR para identificar el mRNA del gen GFP .....	108
<b>Figura 59.</b> Resultado de la RT-PCR para identificar el mRNA del gen GFP y del gen endógeno GAPDH.....	109

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mezcla de reacción para el alineamiento de oligos .....	38
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de termociclador para la alineación de secuencias .....	39
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para digestión del vector pBUN4SU6M.....	39
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción para la ligación vector-inserto .....	40
<b>Tabla 5.</b> Primers utilizados para la corroboración de gRNAs y polylinker por PCR .....	44
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción para PCR punto final.....	44
<b>Tabla 7.</b> Condiciones del termociclador para PCR punto final.....	44
<b>Tabla 8.</b> Primer utilizados en la reamplificación de los casetes de gRNA.....	46
<b>Tabla 9.</b> Mezcla de reacción para la ligación múltiple del vector a usar en tomate.....	48
<b>Tabla 10.</b> Primers utilizados en la secuenciación del casete de gRNAs en cada vector.....	49
<b>Tabla 11.</b> Mezcla de reacción 1 para cDNA. ....	60
<b>Tabla 12.</b> Mezcla de reacción 2 para cDNA. ....	60
<b>Tabla 13.</b> Genes participantes en el ciclo de replicación viral de algunos virus.....	62
<b>Tabla 14.</b> Genes ortólogos de ARL8 en <i>S. lycopersicum</i> y <i>C. annuum</i> . .. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Tabla 15.</b> Datos obtenidos del experimento de germinación de semillas en distintas concentraciones de glufosinato .....	88

## RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) y el chile (*Capsicum annuum*) son dos de las hortalizas de mayor consumo y exportación en México y en todo el mundo. Sin embargo, ambos cultivos pueden ser afectados por diversos fitopatógenos como son los virus. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) es un nuevo tobamovirus surgido en el 2014 que afecta a ambas solanáceas. El virus causa clorosis o patrón de mosaico en las hojas, así como frutos con manchado clorótico y veteado, lo que puede conllevar a pérdidas de entre el 30 al 100% de la producción. En el presente trabajo se propuso un diseño para la edición de genes relacionados con el ciclo viral de ToBRFV como estrategia para generar plantas resistentes de *S. lycopersicum* y *C. annuum*. Dentro de los resultados obtenidos se destaca la obtención de los vectores de edición para cada especie con múltiples gRNAs específicos para cada uno de los genes ARL8 los cuales fueron seleccionados como blanco de edición ya que en la literatura han sido reportados como genes necesarios para la replicación de ciertos tobamovirus. En el proceso de transformación genética se utilizaron dos estrategias diferentes: el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración de explantes en cultivo *in vitro* para las plantas de tomate y magnetofección de polen para las plantas de chile. Para la magnetofección de polen, se desarrolló la síntesis y caracterización de las MNPs, así como la corroboración del proceso de magnetofección. Finalmente se destaca la obtención de cinco plantas regeneradas mediante el proceso de cultivo *in vitro* y su aclimatación a las condiciones de invernadero, de las cuales, una de ellas muestra características fenotípicas diferentes en comparación con la planta silvestre, como lo es la pérdida de dominancia apical y su aspecto arbustivo, características que le podrían conferir ventajas para su producción en campo.

Este proyecto permitió diseñar una estrategia de edición a través del uso de genes de resistencia recesiva y técnicas innovadoras como lo es CRISPR/Cas 9 y la magnetofección de polen, las cuales permitirán la obtención de cultivos mejorados en menor tiempo y menor costo en comparación a las técnicas convencionales.

## ABSTRACT

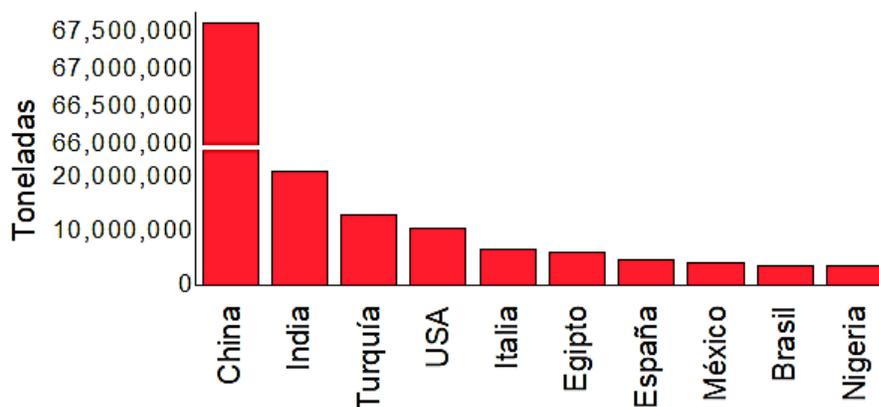
Tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum annuum*) are two of the most consumed and exported vegetables in Mexico and worldwide. However, both crops can be affected by various phytopathogens, such as viruses. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) is a new tobamovirus emerged in 2014 that affects tomato and pepper. The virus causes chlorosis or mosaic patterns on the leaves, as well as fruits with chlorotic spots and streaks. ToBRFV infection can lead to 30-100% loss of crop yield. In the present work, gene editing of ToBRFV viral cycle related genes was proposed as a strategy to generate resistant plants of *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annuum*. Among the results obtained, editing vectors for each species with multiple specific gRNAs for each of the ARL8 genes, which were selected as editing targets since in the literature they have been reported as genes necessary for replication of certain tobamoviruses, were constructed. Two different strategies were used in the genetic transformation process: the use of *Agrobacterium tumefaciens* and explant regeneration in *in vitro* culture for tomato plants and pollen magnetofection for pepper plants. For pollen magnetofection, the synthesis and characterization of MNPs was developed, as well as the corroboration of the magnetofection process. Finally, the obtaining of five regenerated plants through the *in vitro* culture process and their acclimatization to greenhouse conditions was achieved; one of them shows different phenotypic characteristics compared to the wild plant, such as the loss of dominance apical and its bushy appearance, characteristics that could confer advantages for its production in the field.

This work allowed the design of an editing strategy through the use of recessive resistance genes, using innovative techniques such as CRISPR/Cas 9 and pollen magnetofection, which will allow obtaining improved crops in less time and lower cost compared to conventional techniques.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia del tomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*)

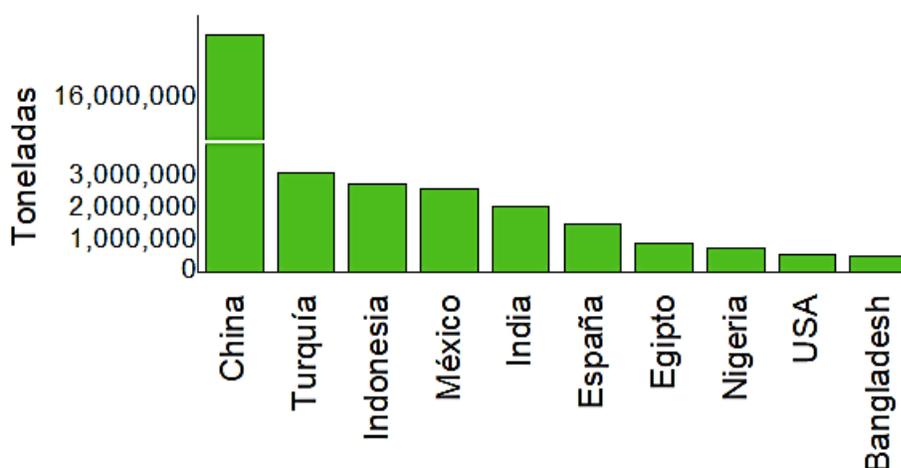
El tomate (*S. lycopersicum*) es una de las hortalizas de mayor importancia en la industria alimentaria y México es uno de los principales productores a nivel mundial (**Fig. 1**). Para el año 2018 se estimó una producción de 3.95 millones de toneladas, de las cuales 2.17 fueron exportadas con un valor de 2,613.25 millones de dólares. Se estima que para el 2030 la producción aumente a 7.56 millones de toneladas, con una exportación de 5.50 millones de toneladas correspondientes a 6,641.02 millones de dólares (SAGARPA, 2017). El último reporte generado por el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) en cuanto a la producción agrícola de jitomate en nuestro país para el año 2021, indica un valor de producción total de 31, 503, 817.27 millones de pesos (SIAP, 2022).



**Figura 1.** Principales países productores de jitomate en el año 2021. Elaboración propia con datos de FAOSTAT (2021).

Otro cultivo de amplio uso en la dieta de la población mexicana y de gran importancia económica para nuestro país es el chile (*C. annuum*) en sus distintas variedades, las cuales son distribuidas a todo el mundo en diversas presentaciones, como son:

enlatados, deshidratados, secos, encurtidos, etc. (**Fig. 2**). Para el año 2018 se estimó una producción de 3.07 millones de toneladas de este cultivo, de las cuales 1.05 fueron exportadas con un valor de 1,048.6 millones de dólares. Se estima que para el 2030 la producción aumente a 4.49 millones de toneladas, con una exportación de 2.11 millones de toneladas correspondientes a 2,109.98 millones de dólares (SAGARPA, 2017). El último reporte generado por el SIAP en cuanto a la producción agrícola de las distintas variedades de chile en nuestro país para el año 2021, arrojó un valor de producción total de 30,642,661.36 millones de pesos (SIAP, 2022).

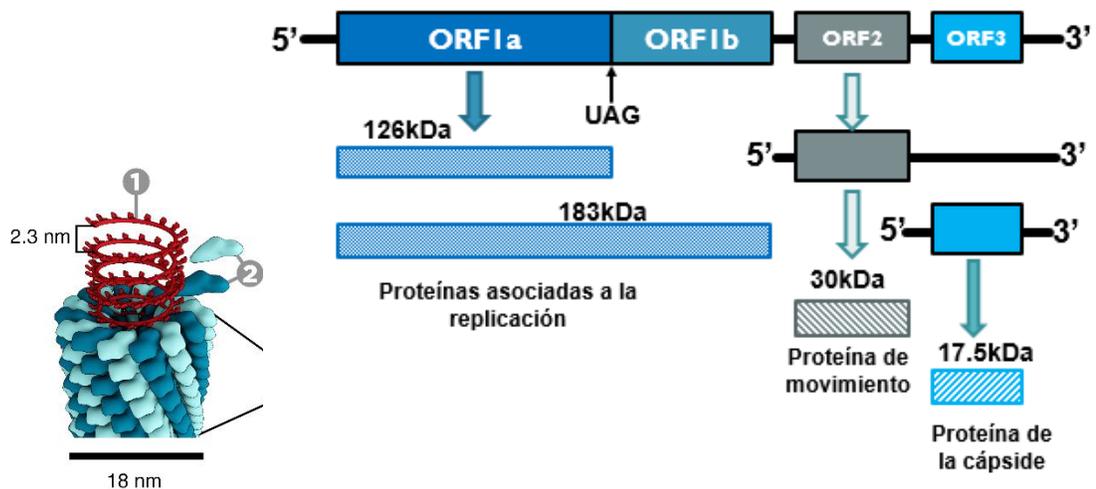


**Figura 2.** Principales países productores de chiles en el año 2021. Elaboración propia con datos de FAOSTAT (2021).

## 1.2 Virus fitopatógenos: *Tobamovirus*

Los virus causantes de enfermedades en las plantas representan un foco de atención para el sector agrícola ya que pueden generar pérdidas importantes de hasta el 100% de la producción. Se estima que la pérdida económica mundial debida a virus fitopatógenos llega a ser mayor a los 30 billones de dólares anuales (Avner et al., 2021). Diversos miembros del género *Tobamovirus* son causantes de enfermedades

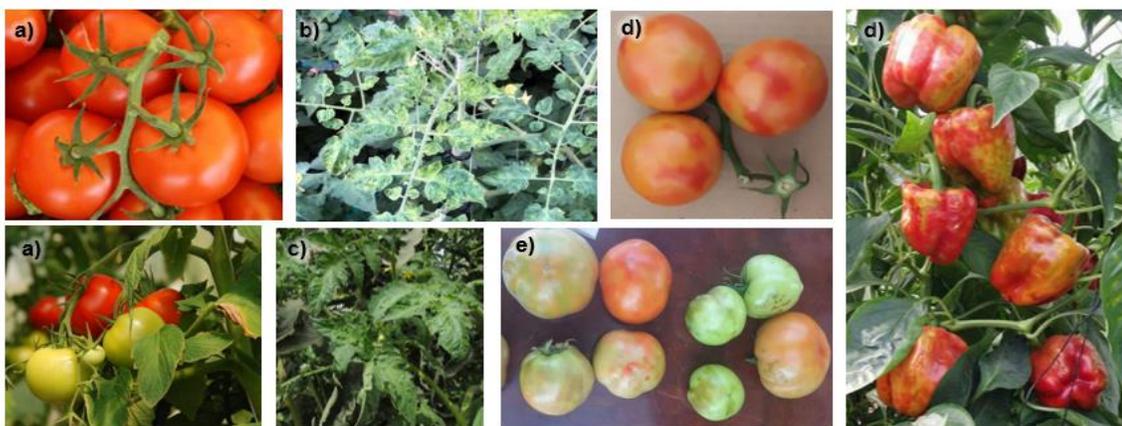
en solanáceas como jitomate, chile y papa. Dentro del grupo de los *tobamovirus* se encuentra el Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV) y Pepper mild mottle virus (PMMoV), los cuales son virus de RNA de cadena simple con un tamaño promedio del genoma de 6.4 kb. El genoma de los *tobamovirus* codifica para una replicasa viral, una polimerasa de RNA dependiente de RNA con dominio de helicasa (RdRp), la proteína de la cápside (CP) y la proteína de movimiento (MP), que permite al virus el transporte de su RNA de célula a célula a través de plasmodesmos y a larga distancia a través del tejido vascular (Maayan et al., 2018; Hak et al., 2021) (**Fig. 3**). Las partículas virales son muy estables y fáciles de transmitir a través de la ropa, herramientas, suelo, agua, transferencia mecánica, polinizadores y semillas (Avner et al., 2021; EPPO, 2020; Ziebell et al., 2020; Salvatore et al., 2020).



**Figura 3.** Estructura y organización del genoma de los tobamovirus. ORF: open reading frame.

### 1.2.1 Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) es un nuevo tobamovirus surgido en 2014 en el sur de Israel y posteriormente reportado en 2016 en Jordán. (EPPO, 2020; SADER, 2018;Luria, 2017). El virus causa clorosis o un patrón de mosaico en las hojas, así como hojas arrugadas o con estrechamientos; los frutos presentan un manchado clorótico y veteadado, además de una mal maduración y deformación del fruto (EPPO, 2020) (**Fig. 4**). Actualmente se ha convertido en un reto a vencer para la industria agricultora debido a su capacidad de evadir los mecanismos de defensa presentes en las plantas, lo que le ha permitido esparcirse de manera eficiente en distintos países incluyendo México, donde el primer contagio se reportó en sembradíos de tomate y chile en el municipio de Yurécuaro, Michoacán, en agosto del 2018 (SADER, 2018; Luria et al, 2017; Hak et al., 2021). El ToBRFV ha mostrado evadir la respuesta de hipersensibilidad generada por el gen  $Tm2^{-2}$ , el cual ha sido utilizado de manera eficiente por décadas para el control de plagas por tobamovirus en plantas de jitomate (Zhi-Yong et al., 2021; Michie et al., 2011).

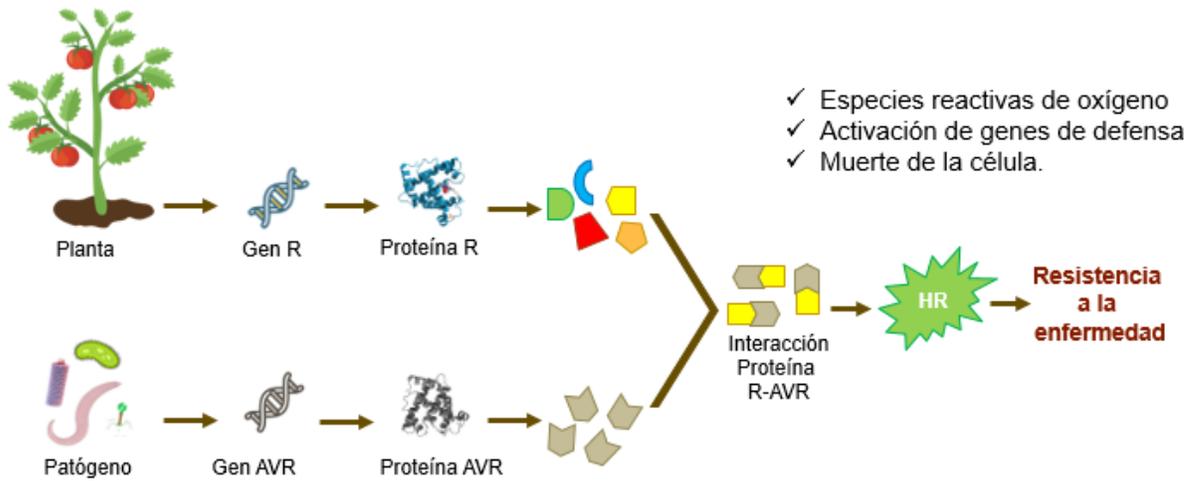


**Figura 4.** Síntomas generados por el Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). a) Planta y frutos sanos; Hojas con: b) clorosis o patrón de mosaico y c) arrugadas o con estrechamiento; Frutos con: d) manchado clorótico o veteadado y e) deformación y mala maduración.

### 1.3 Resistencia contra virus

Dentro de las estrategias implementadas para el control de las plagas virales en los distintos cultivos se tiene el uso de los genes de resistencia. Los genes de resistencia contribuyen con la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos o funcionan como parte de la maquinaria de replicación viral. Estos han sido clasificados en dos tipos en función de su expresión, los genes de resistencia dominantes y los genes de resistencia recesivos (Jean-Luc et al., 2018; Mayank et al., 2012; Masayoshi et al., 2016). Los genes de resistencia dominantes (R) fueron los primeros en ser utilizados como estrategia de control de diversas infecciones. Estos forman parte del sistema inmune de la planta, donde su función es identificar a los agentes patógenos a través del reconocimiento de las proteínas de avirulencia (Avr) propias de cada patógeno, lo que conlleva a una serie de señalizaciones dentro de la célula para desarrollar una respuesta de hipersensibilidad (HR) con la cual se logra controlar al agente patógeno (Mayank et al., 2012) (**Fig. 5**). Como ejemplo se tiene a los genes de resistencia Tm-1, Tm-2, Tm-2<sup>2</sup> en las plantas de tomate, los cuales han sido empleados por décadas para el control de tobamovirus como el ToMV y el TMV (Ishikawa et al., 2014; Frank et al., 2003; Yonatan et al., 2018; Tianyuan et al., 2017). La resistencia conferida por estos genes se caracteriza por ser eficiente y duradera; sin embargo, los agentes virales se mantienen en constante evolución, por lo que suelen surgir nuevos virus con mutaciones que confieren la capacidad de evadir la respuesta inmune de los genes de resistencia dominantes (Michie et al., 2011). Este es el caso de ToBRFV en el que se ha demostrado que mutaciones en la MP del

virus le confieren la capacidad de evadir el reconocimiento por el gen de resistencia Tm-2<sup>2</sup> (Hagit et al., 2021; Avner et al, 2021).



**Figura 5.** Mecanismo general de la función de los genes de resistencia dominantes (R).

Por su parte, los genes de resistencia recesivos se han convertido en una estrategia de interés en las últimas décadas para el control de plagas. Si bien algunos de estos genes están codificados en alelos recesivos, esta no es la característica principal por la cual se les denomina recesivos. Su característica principal es que funcionan como genes de susceptibilidad para el virus, es decir, son genes cuyos productos serán utilizados y aprovechados por el agente viral para poder llevar a cabo su ciclo viral, por lo que modificaciones o silenciamiento de estos genes susceptibles pueden disminuir o impedir la replicación viral (Jean-Luc et al., 2018; Masayoshi et al., 2016). Estos genes suelen participar activamente en cualquiera de los pasos de la infección, ya sea en el proceso de replicación del virus o en su transporte entre las células. Por ejemplo, los virus de RNA de cadena positiva [(+) RNA], como los miembros del género *Tobamovirus*, requieren sintetizar una cadena complementaria de RNA de

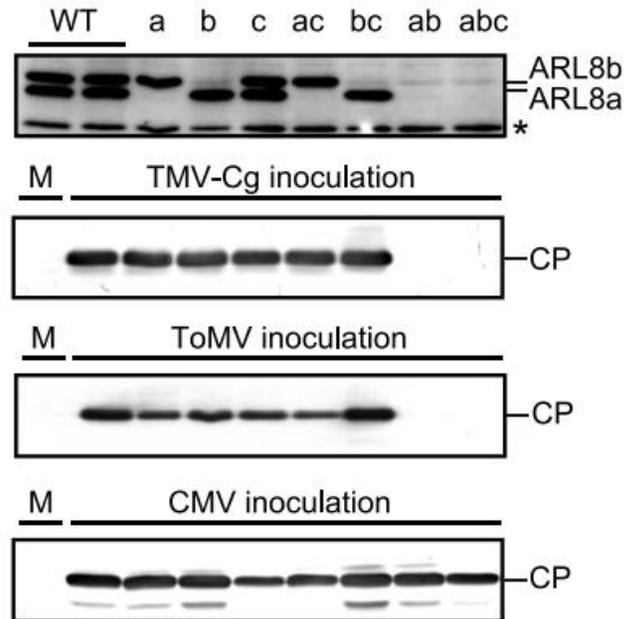
sentido negativo [(-) RNA] que posteriormente es usada como molde para sintetizar la cadena de (+) RNA progenitora. Este proceso de replicación es realizado por la RdRp con dominio de helicasa y otras proteínas del huésped con las cuales se forma el complejo de replicación que se ensambla en las membranas intracelulares de la célula (Ishikawa et al., 2014; Masayuki et al., 2004). Varias de estas proteínas involucradas en el proceso han sido identificadas, convirtiéndose en candidatas como posibles genes de resistencia recesiva. Algunas de las proteínas del huésped implicadas en la replicación del RNA viral de los *Tobamovirus* que han sido reportadas son TOM1, TOM2A, TOM3, HSP70, eEF1A y ARL8. Diversos estudios han demostrado que el silenciamiento o mutación de estos genes con herramientas de edición genética como CRISPR/Cas 9 o el uso de siRNA (small interfering RNA) confieren resistencia contra algunos virus (Jannat et al., 2020; Sunil et al., 2012; Masaki et al., 2011; Yayoi et al., 2003; Michael et al., 2022). Uno de los ejemplos más recientes que se tiene es la obtención de plantas de *S. lycopersicum* con un cuádruple knockout de los genes TOM que mostraron resistencia contra la infección generada por el ToBRFV (Masayuki et al., 2022).

### **1.3.1 Producto génico ARL8**

ARL8 (ADP-ribosylation factor-like protein 8) pertenece a la familia de proteínas de unión a GTP, específicamente al grupo de las proteínas ARF (ADP-ribosylation factor). Estas proteínas se caracterizan por tener una hélice anfipática en el extremo amino (N) terminal que le permite unirse a distintas membranas en la célula, así como por poseer un ciclo de unión a GTP y GDP. ARL8 regula su función entre la forma activa (unida a la membrana y asociada a GTP) y la forma inactiva (libre en el

citosol y asociada a GDP). Las funciones principales de ARL8 y sus ortólogos es participar durante el tráfico de membranas en el reclutamiento de las proteínas que recubren vesículas y en la formación de los endosomas tardíos y lisosomas procedentes del aparato de Golgi (Richard et al., 2006; Vanessa et al., 2003).

Sin embargo, se han descrito otras funciones de esta proteína que le confieren interés biotecnológico como candidata a gen de resistencia recesivo. Masaki y colaboradores reportaron en 2011 la identificación de una pequeña proteína de 20 kDa que mostró participar en el complejo de replicación de algunos tobamovirus, demostrando en sus experimentos tener un papel crucial para la replicación viral en conjunto con la proteína TOM1. Los experimentos desarrollados en *Arabidopsis thaliana*, en donde se consiguió una planta triple knockout de este gen, demostraron que no se afecta la morfología y crecimiento de la planta, pero si la replicación de los tobamovirus TMV y ToMV (Masaki et al., 2011) (**Fig.6**). Estas características descritas por el grupo de Masaki convierten a esta proteína en un candidato potencial para edición genética de sus ortólogos en tomate y chile como una estrategia para el control de ToBRFV.

**A**Wild-type *arl8a-arl8b-arl8c***B** *Arabidopsis* plants

**Figura 6.** Efectos de mutaciones únicas y múltiples en *A. thaliana* en los genes *arl8* sobre la replicación viral. (a) Planta silvestre (WT) y planta con triple mutante de *arl8* (*arl8a-arl8b-arl8c*). La fotografía fue tomada 5 semanas después de la siembra. (b) Efectos de la mutación en *arl8* sobre la multiplicación de TMV-Cg, ToMV y CMV. Las proteínas de la cápside (CP) fueron detectadas mediante inmunotransferencia dos días post inoculación para TMV-Cg y CMV, y siete días post inoculación para ToMV; el asterisco indica la señal cruzada del anticuerpo anti-ARL8 con una proteína celular, que sirvió como control de carga (Masaki et al., 2011).

#### 1.4 Edición genética

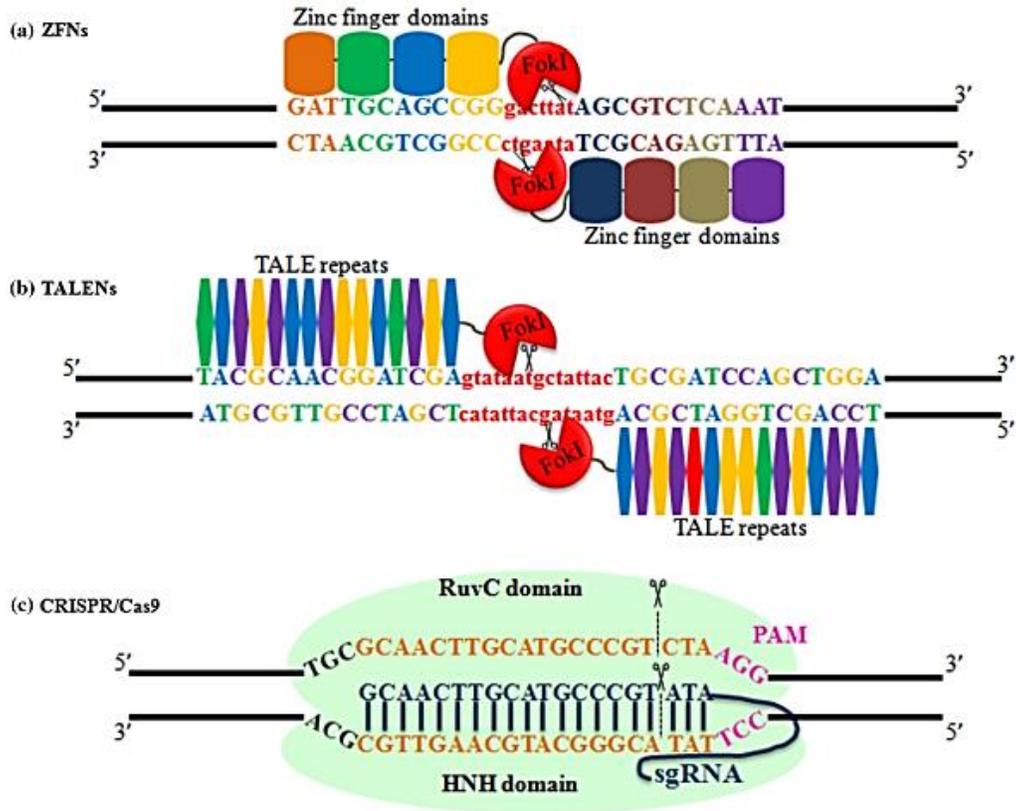
Después del gran logro que significó dilucidar cada una de las secuencias de nucleótidos que conforman el genoma humano mediante el proyecto HUGO, surgió un nuevo reto para la comunidad científica: cómo poder modificar o alterar dichas

secuencias en otros organismos para obtener diversos beneficios. Por lo que surgió la edición genética o edición del genoma. La edición genética permite realizar modificaciones puntuales de interés en un genoma mediante el uso de distintas nucleasas sitio dirigidas y el uso del sistema de reparación genómico propio de cada célula (Krishan et al., 2020).

Para poder realizar la edición genética de algún gen de interés se debe llevar a cabo dos procesos importantes dentro de la célula: el corte de la doble cadena de DNA y la reparación de dicho corte. Para poder efectuar el primer proceso se ha hecho uso de diversas nucleasas sitio dirigidas que tienen la capacidad de cortar la doble hebra de DNA en sitios específicos. Entre las herramientas más importantes están las nucleasas de dedos de zinc (zinc-finger nucleases o ZFNs), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (transcription activator-like effector nucleases o TALENs) y el sistema CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat-Cas) (Gao., 2021; X. Robert et al., 2021; Krishan et al., 2020) (**Fig.7**).

Las ZFNs poseen un dominio de unión a DNA que está formado por una proteína de dedos de zinc (con 3 a 6 dominios estructurales que se unen a tres bases nucleotídicas) y por un dominio FokI encargado de realizar el corte en la secuencia de DNA (Krishan et al., 2020).

Por su parte, las endonucleasas TALENs se encuentran formadas por un dominio de unión a DNA de TALE (transcription activator-like effector) unido al dominio FokI. En este sistema cada TALE está conformado por 33-35 aminoácidos que determinan el sitio de unión. Ambos sistemas, ZFNs y TALENs, han sido utilizados en diversos estudios clínicos . Sin embargo, el mayor número de estudios ha sido realizado utilizando el sistema CRISPR-Cas9 (Krishan et al., 2020; Robert et al., 2021).



**Figura 7.** Endonucleasas sitio dirigidas utilizadas en edición genética. a) ZFNs, b) TALENs, c) CRISPR/Cas9. Imagen tomada de Krishan et al. (2020).

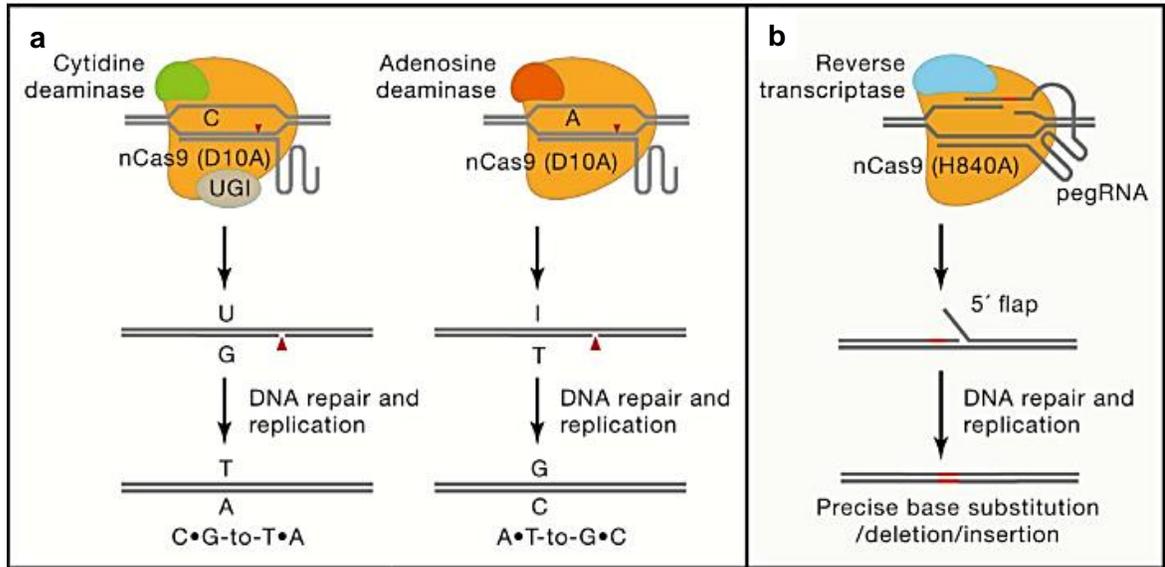
### 1.4.1 Sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 es una herramienta que ha revolucionado la investigación en el campo de la edición genética debido a su facilidad y bajo costo; fue descubierto en bacterias y adaptado por ingeniería genética para poder realizar cortes específicos en una secuencia de DNA. (Robert et al., 2021; Greene et al, 2021).

El sistema CRISPR-Cas9 se encuentra conformado por una nucleasa, Cas 9, que se encarga de realizar el corte en la doble cadena de DNA y por un RNA guía (gRNA) que se encarga de especificar el sitio de corte mediante el apareamiento de bases (**Fig. 7c**). El gRNA está formado por 17-20 pares de bases que interactúan con el

DNA blanco y por una secuencia conservada que sirve de andamio molecular (scaffold) que interactúa con Cas 9. Para que el sistema pueda identificar el sitio de corte es necesario que en él se encuentre la secuencia PAM (protospacer-associated motif), la cual está compuesta por 2 a 5 nucleótidos y se localiza corriente abajo de la cadena blanco en la secuencia complementaria. Para el caso de la proteína Cas9, dicha secuencia es NGG, donde N representa cualquier nucleótido (Robert et al., 2021; Greene et al, 2021).

Además de este sistema, se han desarrollado nuevas variables del sistema CRISPR-Cas9 con la intención de aumentar su eficiencia y eliminar posibles ediciones fuera de los loci seleccionados (eliminación de target-offs), como son el sistema de edición de bases (CRISPR-CAS cytosine base editors y CRISPR-CAS adenine base editors) y el sistema CRISPR-Cas prime editing (**Fig. 8**). En el sistema de edición de bases, la proteína Cas9 mutada para solo cortar una de las hebras del DNA (Nickase Cas9 o nCas9) se encuentra unida a una enzima con actividad citidina desaminasa o a una desoxiadenosina desaminasa, que se encargan de realizar el cambio de una C-G por T-A o de A-T por G-C, realizándose así el cambio puntual de estas bases. En la tecnología de prime editing, la proteína nCas9 se encuentra unida a una retrotranscriptasa (RT) y hace uso de un gRNA modificado, denominado pegRNA (del inglés prime editing RNA). Este pegRNA posee su extremo 3' más largo, el cual consiste en un primer de unión al sitio de edición que es usado por la enzima reverso transcriptasa (RT) como molde con la edición deseada. (Gao., 2021).



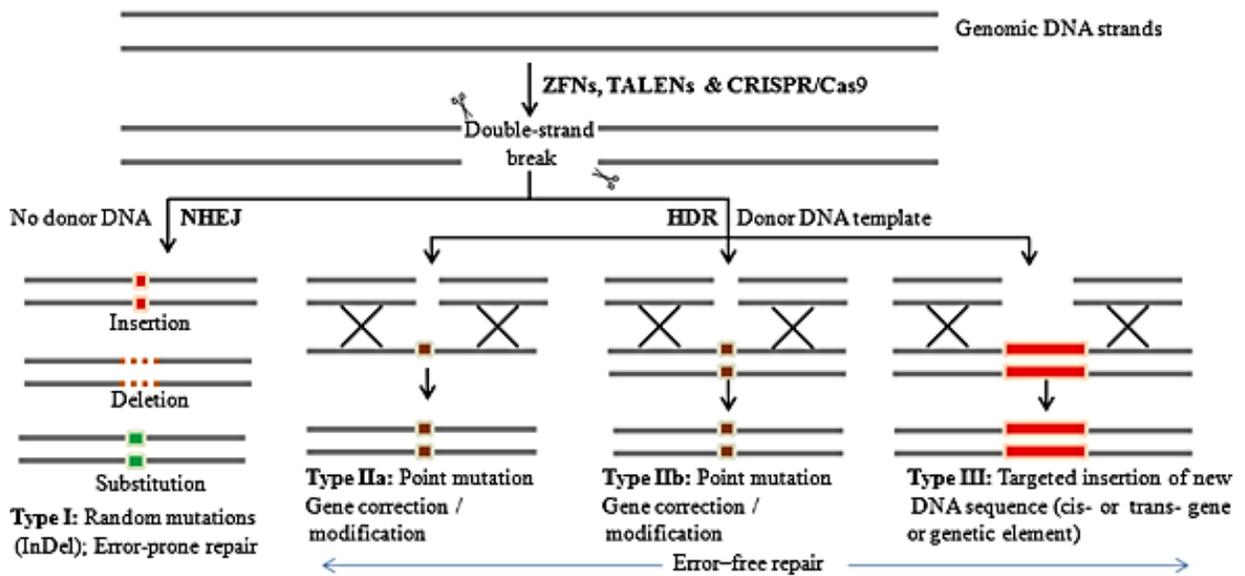
**Figura 8.** Variables del sistema CRISPR/Cas 9. a) Sistema de edición de bases (CRISPR-CAS cytosine base editors y CRISPR-CAS adenine base editors) y b) Sistema de CRISPR-Cas prime editing. Imagen tomada de Gao (2021).

### 1.4.2 Mecanismos de reparación de DNA

Como se mencionó previamente, para poder llevar a cabo una edición genética es necesario realizar un corte en la doble hebra de DNA y posteriormente la reparación del mismo, por lo que los mecanismos de reparación que posee la célula cumplen un papel fundamental para la edición genética. Gracias a estos mecanismos se logran generar las modificaciones deseadas a través de la producción de inserciones o deleciones (indels) al azar o la inserción de secuencias nucleotídicas específicas (mediante el uso de una secuencia molde), todo dependiente del camino de reparación que la célula tome para reparar el daño (Greene et al., 2021).

La célula cuenta con distintos mecanismos de reparación para los cortes de la cadena doble de DNA, como son la unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ), la reparación por unión de extremos no homólogos (non-homologous end

joining o NHEJ) o la reparación por recombinación homóloga (homology-directed repair o HDR), siendo los de mayor interés para la edición genética la reparación por NHEJ y HDR (Greene et al., 2021; Krishan et al., 2020; Teruaki et al., 2013) (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Mecanismos de reparación de la cadena doble de DNA. La célula cuenta con dos mecanismos principales: NHEJ (non-homologous end joining) y HDR (homology-directed repair). A través del mecanismo NHEJ (Tipo I) se generan mutaciones al azar o indels. Para la reparación por HDR, se requiere una secuencia molde que puede ser monocatenaria (Tipo IIa) o bicatenaria (Tipo IIb y III) con lo que se generan modificaciones exactas. Imagen tomada de Krishan (2020).

A través de la vía de reparación de NHEJ, la célula tiene la capacidad de unir ambas hebras de DNA con lo que pueden ocurrir indels de algunos nucleótidos dentro de la secuencia de interés. Estos indels propician mutaciones al azar que pueden alterar la función del gen de interés generándose un knockout. Por su parte, para la reparación por recombinación homóloga, es necesaria la presencia de una secuencia molde o de referencia la cual posee extremos homólogos al sitio de corte que le permiten unirse por complementariedad para llevar a cabo la reparación. Con este mecanismo

es posible la inserción de fragmentos de DNA que ya poseen la modificación específica que se desea realizar (Greene et al., 2021; Teruaki et al., 2013).

### **1.4.3 Edición genética en plantas**

Las distintas condiciones de estrés biótico y abiótico que enfrentan las plantas hacen necesario incrementar su variabilidad genética para volverlas resistentes. Para lograr este objetivo, se han hecho uso de cuatro técnicas distintas, principalmente: cruce de especies, mutagénesis, transgénesis y edición genética. Mediante el cruce de especies se obtienen los rasgos deseados a través de la recombinación sexual de sus caracteres. Esta técnica ha sido empleada por años, sin embargo, está limitada por la compatibilidad de especies por lo que solo se pueden cruzar genomas parentales. Con las técnicas de mutagénesis se logra generar mutaciones al azar que pueden conllevar a la adquisición de un nuevo rasgo favorable, esto se logra mediante el uso de agentes químicos o radiación ionizante. Dentro de sus desventajas se puede encontrar el largo tiempo que toma el obtener una mutación deseada y su difícil identificación. A través de las técnicas de transgénesis se logran insertar genes de características deseadas de cualquier especie en otra de interés. Con esto se puede incrementar fácilmente la variabilidad genética; sin embargo, dichos genes externos son insertados de manera aleatoria en cualquier parte del genoma. Estas plantas, denominadas organismos genéticamente modificados (GMOs), son estrictamente sobre reguladas por las instituciones gubernamentales y actualmente no son bien aceptados por la sociedad ya que, por desconocimiento e intereses de particulares, son considerados como cultivos no seguros (Gao., 2021).

Por su parte, la edición génica ha revolucionado el campo de la obtención de cultivos con mayor variabilidad genética ya que estas técnicas permiten realizar modificaciones puntuales en el genoma de la planta, con lo cual se obtienen las características deseadas en menor tiempo en comparación con las técnicas convencionales de cruce y mutagénesis, y sin la necesidad de insertar material genético exógeno. En términos del producto generado, las plantas editadas son indistinguibles de las plantas obtenidas por mutagénesis al azar, por lo que tiene mayor aceptación dentro de la población (Gao., 2021).

Dos pasos importantes para que el aumento de variabilidad genética en plantas mediante edición genética sea un éxito y que muchas veces pueden representar un cuello de botella en estas estrategias, son los mecanismos de liberación de la herramienta de edición a usar (transformación de la planta) y la regeneración de los tejidos posiblemente transformados y editados. Algunos de los sistemas utilizados para la liberación de las herramientas de edición dentro de las células son el bombardeo de partículas de tungsteno u oro recubiertas con la herramienta de edición (técnica denominada biobalística), la liberación mediante *Agrobacterium tumefaciens* y el uso de nanopartículas magnéticas (MNPs). La principal técnica de regeneración utilizada es el cultivo *in vitro*, que emplea combinaciones de reguladores de crecimiento vegetales y medios suplementados con vitaminas y minerales para permitir su crecimiento y regeneración (Dulam et al., 2020).

#### **1.4.4 Transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens***

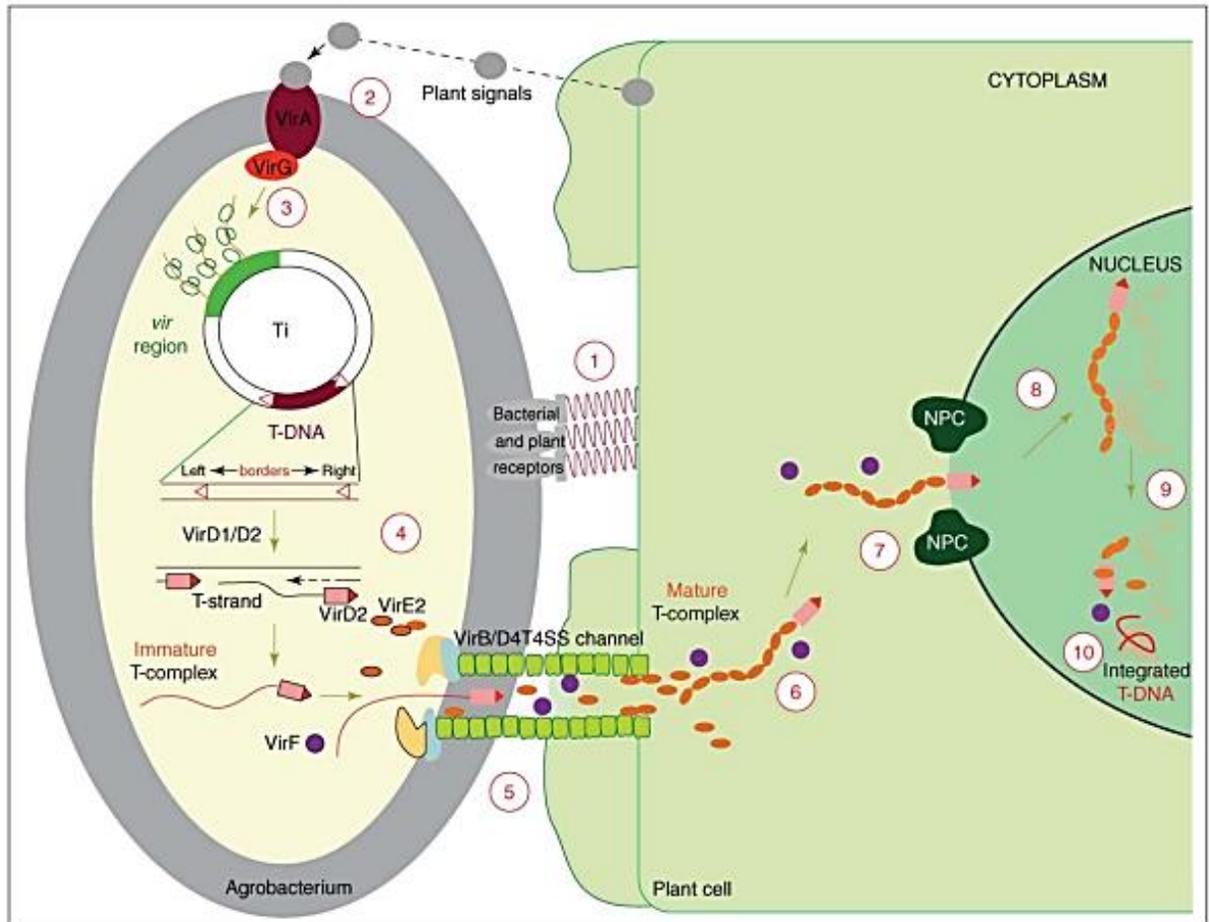
*A. tumefaciens* es una bacteria Gram negativa que posee la capacidad de transferir DNA codificado entre los bordes izquierdo y derecho del plásmido Ti (T-DNA) en

diversas especies de plantas. En la naturaleza, *Agrobacterium* es una bacteria patógena que produce la enfermedad de la agalla de la corona; sin embargo, la biotecnología ha logrado eliminar los genes cuyos productos están asociados a la formación de tumores y síntesis de aminoácidos modificados para aprovechar sus mecanismos de transformación genética de plantas (Citovsky et al., 2006; Madhu et al., 2022).

*Agrobacterium* cuenta con un plásmido inductor de tumores o plásmido Ti, del que transfiere a la planta la fracción T-DNA que posee los oncogenes para formar un tumor. La transferencia de este plásmido se logra gracias a la ayuda de los genes de virulencia o genes vir que, en las cepas modificadas del laboratorio, se encuentran en el genoma bacteriano. Para que la transferencia del T-DNA ocurra, es necesaria la transcripción de los genes vir que codifican para las proteínas VirA/VirG, y que se activan por el reconocimiento de sustancias liberadas en las paredes celulares de plantas dañadas por una herida. Sustancias análogas son la acetosiringona y la  $\alpha$ -hidroxiacetosiringona, que son reconocidas por la bacteria, lo que le permite anclarse a la célula vegetal. Posterior a esto, la bacteria activa el resto de los genes vir para continuar con la síntesis del T-DNA y su posterior transferencia e inserción en el genoma de la planta (**Fig. 10**) (Citovsky et al., 2006).

Este mecanismo de *A. tumefaciens* ha sido adecuado por los científicos para la transferencia de genes de interés. Para esto, los oncogenes del T-DNA son eliminados del plásmido Ti y reemplazados por los genes que se desean transferir. La transformación de explantes, callos o semillas de distintas plantas a través del uso de *A. tumefaciens* es una de las técnicas más empleadas, estimándose que el 85%

de las plantas transgénicas han sido transformadas mediante este método (Citovsky et al., 2006; Madhu et al., 2022).

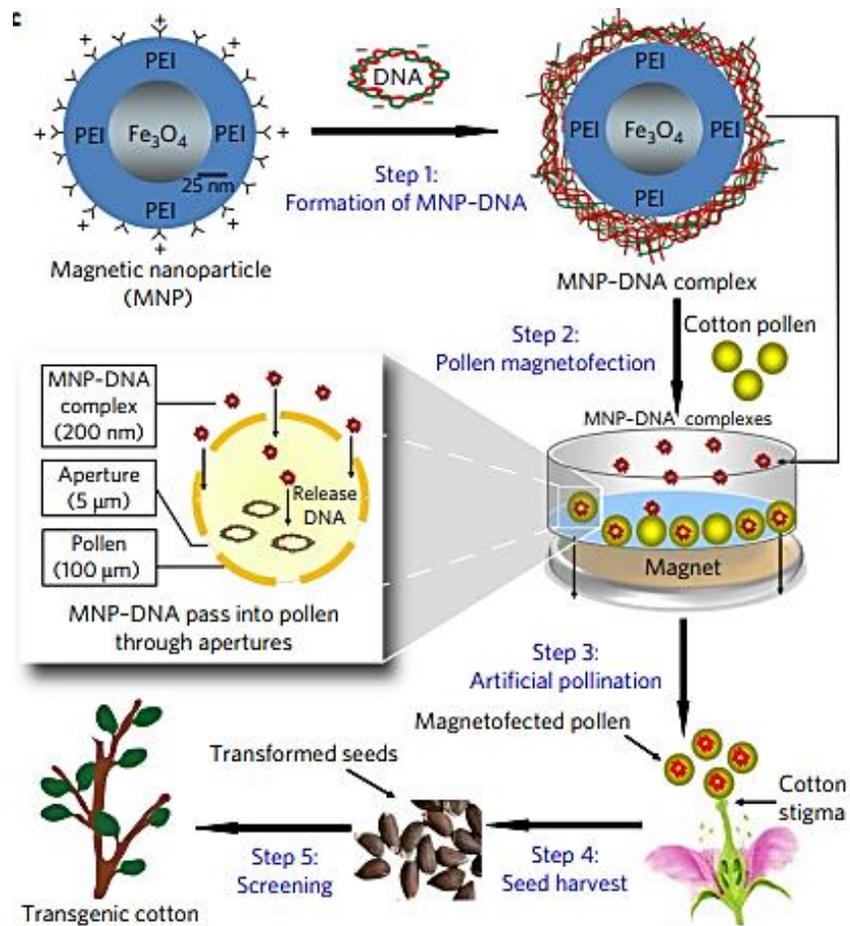


**Figura 10.** Mecanismo de transformación utilizado por *A. tumefaciens*. El proceso se conforma por 10 pasos principales comenzando por el reconocimiento y la unión de la bacteria a la célula huésped (1) y la detección de señales específicas de la planta por las proteínas VirA/VirG de *Agrobacterium* (2). El siguiente paso es la activación de los genes vir (3), la generación de una copia móvil del T-DNA por el complejo proteico VirD1/D2 (4) y la liberación del complejo VirD2-DNA (complejo T-inmaduro), en conjunto con otras proteínas Vir en el citoplasma de la célula huésped (5). Ya en el citoplasma, la proteína VirE2 se une a la hebra de T-DNA para formar el complejo T-DNA maduro (6) el cual viaja por todo el citoplasma y es activamente importado al núcleo de la célula huésped (7). Dentro del núcleo, el T-DNA es reclutado al punto de integración (8) y separado de sus proteínas acompañantes (9) para ser integrado en el genoma de la célula (10). Imagen tomada de Citovsky et al. (2006).

#### 1.4.5 Transformación mediante magnetofección de polen

Una técnica nueva que ha sido reportada para la transformación genética de plantas es la polinización artificial con polen magnetofectado. Esta técnica consiste en utilizar nanopartículas magnéticas (MNPs) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcionalizadas con polietilenimina (PEI) como acarreadoras de los vectores de edición. Estas MNPs, poseen una carga neta positiva que les permite interactuar con partículas de DNA cargadas negativamente a pH neutro y, al aplicar un campo magnético, estas MNPs recubiertas con DNA (complejo MNP-DNA) pueden ser dirigidas al interior de las células. Específicamente para la magnetofección de polen, la técnica se basa en introducir estos complejos MNP-DNA a través de las aperturas de polen al colocar los granos de polen en conjunto con los MNP-DNA en un campo magnético. Una vez obtenido el polen magnetofectado, se utiliza para la polinización artificial de plantas, las cuales producirán frutos cuyas semillas poseerán la edición deseada (**Fig. 11**).

La regeneración *in vitro* de muchas plantas es un proceso difícil y consumidor de tiempo que debe hacerse en condiciones de esterilidad, por lo que técnicas como la magnetofección de polen que evitan dichos procesos de regeneración, son atractivos para la edición genética. Sin embargo, esta técnica aún se encuentra en desarrollo, por lo que existen pocos reportes exitosos hasta el momento. (Xiang et al., 2017; Rui et al., 2019; Conti et al., 2022).



**Figura 11.** Mecanismo de transformación mediante magnetofección de polen. Imagen tomada de Xiang et al. (2017).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Considerando la emergencia sanitaria que representa la propagación del ToBRFV y las devastadoras consecuencias que puede tener su propagación en la economía del país, ya que los cultivos de tomate y chile son dos solanáceas de importancia económica que pueden ser hospederos del virus ToBRFV, es importante buscar nuevas estrategias para obtener genotipos resistentes y así evitar el arraigamiento del virus y su propagación.

## **3. HIPÓTESIS**

Utilizando herramientas bioinformáticas e ingeniería genética, es posible el diseño de una estrategia de edición en *S. lycopersicum* y *C. annuum* que pueda ser utilizada para obtener plantas resistentes contra el tobamovirus ToBRFV.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

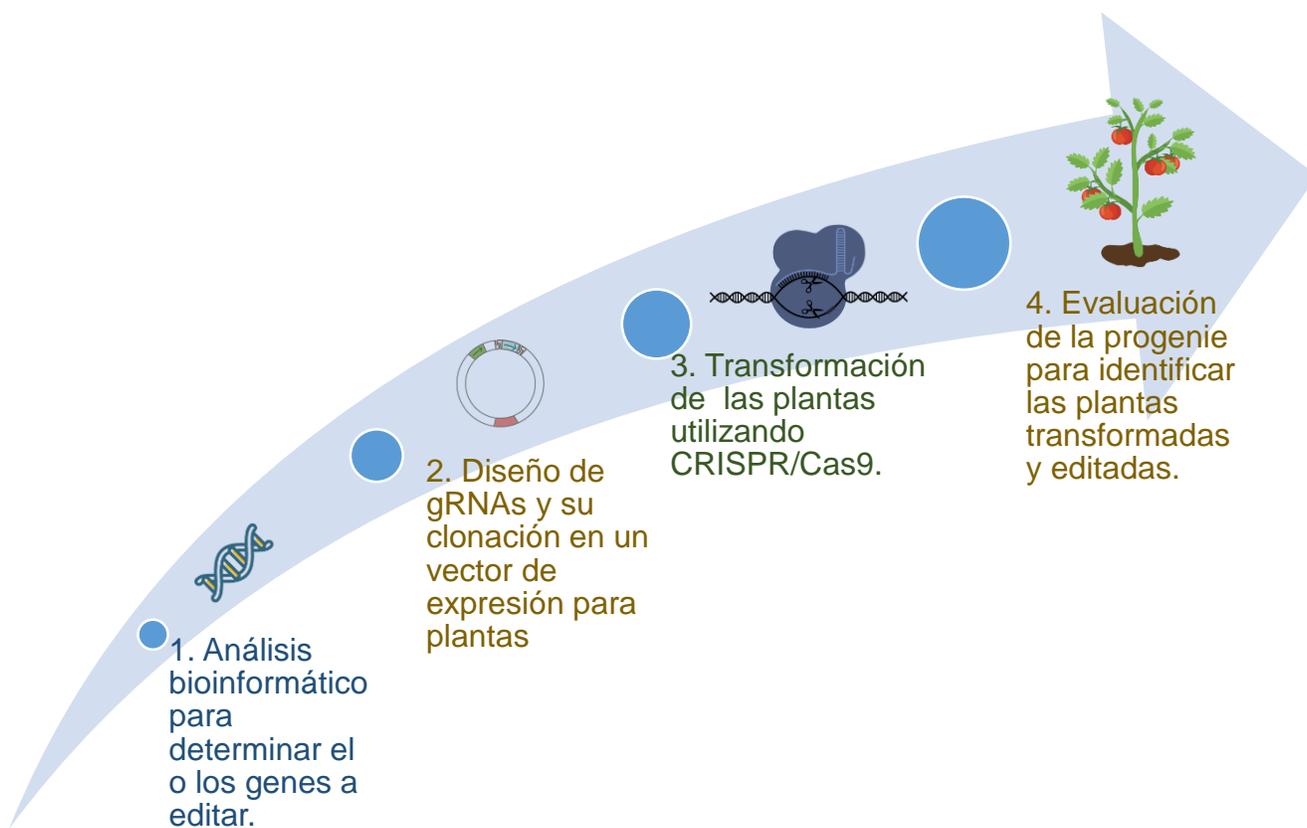
Diseñar una estrategia de edición en *S. lycopersicum* y *C. annuum* que pueda ser utilizada para obtener plantas resistentes contra el tobamovirus ToBRFV.

### 4.2 Objetivos Particulares

- Determinar por herramientas bioinformáticas la presencia de genes candidatos para generar resistencia en *S. lycopersicum* y *C. annuum*.
- Diseñar gRNAs para editar, mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9, a los genes que codifican proteínas con mejor interacción molecular evidenciada.
- Clonar gRNAs en vectores de expresión de planta.
- Transformar genéticamente a explantes de tomate y regenerarlos vía cultivo de tejidos.
- Polinizar plantas de Chile con polen magnetofectado con el vector de edición.
- Analizar la progenie para identificar las plantas transformadas y editadas genéticamente.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental constó de cuatro etapas para poder lograr todos los objetivos planteados (**Fig. 12**). En la primera etapa se llevó a cabo el análisis bioinformático para poder determinar el gen o los genes a editar. En la etapa dos se realizó el diseño de los gRNAs a utilizar para el sistema CRISPR/Cas 9 y su clonación en un vector de expresión para plantas. Para la etapa tres, se llevó a cabo el proceso de transformación de las plantas de interés utilizando la herramienta de CRISPR/Cas 9. Finalmente, en la etapa cuatro se realizó el estudio de las plantas obtenidas para determinar las plantas transformadas y editadas.



**Figura 12.** Estrategia experimental de la investigación.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Análisis bioinformático para la determinación e identificación de los genes a editar

La determinación de genes a editar se hizo con base en la información reportada en la literatura respecto a los genes que han demostrado participar en el ciclo viral de algunos tobamovirus y que pueden ser candidatos para generar resistencia.

Para la identificación de los genes de interés en *S. lycopersicum* se realizó un blastp en los servidores PROTEIN BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) y el Solgenomics/bioblast (<https://solgenomics.net/tools/blast/>) para identificar los genes de interés ortólogos con *A. thaliana*. Para el caso de *C. annuum*, igualmente se desarrolló un blastp en el servidor PROTEIN BLAST del NCBI usando como secuencias query la secuencia de aminoácido perteneciente a *A. thaliana*. Una vez obtenidas las secuencias se realizó un alineamiento en el software MEGA 11 para identificar regiones conservadas. Posteriormente se realizó el modelado molecular de las proteínas candidatas usando los servidores AlphaFold-Colab (<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>) y SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>); así como el refinamiento y validación de las estructuras en los servidores GalaxyWEB (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) y SWISS-MODEL Structure Assessment (<https://swissmodel.expasy.org/assess>) para su uso posterior en la generación de interacciones moleculares entre las proteínas de interés utilizando el servidor HDock SERVER (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>). El análisis

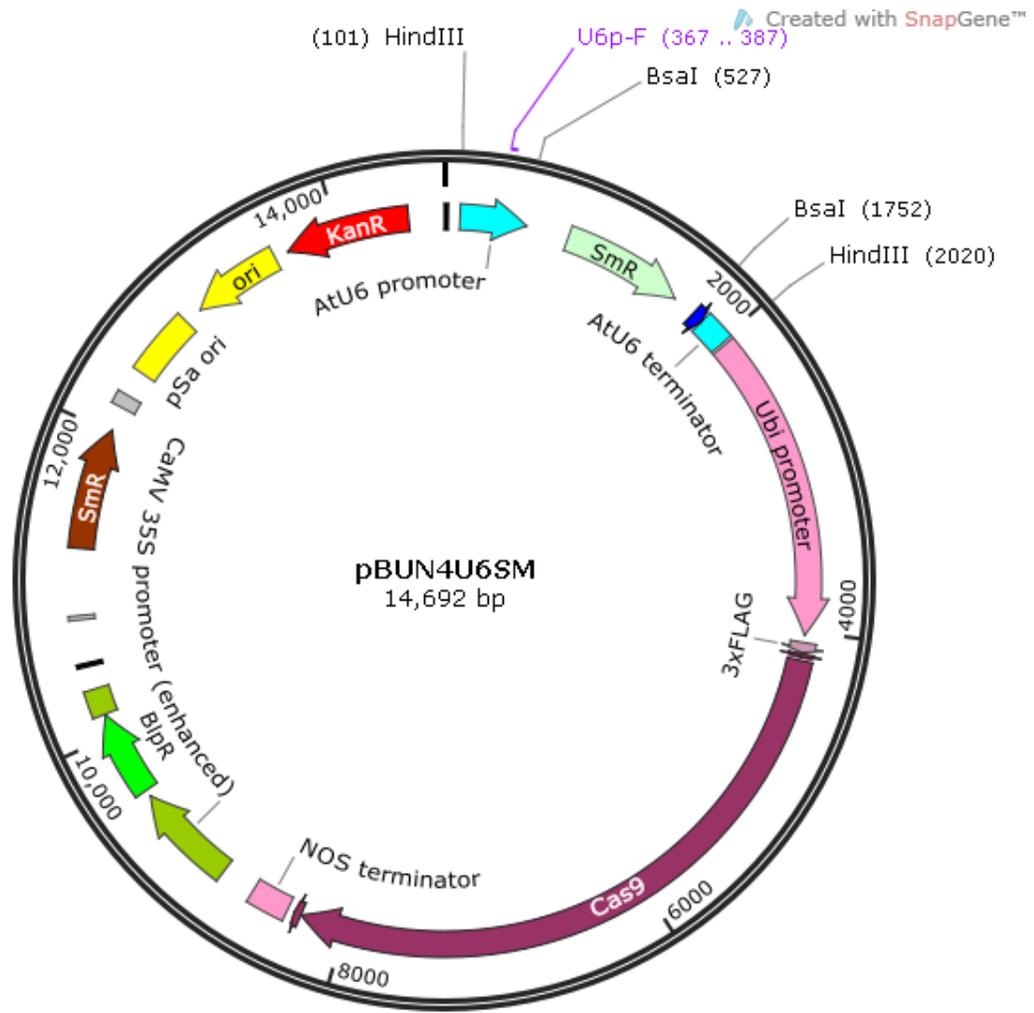
de las interacciones moleculares se realizó utilizando el software LIGPLOT+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/download.html>).

## 6.2 Diseño y evaluación de gRNAs

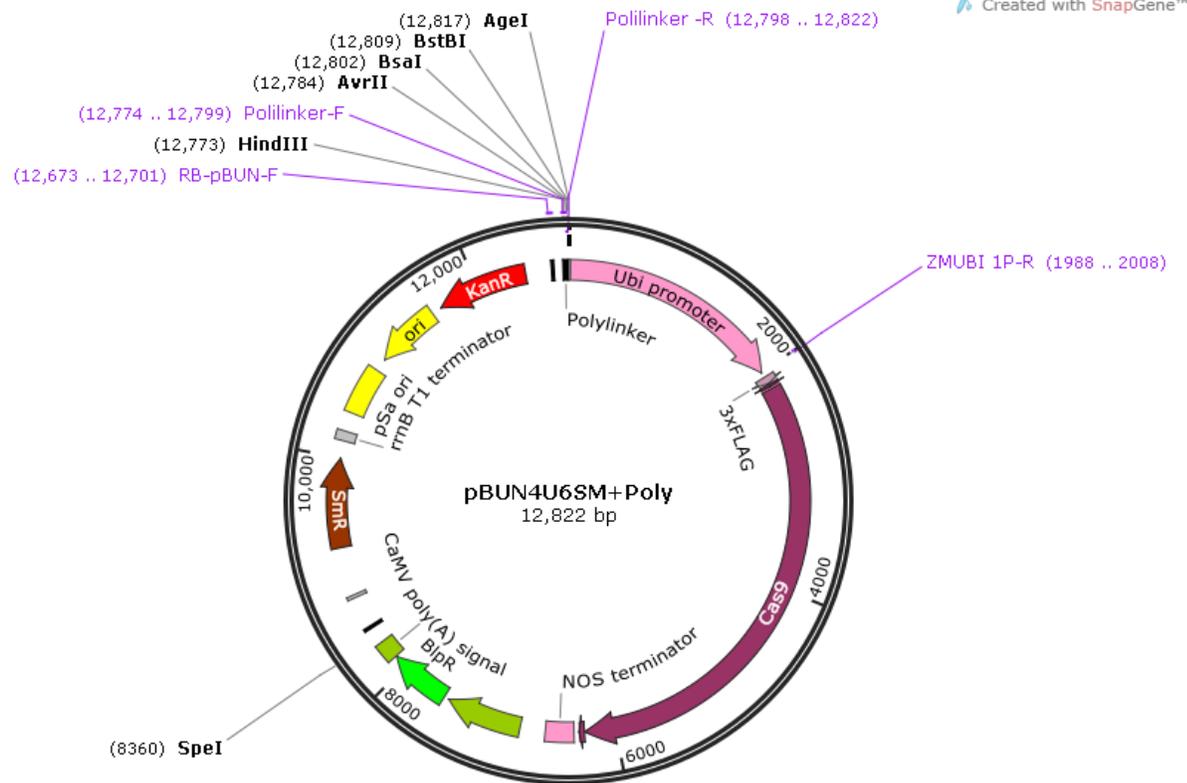
Para el diseño de los gRNAs se hizo uso de los siguientes servidores en línea: CRISPR-P (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>), CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) y Benchling (<https://www.benchling.com/benchling-in-action-group-demo-live-q-and-a>). Los gRNAs elegidos fueron aquellos que se encontraron en secuencias conservadas de los genes, en los aminoácidos más cercanos al N-terminal y aquellos que no presentaron actividad off target en sitios codificantes del genoma. Una vez identificados los gRNAs y verificado que tuvieran una baja capacidad de formar autodímeros mediante el servidor Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), se sintetizaron las secuencias directo y reverso de cada guía con extremos complementarios para sitios de corte con la enzima de restricción Bsal.

## 6.3 Construcción del vector de edición con gRNAs múltiples

El vector utilizado para este trabajo fue el vector pBUN4USM (**Fig. 13**) obtenido por el grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV. El vector fue modificado con la inserción de un polylinker (sitio múltiple de restricción) para facilitar la inserción de varios gRNAs (**Fig. 14**).



**Figura 13.** Mapa del vector pBUN4U6SM.



**Figura 14.** Mapa del vector pBUN4U6SM con el polylinker.

### 6.3.1 Alineamiento de gRNAs y oligonucleótidos del polylinker

Los oligonucleótidos directo y reverso de cada gRNA y del polylinker fueron resuspendidos en agua Milli-Q estéril con la cantidad indicada por el proveedor. Posteriormente se realizó la mezcla de reacción de la **Tabla 1**, y se incubó en el termociclador en las condiciones indicadas en la **Tabla 2**.

**Tabla 1.** Mezcla de reacción para el alineamiento de oligonucleótidos.

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q estéril	14
Primer Directo (100 ng/µl)	4
Primer Reverso (100 ng/µl)	1
Buffer 5X	1
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

**Tabla 2.** Condiciones de termociclador para la alineación de secuencias.

TEMPERATURA (°C )	TIEMPO	°C/sec
94	05:00	3.0
84	00:10	2.0
25	00:10	0.2
16	∞	3.0

Una vez alineados los gRNAs y el polylinker, se confirmó su correcto alineamiento en un gel de agarosa al 5%, utilizando la agarosa Metaphor® Agarose según las indicaciones del proveedor.

### 6.3.2 Clonación de gRNAs y polylinker

Para poder generar el vector de edición con cuatro gRNAs distintos, primero se procedió a insertar el sitio múltiple de restricción (polylinker) en el vector pBUN4U6SM y cada uno de los guías de manera individual en el vector pBUN4U6SM. Para este fin, el vector fue digerido con la enzima HindIII-Hf para la clonación del polylinker y digerido con la enzima BsaI-Hf para la clonación de cada gRNA usando la mezcla de reacción presentada en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para digestión del vector pBUN4SU6M.

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	4 <sup>a</sup>
Buffer CutSmart**	2
Vector (3000ng) <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>
Enzima	1
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

<sup>a</sup> El volumen de agua a utilizar fue el necesario para cumplir con el volumen final de 20 µl.

<sup>b</sup> El volumen de vector a usar dependió de la concentración a la cual se encontraba la muestra.

\*\*El buffer a utilizar dependió de la enzima a usar.

El vector digerido con cada enzima de interés fue purificado del gel de electroforesis utilizando el kit de purificación Gel DNA Recovery de Zymoclean siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el vector digerido con HindIII se recuperó la banda con tamaño de 12,773 pb y para el vector digerido con BsaI la banda con un tamaño de 13,467 pb.

Obtenido el plásmido lineal, se procedió a la ligación del polylinker y de cada gRNA donde se utilizó cada gRNA diluido 1:10. Para el caso del polylinker, se utilizó una proporción vector:inserto de 1:3. La ligación se realizó con el kit de ligación Rapid DNA Ligation Kit de Thermo Fisher Scientific, con la mezcla de reacción indicada en la **Tabla 4**. La reacción se dejó incubando a 28°C durante toda la noche.

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para la ligación vector-inserto.

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
H <sub>2</sub> O	13.1*
Buffer Rapid ligue	4
Vector linealizado (<100 ng)	1.4*
Inserto	1*
Ligasa T4	0.5
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

\*El volumen del vector y del inserto dependió de la concentración que tuvieran las muestras y del tamaño del inserto; el volumen de agua a usar fue el necesario para alcanzar el volumen final.

Posterior a la ligación, se procedió a transformar células de *E. coli* Mach1-T1 con los productos de ligación mediante choque térmico y selección en medio LB con el antibiótico espectinomicina a 50 µg/ml. De las placas obtenidas se seleccionaron tres colonias por cada gRNA para realizar miniprep por lisis alcalina y, posteriormente, la identificación del inserto en las colonias seleccionadas mediante digestión y PCR

punto final. Para la identificación del inserto del polylinker, se siguió la misma metodología, pero analizando un mayor número de colonias.

### **6.3.3 Transformación de células *E.coli* Mach1-T1 por choque térmico**

Para la transformación se utilizaron células quimiocompetentes Mach1-T1 generadas por el personal del laboratorio y almacenadas a -80°C. El procedimiento consistió en colocar los tubos conteniendo las células en hielo y de manera inmediata se les agregó 5µl del vector ligado y se mantuvieron por 30 minutos en hielo. Posterior a este tiempo, las células fueron sometidas al choque térmico por 52 segundos a 42°C sin agitar. Después del choque térmico las células se regresaron al hielo por 2 minutos. Posteriormente, se les agregaron 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente y se llevaron a incubar por 1 hora a 37°C en agitación constante de 225 rpm. Pasada esta incubación, las células fueron plaqueadas en medio LB con espectinomicina a 50 µg/ml para su selección. Las placas se dejaron incubando durante toda la noche a 37°C.

## **6.4 Identificación de colonias con el vector clonado con gRNA o polylinker**

Para la identificación de las colonias correctamente transformadas con el vector con los gRNAs o el polylinker, se realizó la extracción del plásmido mediante el método de lisis alcalina (miniprep) y posterior corroboración por digestión, PCR punto final y secuenciación.

### **6.4.1 Miniprep por lisis alcalina**

Para la recuperación del plásmido, primero se seleccionaron las colonias de interés y se inocularon en 5ml de medio líquido LB con espectinomicina, dejándolas crecer en

agitación a 37°C. Las células fueron recuperadas mediante la centrifugación del cultivo a 14,800 rpm por 5 minutos a 4°C descartando el sobrenadante hasta centrifugar los 5 ml. Posteriormente, la pastilla celular fue resuspendida agregando 250 µl de Solución I (Tris HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, con RNasa A (100 µg/ml adicionada al momento) y mezclando en vórtex. A continuación, se adicionaron 250 µl de la Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1% preparada al momento de usarse), se mezcló suavemente por inversión y se dejó reposando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó 300 µl de Solución III (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial 11.5%, pH 4.5) mezclando en vórtex y llevando a centrifugar por 5 minutos a 14,800 rpm a 4°C. La fase acuosa fue transferida a otro tubo, se añadió 560 µl de isopropanol y se mezcló por inversión 6-8 veces. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a 4°C. Luego el sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó con 500 µl de etanol frío grado biología molecular al 70%, para posteriormente centrifugar por 2 minutos a 14,800 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado. Después se retiró el exceso de etanol y se incubó la pastilla por 10 minutos a 55°C para secar el exceso de alcohol y poder agregar 30 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril. Se estimó la concentración final del plásmido mediante el espectrofotómetro Nanodrop.

#### **6.4.2 Corroboración del inserto mediante digestión con enzimas de restricción**

La ligación correcta de cada gRNA se corroboró mediante una digestión con la enzima HindIII. La digestión se dejó incubando toda la noche y se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0.7% para separar por tamaño el DNA plasmídico e identificar el fragmento liberado de 718 pb. Para analizar el inserto del polylinker,

se realizaron digestiones dobles utilizando la enzima SpeI con tres de las enzimas presentes en el polylinker (HindIII, BsaI y BstBI). La digestión fue analizada en un gel de agarosa al 0.7% para identificar el fragmento esperado de 4,449 pb. La mezcla de reacción para cada digestión se llevó a cabo de acuerdo con la descripción en la **Tabla 3**.

#### **6.4.3 Corroboración del inserto mediante PCR punto final**

Para la PCR de corroboración se utilizaron los primers indicados en la **Tabla 5** y la mezcla y condiciones indicadas en las **Tablas 6** y **7**. Para la corroboración de la clonación de los gRNAs se utilizó el oligonucleótido U6promoter-FW (primer directo) y cada oligonucleótido gRNA-RV como primer reverso. El fragmento amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 2% esperando observar un fragmento de 185 pb. Para el caso del polylinker, se realizaron dos PCR utilizando el oligonucleótido RB-PBUN-FW como primer directo en ambas reacciones y los oligonucleótidos Poly-FW y Poly-RV (fragmento amplificado en cada reacción de 150 pb) y una PCR final usando como primer reverso el oligonucleótido ZMUBI-1P -RV y como directo el oligonucleótido Poly-RV (fragmento amplificado en esta reacción sería de 2,057 pb). Para todas las PCR de corroboración de insertos se calculó la temperatura media de alineamiento ( $T_m$ ) de los oligos en 50°C.

**Tabla 5.** Primers utilizados para la corroboración de gRNAs y polylinker por PCR.

NOMBRE	SECUENCIA 5' - 3'
<b>Para gRNAs</b>	
U6promoter -FW	CCTGGGAATCTGAAAGAAGAG
gRNA 1sl -RV	AAACTCGAAGCCAATTGAGAAAAG
gRNA 2sl -RV	AAACCCAAGGTCCCACAATTTTAT
gRNA 3sl -RV	AAACCCAAGGTCCCACAATTTTAT
gRNA 4sl -RV	AAACCCAAGATCCCAGAGTTTTAT
gRNA 1ca -RV	AAACATCAAAGAAAGCTCCATTTTC
gRNA 2ca -RV	AAACATCAATGAAAGCTCCATTTTC
gRNA 3ca -RV	AAACACCAGCGAAAGTTCCATTTTC
<b>Polylinker</b>	
RB-PBUN -FW	GTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACA
Poly -FW	AGCTTAAGTTCCTAGGACGCGTGGT
Poly -RV	AGTACCGGTTGGTTCGAACGTATA
ZMUBI-1P -RV	CTGCAGAAGTAACACCAAACA

**Tabla 6.** Mezcla de reacción para PCR punto final.

REACTIVO	VOLUMEN ( $\mu$ L) 1X
H <sub>2</sub> O Milli-Q estéril	8.76
Buffer (-Mg <sup>+2</sup> ) 10X	1.25
Mg <sup>+2</sup> (50 Mm)	0.38
dNTPs (10 $\mu$ M)	0.31
Primer Directo (10 $\mu$ M)	0.375
Primer Reverso (10 $\mu$ M)	0.375
Taq platinum	0.05
DNA (20-30 ng/ $\mu$ L)	1.00
<b>Volumen final</b>	<b>12.5</b>

**Tabla 7.** Condiciones del termociclador para PCR punto final.

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Desnaturalización inicial	94	03:00
Desnaturalización	94	00:30
Alineamiento (T <sub>m</sub> )*	50-68	00:30
Extensión	72	1kb/min
Extensión final	72	05:00
Enfriamiento	16	$\infty$

\*La temperatura de alineamiento depende de la T<sub>m</sub> de los primers a utilizar y debe ser estandarizada para cada PCR.

#### **6.4.4 Corroboración por secuenciación.**

Los plásmidos que resultaron con una digestión y amplificación correcta fueron preparados para enviar a secuenciar a la empresa MacroGen (Korea) donde se realizó su secuenciación tipo Sanger. La preparación de plásmidos para su secuenciación se utilizó el Kit Zymo Gene de Zymoclean agregando 4 µl de RNasa A al colocar la solución III. Las muestras recuperadas se diluyeron a una concentración de 100 ng/µl y de esta dilución se enviaron 10µl para la secuenciación.

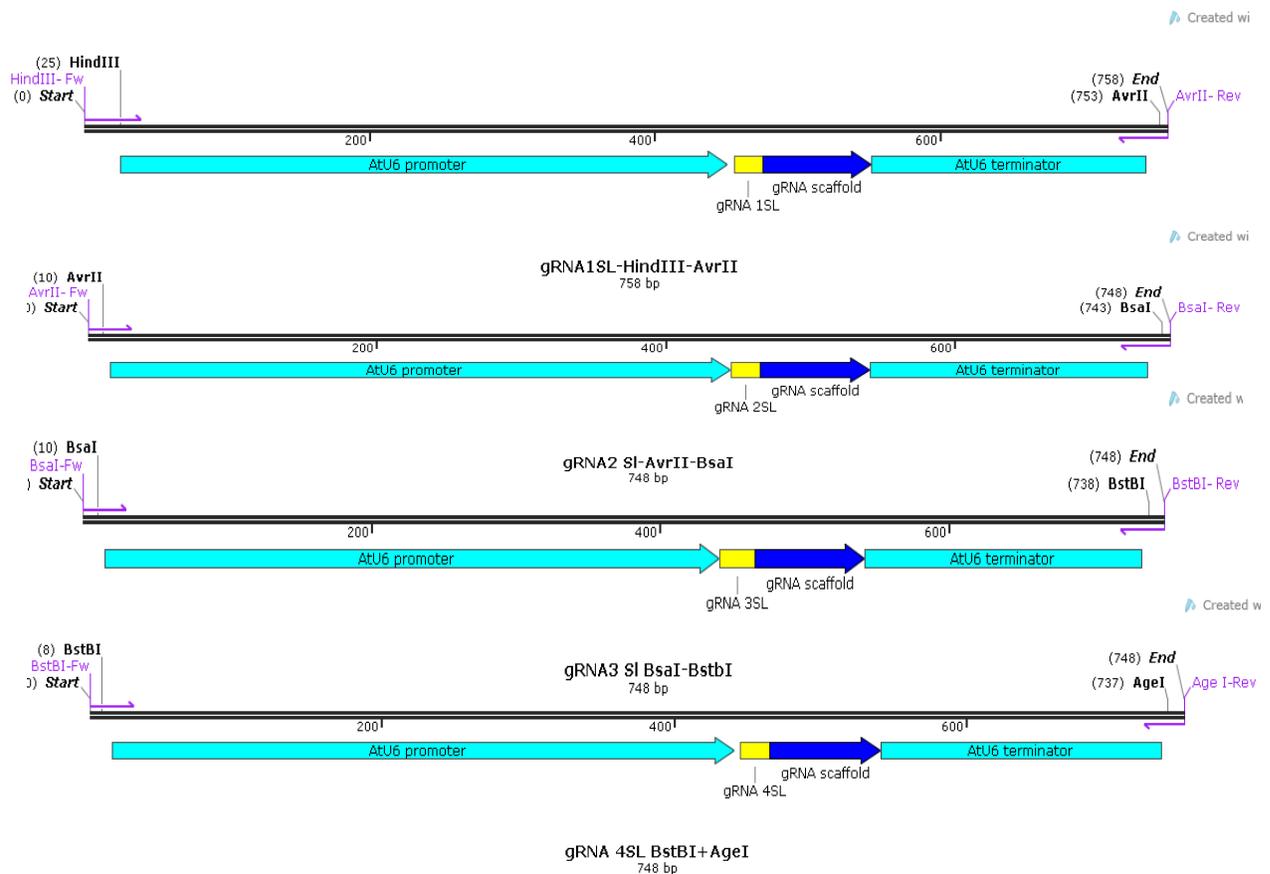
### **6.5 Ensamblaje de múltiples gRNA en el vector pBUN4U6SM + Poly**

#### **6.5.1 Reamplificación del casete de gRNA mediante PCR punto final**

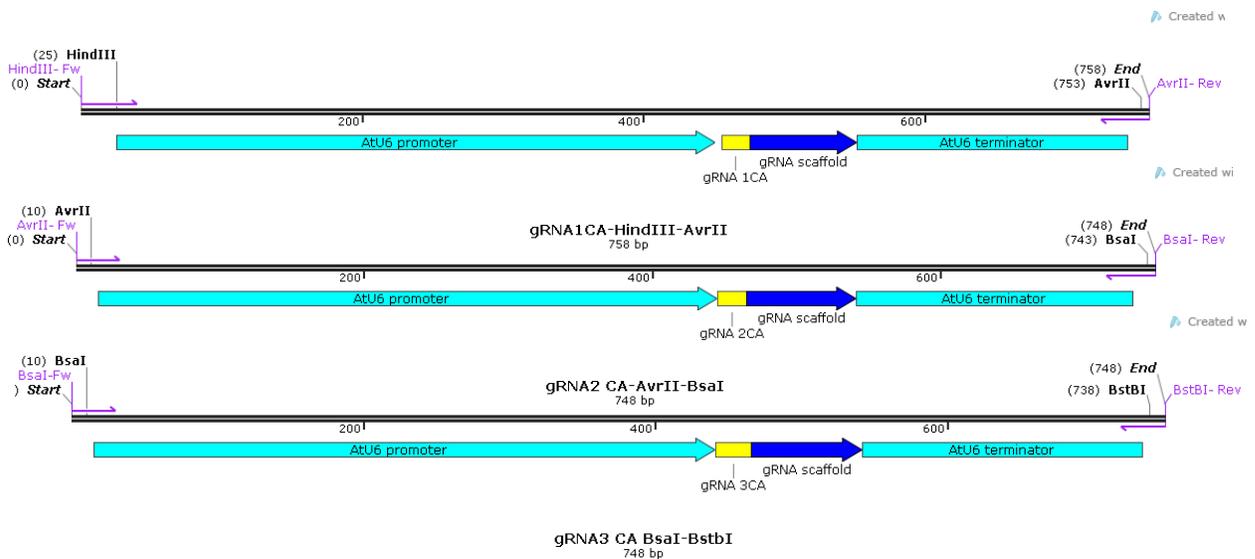
El primer paso para el ensamble de múltiples gRNAs en el vector pBUN4U6SM + Poly fue realizar la reamplificación de cada casete de gRNA mediante PCR punto final utilizando la mezcla de reacción y condiciones de termociclador especificadas en las **Tablas 6 y 7** y una T<sub>m</sub> de 58°C. Para esto, se hizo uso de primers específicos (**Tabla 8**) los cuales insertaron sitios de restricción para las enzimas HindIII, AvrII, BsaI, BstBI y Age I. Para cada fragmento se insertó un sitio de corte para enzimas diferentes tal como se muestra en la **Fig. 15 y 16**. Los fragmentos reamplificados, los cuales fueron de un tamaño de 748pb y 758pb, fueron purificados del gel de agarosa al 1.5% a través del kit de purificación comercial Gel DNA Recovery de Zymoclean siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 8.** Primers utilizados en la reamplificación de los casetes de gRNA.

NOMBRE	SECUENCIA 5' - 3'
HindIII XI-Fw	AAGCTAAGCTCACGTGACGGAATTAAGCTTCGACTTGCCT
AvrII-Fw	GCTACAGGTCCTAGGAGCTTCGACTGCCT
AvrII-Rv	CCTAGGACCTGTAGCTATTGGTTTATCTCA
BsaI-Fw	GTAGGTCTCTATACGAGCTTCGACTTCCT
BsaI-Rv	CGTATAGAGACCTACTATTGGTTTATCTCA
BstBI-Fw	GTCGCCTTCGAATCCAGCTTCGACTTGCC
BstBI-Rv	CAGCGGTTTCGAATGGTATTGGTTTATCTC
AgeI-Rv	CAGCGGACCGGTTGGTATTGGTTTATCTCA



**Figura 15.** Posición de los primers utilizados para la reamplificación de los casetes de gRNA para el vector a usar en tomate.



**Figura 16.** Posición de los primers utilizados para la reamplificación de los casetes de gRNA para el vector a usar en Chile.

### 6.5.2 Digestión de los casetes reamplificados para producir extremos cohesivos

A cada uno de los fragmentos amplificados por PCR y purificados del gel de agarosa se les realizó una doble digestión con las enzimas HindIII-AvrII, AvrII-BsaI, BsaI-BstBI y BstBI-AgeI de acuerdo con los sitios de restricción insertados en cada fragmento. Se utilizaron 0.25µl de cada enzima y toda la muestra de los insertos reamplificados. La digestión se corroboró a través de un gel de agarosa al 1.5% en el cual se cargó toda la muestra de la reacción de digestión y, posteriormente, estas bandas fueron recuperadas mediante purificación del gel de agarosa.

### 6.5.3 Ligación de los fragmentos en el vector pBUN4U6SM + Poly

Los fragmentos recuperados de la digestión se utilizaron para ligar en el vector con el polylinker. Para el vector a emplear en tomate se realizó una ligación múltiple de acuerdo con lo indicado en la **Tabla 9**, en donde el vector pBUN4U6SM +Poly se

digirió con las enzimas HindIII y AgeI y la banda de mayor tamaño obtenida de esta digestión se purificó del gel de agarosa y se utilizó en la ligación. La proporción utilizada vector: inserto para cada fragmento fue de 1:3.

**Tabla 9.** Mezcla de reacción para la ligación múltiple del vector a usar en tomate.

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
H <sub>2</sub> O	10.93
Buffer Rapid ligue	4
Vector linealizado (91.56 ng)	1.2
gRNA1 (16.20ng)	0.70
gRNA2 (16.20ng)	0.53
gRNA3 (16.20ng)	0.64
gRNA4 (16.20ng)	1.0
Ligasa T4	1
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

Para el caso del vector a utilizar en Chile las ligaciones de cada casete de gRNA se realizaron de uno en uno; es decir, primero se digirió el vector con las enzimas HindIII y AvrII y se ligó el fragmento correspondiente al gRNA1; posteriormente el vector ya ligado con el gRNA1 se digirió con las enzimas AvrII-BsaI y se ligó el fragmento del gRNA2; finalmente, el vector que contenía los gRNA 1 y 2 se digirió con las enzimas BsaI-BstBI y se ligó con el cassette del gRNA3. Todas las ligaciones se realizaron con una proporción vector: inserto de 1:3 y de acuerdo con lo indicado en la **Tabla 4**. Después de cada clonación se transformaron bacterias de *E. coli* Mach1 T-1 para extracción de DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina.

#### 6.5.4 Corroboración de los insertos por digestiones enzimáticas

Para corroborar la correcta clonación de cada casete de gRNA en los vectores se hicieron digestiones, en primer lugar, con las enzimas HindIII-AgeI y, posteriormente, dobles digestiones con las enzimas AgeI-BstBI, BstBI-BsaI y BsaI-HindIII. Todas las

digestiones se realizaron de acuerdo con lo indicado en la **Tabla 3**. El resultado de las digestiones fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

### 6.5.5 Corroboración de los insertos por secuenciación

De las colonias que resultaron positivas a la corroboración por digestión, fueron seleccionadas dos colonias (una colonia del vector de tomate y una del vector de chile) para enviar a secuenciar a la empresa Macrogen de acuerdo con lo indicado en el inciso **6.4.4**. Para esta secuenciación se utilizaron primers específicos que permitieron la secuenciación completa del casete de gRNAs en cada vector (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Primers utilizados en la secuenciación del casete de gRNAs en cada vector

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA 5' - 3'</b>
Agel-Fw	GAATTAAGCTACCGGTTGG
BstBI-Fw	AGCTGGATT CGAATGGTAT
BsaI-Fw	CTCGTATAGAGACCTACT
AvrII-Fw	GCTCCTAGGACCTGTAGCT

## 6.6 Transformación genética de tomate

### 6.6.1 Desinfección de semillas

La desinfección de semillas se realizó en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar. Para este fin, se colocaron 100 semillas en un frasco estéril y se les agregó etanol al 70% (lo necesario para cubrir todas las semillas) y se mantuvieron en agitación suave por un minuto. Posteriormente, se decantó el etanol y se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 15% y se mantuvieron en agitación suave por 15 minutos. Terminado este tiempo, se decantó la solución de hipoclorito de sodio y se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril para eliminar el exceso de

hipoclorito de sodio. Después de los enjuagues, las semillas fueron colocadas en toallas estériles para secar el exceso de humedad y se colocaron 10 semillas en cada recipiente de cultivo magenta con medio de germinación (**Anexo 1**). Los recipientes o magentas de cultivo *in vitro* fueron colocados en incubación a 25°C por diez días en oscuridad para la germinación de las semillas y por 4-5 días en fotoperiodo de 16 horas luz para obtener la formación de pigmentos fotosintéticos.

### **6.6.2 Transformación de *Agrobacterium* por electroporación y su acondicionamiento en medio de infección**

Se realizó la transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GL1. Para este fin, el plásmido de edición se utilizó a una concentración de 100 ng/μl y las celdas de electroporación de 1 mm de espacio entre los electrodos, fueron esterilizadas y colocadas en hielo previo a la transformación. Las células electrocompetentes fueron retiradas del ultra congelador y colocadas en hielo donde se les agregó 2μl del plásmido. Después se tomó el volumen de células competentes y se colocaron en el electroporador para recibir un pulso electrochoque a 1800 volts. Inmediatamente después se colocaron 250μL de medio SOC en la celda y se mezcló con las células suavemente, para luego pasar todo el contenido de la celda a un microtubo. Posteriormente, las células se incubaron por dos horas a 28°C a 150 rpm. Transcurrido este tiempo, las células se plaquearon en cajas de medio LB agar con espectinomicina, kanamicina y carbenicilina a 20 μg/ml cada uno, colocándose 50 μl en una placa y en otra 5μl de las células más 45μl de medio SOC; las placas fueron incubadas a 28°C por dos días. La transformación de estas células se corroboró mediante extracción del plásmido, el cual se usó en una posterior transformación de

bacterias *E. coli* Mach1-T1 para extracción de DNA plasmídico y corroboración mediante una doble digestión enzimática con las enzimas AgeI-HindIII.

Para el proceso de infección del material vegetal, se inocularon (24 horas previo a su uso) 50ml de medio LB líquido con triple antibiótico (espectinomicina, kanamicina y carbenicilina) con las células de *Agrobacterium* conteniendo el vector recombinante de interés. Se corroboró la absorbancia del cultivo en un espectrofotómetro (la cual debía ser de 0.8 -1 a 600 nm) y, una vez obtenida la absorbancia dentro del rango esperado, la biomasa se recuperó por centrifugación a 3500 rpm por diez minutos y resuspendió en medio de infección (**Anexo 1**). Las bacterias se dejaron incubando en el medio de infección a 28°C a 150 rpm al menos 30 minutos antes de ser utilizadas para infectar los explantes vegetales.

### **6.6.3 Obtención de explantes e infección con *Agrobacterium***

La obtención de explantes se realizó en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar. Para este fin, a las plantas con pigmentos fotosintéticos se les disectó la raíz y los cotiledones para emplear el hipocotilo. Del hipocotilo se hicieron cortes de un tamaño aproximado de 0.5 – 1cm. Una vez obtenidos los explantes, se colocaron en el medio de infección con *Agrobacterium* previamente preparado e inducido y se colocaron en incubación a 28°C a 90 rpm por 30-45 minutos. Después de este tiempo, los explantes fueron recuperados del medio de infección y colocados en toallas estériles para eliminar el exceso del medio de infección. Posteriormente, los explantes se colocaron en medio de co-cultivo (**Anexo 1**) y se dejaron incubando en oscuridad durante tres días a 25°C.

#### **6.6.4 Regeneración de explantes**

Transcurrido el periodo de tres días en el medio de co-cultivo, los explantes fueron lavados con agua destilada estéril cinco veces y una vez con el medio de lavado con antibiótico (**Anexo 1**) para posteriormente ser colocados en medio de regeneración conteniendo antibiótico meropenem a 100 ug/ml para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* (**Anexo 1**). Esta incubación se realizó por 25-30 días a 25°C con periodos de luz de 16 horas para la regeneración de los explantes. Después de este tiempo, los explantes vigorosos y con brotes se transplantaron a medio SRM con presión de selección (**Anexo 1**), donde permanecieron a 25°C con periodos de luz de 16 horas hasta tener el crecimiento suficiente para ser cambiados a medio de enraizamiento.

#### **6.6.5 Enraizamiento y aclimatación en invernadero**

Las plantas que mostraban regeneración y un tamaño adecuado fueron transplantadas a medio de enraizamiento (**Anexo 1**) y se mantuvieron en él hasta la obtención de raíces y un mayor crecimiento de la planta. Posteriormente, fueron transplantadas en macetas con turba estéril y cubiertas con un plástico, manteniéndose en incubación a 25°C con periodos de luz de 16 horas por 15 días. Después de este periodo, las plantas fueron llevadas al invernadero donde se mantuvieron en observación y se regaron cada tercer día.

#### **6.6.6 Extracción de DNA genómico vegetal con CTAB**

Para la extracción de DNA genómico, primero se precalentó el buffer de lisis CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, CTAB 2%, PVP 4000

1%) a 65°C y aparte, se enfrió a -20°C la base para tubos de 2 ml del equipo de trituración de tejido TissueLyser (Eppendorf). Posteriormente, se colectaron 100 mg de tejido foliar finamente picado en un tubo de 2 ml, se añadió un balín de acero inoxidable estéril y se congeló el tubo en nitrógeno líquido. Los tubos se colocaron en la base del TissueLyser para pulverizarse durante 2 min a una velocidad de 50-s. Posteriormente, se retiró el balín de cada tubo e inmediatamente se añadió a cada tubo 600 µL de CTAB y se incubó a 60°C a 300 rpm por 20 min y, posteriormente, en hielo por 5 min. Se agregó un volumen de fenol saturado: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló vigorosamente en vórtex. Posteriormente se centrifugó a 16000 g durante 10 min a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, evitando colectar la interfase.

A esta fase acuosa se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 16000 g durante 4 min a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, evitando colectar la interfase que contiene proteínas. Después se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol frío, se mezcló y centrifugó a 16000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la pastilla se lavó con 500 µL de etanol frío al 70%. Se centrifugó a 16000 g durante 4 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Este lavado se repitió tres veces. Culminados los lavados con etanol, los tubos destapados se colocaron a 50-55°C durante 10-15 min o hasta que la pastilla estuviera seca completamente. La pastilla se resuspendió en 30 µL de agua Milli-Q estéril y se agregaron 1.5 µL de RNasa A. Finalmente se cuantificó la concentración de DNA en el equipo Nanodrop y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **6.6.7 Identificación de las plantas transformadas mediante PCR punto final**

Para la PCR de identificación de plantas transformadas, se utilizaron los primers U6promoter-FW y gRNA 1SI-RV indicados en la **Tabla 5**. Las condiciones del termociclador empleadas fueron las indicadas en la **Tabla 6** utilizando una  $T_m$  de 60°C y un tiempo de extensión de 19 s. La banda amplificada por PCR fue confirmada en un gel de agarosa al 2%.

### **6.6.8 Determinación de la $DL_{50}$ para el glufosinato de amonio en tomate**

Para determinar la dosis letal a la que se muere el 50% de las plantas o  $DL_{50}$  se realizaron dos experimentos diferentes. En el primer experimento, se puso a germinar 10 semillas estériles en cinco magentas con concentraciones diferentes de glufosinato de amonio (0, 0.5, 5, 10 y 15 mg/L) siguiendo el procedimiento mencionado en el apartado **6.6.1**. Una vez transcurrido el tiempo de germinación, se contaron el total de semillas germinadas y no germinadas y estos datos se utilizaron para realizar un análisis Probit para determinar la  $DL_{50}$ .

En el segundo experimento se utilizaron explantes expuestos al procedimiento de transformación, pero omitiendo el uso de *A. tumefaciens* en el medio de infección. En este caso, los explantes fueron trasplantados del medio de cocultivo a cajas magentas con medio SRM preparado con distintas concentraciones de glufosinato de amonio (0, 0.5, 5, 10 y 15 mg/L). Se colocaron tres cajas magentas por cada concentración de glufosinato con 19 explantes cada una y estas fueron observadas y fotografiadas cada semana hasta alcanzar las tres semanas en este medio. Finalmente, se midió el ancho y largo de cada explante a las tres semanas y los datos obtenidos se utilizaron para realizar un gráfico de barras comparando la

diferencia en los tamaños de los explantes al ser expuestos a las distintas concentraciones de glufosinato.

## **6.7 Transformación genética de Chile**

### **6.7.1 Germinación de semillas y su mantenimiento en invernadero para producción de polen**

Para la germinación de semillas, se colocaron 50-60 semillas en un recipiente con algodón humedecido y cubierto con papel craft en incubación a 28°C hasta que la mayoría de las semillas germinaron (7-10 días). Una vez germinadas, se colocaron en un recipiente más grande con algodón humedecido y en periodos de luz de 16 horas para la obtención de pigmentos fotosintéticos por siete días más con riego cada tres días. Transcurrido ese tiempo, las plantas fueron colocadas en macetas con tierra humedecida durante las primeras horas del día. Posteriormente el cuidado consistió en regar cada tres días las plantas con agua moderada hasta la producción de flores para la recolección de polen.

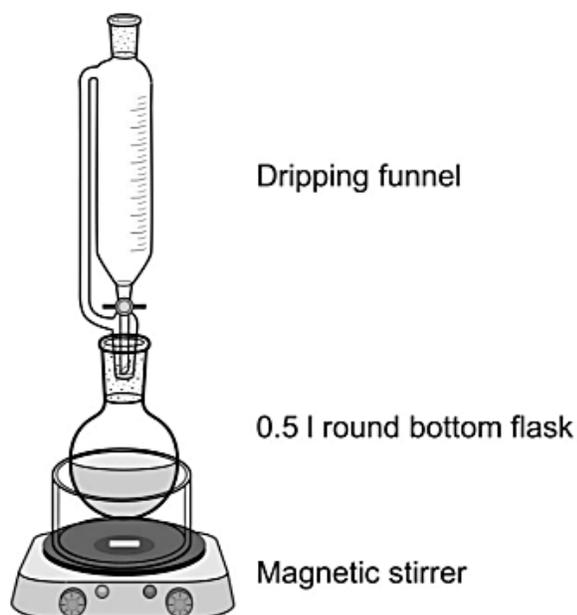
### **6.7.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas (MNPs)**

Para la síntesis de las nanopartículas, en primer lugar, se desgasificaron 100 ml de NaOH 2M con un sistema de filtrado al vacío, manteniendo el vacío durante 1 h y la solución en agitación magnética constante. Una vez desgasificada la solución, se preparó el sistema compuesto por un matraz de fondo redondo, un embudo de gotero, el baño María y un agitador magnético de acuerdo con la **Fig. 17**. La solución de NaOH 2M desgasificada fue colocada en el matraz de recolección de fondo redondo y en el embudo de gotero se colocó la solución de Fe<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub> (3.24g de FeCl<sub>3</sub> y 2g de FeCl<sub>2</sub> disueltos en 60ml de HCl 0.1M). La solución de NaOH 2M se calentó a

80-85°C y una vez alcanzada esta temperatura, se añadió gota a gota los 60 ml de la solución de  $\text{Fe}_2/\text{Fe}_3$  mientras se agitaba constantemente a 600 rpm.

Una vez añadida por completo la solución de  $\text{Fe}_2/\text{Fe}_3$ , se añadieron a la mezcla 10 ml de solución de amoníaco al 25% y se dejó agitando durante 30 minutos.

Posteriormente, la solución se dejó enfriar y se transfirió a tubos falcón de 50 ml. La solución se dejó sedimentando mediante el uso de un magneto y el sobrenadante fue desechado. Una vez obtenido el sedimento, se resuspendió en ddH<sub>2</sub>O estéril y se volvió a sedimentar magnéticamente la mezcla desechando de nuevo el sobrenadante. Se realizó un lavado extra con ddH<sub>2</sub>O y posteriormente dos lavados más con metanol (o hasta alcanzar un pH neutro). La MNPs se dejaron secando en estufa a 56°C durante toda la noche para su posterior uso.



**Figura 17.** Sistema utilizado para la síntesis de las MNPs. Imagen tomada de (Oberacker, 2019).

### **6.7.3 Funcionalización del PEI a las MNPs**

Para la funcionalización o recubrimiento de las MNPs con PEI (polietilenimina) primero se disolvió 1.45 ml de PEI en 150 ml de tolueno (agitación de 600-800 rpm). Una vez disuelto por completo el PEI, se le adiciono 33.12 $\mu$ l de EPO (3-(2 3-epoxipropoxi)-propil-trimetoxisilano) y se mantuvo en agitación durante 24h a 80°C en condiciones de reflujo. Posterior al tiempo de reacción, se adicionaron 2.5 g de las MNPs sintetizadas (ya secas) y 25 ml de etanol; la solución se dejó en agitación a 80°C durante 24 h. Finalmente las MNPs-PEI fueron recuperadas mediante separación magnética y lavadas 3 veces con etanol y 3 veces con una solución de agua-etanol (1:1 v/v) para eliminar los reactantes y subproductos de la reacción. Después de los lavados, las MNPs se dejaron secando a 40°C por 48 h.

### **6.7.4 Caracterización y corroboración del funcionamiento de las nanopartículas**

#### **6.7.4.1 Caracterización de las MNPs con difracción de rayos X para polvos (DRXP)**

La difracción de la muestra se realizó en un difractómetro de rayos X de polvos D2 Phaser marca Bruker con fuente de radiación de CuKA ( $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$ ) con un voltaje de aceleración de 30 kV y una corriente de 100 mA. La muestra se preparó para el estudio colocando el sólido en un portamuestras de vidrio para DRXP y presionándola para formar una capa delgada y homogénea. La muestra se midió en el intervalo de  $2\theta$  de 5–60° con una velocidad de escaneo de 0.091°  $2\theta$ /s. Los datos se analizaron utilizando el software OriginPro versión 8E, en donde se compararon los patrones de difracción de las MNPs ya reportadas y de las MNPs sintetizadas.

#### **6.7.4.2 Caracterización de las MNPs con microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Para la visualización de las MNPs y las MNPs-DNA en el microscopio electrónico de transmisión se realizó una tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2% pH 6. Para esto, se colocaron 5  $\mu$ l de la muestra en la lámina porta muestra y se dejó 2 min. Culminado este tiempo, se secó el excedente de muestra con una sanita y se agregaron 5  $\mu$ l de ácido fosfotúngstico. Se dejó reposar 2 minutos y se secó el exceso de ácido. Se observaron las muestras en el microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM-1400.

#### **6.7.4.3 Caracterización del polen con microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La muestra de polen fue recolectada por la mañana en un microtubo de 2ml e inmediatamente se llevó al laboratorio para comenzar el tratamiento de fijación para ser observada en el microscopio electrónico de barrido. Para la fijación de la muestra, se agregó glutaraldehído al 2.5% y PBS 0.1M pH 7.4 en una proporción 1:10, se mezcló y la muestra se colocó en portaobjetos de un tamaño de 1x1 cm. Las muestras colocadas en los portaobjetos se dejaron en agitación suave por una hora. Al terminar este tiempo, se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno y sin agitación. Después se realizó una posfijación con tetraóxido de osmio al 1% en PBS en una proporción 1:1 y se dejó en agitación suave por una hora. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno. Se continuó con la deshidratación de la muestra utilizando etanol al 50, 60,70,80 y 90% realizándose un lavado de 15min en cada concentración de etanol. Después se realizaron tres lavados más de 15 minutos utilizando etanol absoluto. Posterior a la deshidratación,

se realizó un secado a punto crítico, seguido de un sombreado con oro. Finalmente, la muestra se observó al microscopio JEOL modelo JSM-6510LV.

#### **6.7.4.4 Caracterización de la interacción MNPs-DNA**

Para identificar la correcta interacción de las MNPs con el vector de edición (DNA) se mezclaron distintas concentraciones de MNPs-DNA, las cuales se colocaron en microtubos de 2ml y se dejaron interactuando por 30 min. Al terminar dicho tiempo, la muestra se colocó en un gel de agarosa al 0.8% en la cámara de electroforesis por 30 min. Las proporciones MNPs-DNA (en microgramos) probadas fueron 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1.

Una vez identificada la proporción correcta, se realizó una digestión enzimática de las MNPs interactuando con el DNA de acuerdo con la **Tabla 3** utilizando las enzimas HindIII y AvrI. La reacción se dejó incubando toda la noche a 37°C y fue revisada mediante un gel de agarosa al 0.8%.

#### **6.7.4.5 Corroboración del funcionamiento de las MNPs en el proceso de transformación genética**

Para esta corroboración se hizo uso del vector pBGWFS7 e35S (**Anexo 2**) como vector positivo, el cual codifica para la proteína GFP y la enzima beta-glucuronidasa (gen GUS), además del vector pBGWFS7 (**Anexo 3**) como control negativo ya que no expresa dichos genes. Se realizó el proceso de magnetofección tal y como se describe en el apartado **6.7.5**. Las muestras magnetofectadas se dejaron incubando a 28°C por 24 h. Posterior a este tiempo, se verificó la expresión de la beta glucuronidasa con la tinción X-GLUC y la expresión del gen de GFP mediante RT-PCR.

#### 6.7.4.6 Extracción de RNA mediante el método de Logemann

La extracción de RNA de polen para la síntesis del cDNA se realizó siguiendo el protocolo publicado por Logemann y colaboradores (1987). El polen se maceró en nitrógeno líquido con un pistilo en un microtubo de 2ml.

#### 6.7.4.7 Protocolo de síntesis de cDNA

Para la síntesis del cDNA se realizó la mezcla de reacción indicada en la **Tabla 11** en tubos de 0.2 ml. Esta mezcla de reacción se calentó a 72°C durante 10 min y culminado este tiempo los tubos se centrifugaron brevemente por 5 seg e inmediatamente se colocaron en hielo. Posteriormente, a cada tubo se le agregó la mezcla de reacción indicada de la **Tabla 12**.

**Tabla 11.** Mezcla de reacción 1 para cDNA.

REACTIVO	VOLUMEN ( $\mu$ L) 1X
H <sub>2</sub> O Milli-Q estéril	9.00
Hexámeros aleatorios	1.00
dNTPs (10 $\mu$ M)	1.00
RNA (50 ng/ $\mu$ L)	2.00
<b>Volumen final</b>	<b>14.00</b>

**Tabla 12.** Mezcla de reacción 2 para cDNA.

REACTIVO	VOLUMEN ( $\mu$ L) 1X
Buffer first strand 5x*	4.00
DTT (0.1M)	1.00
MLV-MM4	1.00
<b>Volumen final</b>	<b>6.00</b>

\*Buffer first strand 5x: 250Mm Tris-HCl pH 8.3, 375Mm KCl, 15Mm MgCl<sub>2</sub>.

Finalmente se incubaron los tubos a 50°C durante 60 min y posteriormente a 75°C durante 15 min para inactivar a la RT.

### **6.7.5 Magnetofección de polen**

Para la magnetofección de polen, se colocaron las MNPs disueltas en agua a una concentración de 1 µg/ml y se sonicaron por 15 minutos previo a su uso. Transcurrido el tiempo de sonicación, en un microtubo se colocaron las MNPs y el vector de edición en una proporción 1:1 de MNPs:vector y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 min para generar la interacción entre ambos compuestos. Transcurrido este tiempo se agregó 1ml de medio para germinación de polen (**Anexo 4**).

El polen fue recuperado 20 minutos antes de finalizar el tiempo para la interacción MNPs-vector en un tubo eppendorf. Las MNPs-vector en medio de germinación para polen, fueron agregadas al tubo con polen y posteriormente dicho tubo se colocó en una gradilla magnética durante 30 minutos para el proceso de magnetofección.

### **6.7.6 Polinización con polen magnetofectado**

Este proceso se realizó antes de las 12:00 h ya que, fisiológicamente, las plantas tendrían abiertas sus flores. Para la polinización se escogieron flores a 2 o 3 días antes del proceso de antesis, las cuales fueron emasculadas (con ayuda de unas pinzas) retirándoles los pétalos y estambres para dejar el pistilo expuesto. El polen magnetofectado se colocó en una pequeña cuchara de plástico, de manera cuidadosa, se sumergió el pistilo en el polen dando pequeños toquecitos hasta que se notara la punta del pistilo impregnado de polen. Después de polinizar, cada pistilo polinizado se cubrió con un acetato transparente y delgado rotulando con la fecha de polinización.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Análisis bioinformático para la determinación e identificación de los genes a editar

Para la determinación de los posibles genes a editar en plantas de tomate y chile se hizo una revisión bibliográfica con la que se identificaron aquellos genes que han demostrado participar en el ciclo viral de algunos tobamovirus. Los genes identificados se muestran en la **Tabla 13**, de ellos, se seleccionó el gen que codifica para ARL8 (ADP-ribosylation factor-like o A1C) reportado por Masaki y colaboradores en 2011 como una de las proteínas necesarias para la formación del complejo de replicación utilizado por algunos tobamovirus, lo que lo convierte en un candidato potencial como gen de resistencia recesiva contra el ToBRFV (Masaki et al., 2011).

Gen	Planta	Virus afectado	Referencia
<b>TOM 1</b> <b>TOM 3</b>	<i>Nicotiana spp.</i> <i>Solanum lycopersicum,</i> <i>Capsicum annuum</i>	YoMV, ToMV, TMV, TMGMV, PMMoV, ToBRFV	Ishikawa et al, 1991 Ishikawa et al., 1993 Yamanaka et al., 2002 Kumar et al., 2012 Masayuki et al., 2022
<b>TOM2A</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	YoMV, ToMV	Ohshima et al., 1998 Tsujiimoto et al., 2003
<b><u>ARL8</u></b>	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	ToMV, YoMV	Nishikiori et al., 2011
<b>Tm-2<sup>2</sup></b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	TMV, ToMV	Spiegelman et al., 2021
<b>Tm-1</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	TMV	Ishibashi et al., 2014

**Tabla 13.** Productos génicos que participan en el ciclo de replicación viral de algunos virus. YoMV: Virus del mosaico de la youcai; ToMV: Virus del mosaico del tomate; TMV: Virus del mosaico del tabaco; TMGMV: virus del mosaico verde leve del tabaco; PMMoV: Virus del moteado leve del pimiento; ToBRFV: Virus del fruto rugoso marrón del tomate.

Para identificar la presencia de las proteínas ortólogas de ARL8 en *S. lycopersicum* y *C. annuum* se realizó un protein-BLAST en la base de datos del NCBI utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos de ARL8 de *Arabidopsis thaliana* (NP\_190556.2). Con esta búsqueda, se identificaron cuatro ortólogos de ARL8 en cada especie con un porcentaje de identidad mayor al 75%. La **Tabla 14** resume los datos de las proteínas identificadas.

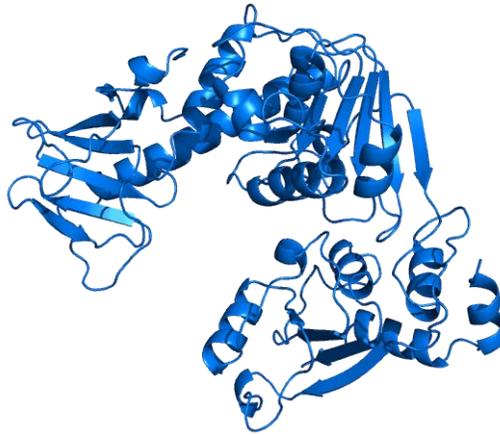
Nombre	Gene ID	Identidad %	Tamaño	NCBI reference sequence ID
<i>Solanum lycopersicum</i>				
ARL8	104645674	90.76	184 aa	NP_001333368.1
ARL8a	101247784	93.48	184 aa	XP_004233461.1
ARL8b	101266697	89.67	184 aa	XP_004234647.1
ARL8c	101254552	78.02	184 aa	XP_004250173.1
<i>Capsicum annuum</i>				
ARL8a	107860183	91	184 aa	XP_016560942.1
ARL8a X1, X2	107858644	92 82	184 aa 161 aa	XP_016558877.1 XP_016558878.1
ARL8b	107868012	89	184 aa	XP_016570035.1
ARL8c	107870507	79	184 aa	XP_016572549.1

**Tabla 14.** Proteínas ortólogas de ARL8 en *S. lycopersicum* y *C. annuum*.

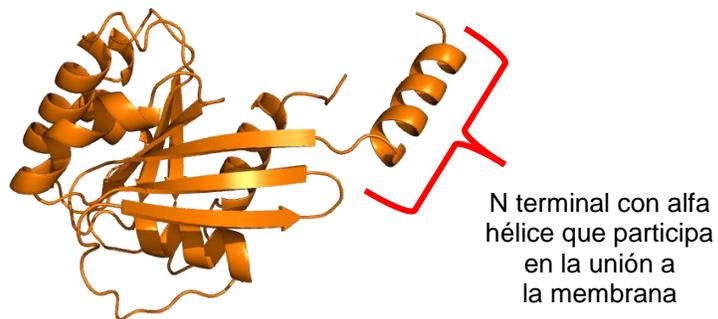
Para determinar su relación filogenética, se calculó el árbol evolutivo de la proteína ARL8 utilizando la secuencia de aminoácidos de *A. thaliana* para identificar los ortólogos en las siguientes especies de solanáceas: *S. lycopersicum*, *C. annuum*, *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum pennellii*, *Solanum verrucosum*, *Amborella trichopoda* y *Thalictrum thalictroides*. El alineamiento de las secuencias proteicas, la identificación del mejor modelo evolutivo y el árbol filogenético fueron realizados en el software MEGA 11. En el árbol se logró observar que las proteínas ARL8 se distribuyen en cuatro clados (**Fig. 18**). Interesantemente, la mayoría de las proteínas de ARL8 para *S.lycopersicum* y *C. annuumm* se encuentran en los clados correspondientes a las proteínas A y B, compartiendo un mismo ancestro común; mientras las proteínas ARL8 C de ambas especies se encuentran en un clado distinto y provenientes de otro ancestro. Esto se correlaciona con los porcentajes de identidad obtenidos en el blast-p del NCBI al identificar estas proteínas, ya que las proteínas ARL8 C muestran porcentajes de identidad más bajos con referencia al resto, pero similares entre ambas especies.



Una vez identificados todas las proteínas de ARL8 en *S. lycopersicum* y *C. annuum*, se procedió a realizar un modelado por homología de cada una de las proteínas de ARL8 de *S. lycopersicum*, de la proteína ARL81C de *A. thaliana* y de la helicasa de ToMV y ToBRFV en los servidores AlphaFold-Colab y SWISS-MODEL. Dichos modelos fueron desarrollados con el fin de analizar la interacción intermolecular entre las proteínas ARL8 y la helicasa viral mediante herramientas de bioinformática de *molecular docking*. Las **Fig. 19** y **20** muestran las estructuras de la helicasa viral de ToMV y ARL8 de *A. thaliana*, respectivamente. Los estudios de *docking* fueron desarrollados en el servidor HDOCK, para lo cual se emplearon las estructuras refinadas de cada proteína y se generaron dockings dobles para cada interacción, es decir, para el primer docking se utilizó la helicasa viral como molécula receptora y ARL8 como ligando, y en el segundo se emplearon de manera recíproca. Para determinar la interacción más adecuada, se tomó en cuenta la estructura de ARL8, ya que posee una alfa hélice en el extremo N terminal (**Fig. 20**). Dicha hélice participa en la interacción de la proteína con las membranas celulares, por lo que los aminoácidos correspondientes a esta alfa hélice no podrían estar interactuando con la helicasa viral. Además, se realizó el estudio con las proteínas de *A. thaliana* y ToMV ya que en el trabajo de Masaki y col. fueron las especies utilizadas para determinar la interacción entre ambas proteínas, por lo que existe evidencia experimental de esta interacción. Los resultados de docking se muestran en las **Fig. 21** y **22**. Todas las poses de los rotámetros mostradas cuentan con un valor de docking score menor a -200 y un confidence score mayor a 0.7. Estos valores denotan una interacción muy probable entre ambas proteínas de acuerdo con los algoritmos del servidor HDOCK.



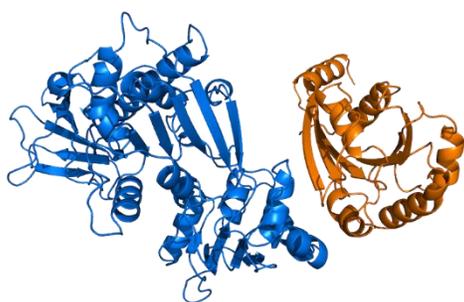
**Figura 19.** Estructura de la helicasa viral de ToMV generada en el servidor SWISS-MODEL.



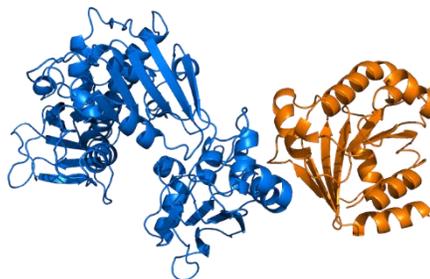
**Figura 20.** Estructura proteica de ARL8 (A1C) de *A. thaliana* generada en el servidor AlphaFold-Colab.

Con el estudio de docking molecular se logró observar que en la mayoría de las poses identificadas para la proteína ARL8 de *A. thaliana* y las distintas proteínas ARL8 de *S. lycopersicum*, los aminoácidos localizados entre las posiciones 44 y 88 de la secuencia proteica de ARL8 se encuentran interactuando con la helicasa viral a través de fuerzas intermoleculares como interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógenos. Los puentes de hidrogeno son una de las interacciones intermoleculares más fuertes, siendo muy importantes en las interacciones proteína-ligando ya que le

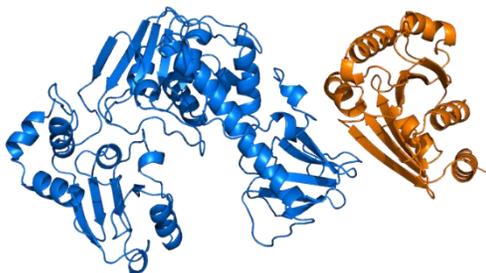
aportan estabilidad a dicha interacción. Algunos de los residuos identificados en el docking molecular que forman puentes de hidrogeno son: Tyr 44, Asp 47, Phe 54, Arg 57, Lys 67, Gln 74, Arg 76, Arg 83 y Tyr 84. La **Fig. 22** muestra todas estas interacciones.



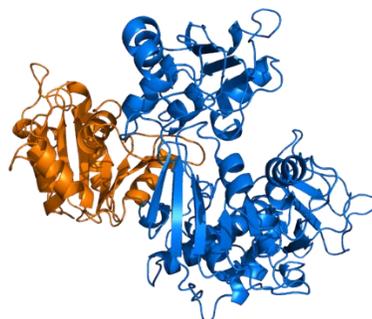
hToMV – ARL8a1c (At)



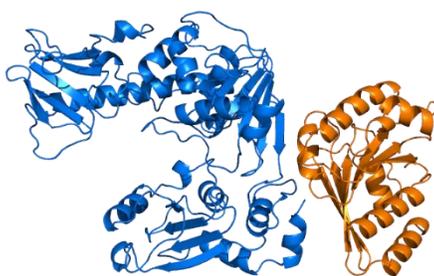
hToBRFV– ARL8a1c (At)



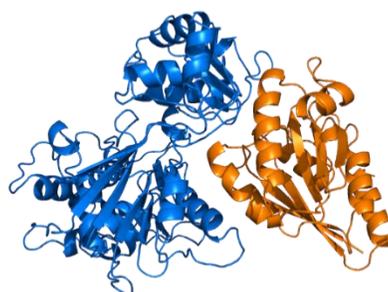
hToBRFV– ARL8 (Sl)



hToBRFV– ARL8a (Sl)

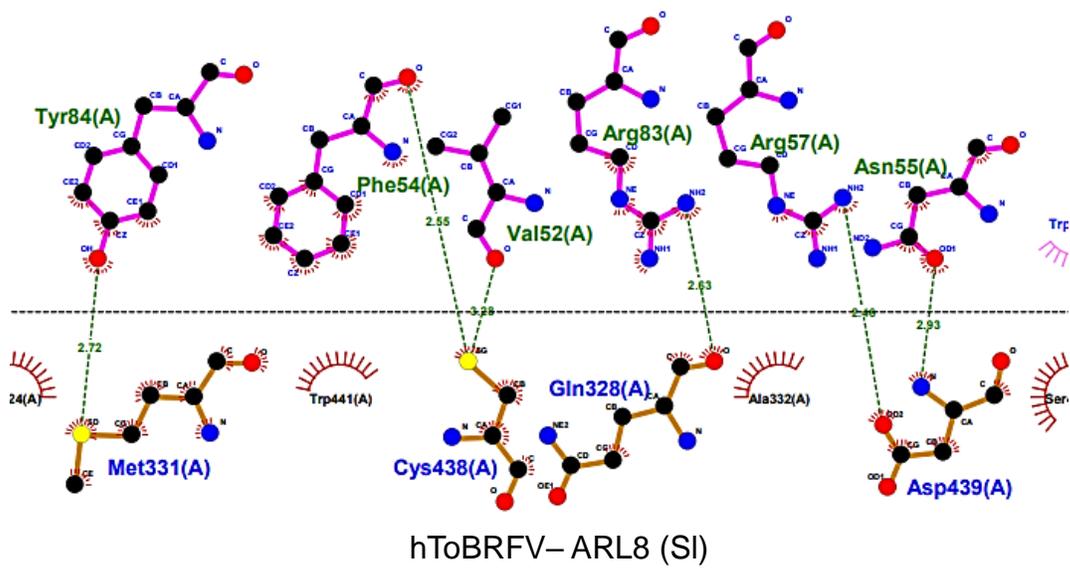
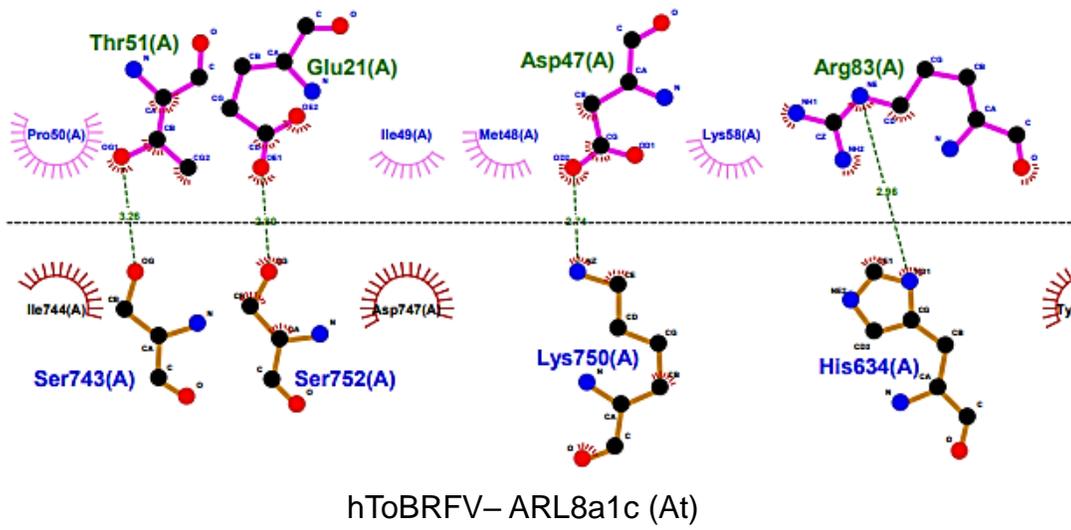
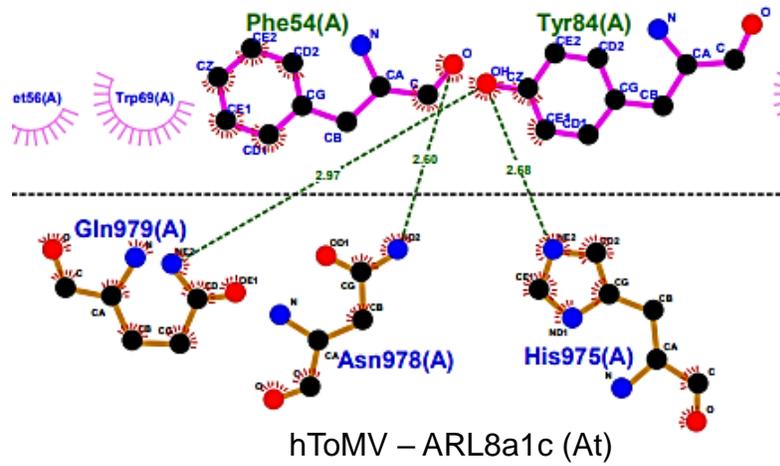


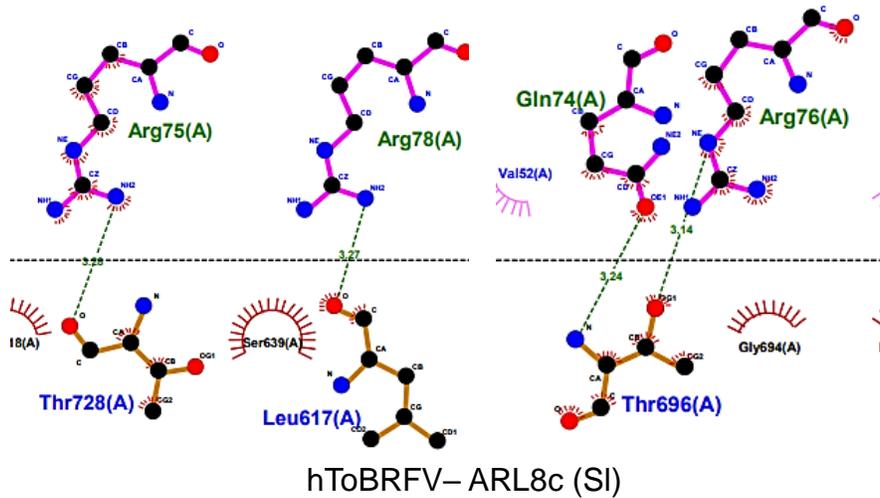
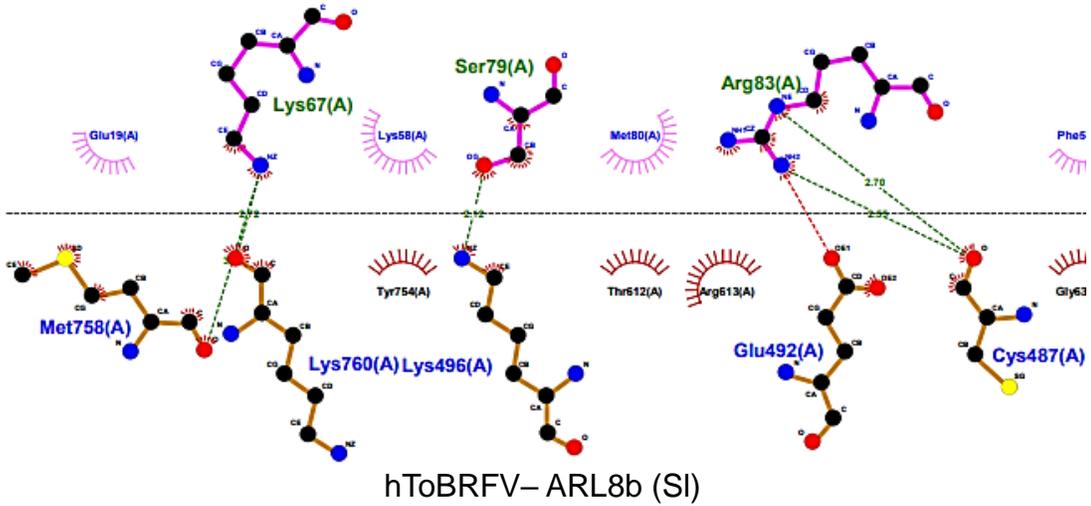
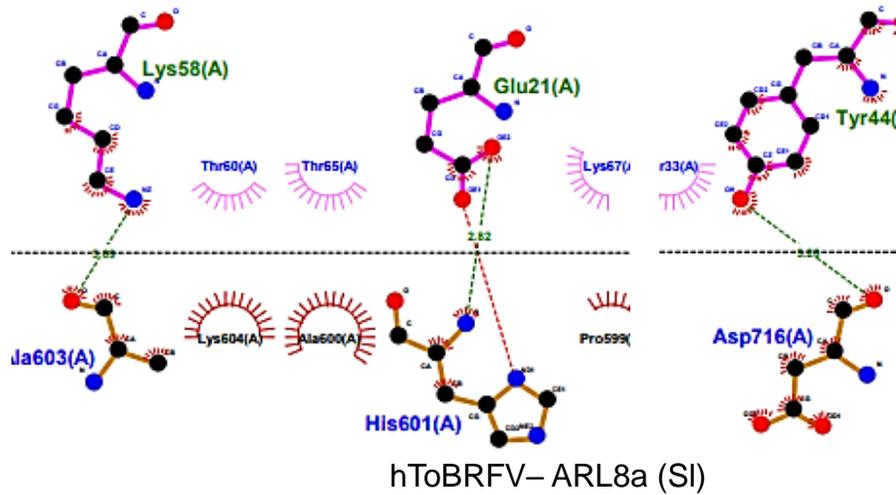
hToBRFV– ARL8b (Sl)



hToBRFV– ARL8c (Sl)

**Figura 21.** Resultados obtenidos con el estudio de *docking molecular* generados por el servidor HDOCK. hToBRFV: helicasa del virus ToBRFV; At: *A. thaliana*; Sl: *S. lycopersicum*.





**Figura 22.** Interacciones intermoleculares entre ARL8 (Magenta) y la helicasa viral (Café). Los puentes de hidrógeno están representados con una línea verde punteada. Las distancias atómicas se indican con números sobre la línea punteada, así como los ángulos de los átomos participantes en la interacción de puentes de hidrógeno y puentes salinos.

## 7.2 Diseño y evaluación de gRNAs

Como se mencionó anteriormente, ARL8 es considerado un gen de resistencia recesiva ya que esta proteína es susceptible a ser utilizada por algunos tobamovirus para completar su ciclo de replicación viral. Si este gen es silenciado o mutado para producir una proteína trunca, que no pueda interactuar con las proteínas del patógeno, el ciclo viral es interrumpido y la infección detenida. Masayuki y col. en el 2022 utilizaron el silenciamiento de los genes de resistencia recesiva TOM1 para generar resistencia contra ToBRFV. En dicho trabajo, ellos demuestran que para tener una alta resistencia contra el tobamovirus es necesario silenciar todos los genes TOM1 presentes en el genoma de la planta. De lo contrario, solo se genera una resistencia parcial, lo que conlleva a la evolución del virus produciéndose nuevas variantes capaces de evadir la resistencia (Masayuki et al, 2022). Con base en dichos resultados, en este proyecto se optó por usar una estrategia similar: generar un vector de edición con los gRNAs suficientes para poder silenciar todos los genes ARL8 en ambas especies y, con ello, buscar la resistencia total. Además de esto, tomando en cuenta los resultados obtenidos en el *docking molecular*, se optó por diseñar gRNAs que realicen el corte en la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 44 y 88 o en la secuencia previa. Estos residuos muy probablemente son los que participan en la interacción entre ARL8 y la helicasa viral, por lo que un cambio sobre esta secuencia o río abajo, podría generar una proteína mutada incapaz de interactuar con la helicasa.

Los gRNAs fueron diseñados utilizando los servidores CRISPR-P, CHOPCHOP y Benchling, con los cuales se determinaron los puntajes de off-target y on-target de

cada RNA guía. Para los gRNAs seleccionados, se tomó en consideración que tuvieran un puntaje de off-target de 0 y un puntaje de on-target mayor a 0.5.

Con todas las consideraciones descritas previamente, se diseñaron cuatro gRNAs para el vector de edición a usar en *S. lycopersicum* y tres para el vector de *C. annuum*. Interesantemente, se identificaron dos regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos en ambas especies por lo que los gRNAs diseñados quedaron sobre estas regiones. Cada gRNA tiene un tamaño de 20 nucleótidos y cuenta con la secuencia PAM. Las **Fig. 23** y **24** muestran los gRNAs, la secuencia de DNA complementaria y la posición del aminoácido codificado en dicha secuencia.



**Figura 23.** gRNAs diseñados para *C. annuum*. Secuencia **PAM** se indica con el color rosa y en el último renglón se muestra la secuencia de aminoácidos que están codificados en esa región.

ARL8 SL  
gRNA 1s1

```
gRNA> (5')CTTTTCTCAATTGGCTTCGAAGG(3')
-----|-----
Gen> GACCCTTCGAAAAGAGTTAACCGAAGCTTCCATATATA
aa>   A  F  L  N  W  L  R  S
      6      10      13
```

ARL8a SL  
gRNA 2s1

```
gRNA> (5')ATAAAATTGTGGGACCTTGGAGG(3')
-----|-----
Gen> TACAGTGATATTTTAACACCCTGGAACCTCCAGTTGGG
aa>   I  K  L  W  D  L  G  G
      66      70      73
```

ARL8b SL  
gRNA 3s1

```
gRNA> (5')ATAAAGTTGTGGGACCTTGGAGG(3')
-----|-----
Gen> TACTACTGATATTTCAACACCCTGGAACCTCCAGTTGGG
aa>   I  K  L  W  D  L  G  G
      66      70      73
```

ARL8c SL  
gRNA 4s1

```
gRNA> (5')ATAAACTCTGGGATCTTGGGG(3')
-----|-----
Gen> TACTACTGGTATTTTGAGACCCTAGAACCCCGGTTTCC
aa>   I  K  L  W  D  L  G  G
      66      70      73
```

**Figura 24.** gRNAs diseñados para *S. lycopersicum*. Secuencia PAM se indica con el color rosa y en el último renglón se muestra la secuencia de aminoácidos que están codificados en esa región.

### 7.3 Construcción del vector de edición con gRNAs múltiples

#### 7.3.1 Clonación de gRNAs en el vector PBUN4U6SM y del sitio polylinker para formar el vector pBUN4U6SM + Poly

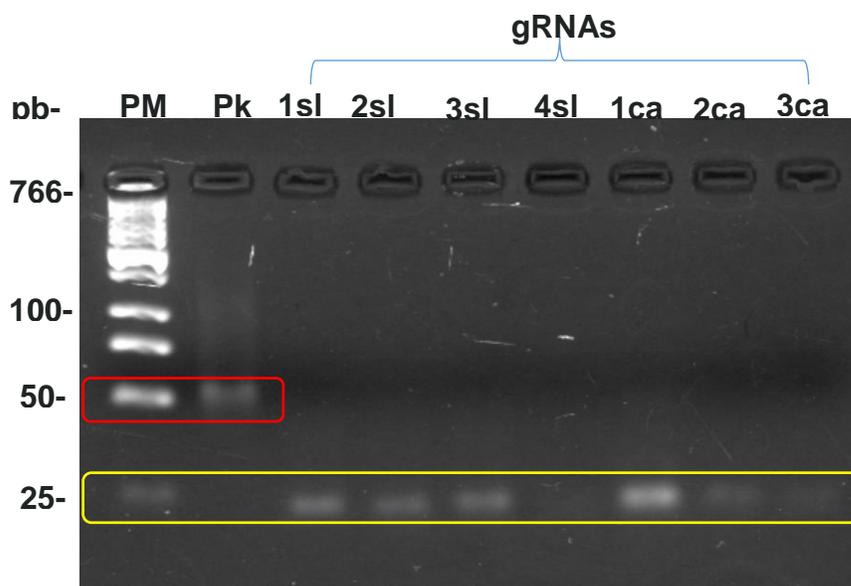
Con la finalidad de aumentar la frecuencia de edición, se generaron los vectores de edición con cuatro gRNAs para *S. lycopersicum* y con tres para *C. annuum*. En primer lugar, se clonó cada gRNA en el vector pBUN4U6SM y el sitio polylinker para generar el vector pBUN4U6SM + Poly.

Para poder realizar estas clonaciones, es importante mencionar que cada oligonucleótido de gRNA fue diseñado con extremos complementarios para la enzima BsaI y los oligonucleótidos del sitio polylinker con extremos complementarios a la enzima HindIII. La **Fig. 25** muestra el diseño de estos oligonucleótidos.

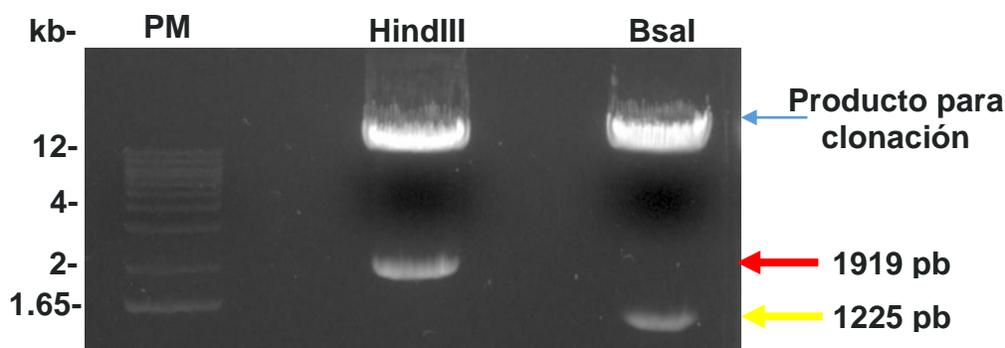


**Figura 25.** Oligos diseñados para los gRNA y el sitio polylinker con extremos cohesivos complementarios a las enzimas BsaI y HindIII.

Los oligonucleótidos directo y reverso de cada gRNA y del polylinker fueron alineados como se indica en la metodología, para posteriormente ser insertados en el vector pBUN4U6SM digerido con las enzimas Bsal y HindIII. Las **Fig. 26** y **27** muestran los geles de electroforesis que comprueban la correcta alineación de cada oligonucleótido y la correcta digestión del vector pBUN4U6SM con cada enzima.



**Figura 26.** Electroforesis de los oligos directo y reverso alineados de cada gRNA (mostrados en el rectángulo amarillo) y el sitio polylinker (mostrado en el rectángulo rojo). Gel de agarosa al 5%. pb: pares de bases; PM: marcador de peso molecular; PK: polylinker; sl: gRNAs de *S. lycopersicum*; ca: gRNAs de *C. annuum*.



**Figura 27.** Linealización del vector pBUN4U6SM con las enzimas HindIII y Bsal. La banda de mayor peso molecular se purificó para ser utilizada en la clonación de los gRNAs y del sitio polylinker. kb: kilo bases; PM: marcador de peso molecular.

Una vez obtenido el vector linealizado, los gRNAs y el sitio polylinker alineados, se realizó la reacción de ligación como se indicó en la metodología. En este paso es importante recalcar que, para poder obtener la correcta clonación del sitio polylinker, se utilizó un exceso de este inserto, lo que forzó su unión al plásmido en lugar de la re-ligación del vector. Se utilizó una proporción vector: inserto de 1:3 (86 ng del vector y 260 ng del inserto).

Con los productos de las ligaciones se procedió a transformar *E. coli* Mach1-T1 y, posteriormente, se hizo la corroboración de los plásmidos en las colonias transformadas. Esta corroboración se realizó mediante digestiones enzimáticas, PCR de punto final y secuenciación Sanger.

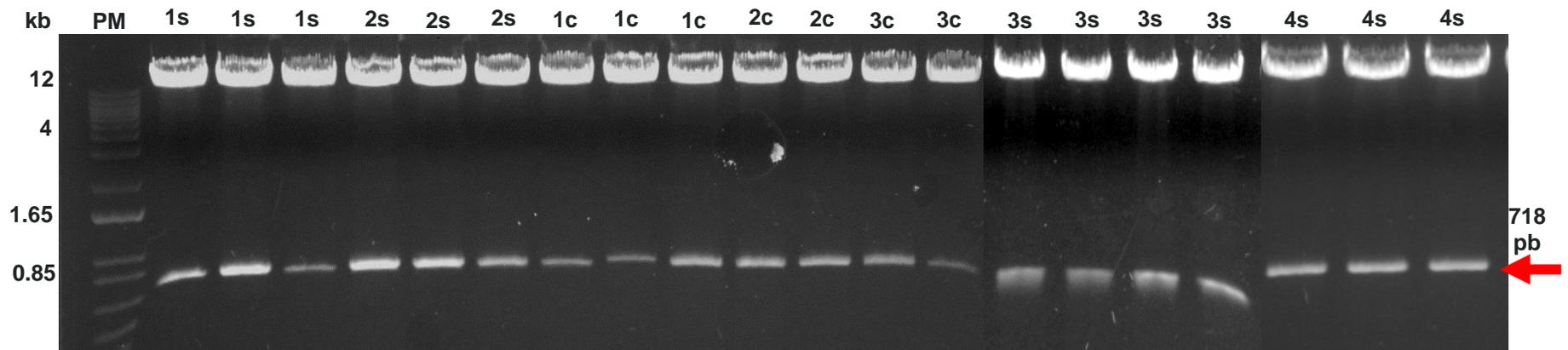
Para los gRNAs se realizaron digestiones con la enzima HindIII, con la cual se esperaba la liberación de cada casete de gRNA que tienen un tamaño de 718 pb. Se digirieron de dos a cuatro clonas por construcción y todas liberaron el fragmento esperado (**Fig. 28**).

Para la comprobación de estos insertos mediante PCR punto final, se amplificó un fragmento de 186 pb utilizando un primer directo sobre el promotor U6 y como primer reverso el oligonucleótido reverso de cada gRNA. Se analizaron todas las clonas corroboradas por digestión enzimática y para todas se obtuvo la amplificación del fragmento esperado (**Fig. 29**).

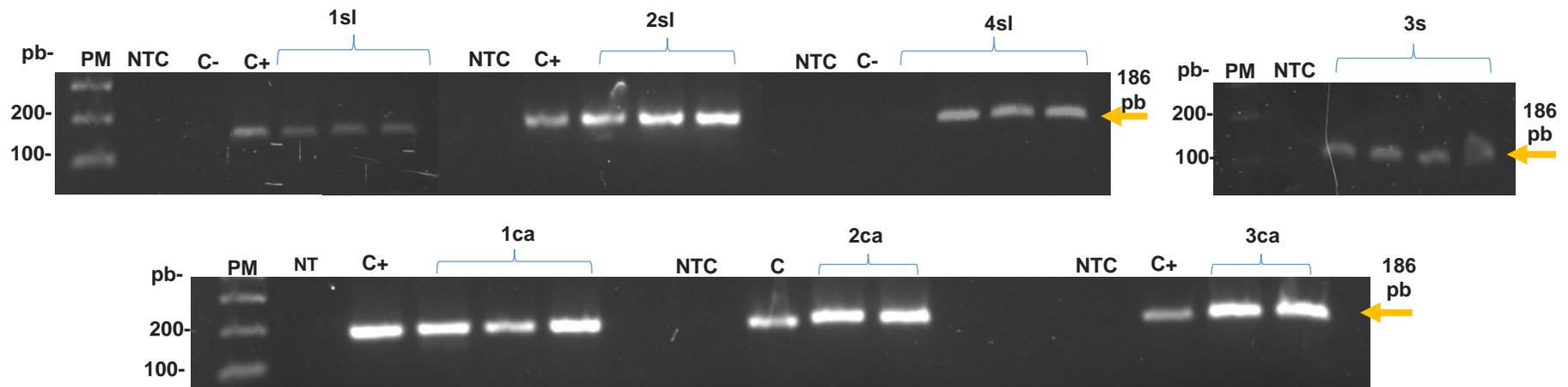
Se comprobó la correcta clonación en el nuevo vector pBUN4U6SM + poly mediante el uso de enzimas de restricción SpeI y BsaI, y se esperaba la liberación de un fragmento de 4,462 pb para la construcción con el sitio polylinker; en cambio, únicamente una linealización en las construcciones que carecieran del inserto. Con esta digestión se identificaron tres colonias positivas con numeración 8, 14 y 20 (**Fig.**

**30).** A las tres colonias candidatas se les realizaron tres digestiones más con el resto de las enzimas del polylinker: HindIII, Bsal y Bstbl. En estas digestiones se esperaba la liberación de un fragmento de 4,462 pb aproximadamente. Los resultados se muestran en la **Fig. 31A** donde se observó que las colonias 8 y 14 liberaron el fragmento esperado en cada digestión; sin embargo, para la colonia 20 solo se obtuvo el resultado esperado en una de las digestiones. Además de las digestiones enzimáticas, la clonación correcta del sitio polylinker se corroboró por PCR punto final, donde el fragmento amplificado tuvo un tamaño de 155 pb (**Fig. 31B**).

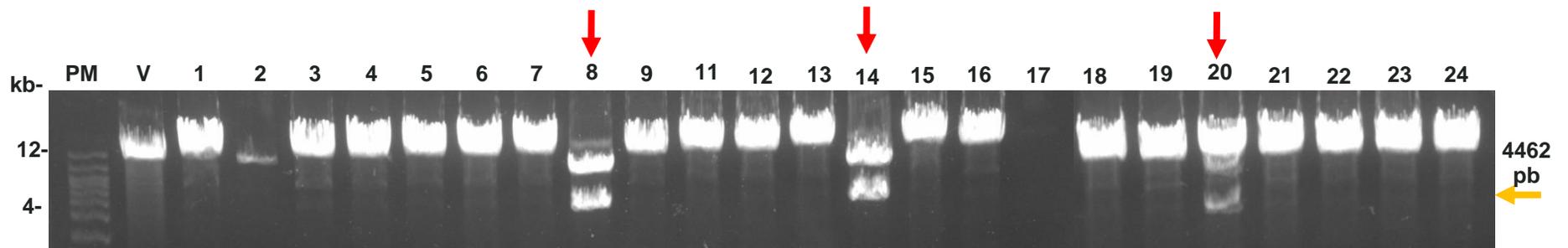
Una vez corroborado cada uno de los insertos clonados mediante digestión enzimática y PCR punto final, se envió a secuenciar una colonia de cada gRNA y las tres colonias con el posible sitio polylinker. Todas las colonias enviadas para los gRNAs tuvieron una secuencia correcta con buena calidad de acuerdo con el electroferograma. En el caso de las colonias enviadas con el sitio polylinker, solo las colonias 8 y 14 arrojaron la secuencia correcta. Las **Fig. 32 y 33** muestran los resultados de las secuenciaciones.



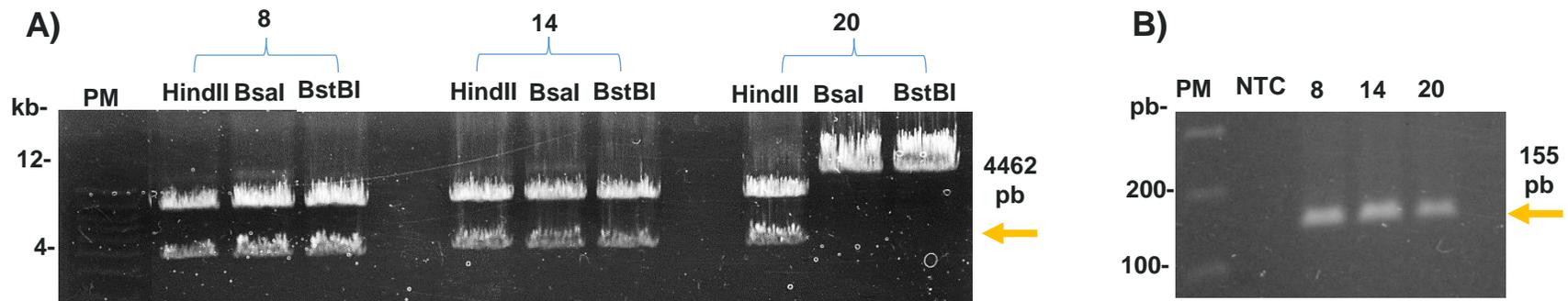
**Figura 28.** Electroforesis de la digestión con HindIII para corroborar la clonación de los gRNAs. El fragmento liberado fue de 718 pb. Gel de agarosa al 0.8%. kb: kilo bases; PM: marcador de peso molecular; s: *S. lycopersicum*; c: *C. annuum*.



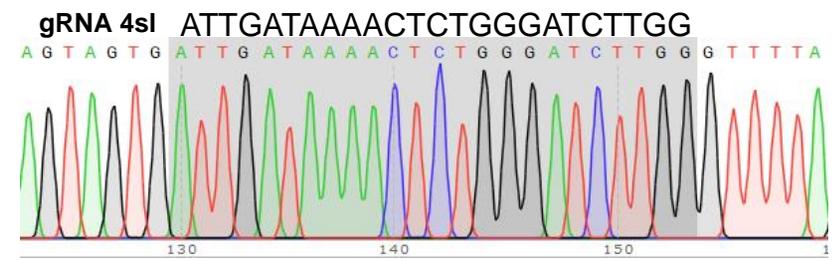
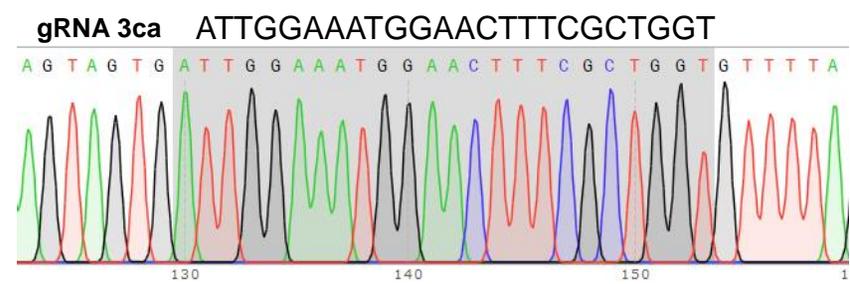
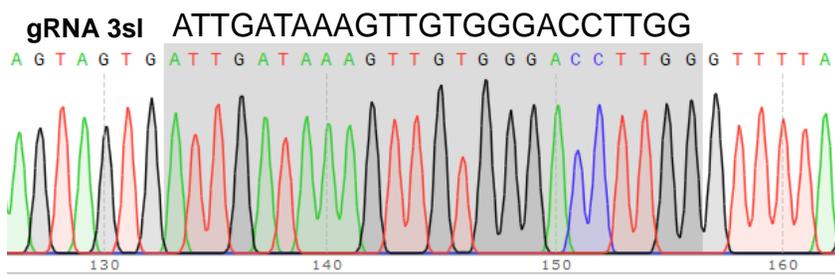
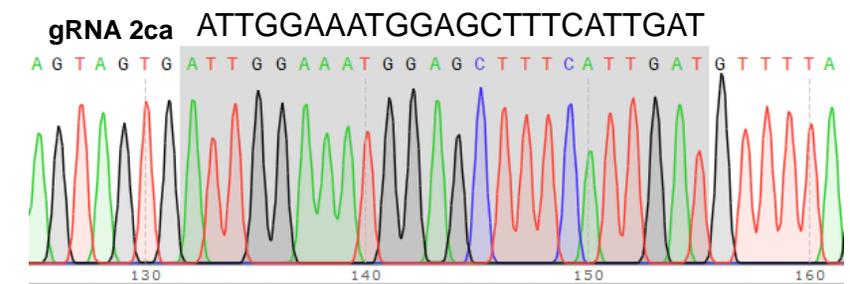
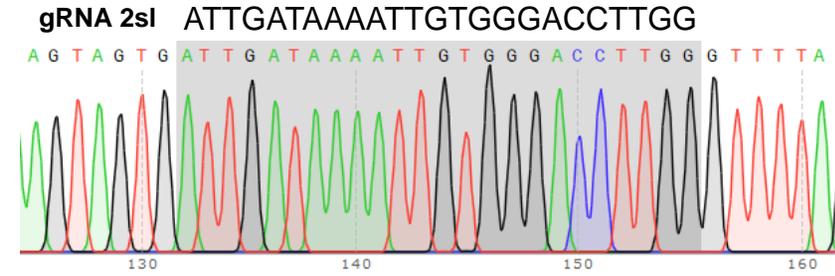
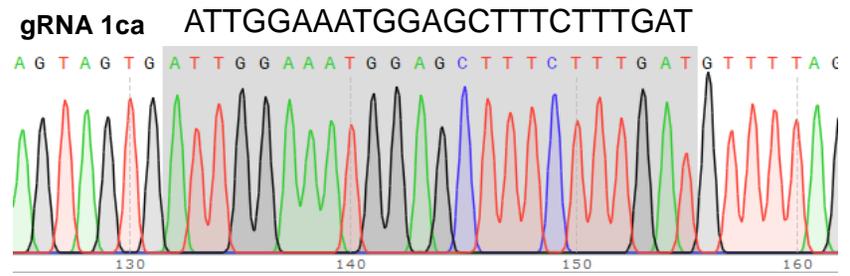
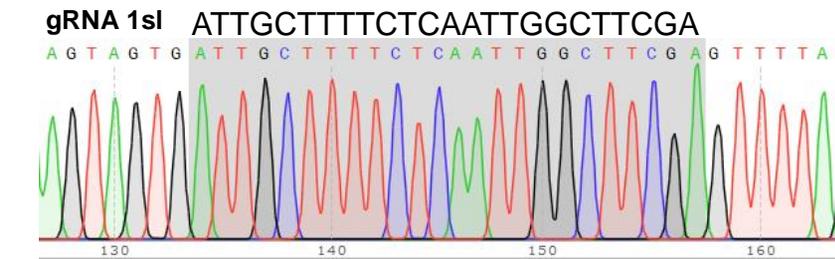
**Figura 29.** Electroforesis de la PCR punto final para corroborar la clonación de los gRNAs. El fragmento amplificado fue de 186 pb. Gel de agarosa al 2%. pb: pares de bases; PM: marcador de peso molecular; NTC: no template control; C-: control negativo; C+: control positivo; sl: gRNAs de *S. lycopersicum*; ca: gRNAs de *C. annuum*.



**Figura 30.** Electroforesis de la digestión con SpeI y BsaI para identificar posibles colonias con el sitio polylinker clonado. El fragmento esperado fue de 4,462 pb. Las flechas rojas indican las colonias positivas (colonias 8, 14 y 20). Gel de agarosa al 0.7%. kb: kilo bases; PM: marcador de peso molecular.

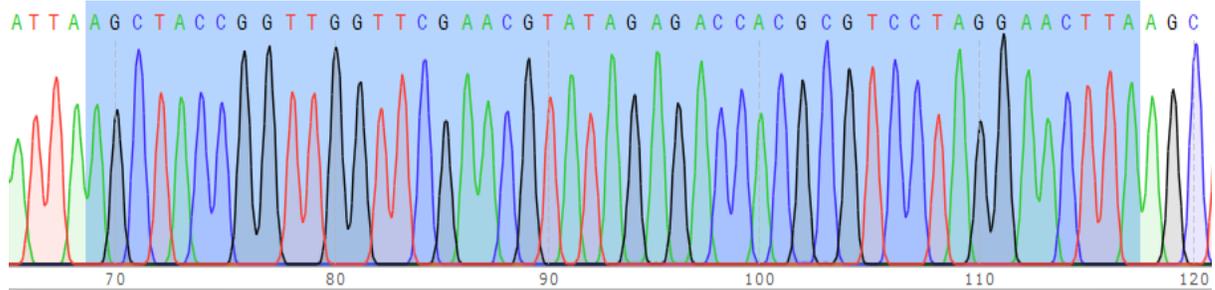


**Figura 31.** Electroforesis de las comprobaciones para las colonias con el sitio polylinker. **A)** Digestiones dobles con las enzimas SpeI más HindIII, BsaI, y BstBI; el fragmento liberado fue de 4,462 pb. **B)** PCR punto final; el fragmento amplificado fue de 155 pb. pb: pares de bases; PM: marcador de peso molecular (escala de 1 kb).

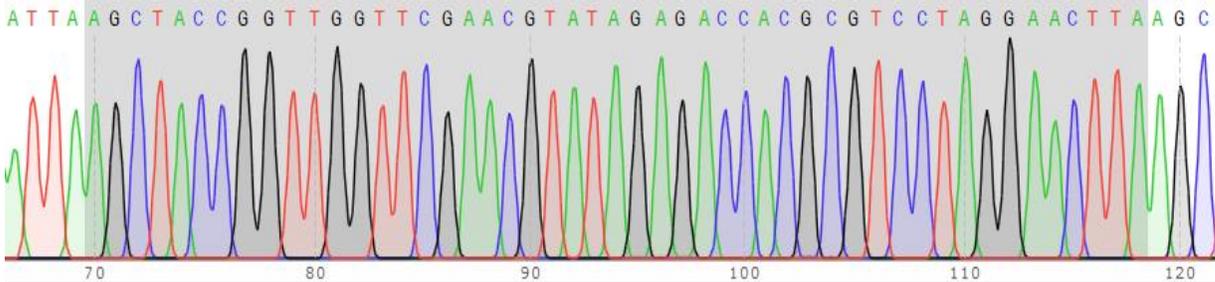


**Figura 32.** Electroferogramas obtenidos para la secuenciación de los gRNAs clonados en el vector pBUN4U6SM. De lado izquierdo se muestran los gRNAs de *S. lycopersicum*; y de lado derecho los de *C. annuum*.

**Col. 8** AGCTACCGGTTGGTTCGAACGTATAGAGACCACGCGTCCTAGGAACTTA



**Col. 14** AGCTACCGGTTGGTTCGAACGTATAGAGACCACGCGTCCTAGGAACTTA



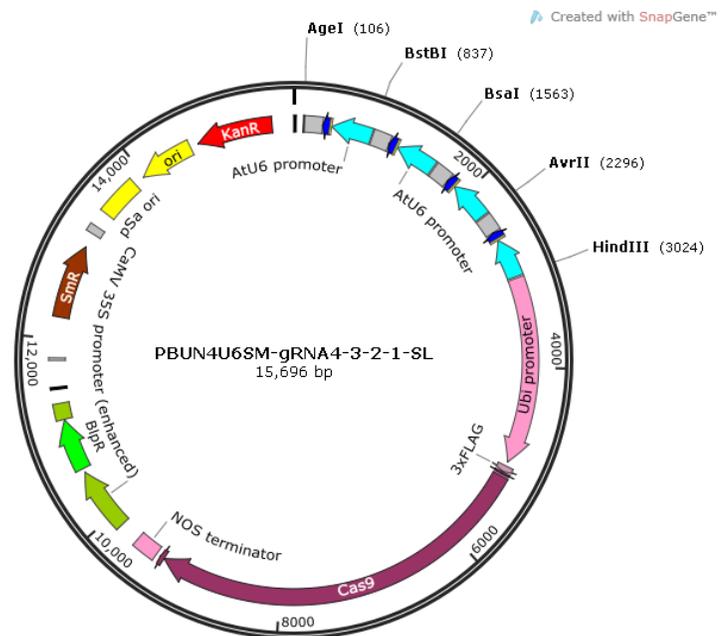
**Figura 33.** Electroferogramas obtenidos para la secuenciación de las colonias 8 y 14 con el sitio polylinker clonado en el vector pBUN4U6SM para formar el vector pBUN4U6SM + poly. Col: colonia bacteriana.

### 7.3.2 Ensamble de múltiples gRNA en el vector pBUN4U6SM + Poly

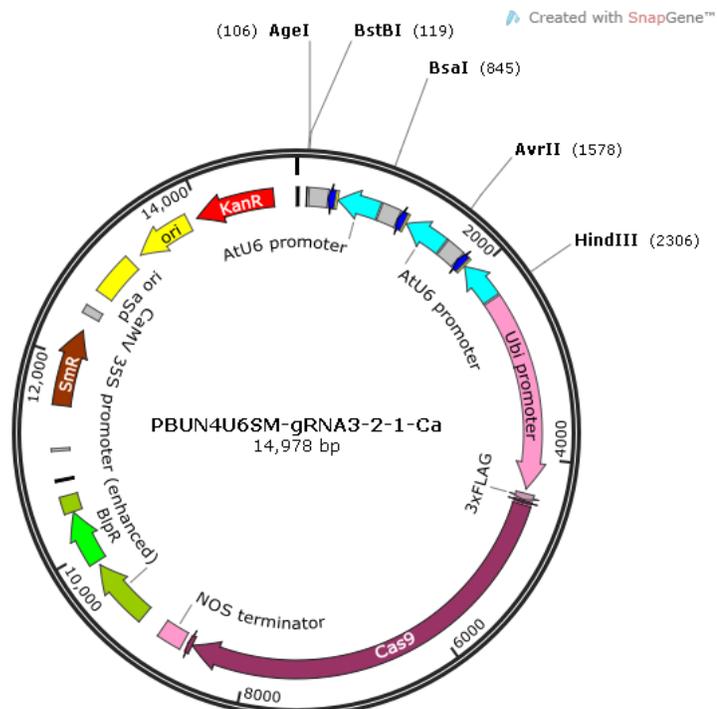
Una vez obtenido el vector pBUN4U6SM + Poly y cada uno de los gRNA clonados en el vector pBUN4U6SM, se procedió a formar los vectores pBUN4U6SM-gRNA4-3-2-1-SI y pBUN4U6SM-gRNA3-2-1-Ca los cuales se muestran en las **Fig. 34** y **35**, respectivamente.

Para este fin, se realizó la amplificación de cada casete de gRNA (formado por el promotor AtU6, el gRNA y el terminador AtU6) con primers específicos para insertar sitios de cortes para las enzimas de restricción del sitio polylinker (enzimas HindIII, AgeI, BsaI, BstBI y AvrI). Es importante mencionar que cada casete de gRNA fue amplificado con sitios de restricción enzimática diferentes en cada extremo, esto con el fin de darle direccionalidad a cada fragmento y así facilitar la ligación. Los

fragmentos amplificados fueron recuperados del gel de agarosa y, posteriormente, digeridos con las enzimas correspondientes.

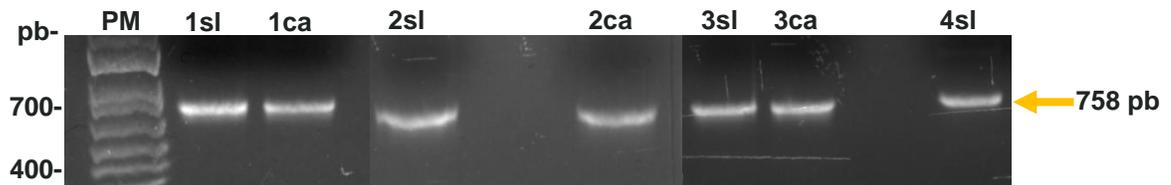


**Figura 34.** Vector pBUN4U6SM-gRNA4-3-2-1-SL utilizado para transformar explantes de *S. lycopersicum*.



**Figura 35.** Vector pBUN4U6SM-GRNA3-2-1-Ca utilizado para transformar polen de *C. annuum*.

La **Fig. 36** muestra los fragmentos amplificados y ya digeridos con las enzimas correspondientes. Cada uno de estos fragmentos, al igual que el vector, fueron recuperados del gel de agarosa y utilizados en el proceso de ligación.



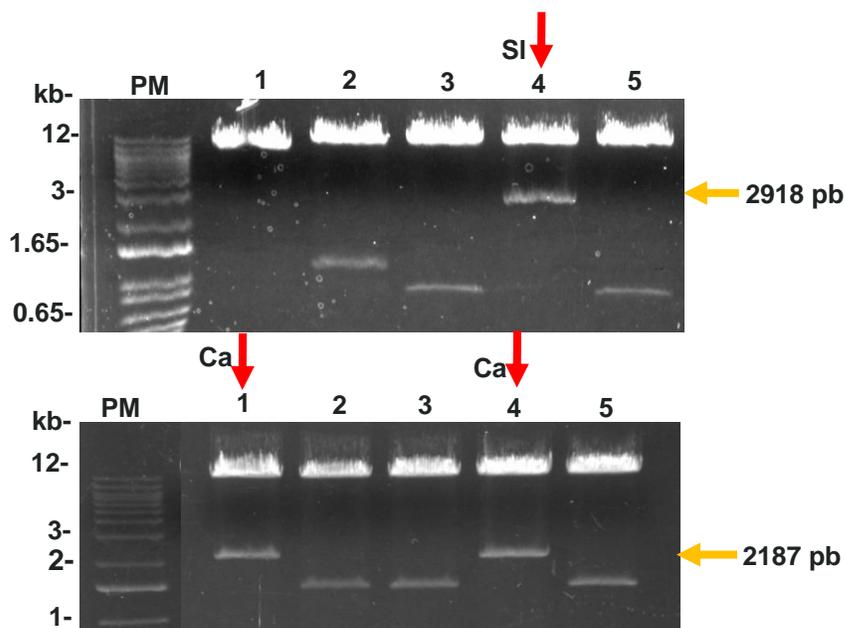
**Figura 36.** Electroforesis confirmatoria de la digestión de cada casete de gRNA amplificado. El tamaño de cada casete de gRNA fue de 758 pb. pb: pares de bases; PM: marcador de peso molecular; sl: *S. lycopersicum*; ca: *C. annuum*.

Para el proceso de ligación de los casetes correspondientes a cada vector, se utilizaron dos metodologías diferentes. Para el vector pBUN4U6SM-gRNA4-3-2-1-SL se realizó una única reacción de ligación, en la cual se colocaron los cuatro casetes de gRNAs digeridos y el vector PBUN4U6SM + Poly digerido con las enzimas HindIII y AgeI. Para el caso del vector pBUN4U6SM-gRNA3-2-1-Ca se realizaron tres ligaciones distintas, una por cada casete de gRNA y utilizando el vector digerido con las enzimas correspondientes a los extremos de cada casete.

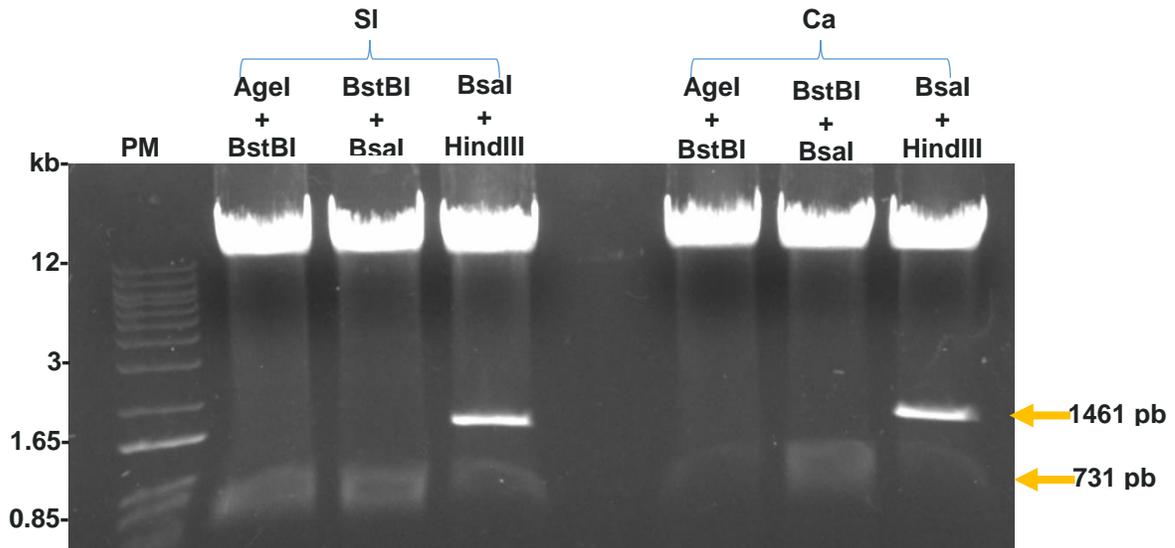
Para corroborar la correcta clonación de todos los casetes de gRNAs en el vector correspondiente, se realizaron digestiones enzimáticas. En primer lugar, con las enzimas HindIII y AgeI con el fin de identificar las colonias que tuvieran el casete completo de gRNAs (**Fig. 37**). Con esta digestión se identificó una colonia para el vector pBUN4U6SM-gRNA4-3-2-1-SL y dos para el vector PBUN4U6SM-GRNA3-2-1-Ca. Se seleccionó una sola colonia por construcción y se hicieron dobles

digestiones con las enzimas Agel-BstBI, BstBI-Bsal y Bsal-HindIII. El resultado para dichas digestiones se muestra en la **Fig. 38** donde se observa la obtención de los fragmentos esperados de 1,461 pb y 731 pb.

Finalmente, se realizó la corroboración mediante secuenciación Sanger, utilizando primers específicos para secuenciar cada casete de gRNA. Para el caso del vector pBUN4U6SM-gRNA4-3-2-1-SL el resultado fue el esperado. Sin embargo, para el vector pBUN4U6SM-gRNA3-2-1-Ca, se identificó el cambio de dos nucleótidos en la secuenciación. Estos cambios sucedieron sobre la secuencia del gRNA1 donde se cambió una adenina (A) por una guanina (G), y sobre la secuencia promotora del gRNA2 en donde se cambió una timina (T) por una citosina (C). La **Fig. 39** muestra el resultado de estas secuenciaciones.

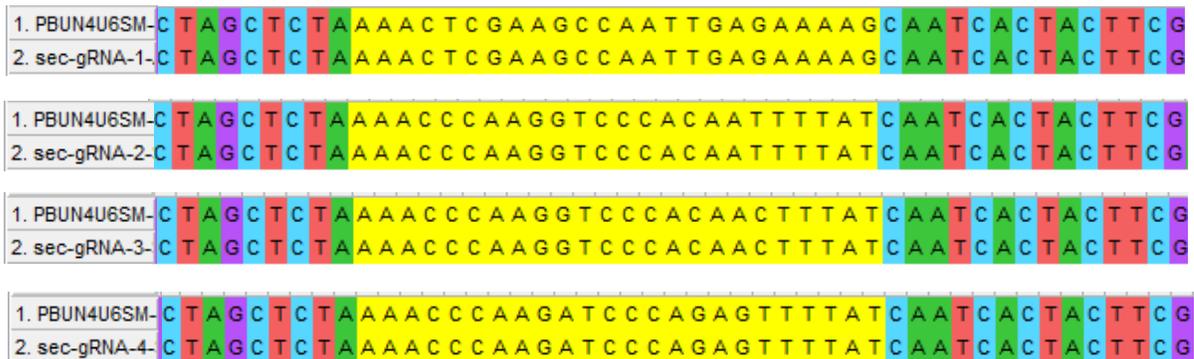


**Figura 37.** Electroforesis de la digestión con HindIII y Agel para identificar los plásmidos recombinantes con los múltiples casetes de gRNA clonados. El fragmento esperado era de 2,918 pb para el vector de SI y de 2,187 para el vector de Ca. Las flechas rojas muestran las colonias positivas. Gel de agarosa al 0.7%. kb: kilo bases; PM: marcador de peso molecular; SI: *S. lycopersicum*; Ca: *C. annuum*.

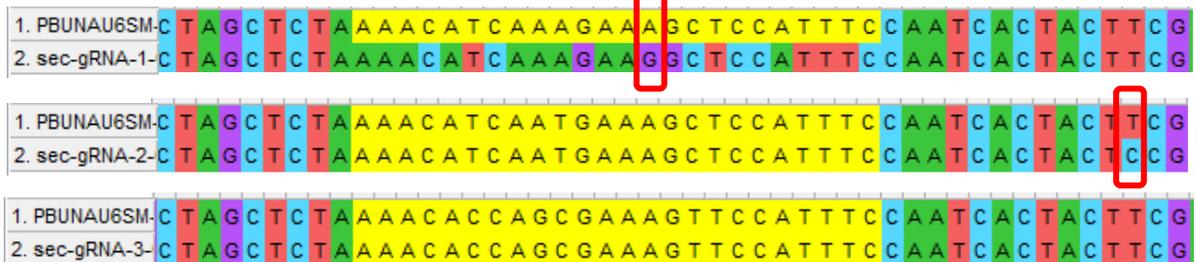


**Figura 38.** Electroforesis de las digestiones dobles para corroborar la correcta clonación de los cassettes de gRNA. Los fragmentos liberados fueron de 1,461 pb para las digestiones con Age-BstBI y BstBI-Bsal y de 731 pb para las digestiones con Bsal-HindIII. Gel de agarosa al 0.7%. kb: kilo bases; PM: marcador de peso molecular. SI: *S. lycopersicum*; Ca: *C. annuum*.

### Vector para tomate (PBUN4U6SM-gRNA4-3-2-1-SL)



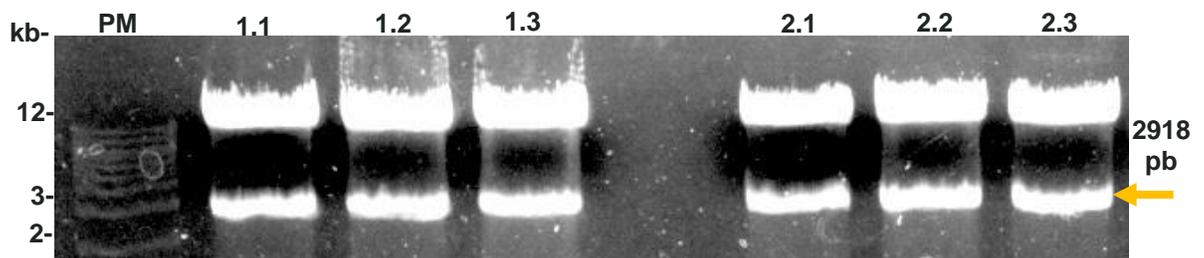
### Vector para chile (PBUN4U6SM-GRNA3-2-1-Ca)



**Figura 39.** Alineamiento de la secuenciación Sanger obtenida para los vectores de edición (2) vs la secuencia de referencia (1). Los nucleótidos diferentes se muestran en los rectángulos color rojo.

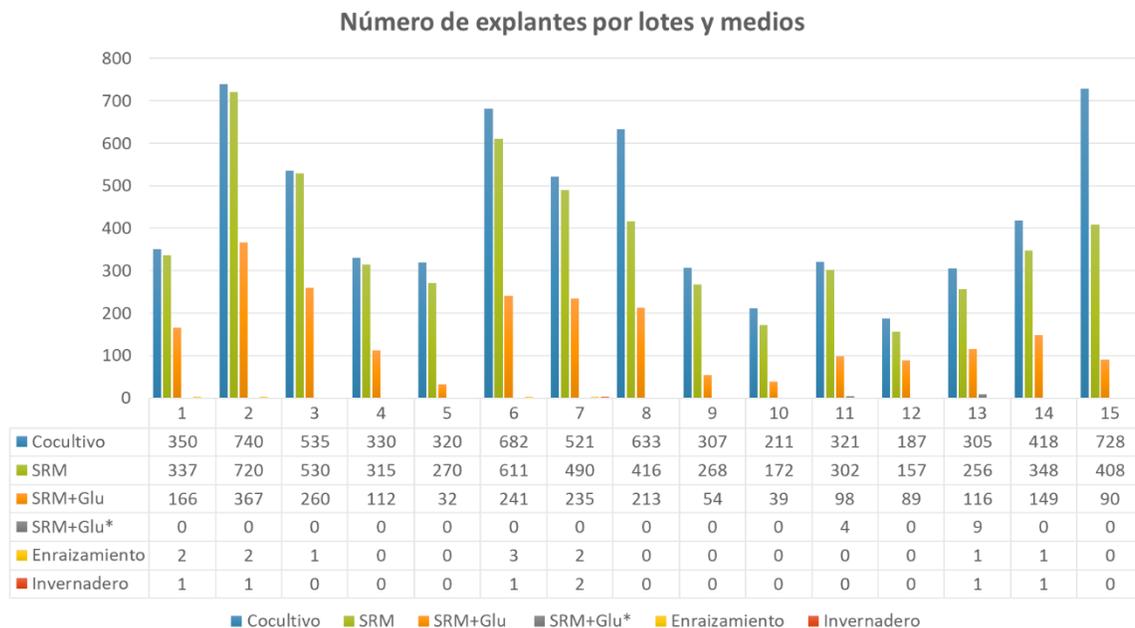
#### 7.4 Transformación genética de tomate

Una vez corroborado el correcto ensamble del vector de edición, se procedió a transformar cepas de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. La transformación se realizó mediante electroporación. Para corroborar la correcta transformación, se realizaron extracciones de DNA plasmídico, que se utilizó para transformar bacterias de *E. coli* Mach1-T1 con el fin de obtener un mayor número de copias del plásmido y así poder realizar la corroboración por digestión enzimática con las enzimas HindIII y AgeI. La **Fig. 40** muestra el gel de electroforesis de esta digestión en la que se pudo observar el fragmento esperado para todas las colonias analizadas.



**Figura 40.** Electroforesis de la digestión doble con HindIII y AgeI para corroborar la correcta transformación de *A. tumefaciens*. El fragmento esperado era de 2,918pb, correspondiente al casete completo de gRNAs. Gel de agarosa al 0.7%. kb: kilo bases; PM: marcador de peso molecular; 1: clona uno; 2: clona dos.

Con la correcta transformación de *A. tumefaciens* se procedió a transformar los explantes de tomate con la metodología ya presentada anteriormente. Se sometieron al proceso de transformación 6,588 explantes en 15 lotes diferentes. La **Fig. 41** muestra el resumen del número de explantes por lotes y medio de cultivo.



**Figura 41.** Total de explantes por lote y medio de cultivo. SRM: Medio selectivo de regeneración; SRM + Glu: Medio selectivo de regeneración con el herbicida glufosinato de amonio;\*: indica un cambio de los explantes en medio nuevo.

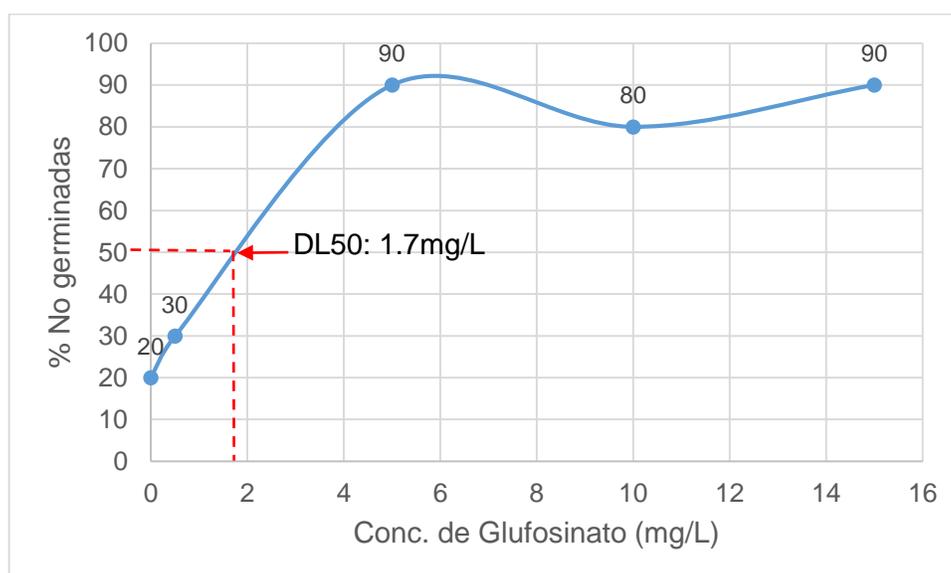
Al obtener la primera planta totalmente regenerada y aclimatada en invernadero se realizaron estudios para verificar si estaba transformada, es decir, si en su genoma se había insertado el fragmento de T-DNA. El resultado obtenido para dicha planta fue negativo, por lo que se hipotetizó que la concentración de glufosinato de amonio utilizada en el medio de selección podría ser muy baja. Por lo que se realizaron dos experimentos diferentes para identificar la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del glufosinato de amonio como agente de selección para el tomate.

En el primer experimento se utilizaron semillas que se pusieron a germinar en medio con distintas concentraciones de glufosinato y se determinó el porcentaje de semillas no germinadas. Estos datos se utilizaron para realizar un análisis Probit para determinar la DL<sub>50</sub>. Para el análisis probit se realizó una regresión

lineal de los datos obtenidos, graficando el porcentaje de semillas no germinadas en unidades Probit vs la concentración de glufosinato de amonio en unidades logarítmicas. Con la obtención del valor de la pendiente ( $b=1.4331$ ) y el punto de intersección del eje y ( $a=4.6702$ ) se calculó la  $DL_{50}$  la cual fue de 1.7 mg/L. La **Tabla 15** y las **Fig. 42** y **43** muestran los resultados de este experimento.

Semillas colocadas	Conc. Glufosinato (mg/L)	Log. Conc.	No germinadas	% No germinadas	% en unidades Probit
10	0	0	2	20	4.16
10	0.5	-0.30103	3	30	4.48
10	5	0.69897	9	90	6.28
10	10	1	8	80	5.84
10	15	1.176091	9	90	6.28

**Tabla 15.** Datos obtenidos del experimento de germinación de semillas en distintas concentraciones de glufosinato y utilizados para el análisis Probit. Evaluación a los 18 días de haber sido colocadas las semillas en el medio.



**Figura 42.** Porcentaje de semillas no germinadas por concentración de glufosinato de amonio utilizado. La flecha roja indica la concentración  $DL_{50}$  obtenida con el análisis Probit.



**Figura 43.** Plántulas obtenidas del experimento de germinación en glufosinato de amonio. La figura muestra la diferencia en tamaños que presentan las plántulas con respecto al control negativo (plántulas germinadas sin herbicida).

Para el segundo experimento se utilizaron explantes para observar el efecto de las distintas concentraciones de glufosinato en la regeneración. Se pudo observar que, en siete días, los explantes en la concentración de 0.5 mg/L presentaron una ligera coloración café y necrosis foliar, en comparación con el control negativo (explantes sin glufosinato). En el caso de los explantes en las concentraciones de 5, 10 y 15 mg/L, a la semana ya presentaban una coloración café total, así como un aspecto necrótico. Al alcanzar las tres semanas en el medio, todos los explantes en medios con glufosinato de amonio presentaron necrosis total (**Fig. 44**). Finalmente se midió a las tres semanas el ancho y largo de cada explante con lo que se observó una

disminución considerable en el tamaño de los explantes en herbicida en comparación con los explantes control (**Fig. 45**).

Con ambos experimentos se determinó que la concentración de glufosinato que se estaba utilizando como agente de selección sí producía efectos sobre la regeneración de los explantes, pero de forma ligera, por lo que la posibilidad de sobrevivencia de plantas no transformadas era elevada. Con este análisis se decidió aumentar la dosis de herbicida en el medio de selección hasta 0.75 mg/L concentración cercana a la DL<sub>50</sub>.

Del total de los explantes sometidos al proceso de transformación (6,588 explantes) el 99.92% sufrió necrosis. El mayor porcentaje de necrosis se observó en el medio de regeneración sin y con glufosinato, siendo de 48.45% y 34.12%, respectivamente. La **Fig. 46** muestra un resumen del total de explantes por medios y el porcentaje de necrosis que ocurrió en cada uno de ellos.

Dentro de las razones que pudieron ocasionar este alto grado de necrosis se consideraron las siguientes: la concentración de hormonas en el medio de regeneración, las condiciones del *A. tumefaciens* en el momento de la infección y el daño en el desarrollo de las células por el knockout de los genes ARL8.

Para la regeneración en cultivo *in vitro* se hace uso de distintos reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas) para propiciar la diferenciación de las células totipotentes en cada uno de los tejidos que conforman la planta, por lo que la combinación y concentración que se utilice de cada una de estas hormonas es la base para poder obtener la regeneración completa de una planta a partir de un explante. La concentración y tipo de hormona que se usa es específica para cada especie, variedad y tipo de explante que se utilice. Cruz y colaboradores reportaron

que el uso de 0.1mg/L de ácido indol acético (IAA) y 2mg/L de zeatina generó una mayor producción de callos en explantes de la variedad Micro-Tom en comparación con el uso de BAP (benzilaminopurina) (Cruz et al., 2011). Titeli y colaboradores reportaron, para la variedad Areti, el uso de medio de regeneración con 0.1mg/L de IAA y 1mg/L de zeatina; y, para la variedad Makedonia, el uso 0.5mg/L de zeatina como las mejores concentraciones de hormonas para la regeneración en estas variedades (Titeli et al., 2011). Sandhya y colaboradores reportaron el uso de 2 mg/L de zeatina en combinación con 0.1 mg/L de IAA como la mejor concentración para la regeneración de explantes de hipocótilo de las variedades Arka Vikas y PED (Sandhya et al., 2022). En este trabajo, el medio de regeneración se formuló con 1 mg/L de IAA y 1 mg/L de zeatina, concentraciones muy distintas a las reportadas para otras variedades, por lo que probar otras concentraciones similares a las reportadas podría mejorar los resultados obtenidos.

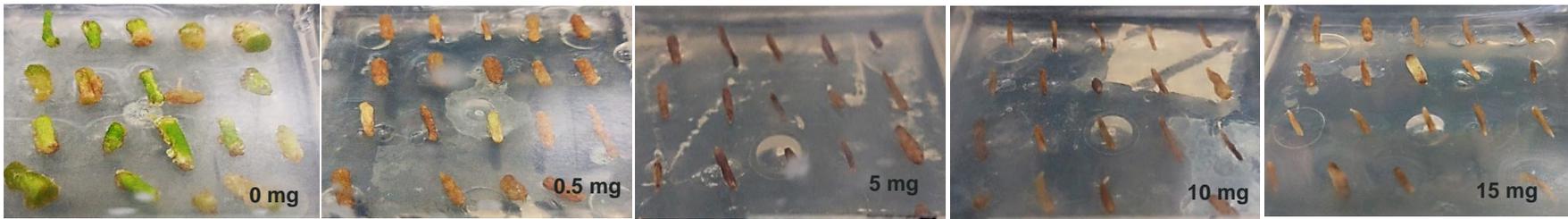
Una gran cantidad de explantes murieron al ser colocados en el medio de regeneración con glufosinato, lo que podría indicar que los explantes no fueron transformados por *Agrobacterium*. Condiciones como el tiempo de exposición de los explantes con la bacteria, el uso de inductores para la transferencia del T-DNA (como la acetosiringona) y la absorbancia a la que se use el inóculo de *Agrobacterium* para el proceso de transformación, influyen en los resultados. Prihatna y colaboradores reportaron el uso de *Agrobacterium* a una densidad óptica (OD<sub>600</sub>) de 0.2; Cruz y colaboradores reportaron una OD<sub>600</sub> de 0.5, y Sandhya y colaboradores de 0.6 (Prihatna et al., 2019; Cruz et al., 2011; Sandhya et al., 2020). En este trabajo, el inóculo de *Agrobacterium* se utilizó a una OD<sub>600</sub> de 0.8-1.0, lo que es una densidad óptica elevada a comparación de lo reportado.

Finalmente, no se descarta la posibilidad de que el silenciamiento de los genes ARL8 en explantes de *S. lycopersicum* pueda ser una mutación que impida el desarrollo y regeneración de las plantas, ya que Kravchik y colaboradores (2022) reportaron no haber podido obtener líneas de *S. lycopersicum* cv M82 con el knockout de los genes ARL8, con lo que ellos concluyeron que dicha mutación impide la regeneración de las plantas (Kravchik et al., 2022). Lo que sugiere que la ausencia de función de ARL8 es esencial para la planta.

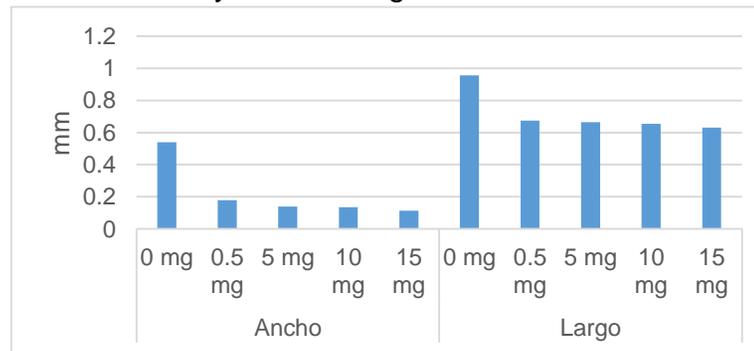
- Una semana en el medio



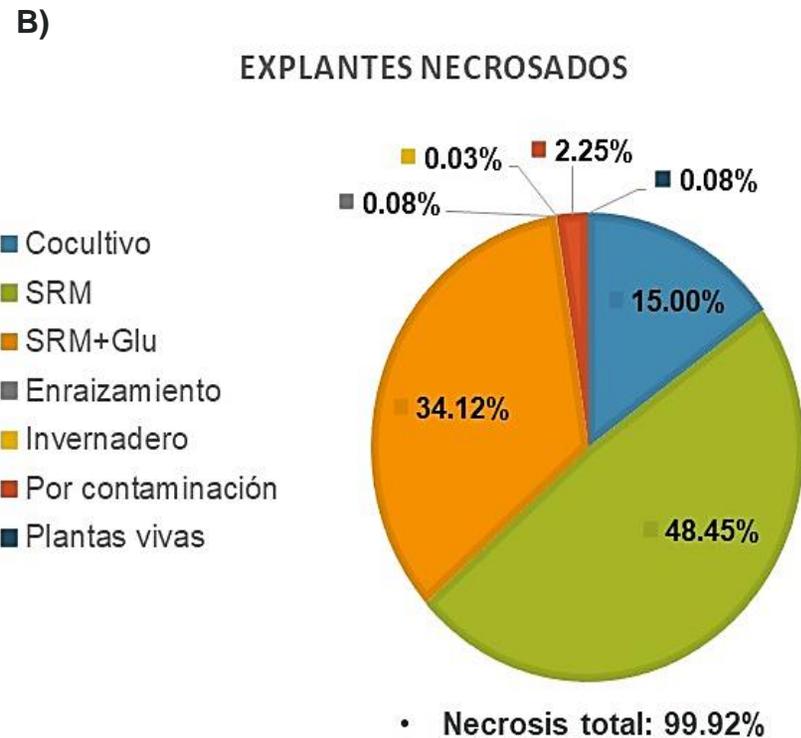
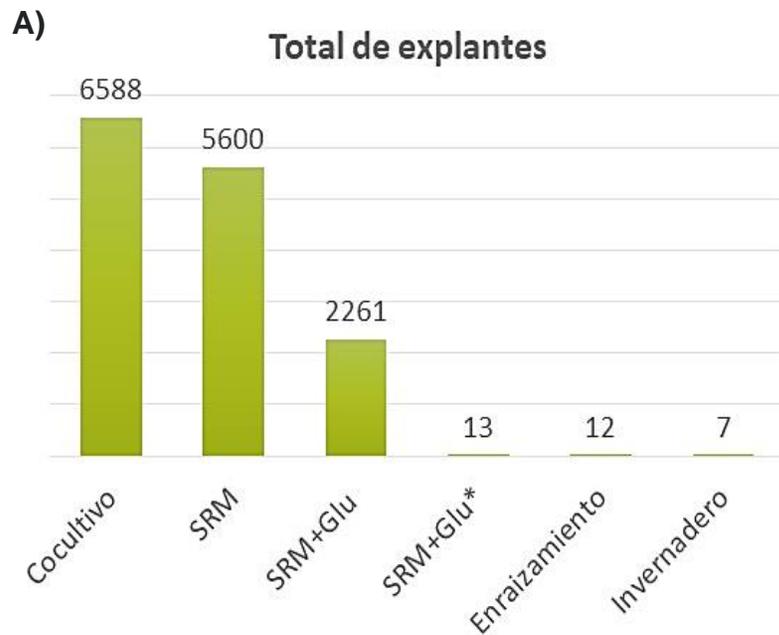
- Dos semanas en el medio



**Figura 44.** Resultados del experimento con explantes en medio de regeneración con glufosinato a distintas concentraciones (primera y segunda semana de incubación). Se logra observar como todos los explantes en medio con glufosinato presentaron una coloración café y diferentes grados de necrosis.



**Figura 45.** Tamaño de los explantes a las tres semanas en el medio con glufosinato.

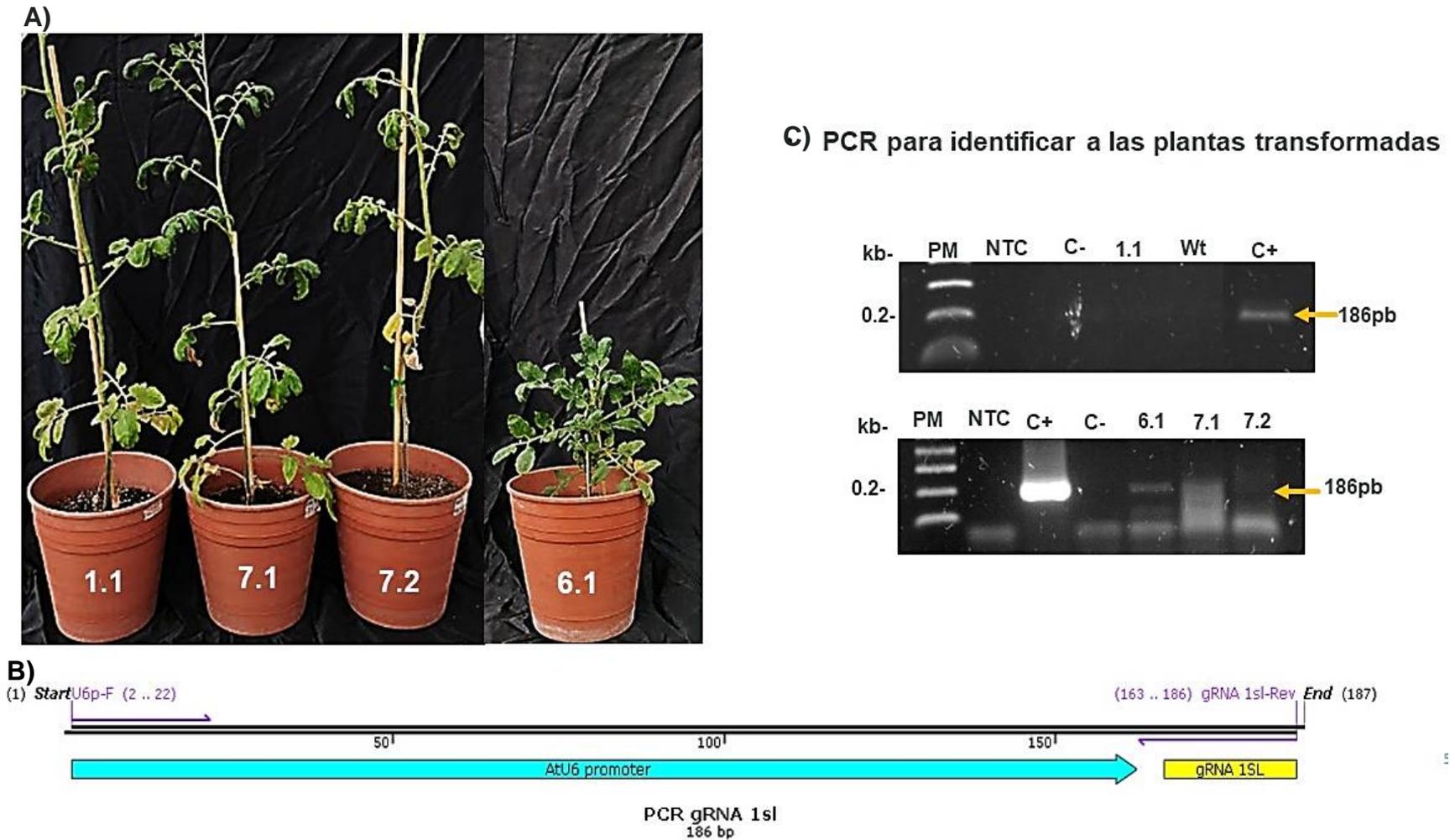


**C)**

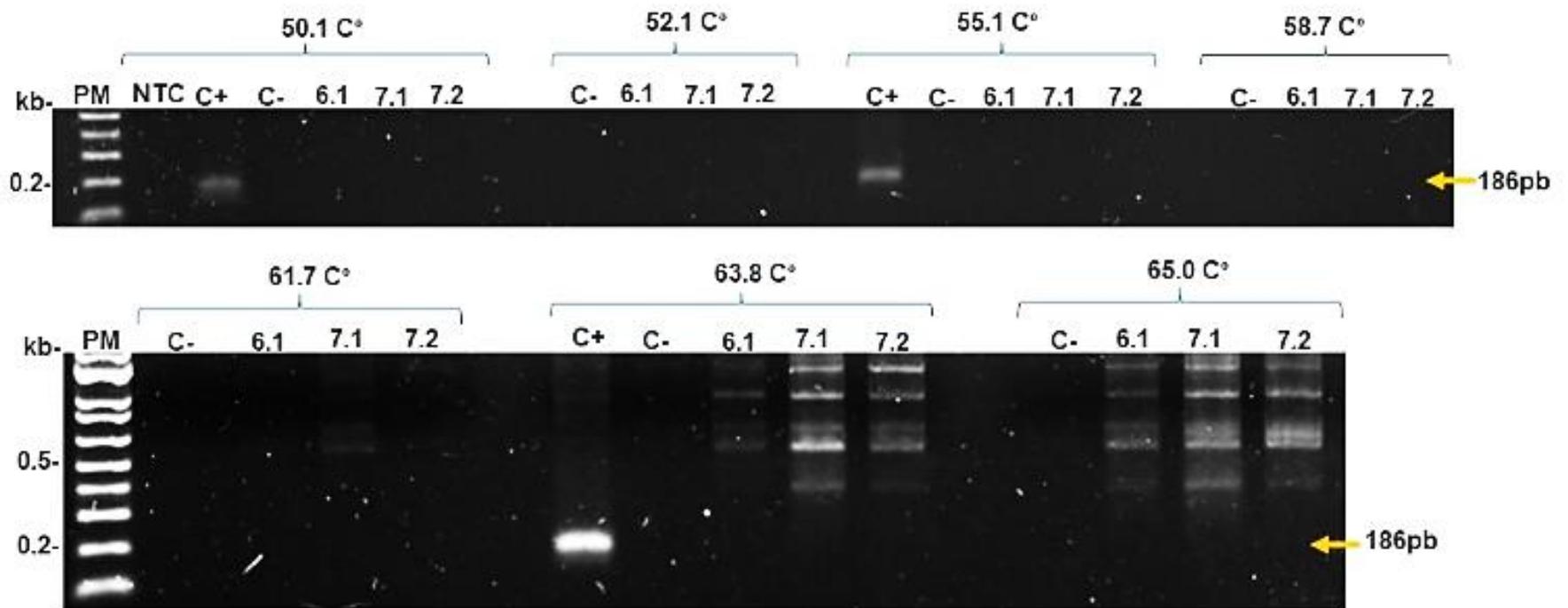
Cocultivo		SRM		SRM+Glu		Enraizamiento		Invernadero		Por contaminación		Plantas vivas	
#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
988	14.99696	3192	48.45173	2248	34.12265	5	0.075896	2	0.030358	148	2.246509	5	0.075896

**Figura 46.** Resumen del proceso de regeneración de *S. lycopersicum* mediante cultivo *in vitro*. **A)** Total de explantes por medio de cultivo. **B)** Porcentaje de explantes necrosados por medio de cultivo. **C)** Número y porcentaje de explantes necrosados por medio de cultivo. SRM: Medio de regeneración; SRM+Glu: Medio de regeneración con glufosinato.

De todos los explantes sometidos al proceso de transformación se lograron aclimatar cinco plantas en el invernadero (plantas 1.1, 6.1, 7.1, 7.2 y 14.1) y a cuatro de éstas (plantas 1.1, 6.1, 7.1, 7.2) se les realizó una prueba de PCR y una prueba de resistencia a glufosinato para identificar la transformación. Con la prueba de PCR se buscó identificar un fragmento de DNA correspondiente al vector de transformación, para lo cual se usó como directo el oligonucleótido U6promoter -FW y como reverso el oligonucleótido gRNA 1sl-RV. La **Fig. 47c** muestra el resultado de la PCR en el que se puede observar que para la planta 6.1 se amplificó un fragmento del tamaño esperado (186 pb). Considerando que la banda obtenida en este primer experimento fue muy tenue, se decidió repetir esta prueba utilizando una muestra nueva de DNA y un gradiente de temperaturas en el rango de los 50°C a los 65°C con el fin de optimizar y validar el resultado obtenido (**Fig. 48**). Sin embargo, con esta PCR no se amplificó el fragmento del tamaño esperado para ninguna de las muestras, por lo que se optó por realizar una prueba de resistencia a glufosinato en hojas. Esta prueba consistió en colocar glufosinato a una concentración de 1 mg/L en dos hojas por cada planta y documentar, mediante fotografías, la presencia de necrosis al día cero y siete (**Fig. 49**). El vector de transformación posee el gen bar (gen de resistencia a glufosinato) por lo que las plantas transformadas deben ser resistentes a este herbicida y no presentar necrosis. En este caso, todas las plantas presentaron necrosis a los siete días con lo que se concluyó que ninguna de ellas estaba transformada.



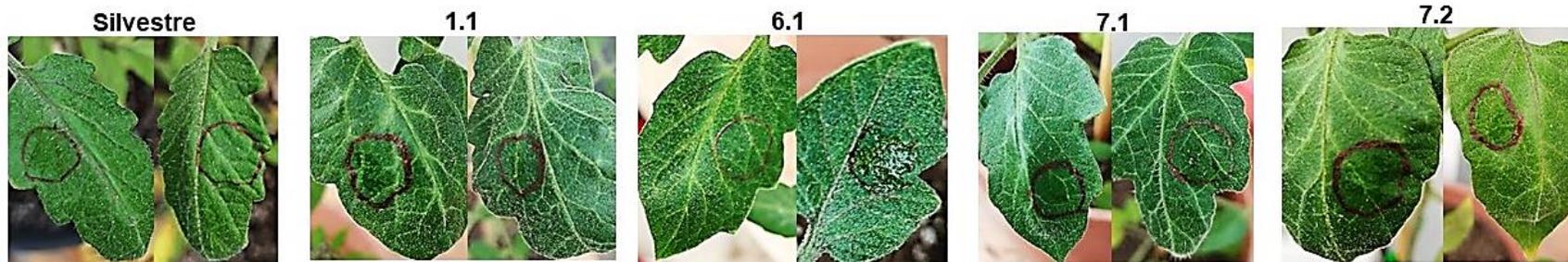
**Figura 47.** Identificación de plantas transformadas. **A)** Plantas aclimatadas en invernadero. **B)** Fragmento del vector de edición identificado mediante PCR. **C)** Electroforesis de la PCR realizada para identificar las plantas transformadas; gel de agarosa al 2%; Tm de 60°C. kb: kilo bases; PM: marcador de peso molecular; NTC: no template control; C-: control negativo; Wt: planta silvestre; C+: control positivo; pb: pares de bases.



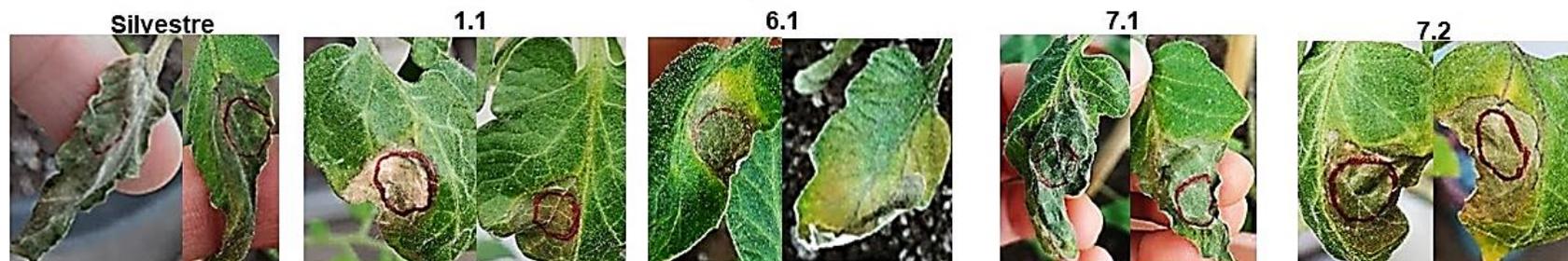
**Figura 48.** Electroforesis de la PCR realizada para identificar las plantas transformadas. Gel de agarosa al 2%. Gradiente de temperatura de 50.1°C a 60°C. kb: kilo bases; PM: marcador de peso molecular; NTC: no template control; C-: control negativo; C+: control positivo; pb: pares de bases.

• Resistencia a glufosinato: día cero

Glufosinato: 1mg/L



• Resistencia a glufosinato: día siete



53

**Figura 49.** Resultados del experimento de resistencia a glufosinato. El círculo indica la posición en la que se aplicó el glufosinato.

Como ya se mostró previamente, no se identificó ninguna de las plantas regeneradas como transformadas; sin embargo, es importante recalcar el fenotipo de la planta 6.1. Esta planta posee un fenotipo diferente a una planta silvestre pues se observa la pérdida de dominancia apical, por lo que es una planta más pequeña (altura de 29 cm), presenta un mayor número de ramas y tiene un aspecto arbustivo (**Fig. 50**). Estas diferencias fenotípicas pueden ser producto de la variación somaclonal.

La variación somaclonal son modificaciones al azar que se generan durante el proceso del cultivo *in vitro*. Estas modificaciones pueden ocurrir a nivel genómico como pequeñas mutaciones puntuales en la secuencia del DNA o mutaciones en los cromosomas como inserciones, deleciones, translocaciones, o cambio en el número de éstos (aneuploidía o poliploidía). También puede haber cambios a nivel epigenómico como la modificación del patrón de metilación o acetilación del DNA y de las histonas. Todas estas modificaciones producto de la variación somaclonal pueden transferirse a las siguientes generaciones, por lo que esta estrategia forma parte de las técnicas de mejoramiento genético para plantas (Duta et al., 2023; Wang et al., 2012).

La planta 6.1 regenerada es un resultado importante obtenido en este proyecto ya que puede presentar características de interés para su producción en campo, como resistencia a diversos factores biótico o abióticos o una mayor facilidad para su producción debido a su diferencia de tamaño.



54

**Figura 50.** Fenotipo de la planta regenerada 6.1. **A, B y C)** Planta 6.1. **D)** Comparación entre una planta silvestre (wt) y la planta 6.1. **E)** Comparación entre las plantas 7.2 y 6.1, ambas plantas provienen del cultivo *in vitro* y fueron trasplantadas a tierra el mismo día. La planta 7.2 tiene una altura de 100cm y la planta 6.1 de 29 cm.

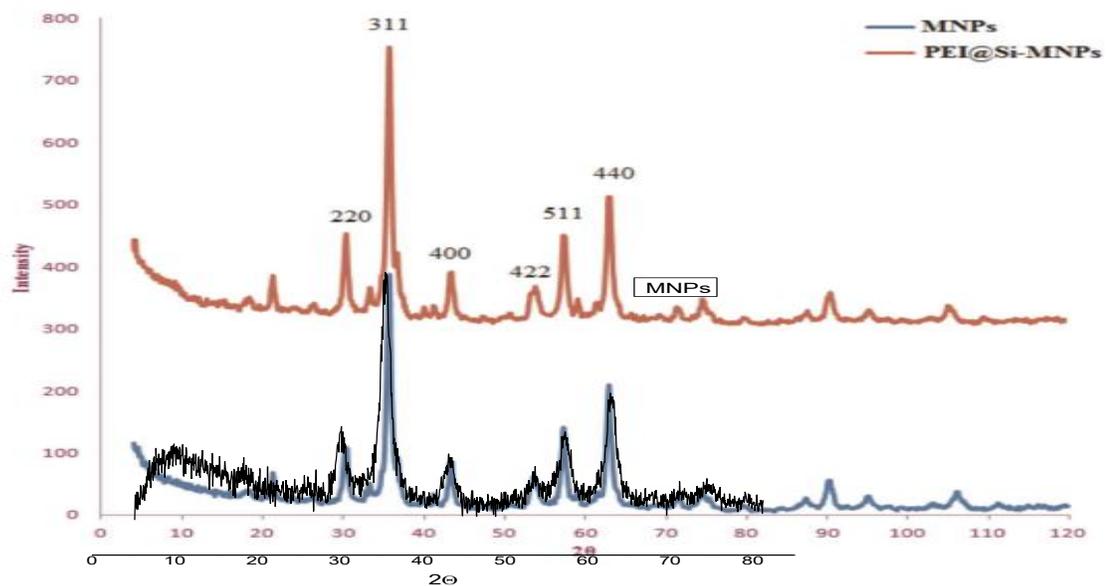
## 7.5 Transformación genética de Chile

Para la transformación de Chile utilizando el método de magnetofección de polen, primero se colocaron a germinar semillas de Chile serrano variedad Tampiqueño para obtener plantas como fuente de polen. Esta variedad fue seleccionada con base en los resultados obtenidos por Ortiz y colaboradores quienes reportaron dicha variedad como susceptible a la infección contra el virus ToBRFV (Ortiz et al., 2021).

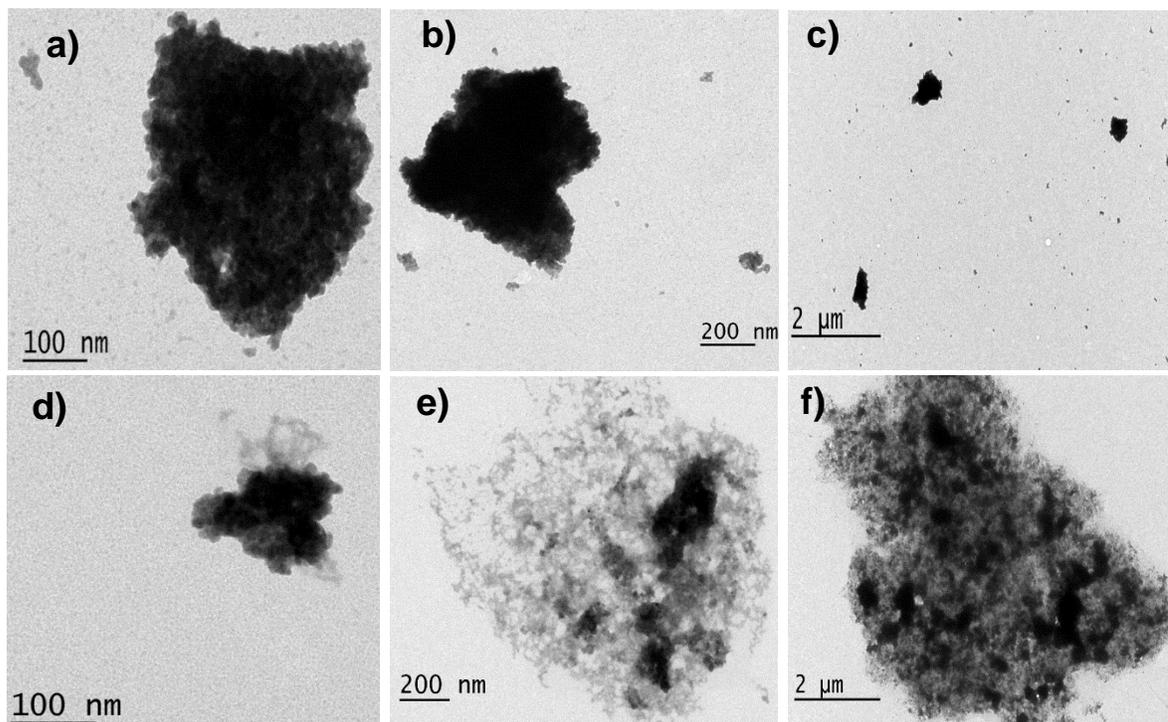
Durante el crecimiento de las plantas para la obtención de polen, se sintetizaron las MNPs con el protocolo ya mencionado obteniéndose 1.44 g de MNPs funcionalizadas con PEI. Para la caracterización de las MNPs se realizaron estudios de XRDP, obtención de micrografías TEM, análisis electroforéticos y digestión enzimática para identificar la proporción de concentraciones correcta para la interacción entre las MNPs y el DNA.

Con el estudio de XRDP se buscó conocer el patrón de difracción de las MNPs para compararlo con el patrón de difracción reportado por Khoobi y colaboradores, ya que se siguió parte de su protocolo en la síntesis de las MNPs (Khoobi et al., 2015). La **Fig. 51** muestra ambos patrones de difracción, en los que se observa que los picos de difracción son los mismos.

Las MNPs poseen un tamaño aproximado de 5 a 10 nm según lo reportado por Khoobi y suelen formar agregados de distintos tamaños. Con las micrografías de TEM se logró identificar cúmulos con un tamaño de 150 a 600 nm para las MNPs sin interactuar con el DNA y para las MNPs interactuando con el DNA en una proporción 1:16 se observaron cúmulos más grandes con un tamaño de 150nm a 8  $\mu$ m (**Fig. 52**).

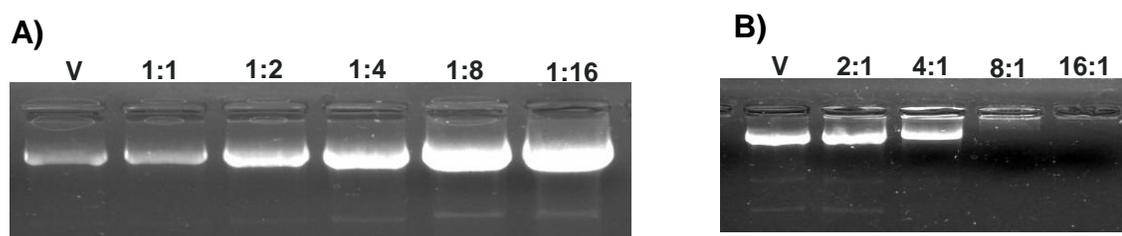


**Figura 51.** Comparación entre los difractogramas de las MNPs sintetizadas por Khoobi y col. (color azul y rojo) y las sintetizadas en este proyecto (color negro).

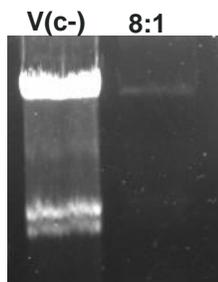


**Figura 52.** Micrografías TEM de las MNPs (a, b, c) y de las MNPs-DNA (d,e,f).

Para encontrar la mejor concentración en la que eficientemente se coordinan las MNPs y el DNA en las que se esperaría no hubiera un exceso de DNA libre, se realizaron dos experimentos: un análisis electroforético en gel de agarosa utilizando distintas proporciones de concentración entre las MNPs y el DNA, y una digestión enzimática con las enzimas HindIII y AvrI. Con el primer experimento se identificó la proporción correcta en la cual las MNPs se encontraban completamente saturadas con el DNA. En estado de saturación, la carga neta del complejo es cero, por lo tanto, en el gel de agarosa no se observaría un desplazamiento del DNA. La proporción de saturación identificada fue de 8:1 MNPs:DNA (**Fig. 53**). Para la digestión enzimática se utilizó la proporción correcta identificada (8:1) y el plásmido sin interactuar como control negativo. La interacción de las MNPs con el DNA protege las moléculas de DNA impidiendo que las enzimas de restricción puedan realizar el corte en la cadena de ácidos nucleicos, por lo que en este experimento se esperaba observar dos bandas para el control negativo y ausencia de bandas en la muestra de MNPs-DNA (**Fig. 54**). El resultado obtenido confirmó que el complejo MNPs-DNA era estable y resistente después de 24 horas, tiempo que duró el experimento.

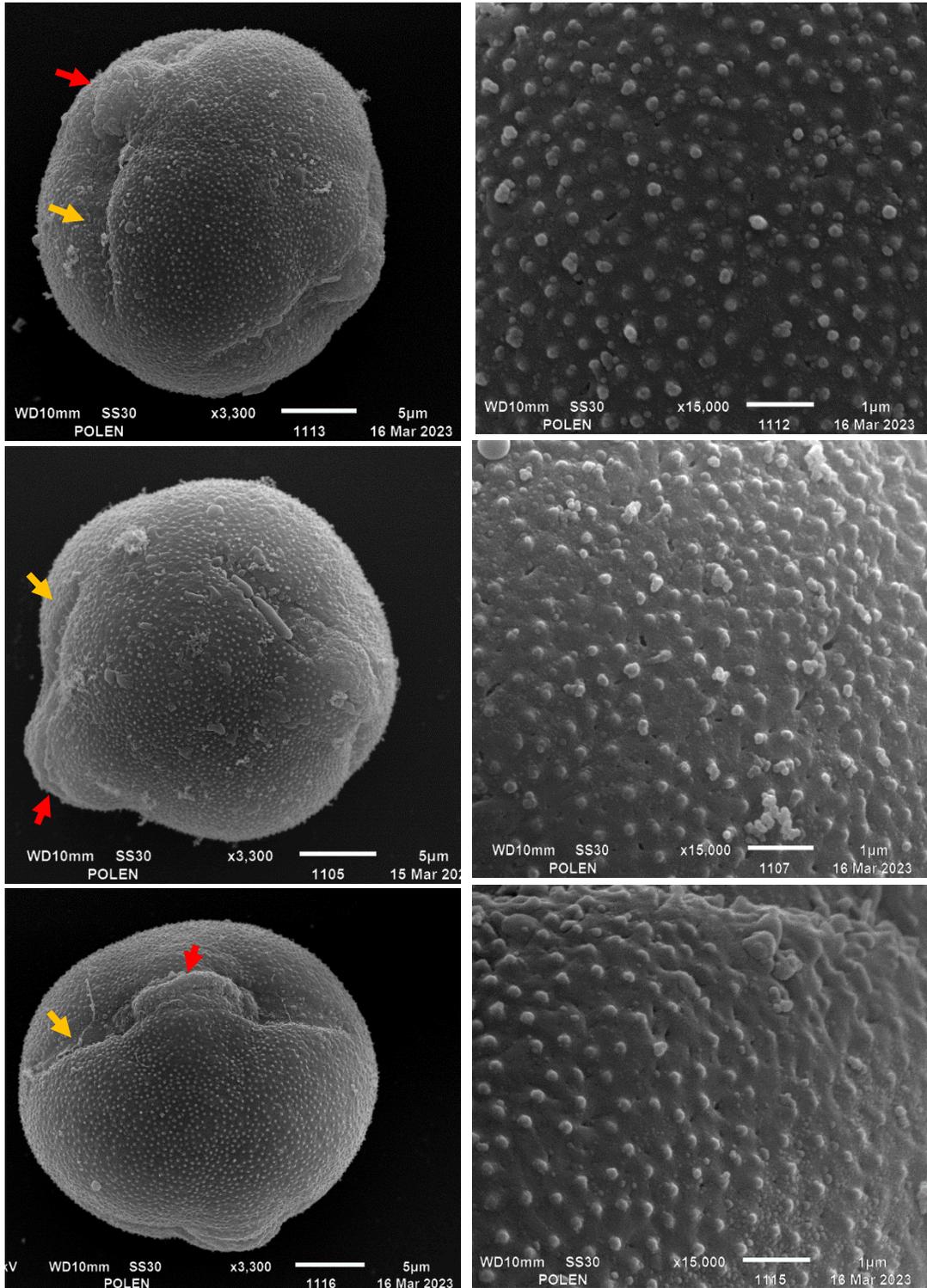


**Figura 53.** Electroforesis de la migración del complejo MNPs-DNA probando distintas proporciones de concentraciones. **A)** Experimento variando la concentración de DNA; **B)** Experimento variando la concentración de MNPs. Geles de agarosa al 0.8%. V: vector.



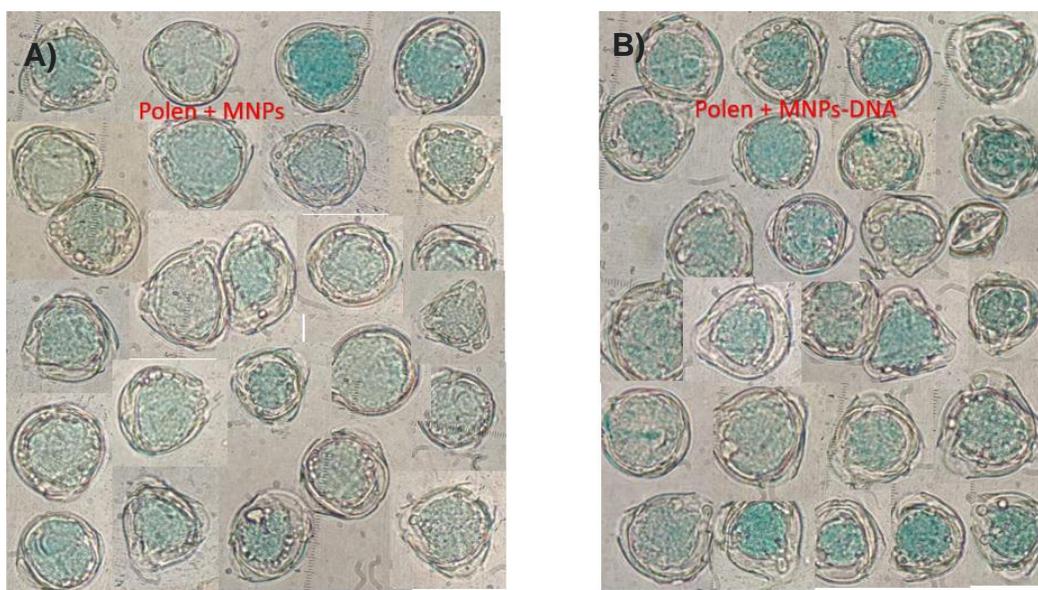
**Figura 54.** Electroforesis de la doble digestión con las enzimas HindIII y AvrI del complejo MNPs-DNA 16:1. Gel de agarosa al 0.8%. V(c-): vector pBUN4U6SM-gRNA3-2-1-Ca utilizado como control negativo. 8-1 complejo MNPs-DNA.

Además de caracterizar las MNPs, se realizó una caracterización por SEM para los granos de polen de la variedad a utilizar con el fin de identificar la presencia de aperturas en la membrana que permitan la introducción de las MNPs-DNA. Con las micrografías SEM se determinó el tamaño de los granos de polen, los cuales tiene un diámetro aproximado de 20 a 30  $\mu\text{m}$ , por lo que se consideran granos medianos (**Fig. 55**). Los granos tuvieron una forma elipsoide donde el diámetro del plano polar fue mayor por lo que son granos prolados. Además, presentaron dos o tres aperturas en forma de surcos (colpos) que se extienden de polo a polo y aperturas redondas (poros de un diámetro aproximado de 9  $\mu\text{m}$ ) en la zona central de cada colpo, por lo que se clasificaron como tricolporados o dicolporados (Halbritter et al., 2018). La exina, que es la capa exterior que cubre los granos de polen, presentó pequeñas porosidades circulares o alargadas con un tamaño aproximado de 75 a 200nm y fue más delgada en la zona de las aperturas, sitio por el que se espera que las MNPs-DNA entren al núcleo del polen (Halbritter et al., 2018; Zhao et al., 2017).



**Figura 55.** Micrografías SEM de los granos de polen de Chile serrano variedad tampiqueño. Las flechas amarillas indican los colpos y las rojas los poros.

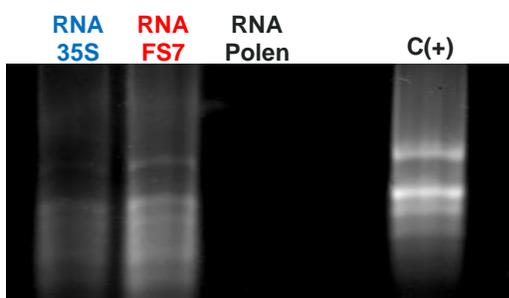
Ya con la MNPs sintetizadas y las plantas produciendo polen se comenzó con los experimentos para verificar el funcionamiento de las MNPs en el proceso de transformación, utilizando un vector para la expresión del gen GUS (vector pBGWFS7 e35S). En primer lugar, se realizó un experimento magnetofectando una muestra de polen con las MNPs (control negativo) y otra con las MNPs-DNA (muestra problema); ambas muestras se dejaron en medio de germinación por 24 horas. Cuando transcurrió este tiempo se eliminó el medio de germinación con una pipeta y se agregó un ml de solución conteniendo el sustrato X-Gluc de la enzima glucuronidasa. El resultado esperado era la coloración azul de los granos en la muestra problema y ausencia de coloración en el control negativo; sin embargo, en ambas muestras los granos presentaron una coloración azul (**Fig. 56**). Algunas bacterias pueden expresar la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, por lo que su presencia en el polen puede dar falsos positivos, indicado por la coloración azul en ambas muestras (Dashnyam et al., 2018).



**Figura 56.** Tinción x-gluc de las muestras de polen magnetofectadas. **A)** Control negativo; **B)** Muestra problema.

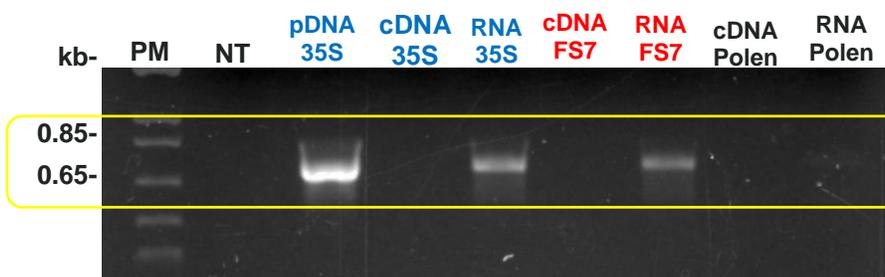
Debido al resultado falso positivo que se obtuvo con la tinción x-gluc, se optó por realizar la comprobación mediante RT-PCR. El vector pBGWFS7 e35s posee el gen para expresar la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y la proteína verde fluorescente (GFP), por lo que en esta RT-PCR se trató de amplificar el mRNA correspondiente al gen GFP como evidencia de la expresión del vector y, por lo tanto, el correcto funcionamiento de las MNPs como transportadoras del vector al núcleo del polen. En esta prueba, se hizo uso de dos controles negativos: una muestra de polen magnetofectado solo con las MNPs más agua y otra muestra de polen magnetofectado con el vector pBGWFS7 (vector que posee el gen GFP, pero carece del sitio promotor por lo que el gen no debe expresarse). Las muestras magnetofectadas se dejaron en medio de germinación durante 24 horas y, transcurrido este tiempo, se realizó la extracción de RNA para el estudio de RT-PCR.

La integridad del RNA se verificó mediante un gel de agarosa al 1.4% (**Fig. 57**). En el gel se pudo observar que las tres muestras presentaron degradación, incluso en el control negativo donde solo se usó polen y MNPs, no se apreció la presencia de bandas. La muestra con mejor integridad del RNA fue el control negativo con el vector pBGWFS7.



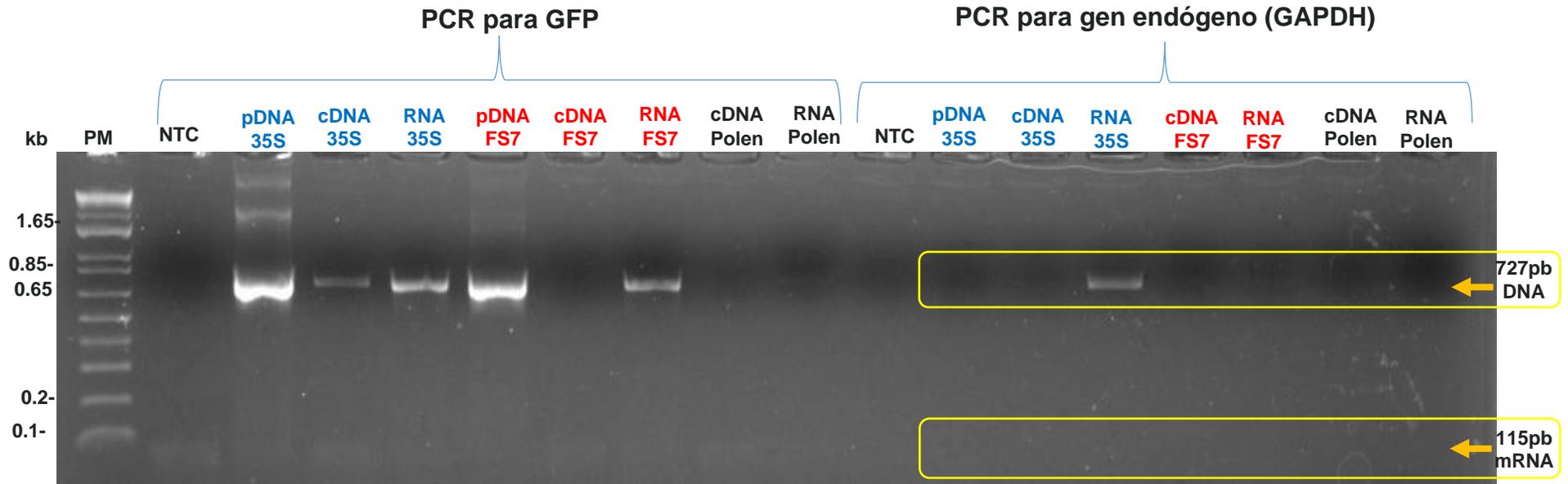
**Figura 57.** Electroforesis para verificar la integridad del RNA. **RNA 35S:** polen magnetofectado con vector pBGWFS7 e35S; **RNA FS7:** polen magnetofectado con vector pBGWFS7; **RNA Polen:** polen magnetofectado con MNPs; C(+): RNA con buena integridad. Gel de agarosa al 1.4%.

Aunque las muestras no presentaron un alto grado de integridad en el gel de agarosa, se utilizaron para la síntesis de cDNA y la amplificación por PCR. La **Fig. 58** muestra el resultado de la PCR realizada con estas muestras en las que se esperaba la amplificación de un fragmento de 700 pb para el cDNA de la muestra problema y la ausencia de bandas en las muestras de control negativo. Sin embargo, hubo amplificación del fragmento esperado en la muestra de RNA problema y del control negativo con el vector pBGWFS7, lo que se pudo deber a residuos del plásmido durante el proceso de magnetofección, ya que se utilizó un microgramo de cada vector y pudo no ser eliminado totalmente durante la extracción de RNA.



**Figura 58.** Resultado de la RT-PCR para identificar el mRNA del gen GFP. Kb: kilobases; PM: marcador de peso molecular; NTC: no template control; **pDNA 35S**: vector pBGWFS7 e35S; **cDNA** y **RNA 35s**: cDNA y RNA del polen magnetofectado con el vector pBGWFS7 e35s; **cDNA** y **RNA FS7**: cDNA y RNA del polen magnetofectado con el vector pBGWFS7; **cDNA** y **RNA polen**: cDNA y RNA del polen magnetofectado con MNPs.

Para validar la correcta síntesis del cDNA, se volvió a sintetizar cDNA y se realizó de nuevo la PCR para GFP y PCR del gen endógeno GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa). La **Fig. 59** muestra el resultado de la PCR en la que se pudo observar que no se obtuvo la banda esperada de 115 pb correspondiente a la amplificación del mRNA de GAPDH.



**Figura 59.** Resultado de la RT-PCR para identificar el mRNA del gen GFP y del gen endógeno GAPDH. La amplificación de una banda de 727pb en el gen GAPDH corresponde al DNA y la banda de 115 pb corresponde al mRNA, siendo esta última la banda de interés para corroborar la correcta síntesis del cDNA. kb: kilobases; PM: marcador de peso molecular; NTC: no template control; **pDNA 35S**: vector pBGWFS7 e35S; **cDNA** y **RNA 35s**: cDNA y RNA del polen magnetofectado con el vector pBGWFS7 e35s; **pDNA FS7**: vector PBGWFS7; **cDNA** y **RNA FS7**: cDNA y RNA del polen magnetofectado con el vector pBGWFS7; **cDNA** y **RNA polen**: cDNA y RNA del polen magnetofectado con MNPs.

Zhao y colaboradores reportaron en 2017 la correcta magnetofección de polen de algodón en donde confirmaron la expresión del gen Gus mediante la tinción X-gluc y la internalización de las MNPs-DNA mediante espectroscopia de dispersión de energía (energy dispersive spectroscopy o EDS) (Zhao et al., 2017). Por otra parte, Vejlupkova y colaboradores reportaron el uso de magnetofección de polen para transformar plantas monocotiledóneas (lirio, sorgo y maíz) en las cuales no se logró la transformación (Vejlupkova et al., 2017).

Los resultados obtenidos con la tinción para la  $\beta$ -glucuronidasa y la RT-PCR no permitieron elucidar si las MNPs se encuentran funcionando en el proceso de magnetofección, ya que los controles negativos resultaron positivos y la integridad del RNA no fue la adecuada, por lo que dichos experimentos deben repetirse. Además, es importante mencionar que en estos experimentos no se había determinado la proporción adecuada para formar el complejo MNPs-DNA en estado de saturación, por lo que los próximos experimentos deben repetirse con la proporción adecuada para evitar inconsistencias por esta variable.

## 8. CONCLUSIONES

- Con los objetivos planteados fue posible corroborar la hipótesis y desarrollar una estrategia de edición innovadora para ambas especies. Sin embargo, aún es necesario estandarizar ciertas etapas del proceso para tener mejores rendimientos.
- Se determinó, como principal candidato para generar resistencia en plantas de *S. lycopersicum* y *C. annuum* mediante edición genética, al gen ARL8.
- Se diseñaron gRNAs específicos para cada uno de los genes de ARL8 presentes en los genomas de *S. lycopersicum* y *C. annuum*.
- Se generó el vector pBUN4U6SM + poly para poder obtener los vectores con gRNAs múltiples. Para las plantas de *S. lycopersicum* se generó el vector pBUN4U6SM-gRNA4-3-2-1-SI donde se clonaron cuatro gRNAs distintos y para las plantas de *C. annuum* se construyó el vector pBUN4U6SM-gRNA3-2-1-Ca con tres gRNAs distintos.
- Se sometieron al proceso de transformación 6,588 explantes de *S. lycopersicum*, de los cuales, se tienen 5 plantas ya aclimatadas en invernadero.
- Se sintetizaron y caracterizaron las MNPs para el proceso de magnetofección de polen y se realizaron algunas pruebas de magnetofección que aún requieren estandarización.
- De las cinco plantas regeneradas, la planta 6.1 presentó un fenotipo diferente en comparación con las plantas silvestres, lo que puede representar características de interés biotecnológico.

## 9. PERSPECTIVAS

Para corroborar si el alto porcentaje de necrosis obtenido en el proceso de cultivo *in vitro* se debe a alguna de las causas ya mencionadas previamente, se recomienda repetir esta etapa utilizando las concentraciones de hormonas y de OD<sub>600</sub> para *A. tumefaciens* reportadas en la literatura. En primer lugar, con lotes control para estandarizar las condiciones correctas para la variedad y el tipo de explante utilizado y, posteriormente, ya definidos esos parámetros, con lotes transformados con el vector de edición para el gen ARL8.

Respecto a la planta 6.1, se recomienda darle seguimiento para poder observar si sus características fenotípicas se mantienen en las siguientes generaciones y evaluar si, además, presenta resistencia contra algunos factores bióticos o abióticos.

Finalmente, para el proceso de magnetofección de polen, se recomienda repetirlo con las condiciones de interacción MNPs-DNA ya estandarizadas para determinar si el proceso funciona. De funcionar, se recomienda proceder con la polinización artificial de las plantas.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Anexo 1 Medios para transformación genética de tomate.

#### Medio para germinar semillas de tomate

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X MS</li><li>• 2.8 mg/L Sulfato ferroso</li><li>• 3.8 mg/L NaEDTA</li><li>• 0.59 g/L MES</li><li>• 30 g/L Sacarosa</li><li>• *****pH 5.8</li><li>• 2 g/L gelrite o phytogel</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X Vitaminas B5</li></ul>

#### Medio líquido de infección

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1/10X MS</li><li>• 30 g/L Sacarosa</li><li>• *****pH 5.8</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• IAA (1mg/L)</li><li>• Zeatina (1mg/L)</li><li>• Acetosyringona (40mg/L)</li></ul>

#### Medio de co-cultivo para tomate

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X MS</li><li>• 2.8 mg/L Sulfato ferroso</li><li>• 3.8 mg/L NaEDTA</li><li>• 0.59 g/L MES</li><li>• 30 g/L Sacarosa</li><li>• *****pH 5.8</li><li>• 6 g/L gelrite o phytogel</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X Vitaminas B5</li><li>• IAA (1mg/L)</li><li>• Zeatina (1mg/L)</li><li>• Acetosyringona (40mg/L)</li></ul>

### Medio liquido de lavado de explantes\*\* en caso de infección masiva.

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X MS</li><li>• 30 g/L Sacarosa</li><li>*****pH 5.8</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Meropenen 100mg/L</li></ul>

### Medio de regeneración de brotes e inhibición de crecimiento de *Agrobacterium*

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X MS</li><li>• 2.8 mg/L Sulfato ferroso</li><li>• 3.8 mg/L NaEDTA</li><li>• 0.59 g/L MES</li><li>• 30 g/L Sacarosa</li><li>*****pH 5.8</li><li>• 6 g/L gelrite o phytogel</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X Vitaminas B5</li><li>• IAA (1mg/L)</li><li>• Zeatina (1mg/L)</li><li>• Meropenen (100mg/L)</li></ul>

### Medio SRM con presión de selección

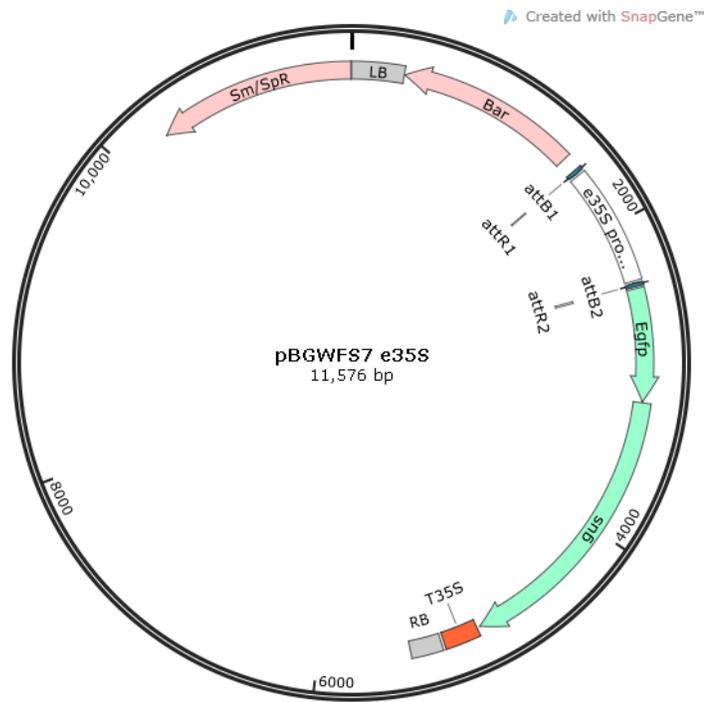
Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X MS</li><li>• 2.8 mg/L Sulfato ferroso</li><li>• 3.8 mg/L NaEDTA</li><li>• 0.59 g/L MES</li><li>• 30 g/L Sacarosa</li><li>*****pH 5.8</li><li>• 6 g/L gelrite o phytogel</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X Vitaminas B5</li><li>• IAA (1mg/L)</li><li>• Zeatina (1mg/L)</li><li>• Meropenen (100mg/L)</li><li>• Glufosinato (0.75mg/L)</li></ul>

### Medio de enraizamiento

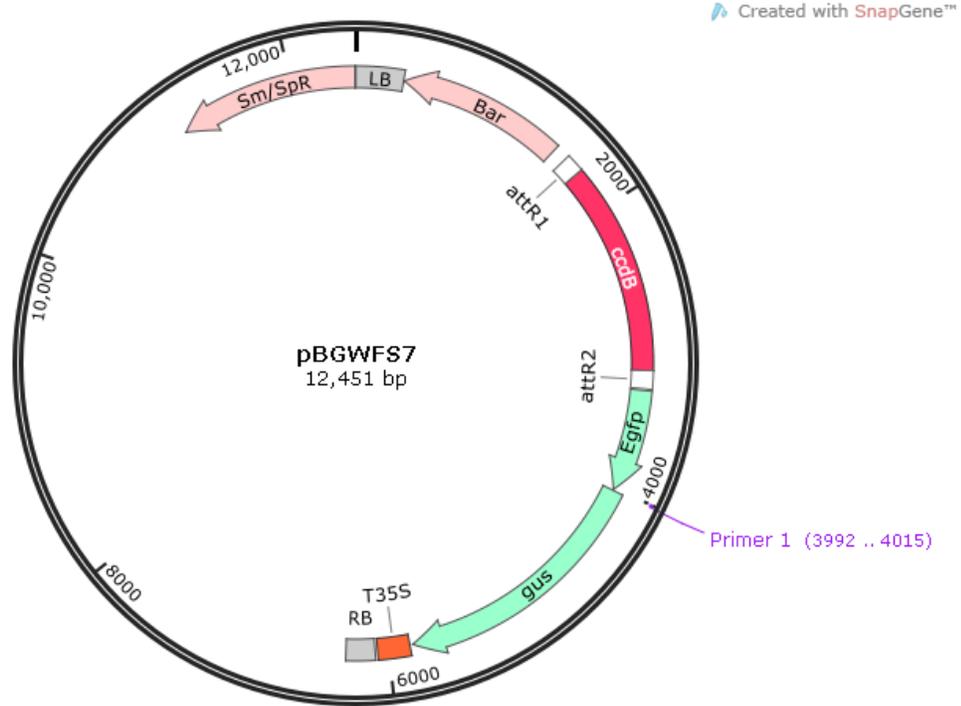
Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración
<ul style="list-style-type: none"><li>• 0.5X MS</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X Vitaminas B5</li></ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2.8 mg/L Sulfato ferroso</li> <li>• 3.8 mg/L NaEDTA</li> <li>• 0.59 g/L MES</li> <li>• 30 g/L Sacarosa</li> <li>• *****pH 5.8</li> <li>• 6 g/L gelrite o phytogel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IBA (1mg/L)</li> <li>• Meropenen (100mg/L)</li> <li>• Glufosinato (0.75mg/L)</li> </ul>
---	--

**10.2 Anexo 2 Vector pBGWFS7 e35S**



### 10.3 Anexo 3 Vector pBGWFS7



### 10.4 Anexo 4. Medio de germinación para polen

Esterilizados por autoclave	Esterilizados por filtración
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 15g/100ml sucrosa</li> <li>• 10.3mg/100ml H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></li> <li>• 5.3mg/100ml KNO<sub>3</sub></li> <li>• 10.3mg//100ml CaNO<sub>3</sub></li> <li>• 51.7mg/100ml MnSO<sub>4</sub></li> <li>• 10.3mg/100ml MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3mg GA3</li> </ul>

## 11. REFERENCIAS

- Abraham Cruz-Mendívil, J. R.-L.-B.-M.-V.-V.-M.-O. (2011). A Simple and Efficient Protocol for Plant Regeneration and Genetic Transformation of Tomato cv Micro-Tom from Leaf Explants. *HORTSCIENCE*, VOL. 46(12).
- Avner Zinger, M. L.-F. (2021). Identification and Mapping of Tomato Genome Loci . *Plants*, 10, 179. <https://doi.org/10.3390/plants10010179>.
- Cahya Prihatna, R. C. (2019). Optimisation of regeneration parameters improves transformation efficiency of recalcitrant tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01583-w>.
- Citovsky, T. T. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 147-154 DOI 10.1016/j.copbio.2006.01.009.
- Dulam Sandhya, P. J. (2020). The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18:25 <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00036-8>.
- Dulam sandhya, P. J. (2022). Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103292>.
- FAO. (2021). *FAOSTAT*. Obtenido de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Frank C. Lanfermeijer, J. D. (2003). Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-22 from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology*, 52: 1030-1049.
- Gao, C. (2021). Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 1621- 1635 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.005> .
- Georgiana Duta-Cornescu, N. C.-M.-G. (2023). Somaclonal Variation—Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>.
- Greene, C. X. (2021). DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends in Genetics*, 639-656 <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.02.008>.
- Hagit Hak, Z. S. (2021). The Tomato Brown Rugose Fruit Virus Movement Protein Overcomes Tm-22 Resistance in Tomato While Attenuating Viral Transport. *MPMI*, <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-21-0023-R>.

- Heidemarie Halbritter, S. U.-R. (2018). *Pollen Morphology and Ultrastructure*. In: *Illustrated Pollen Terminology*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6_3).
- Ishikawa, K. I. (2014). Mechanisms of tomato mosaic virus RNA replication and its inhibition by the host resistance factor Tm-1. *Current Opinion in Virology*, 9:8-13 <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.08.005>.
- Jannat Shopan, X. L. (2020). Eukaryotic Translation Initiation Factors Shape RNA viruses resistance in plants. *Horticultural plant journal*, 81-88.
- Jean-Luc Gallois, B. M.-R. (2018). Role of the Genetic Background in Resistance to Plant Viruses. *MDPI*, 19, 2856; doi:10.3390/ijms19102856.
- JURGENLOGEMANN, J. S. (1987). Improved Method for the Isolation of RNA from Plant Tissues. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 16-20.
- Krishan Kumar, G. G. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251:91 <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>.
- Luis Enrique Ortiz Martínez, D. L. (2021). Respuesta de variedades de chile a la infección con Tomato brown rugose fruit virus. *Summa Phytopathol*, 209-214 .
- Madhu Tiwari, A. K. (2022). Agrobacterium-mediated gene transfer: recent advancements . *Planta*, 256:37 <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03951-x>.
- Masaki Nishikiori, M. M. (2011). A Host Small GTP-binding Protein ARL8 Plays Crucial Roles in Tobamovirus RNA Replication. *PLoS Pathog*, 7(12): e1002409. doi:10.1371/journal.ppat.1002409.
- Masayoshi Hashimoto, Y. N. (2016). Recessive resistance to plant viruses: potential resistance genes beyond translation initiation factors. *Frontiers in Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01695>.
- Masayuki Ishikawa, T. Y. (2022). Tomato brown rugose fruit virus resistance generated by quadruple knockout of homologs of TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION1 in tomato. *Plant physiology*, 1-8, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac103>.
- Masayuki ISHIKAWA, Y. O. (2004). Replication of tobamovirus RNA. *Proc. Jpn. Acad., Ser. .*
- Mayank Anand Gururani, J. V. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions . *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51-65 <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.002>.
- Mehdi Khoobi, T. M. (2015). Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles:. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2017-226 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.09.044>.

- Michael Kravchik, Y. S. (2022). Knockout of SITOM1 and SITOM3 results in differential resistance to tobamovirus in tomato. *Molecular plant pathology*, DOI: 10.1111/mpp.13227.
- Michie Kobayashi, A. Y.-K. (2011). Identification of an amino acid residue required for differential recognition of a viral movement protein by the Tomato mosaic virus resistance gene Tm-22. *Journal of Plant Physiology*, 1142-1145 doi:10.1016/j.jplph.2011.01.002.
- Neta Luria, E. S.-R. (2017). A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0170429.
- Oberacker. (2019). Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid manipulation. . *PLoS Biology*, 17(1), <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000107>.
- OEPP (2020). Bulletin OEPP 0. DOI: 10.1111/epp.12711.
- Punsaldulam Dashnyam, R. M.-J.-C. (2018).  $\beta$ -Glucuronidases of opportunistic bacteria are the major contributors to xenobiotic-induced toxicity in the gut. *Nature Scientific Reports* , DOI:10.1038/s41598-018-34678-z.
- Richard A. Kahn, J. C. (2006). Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *The Journal of Cell Biology*, 645-650 <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200512057>.
- Rui Zhang, Z. M. (2019). *Transgenic Cotton: Methods and Protocols*. Greenville, NC, USA: Springer Nature.
- SADER, S. (2018). *Análisis de riesgo para el tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) en México*. México.
- SAGARPA. (2017). *Planeación agrícola nacional 2017-2030*. México.
- Sagarpa. (2017). *Planeación agrícola nacional 2017-2030. Chiles y pimientos Mexicanos*. México.
- Salvatore Davino, A. G. (2020). Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Seed Transmission Rate and Efficacy of Different Seed Disinfection Treatments. . *Plants* , 9, 1615; doi:10.3390/plants9111615.
- SIAP. (2022). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Obtenido de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sunil Kumar, A. K. (2012). Inhibition of TMV multiplication by siRNA constructs against TOM1 and TOM3 genes of *Capsicum annuum*. *Journal of Virological Methods*, 78-85 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.014>.

- Teruaki Iyama, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 620-636 <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>.
- Tianyuan Chen, D. L. (2017). Antiviral Resistance Protein Tm-22 Functions on the Plasma Membrane. *Plant Physiology*, [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.01512](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.01512).
- Vaia Styliani Titeli, I. Z.-O. (2011). Development of a Simple and Low-Resource Regeneration System of Two Greek Tomato Varieties. *Agriculture*, 11, 412. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050412>.
- Vanessa Vernoud, A. C. (2003). Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology*, pp. 1191–1208, [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org).
- Wang, A. K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep*, 31:597–620 .
- X. Robert Bao, Y. P. (2021). Tools for experimental and computational analyses of off-target editing by programmable nucleases. *NATURE PROTOCOLS*, 10-26 <http://crossmark.crossref.org/dialog/?doi=10.1038/s41596-020-00431-y&domain=pdf>.
- Xiang Zhao, Z. M. (2017). Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature plants*, 956-964 <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0063-z>.
- Yayoi Tsujimoto, T. N.-a. (2003). Arabidopsis TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *The EMBO Journal*, 335-343.
- Yonatan Maayan, E. P. (2018). Using genomic analysis to identify tomato Tm-2 resistance-breaking mutations and their underlying evolutionary path in a new and emerging tobamovirus. *Springer Nature*, <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3819-5>.
- Yonatan Maayan, E. P. (2018). Using genomic analysis to identify tomato Tm-2 resistance-breaking mutations and their underlying evolutionary path in a new and emerging tobamovirus. *Springer Nature*, <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3819-5>.
- Zhi-Yong Yan, H.-Y. M.-S.-P.-D. (2021). Identification of genetic determinants of tomato brown rugose fruit virus that enable infection of plants harbouring the Tm-22 resistance gene. *Molecular Plant Pathology*, DOI: 10.1111/mpp.13115.
- Ziebell, Y. Z. (2020). Novel targets for engineering Physostegia chlorotic mottle and tomato brown rugose fruit virus-resistant tomatoes: in silico prediction of tomato microRNA targets. *PeerJ*, DOI 10.7717/peerj.10096.

Zuzana Vejlupkova, C. W. (2017). No evidence for transient transformation via pollen magnetofection in several monocot species. *Nature Plants*, <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0063-z>.