



**Instituto Tecnológico Nacional de México  
Campus Tuxtla Gutiérrez**



Informe técnico de residencia

Título:

**Estrategias biotecnológicas para el control de  
enfermedades en plantas de jitomate.**

**Presenta**

Martha Verónica Eugenio Chandoquí

Asesor interno:

Dra. Nancy Ruiz Lau

Asesor externo:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, a 13 de Diciembre del 2018

## **Agradecimientos**

Agradezco principalmente a mis padres, a mi tío José, a mi hermana Rosa, quienes fueron mi constante motivación en todo este tiempo y por apoyarme en todo momento en la realización de la residencia profesional.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Ángel Gabriel por abrir las puertas del laboratorio, por su compromiso, dedicación y paciencia conmigo.

A Ana Luz Romero y a Melissa Archuleta por ser mis mentoras, por compartirme de su conocimiento y ayudarme en la realización de los experimentos, además de compartir experiencias, alegrías y frustraciones.

Y por último a todo el equipo que conforma el laboratorio 1 de Biología Molecular de plantas, Rosalba, Nadia, Karen, Alex, Arón, Angélica, Salvador y Leonardo, quienes muy amablemente me explicaron y ayudaron en diferentes situaciones.

## RESUMEN

Existen enfermedades producidas por diversos patógenos que afectan los cultivos, causando graves pérdidas económicas, tales como el chancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). Las estrategias utilizadas para enfermedades de plantas hasta el momento han sido ineficientes para su manejo. En el presente trabajo se emplearon dos técnicas biotecnológicas para el manejo de estas enfermedades, una de las técnicas es la utilización de la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 para el estudio de genes funcionales en plantas, en donde no se logró la clonación de vectores que contenían las guías de para el gen *SCEI* en *A. tumefaciens*. Por otro lado también se transformaron plantas de tabaco con *A. tumefaciens* que contenía el vector con guías de ARN de tomate para el gen *SCEI* y el gen de la quelatasa, para generar el “knock-out”, se realizaron extracciones de los explantes para corroborar la transformación, no se obtuvo transformantes y los explantes presentaron oxidación. Otra estrategia que se llevó a cabo, fue el uso del extracto de la especie de *Salvia* en tres diferentes concentraciones A, B y C, en donde el mejor tratamiento se obtuvo con las plantas tratadas a concentración A, la cual tuvo un 33.4% de severidad 2, un 50 % severidad 3 y el 16.6 % presentaron severidad 4. Estas técnicas empleadas representan una gran posibilidad para el manejo de enfermedades.

## Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1. GENERALIDADES DEL PROYECTO.....</b>	<b>2</b>
1.1. Descripción de la empresa .....	2
1.2. Área de trabajo.....	3
1.3. Problemas a resolver .....	3
1.4. Objetivo general.....	3
1.4.1. Objetivo específico .....	3
1.5. Justificación .....	4
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
2.1. Cultivo de jitomate .....	5
2.1.1. Enfermedades en cultivo de jitomate .....	5
2.1.1.1. Características del patógeno .....	5
2.1.1.2. Movimiento bacteriano en la planta .....	6
2.2. Manejo de enfermedades en plantas .....	6
2.2.1. Exclusión.....	6
2.2.2. Erradicación.....	7
2.2.3. Protección .....	7
2.2.3.1. Extractos de plantas como control biológico.....	8
2.2.3.2. Características de metabolitos secundarios en plantas.....	8
2.2.3.3. Metabolitos secundarios de plantas con actividad antimicrobiana ..	9
2.2.3.3.1. Compuestos fenólicos .....	9
2.2.3.3.2. Alcaloides .....	10
2.2.3.5. Planta de <i>Salvia microphylla</i> como control biológico.....	10
2.2.4. Resistencia.....	11
2.2.4.1. Estudio de genes involucrados en la resistencia a enfermedades ..	11
2.2.4.2. CRISPR/Cas9 como estrategia para el análisis funcional de genes	12
2.2.4.3. Utilización de CRISPR/Cas9 en ingeniería genética .....	13
2.2.5. Métodos de expresión en células objetivo .....	14
2.2.5.1. Métodos indirectos .....	14
2.2.5.1.1. Sistema <i>Agrobacterium</i> .....	14
2.2.5.1.2. Vectores virales.....	16
2.2.5.2. Métodos directos.....	16

2.2.5.2.1.	Liposomas .....	16
2.2.5.2.2.	Biobalística.....	17
2.2.5.3.	Gen SCEI.....	17
3.	<b>PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS</b> .....	17
3.1.	<b>Edición génica del gen <i>SCEI</i> en plantas de tabaco mediante CRISPR/Cas9</b>	17
3.1.1.	Protocolo de desinfección de semillas de <i>N. tabacum</i> .....	17
3.1.2.	Guías únicas utilizadas.....	17
3.1.3.	Hibridación de guías.....	18
3.1.4.	Ligación de guía al vector.....	18
3.1.5.	Transformación por choque térmico de células calcio competentes....	19
3.1.6.	Preparación de células electro competentes .....	20
3.1.7.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediante electroporación.....	20
3.1.8.	Transformación de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Nicotiana tabacum</i> .....	20
3.1.9.	Análisis de explantes transformados .....	21
3.2.	<b>EXTRACTO DE <i>Salvia</i></b> .....	21
3.2.1.	Material vegetal.....	21
3.2.2.	Microorganismo fitopatógeno.....	21
3.2.3.	Tratamientos.....	21
3.2.4.	Infección .....	21
3.2.5.	Preparación del extracto de <i>Salvia</i> .....	22
3.2.6.	Aplicación del extracto .....	22
3.2.7.	Aplicación del control químico.....	22
3.2.8.	Variables a medir.....	22
3.2.9.	Análisis de infección con <i>Cmm</i> .....	22
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	23
4.1.	<b>Edición génica del gen <i>SCEI</i> en plantas de tabaco mediante CRISPR/Cas9</b>	23
4.1.1.	Clonación del vector en células calcio-competentes.....	23
4.1.2.	Secuenciación de guía Gscnt1 .....	23
4.1.3.	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> mediante electroporación.....	23
4.1.4.	Transformación de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Nicotiana tabacum</i> .....	23

4.1.4.1.	Análisis de explantes transformados con guías de tomate (gS2 y gC1) de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	25
4.2.	Extracto de <i>Salvia</i>	26
4.2.1.	Crecimiento de plantas	26
4.2.2.	Severidad	27
4.2.3.	Incidencia	28
4.2.4.	Análisis de infección con <i>Cmm</i>	29
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
6.	CONCLUSIÓN	32
7.	COMPETENCIAS DESARROLLADAS	32
8.	BIBLIOGRAFÍA	33
9.	ANEXOS	36

## INTRODUCCIÓN

México cuenta con una diversidad de climas y suelos en sus diferentes regiones que hacen que sus tierras sean cultivables, ofreciendo una amplia gama de productos vegetales, tales como, tomate, papas, frijoles, tabaco, entre otros. Existen enfermedades producidas por diversos patógenos que afectan los cultivos, tanto en México como alrededor del mundo, causando graves pérdidas del cultivo y económicas. Una de las enfermedades importantes en cultivos de tomate es el “chancro o cáncer bacteriano” causado por la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* la cual ha causado grandes pérdidas de cultivo, debido a la presencia sus múltiples serina proteasas y enzimas degradadoras de la pared celular, las cuales son codificadas por dos plásmidos (pCM1 y pCM2) y un isla de patogenicidad ubicada en el cromosoma, ocasionando la marchitez de la planta y con ello su muerte.

En la actualidad, existen técnicas de manejo, como son la exclusión, la erradicación, la protección y la resistencia. La exclusión hace referencia al uso de semillas certificadas, medidas de higiene dentro del área de cultivo. La erradicación es la eliminación del patógeno antes de que se establezca o de disemine. La protección es el establecimiento de una barrera entre el patógeno y la planta huésped, a menudo es de naturaleza química, como fungicidas, bactericidas, nematicidas o el uso de control biológico. Por último, se encuentra la resistencia, hace referencia a aquellas plantas que disponen de cualidades satisfactorias, adaptadas a las condiciones de la región. Sin embargo el uso de estas estrategias contra fitopatógenos, medidas sanitarias, semillas certificadas, no ha sido suficientes para el manejo de las enfermedades en plantas. El presente trabajo se basará en estas dos últimas técnicas (protección y resistencia), ya que ofrecen una alternativa viable para el control de enfermedades y de las cuales surgen los objetivos del presente trabajo, el primer objetivo se basó en el uso de la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición del gen SCEI que previamente en trabajos del laboratorio de biología molecular de plantas, se sugiere que éste se encuentra involucrado en la defensa temprana de la planta contra el chancro bacteriano, como segundo objetivo se estudió el uso del extracto de la planta de *Salvia* como control biológico contra el chancro bacteriano.

## **1. GENERALIDADES DEL PROYECTO**

### **1.1. Descripción de la empresa**

El Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., IPICYT, fundado el 24 de Noviembre del año 2000, es un Centro Público de investigación multi e interdisciplinario del Sistema CONACYT y representa un esfuerzo importante en pro de la descentralización de las actividades científicas y tecnológicas en el país. Esto fue también posible gracias al interés explícito del Gobierno del Estado de San Luis Potosí, quien aportó recursos para la construcción de los primeros edificios que albergan al Instituto.

El IPICYT cuenta con grupos de investigación de alta calidad, que además de generar conocimientos de frontera y formar recursos humanos a nivel posgrado, interacciona con los diversos sectores de la sociedad para apoyar el desarrollo del San Luis Potosí del siglo XXI.

El Instituto es una Asociación Civil, y tiene como fundadores asociados al Gobierno del Estado de San Luis Potosí, al Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, a la Secretaría de Educación Pública, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al Centro de Investigación en Matemáticas, A. C. y al Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C.

El IPICYT fue establecido con el propósito de proveer a la región de un espacio alternativo para el cultivo de las ciencias naturales y exactas, así como para desarrollar tecnologías vinculadas a la solución de problemas locales, regionales y nacionales. El Instituto considera también entre sus objetivos estratégicos la difusión y transferencia del conocimiento generado por sus actividades de investigación, así como la formación de recursos humanos de excelencia en campos del conocimiento de frontera. En el IPICYT se cultivan líneas de investigación en las disciplinas de Biología Molecular, Materiales Avanzados, Matemáticas Aplicadas, Ciencias Ambientales y Geociencias Aplicadas. Los requerimientos de la sociedad así como las oportunidades y limitaciones del entorno están presentes en la selección de estas áreas de conocimiento. En este sentido, cabe destacar que una de las características distintivas del Instituto es abordar problemas de investigación de manera interdisciplinaria en las áreas de ciencias exactas y naturales.

Aunque su compromiso inmediato está ligado al Estado de San Luis Potosí, su misión ciertamente le permite trascender la región y tener cabida en los ámbitos nacional e internacional, debido a la excelencia de sus productos de investigación y a la oportunidad existente para los proyectos estratégicos que desarrolla en las áreas de conocimiento de su ámbito de competencia.

## **1.2. Área de trabajo**

El experimento se llevó a cabo en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Laboratorio de Biología Molecular de plantas, bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.

## **1.3. Problemas a resolver**

- Clonación del vector en *A. tumefaciens*
- Reducción de condensación y oxidación de explantes de tabaco

## **1.4. Objetivo general**

- Utilizar la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición génica del gen relacionado con defensa bacteriana *SCEI* en plantas de tabaco.
- Estudiar en diferentes concentraciones extractos de *Salvia* (chía) contra el cáncer bacteriano en plantas de jitomate

### **1.4.1. Objetivo específico**

- Clonar los plásmidos en *A. tumefaciens* que contienen la guía sencilla del RNA del gen *SCEI* y del gen de quelatasa que se usa como control de transformación.
- Utilizar una construcción con una guía sencilla del RNA del gen *SCEI* para transformar genéticamente plantas de tabaco y realizar a partir del ADN extraído de explantes, un ensayo de PCR y secuenciación del producto para determinar si se editó la secuencia del gen y se obtuvo el Knock out.
- Evaluar si los extractos de *Salvia* sirven como control biológico en plantas de jitomate infectadas con la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* responsable del chancro bacteriano.

### **1.5. Justificación**

La agricultura en México es considerada una de las principales actividades de mayor valor económico y social, ya que funciona como herramienta para el progreso, el crecimiento productivo, y se ve beneficiado por la diversidad de climas y suelo. Sin embargo, las crecientes enfermedades causadas por diversos patógenos que invaden los cultivos, no sólo a campo abierto sino también en invernaderos, se ha convertido en un problema que causa pérdidas completas de cultivos, reducen drásticamente la calidad de producto en el mercado, y con ello grandes pérdidas económicas.

Este trabajo tiene como objetivo principal la implementación de nuevas técnicas para el manejo de enfermedades, debido a que el uso desmedido de técnicas tradicionales para combatir enfermedades como el uso de productos químicos (fungicidas, bactericidas, antibióticos, compuestos cúpricos, etc.) con el paso del tiempo se ha vuelto obsoletos para su manejo, debido a que muchos de los agentes causales han ido evolucionando creando resistencia a estos productos, por otro lado, el daño que generan al ambiente y a la salud es alto.

El uso de nuevas técnicas para el manejo de enfermedades como el virus del mosaico del tabaco y el chancro bacteriano, en el primero de los casos, con la búsqueda de nuevos genes resistentes a enfermedades se podrán obtener plantas más resistentes contra esta enfermedad que afecta a las solanáceas incluyendo el tomate, para el segundo caso, el uso de productos extraídos de plantas representa una alternativa aún más amigable para el planeta y para la salud.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Cultivo de jitomate

*Solanum lycopersicum*, es una planta de la familia de las *Solanaceae* originaria de América y cultivada en todo el mundo. La temperatura óptima de desarrollo del cultivo de jitomate oscila entre los 20 y 30 °C. Es uno de los principales vegetales cultivados en México, su producción total hasta el 2017 era de 3 mil 056 toneladas y el 50% del volumen nacional se concentra en cuatro entidades federativas, el principal productor es Sinaloa, al generar 24% del total, le sigue San Luis Potosí con 11%, Michoacán 7% y Zacatecas que aporta 6%, (SIAP, 2017).

Entidad	Producción
	2017
<b>Nacional</b>	<b>3,056</b>
Sinaloa	745
San Luis Potosí	334
Michoacán	211
Zacatecas	192
Jalisco	179
Baja California	145
Puebla	122
Sonora	115
Morelos	108
México	103
Querétaro	103
Coahuila	101
Resto	597

**Figura 1. Producción (miles de toneladas) de tomate rojo, años agrícolas 2016-2017 (SIAP).**

#### 2.1.1. Enfermedades en cultivo de jitomate

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más populares y de mayor consumo en todo el mundo, sin embargo la enfermedad de cáncer o chancro bacteriano, ocasionada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) la cual considerada una seria amenaza para este cultivo, ya que ha causado epifitias en todo el mundo afectando a cultivos de tomates sembrados a cielo abierto como en invernaderos (Sen et al., 2015); lo que ocasiona grandes pérdidas económicas.

##### 2.1.1.1. Características del patógeno

*Clavibacter* puede crecer a temperaturas de 20 a 30°C, puede sobrevivir a 50°C y su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C. Su pH óptimo de crecimiento de esta bacteria esta entre los 7 y 8, pero *Clavibacter* crece aún en el xilema de plantas con pH 5. (31-12). *Cmm* es una bacteria Gram-positiva y su naturaleza patógena se derivada de sus múltiples serina proteasas y enzimas degradadoras de la pared celular, las cuales son codificadas por dos plásmidos (pCM1 y pCM2) y un isla de patogenicidad ubicada en el cromosoma (Tancos et al., 2013).

### **2.1.1.2. Movimiento bacteriano en la planta**

Los principales hospedadores de *Cmm* son cultivos solanáceos como tomate y pimiento. Las principales fuentes para el brote de la enfermedad son semillas, desechos de plantas infectados, prácticas de cultivo como poda, contacto entre plantas infectadas y sanas y las prácticas de riego (Sen et al., 2015)

La bacteria *Cmm* una vez que infecta la planta, se extiende a través del xilema, formando estructuras extensas similares a las biopelículas, que ayudan en la colonización y el movimiento del patógeno, causando la marchitez, decoloración vascular. Cuando la bacteria se encuentra presente en la superficie de la fruta puede causar lesiones conocidas como "ojo de pájaro" que consisten en pequeños puntos de color canela con halos blancos.

## **2.2. Manejo de enfermedades en plantas**

Desde años atrás las plantas han sido afectadas alrededor de todo el mundo por diversas enfermedades causando pérdidas de cultivares enteros, de la estética del producto y económicas. Para poder contrarrestar la enfermedad existen prácticas de manejo de enfermedades en plantas que se basan en anticipar la incidencia de la enfermedad y de atacar puntos vulnerables en el ciclo de la enfermedad (por ejemplo, puntos débiles en la cadena de infección). La meta del manejo de enfermedades en plantas es la de reducir el daño (Maloy, 2005)

Whetzel (1980) agrupo el manejo de las enfermedades en 4 principios generales: exclusión, erradicación, protección y resistencia.

### **2.2.1. Exclusión**

Este principio se define como cualquier medida que se toma para prevenir la introducción de un agente causal de enfermedad (patógeno) dentro de una región, finca o plantación. La estrategia básica asume que la mayoría de los patógenos solo pueden movilizarse distancias cortas, sin ayuda de agentes tales como el ser humano u otros vectores.

Desafortunadamente, las medidas de exclusión solo retardan la entrada del patógeno, aunque la exclusión puede proporcionar el tiempo suficiente para planificar como manejar el patógeno cuando finalmente incida.

Una estrategia para excluir fitopatógenos es la de producir semillas o material vegetativo de siembra libre de patógenos, a través de programas de certificación de semillas y de materiales vegetativos de propagación. Estos programas utilizan tecnologías que incluyen el aislamiento de áreas de producción, inspecciones de campo y remoción de plantas sospechosas para producir y mantener material de siembra libre de patógenos. La siembra de material libre de patógenos puede mejorarse mediante cultivo de tejidos y técnicas de micropropagación, al igual que se le puede mantener en lugares protectores cerrados tal como invernaderos de malla, para excluir a los patógenos y sus vectores. La exclusión puede obtenerse

mediante prácticas tan simples como la limpieza del equipo agrícola, para remover restos de cosecha y suelo contaminado que pueden albergar patógenos, nematodos u otros organismos de suelo y así prevenir su introducción en campos no infestados.

### **2.2.2. Erradicación**

Este principio procura la eliminación del patógeno luego de su introducción en un área, pero antes de que se establezca o se disemine ampliamente. Este principio se puede aplicar a plantas individuales, lotes de semilla, campos o regiones, aunque generalmente no es efectivo en áreas geográficas grandes.

La erradicación depende del tipo de patógeno que infecte la planta, algunos involucran la remoción de suelo infestado, la fumigación de suelos, el quemado, la remoción de las plantas infectadas y rotaciones de cultivo. La erradicación se puede alcanzar también mediante la destrucción de malezas que son reservorios de diversos patógenos o de sus insectos vectores. Sin embargo la erradicación completa de los patógenos, especialmente en áreas grandes rara vez se alcanza.

### **2.2.3. Protección**

Este principio depende del establecimiento de una barrera entre el patógeno y la planta huésped o de la parte susceptible de la planta huésped. A menudo se le considera que esta barrera es de naturaleza química, por ejemplo un fungicida, bactericida o nematicida, pero también se puede considerar el caso de una barrera física o espacial o temporal. Una desventaja de la implementación de barreras químicas es que su modos de acción está limitado a un solo sitio en particular (su sitio de actividad específica está controlado por uno o pocos genes) por ello son más propensos a que se desarrollen casos de resistencia al fungicida por parte del patógeno.

La protección involucra algunas prácticas culturales que modifican al medio ambiente, tales como labranza, drenaje, irrigación o modificación del pH del suelo. También involucra cambios en la profundidad de siembra, espaciamiento entre plantas, podas y raleos u otras prácticas que permitan a las plantas escapar a la infección o reducir la severidad de una enfermedad.

El término control biológico o también conocido como biocontrol ha sido usado en diferentes campos de la biología, frecuentemente utilizado en la entomología y en la patología de plantas. En el primero de los casos el término hace referencia al uso de organismos vivos para controlar a otros. En patología de plantas este término ha sido aplicado al uso de los productos naturales extraídos o fermentados de varias fuentes. Inhibiendo así su reproducción, crecimiento o infección (Cook, 1993).

### **2.2.3.1. Extractos de plantas como control biológico**

El control biológico de la enfermedad en los últimos años parece ser una solución prometedora, pues diversos estudios realizados en todo el mundo han dado resultados alentadores, (El kinany et al., 2017) pues se considera una alternativa amigable con el ambiente, la salud, y se sabe que reduce la probabilidad de que el patógeno desarrolle resistencia a ellos (Barda et al., 2015), comparados con alternativas sintéticas. Tal es el caso del uso de extractos de plantas que a lo largo del tiempo han sido utilizadas como anti fúngicos, insecticidas y antimicrobianos (El-Mougy et al., 2007), estos pueden ser mezclas simples con efectos específicos o mezclas complejas con múltiples efectos sobre el patógeno.

Los extractos de origen vegetal se caracterizan por la presencia de determinados metabolitos secundarios los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas, y que pueden ser agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides. Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antivirales, antimicrobianos y repelentes.

### **2.2.3.2. Características de metabolitos secundarios en plantas**

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no sólo tienen una gran importancia ecológica, sino que también, una síntesis activa de estos compuestos se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas de estrés biótico o abiótico.

Estos compuestos son clasificados en dos grupos principales nitrogenados y no nitrogenados. En el grupo de metabolitos nitrogenados se encuentran los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucosidos cianogénicos y glucosinolatos. Los metabolitos no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Jiménez et al., 2004).

Los precursores de la biosíntesis de metabolitos se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. Una síntesis constitutiva y específica de estos compuestos puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular.

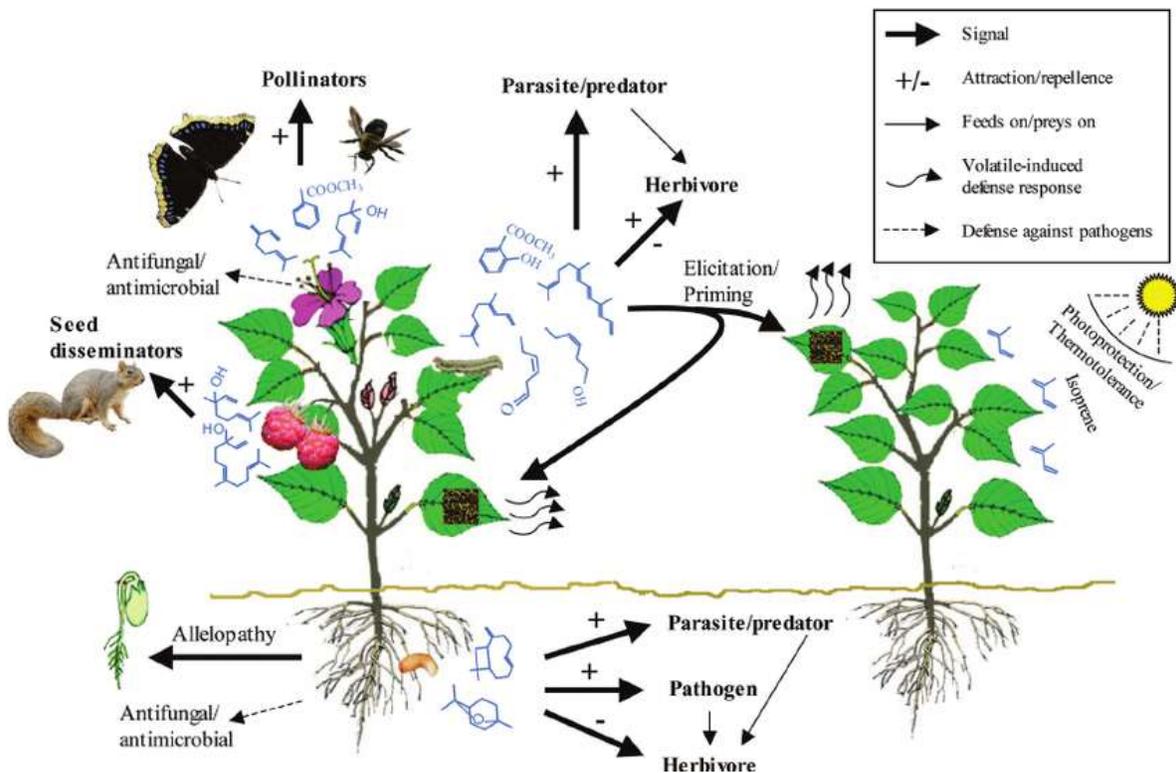


Figura 2. Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas. (Dudareva, 2007).

### 2.2.3.3. Metabolitos secundarios de plantas con actividad antimicrobiana

El reino vegetal es sin duda el que ofrece sustancias potencialmente útiles aplicables a diversas enfermedades tanto humanas como en las plantas mismas. Globalmente las plantas producen más de 100 000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios, que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta, en parte de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales.

#### 2.2.3.3.1. Compuestos fenólicos

Los fenoles más simples consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámicos y cafeico. Los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo parece que están relacionado directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad. Su mecanismo parece estar ligado con la inhibición enzimática (Domingo et al. 2003).

Las quinonas son ubicuas en la naturaleza y son causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Su alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función, esto le confiere potencial antimicrobiano, compuestos como la hipericina (Elisha et al., 2017).

Las cumarinas tienen un mecanismo de acción que parece estar relacionado con la interacción con el ADN eucariota, algunos compuestos como la esculetina, la umbeliferona y la escopiletina.

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo, su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. Las más conocidas son las catequinas, presentes en el té verde (*Camellia sinensis*) (Domingo et al. 2003).

#### **2.2.3.3.2. Alcaloides**

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Cushnie et al., 2014).

#### **2.2.3.4. Terpenos**

Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40, 000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia. Entre los metabolitos se encuentran hormonas, carotenoides, clorofilas y plastoquinonas.

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5): monoterpenos (2 unidades C5), sesquiterpenos (3 unidades C5), diterpenos (4 unidades C5) (García et al., 2009).

El canfor, alfa-tujona y 1,8-cineol, son compuestos conocidos por tener potencial antimicrobiano, el mecanismo de acción de estos, es mediante la disrupción de la integridad de la membrana de la bacteria (Knobloch et al., 1989).

#### **2.2.3.5. Planta de *Salvia microphylla* como control biológico**

*Salvia* es el género más numeroso de la familia de las lamiáceas, con 700 a 900 especies de arbustos, herbáceas perennes y anuales. Comúnmente también se denominan salvia, aunque generalmente este nombre se asocia más a la especie *Salvia officinalis*, conocida popularmente por su uso en gastronomía, como planta ornamental y medicinal.

El efecto antimicrobiano del extracto de *Salvia* ha sido objeto de varios estudios (Talibi et al., 2011), previamente se ha reportado que existe una relación entre la composición química de los componentes más abundantes en aceites esenciales de *Salvia* y la actividad antimicrobiana. En este contexto, el canfor,  $\alpha$ -tujona y 1,8-cineol son conocidos por tener potencial antimicrobiano (Knobloch et al., 1989). También otros estudios sugieren que estas sustancias tienen un mecanismo de disrupción de la integridad de la membrana de la bacteria (Deans et al., 1990). Los aceites esenciales de esta especie han sido probados contra algunas bacterias, como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, arrojando resultados alentadores (Haziri et al., 2018).

Además, se ha demostrado la presencia de *inhibidores de crecimiento volátiles producidos por especies de Salvia que se llevaron a cabo en S. leucophylla y S. apiana* por Muller (1964). También revelaron que las bacterias Gram-positivas son más sensibles al aceite esencial de *Salvia officinalis* que las bacterias Gram-negativas (Kheder, et al., 2017).

#### **2.2.4. Resistencia**

Este principio hace referencia a aquellas plantas que disponen de cualidades satisfactorias, adaptadas a las condiciones de la región. El uso de plantas resistentes a enfermedades elimina la necesidad de esfuerzos adicionales para reducir las pérdidas causadas por enfermedades, a menos que adicionalmente estén presentes otras enfermedades. Las plantas resistentes se obtienen con métodos estándares de mejoramiento mediante selección y/o hibridación.

La importancia del desarrollo de plantas resistentes a enfermedades es la inserción de genes de otros organismos dentro de la plantas para transmitir alguna característica.

##### **2.2.4.1. Estudio de genes involucrados en la resistencia a enfermedades**

Las plantas genéticamente modificadas se han convertido en una estrategia que ha beneficiado a más de un agricultor, aportando beneficios a diferentes cultivares. Las modificaciones genéticas surgieron debido a la susceptibilidad de las plantas a diversos patógenos y a la resistencia que muchos de estos han creado a diversas sustancias que hoy en día se utilizan. Estas modificaciones se basan en el estudio de genes que estén relacionados a la resistencia contra enfermedades, mediante su inserción a la planta para dotarla de resistencia, codificando proteínas que actúan directamente o indirectamente contra la virulencia del patógeno (Anand et al., 2012) Se aplica comúnmente en variedades de cultivos de alto rendimiento para mejorar la resistencia a patógenos de importancia agronómica (Parker et al., 2001) y son efectivos contra patógenos bacterianos, virales y fúngicos (Martin, 1999).

El análisis de genes se realiza mediante la supresión génica del gen de interés o mejor conocido como silenciamiento génico postranscripcional, el cual es un fenómeno natural que ocurre en plantas, este fenómeno involucra el corte de ARN de doble cadena en ARNs pequeños de 21 a 26 nucleótidos por una enzima ARNasa tipo III. En plantas, han sido descubiertas tres rutas del silenciamiento según los análisis genéticos y moleculares; silenciamiento mediado por ARNs de interferencia en el citoplasma, silenciamiento de ARNs mensajero endógenos por miRNAs y silenciamiento asociado con la metilación del ADN y la represión de la transcripción (Fiallo, 2012). Sin embargo, esta estrategia genera “knock-downs”, es decir, no permite realizar la inactivación completa del gen, por otro lado, existe una técnica de edición génica denominada CRISPR/Cas9 (Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas), el cual permite generar la inactivación completa del gen (knock-out)

#### **2.2.4.2. CRISPR/Cas9 como estrategia para el análisis funcional de genes**

La tecnología CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas asociadas a proteínas Cas) es un mecanismo de defensa inmune adaptivo presente en bacterias y arqueas el cual incorpora ADN de bacteriófagos y plásmidos invasores entre sus secuencias palindrómicas, y posteriormente generan crRNA (RNA transcrito de CRISPR), por consiguiente cuando un virus de algunos de los tipos semejantes a los ARNcr introduce su ADN en la célula bacteriana, la molécula reconoce al intruso y provoca la intervención de la proteína Cas9 que corta el material genético y lo elimina (Wang et al., 2016)

El sistema CRISPR se puede dividir en tres etapas (Doudna, 2016):

1. Fase adaptiva: Inserción de una secuencia corta de ADN invasor (protoespaciador) al locus de CRISPR como una secuencia (espaciadores) seguido de una repetición y en posición 5' respecto a la secuencia espaciadora y siempre tras la secuencia líder. En esta fase las proteínas Cas 1 y Cas2 son las encargadas de escindir el protoespaciador del resto del material genético foráneo e incluirlo dentro del locus. En esta etapa se otorga la memoria genética para poder realizar las dos siguientes fases.
2. Fase de expresión: Transcripción de crRNA precursor (pre-crRNA) que sufre maduración para generar crRNAs individuales, cada uno compuesto de una porción de repetición y una porción espaciadora de orientación de invasor. Este pre-crRNA es procesado mediante la endonucleasa RNAasa II, dando lugar a secuencias de ARN constituidas por una única región espaciadora flanqueada por una corta secuencia repetitiva, que servirá como zona de anclaje de Cas9 en la etapa posterior.

3. Fase de interferencia: Esta etapa tiene lugar cuando el genoma de un organismo foráneo reincidente intenta de nuevo infectar la célula. Entonces la escisión es dirigida por el crRNA de ácido nucleico el cual se une mediante complementariedad de bases Watson-Crick a la secuencia activadora tracrRNA, Cas hacia la secuencia diana del material genómico invasivo que debe degradar.

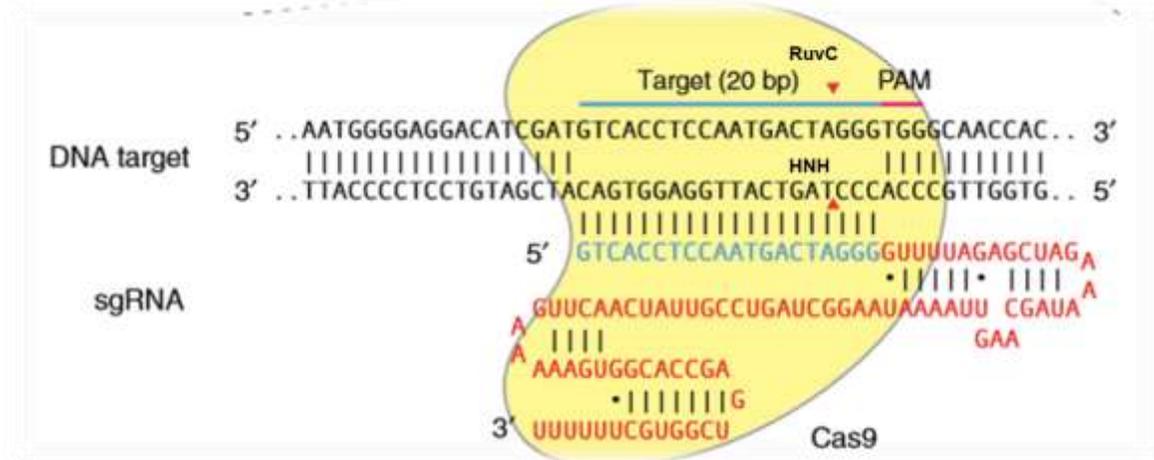
Existen diferentes sistemas CRISPR que utilizan distintos mecanismos moleculares para lograr el reconocimiento y el corte de doble cadena del ADN exógeno y se han clasificado en 2 sistemas, los sistemas de clase 1 (tipo I, III y IV) requieren un gran complejo de varias proteínas efectoras, pero en los sistemas de clase II (tipo II, V y VI) solo requieren de una endonucleasa guiada por ARN (Wang et al., 2016). La Cas9 del sistema CRISPR tipo II de *Streptococcus pyogenes*, requiere de la presencia de una secuencia específica PAM (Motivo protoespaciador adyacente) que es adyacente a al sitio blanco, (NGG, donde N es cualquier nucleótido). Estos cortes de doble cadena se pueden reparar mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) para generar inserciones y eliminaciones aleatorias o se pueden reparar de manera precisa mediante reparación dirigida por homología (HDR) con plantilla de ADN exógeno para generar inserciones, eliminaciones o sustituciones diseñadas a medida.

#### **2.2.4.3. Utilización de CRISPR/Cas9 en ingeniería genética**

La más utilizada es la del tipo II, una nucleasa Cas9 asociada a CRISPR, cuyas actividades de escisión son programadas por ARN, creando roturas de doble cadena.

Para su utilización el sistema CRISPR/Cas9 utiliza una secuencia guía de ARN de 20 nucleótidos, la cual es creada mediante programas bioinformáticos disponibles en la web, tales como CHOPCHOP, CRISPOR y CCTop, estas plataformas ayudan a elegir la guía más adecuada de acuerdo al tipo de Cas9 de cada organismo que detecta un PAM distinto, la más comúnmente usada es la de *Streptococcus pyogenes* que detecta la secuencia previa al motivo 5'-NGG. La correcta elección de la guía de ARN recae en el segmento de 12 nucleótidos más cercanos a la secuencia PAM o al extremo 3', que deben tener completa complementariedad (en los restantes 8 nucleótidos pueden permitir mismatches) para aumentar la eficiencia del corte (Doudna et al., 2014).

Una vez que a la guía de ARN se une por complementariedad de bases a la secuencia blanco, la Cas9 reconoce el motivo protoespaciador adyacente (PAM) y genera el corte 3 bases aguas arriba del borde 3' (Figura 3). LA escisión se produce en ambas cadenas de DNA (DSB) gracias a los dominios RuvC y HNH de la Cas9 (Wang et al., 2016).



**Figura 3. Esquema de la nucleasa Cas9 guiada por ARN (Ran et al., 2013).**

### **2.2.5. Métodos de expresión en células objetivo**

La ingeniería genética de plantas está dirigida a la producción de genotipos que expresen características de interés, mediante la integración en el genoma vegetal, de segmentos de ADN foráneo proveniente de cualquier origen. Este ADN altera las características de la planta, mediante la modificación dirigida y controlada de su genoma, al añadir, eliminar o modificar alguno o algunos de sus genes (Danilova, 2007; Karimi et al., 2007).

Se han desarrollado diferentes métodos de transformación genética, se clasifican en métodos indirectos y métodos directos, de acuerdo con el mecanismo utilizado para la transferencia del material genético hacia la célula vegetal.

#### **2.2.5.1. Métodos indirectos**

Estos métodos se basan en la utilización de vectores biológicos, empleando sus características naturales de patogenicidad en plantas, para la introducción de los genes de interés al genoma vegetal.

##### **2.2.5.1.1. Sistema Agrobacterium**

Debido a la capacidad y a la eficiencia de este género en infectar diversos organismos vegetales surgió la idea de utilizar esta bacteria. El segmento de DNA transferido es conocido como a región T-DNA (ADN de transferencia) y se encuentra en el plásmido residente de la bacteria llamado plásmido Ti (inductor de tumores). Esta región contiene genes que codifican para la biosíntesis de fitohormonas y opinas (carbohidratos únicamente metabolizables por la bacteria). Para que se dé una transferencia efectiva de esta región es necesaria la expresión de los "genes Vir" contenidos en la región Vir (región de virulencia), la cual, se encuentra en el plásmido TI. Para utilizar este tipo de sistema de transformación se requiere de cepas desarmadas, que son aquellas, en las que el T-DNA ha sido eliminado. Para esto es introducido a la cepa de *Agrobacterium* a desarmar, un plásmido foráneo

con regiones de homología con el T-DNA y un gen para resistencia a antibióticos. Dado el proceso de recombinación entre el plásmido Ti y el plásmido Ti el gen para resistencia a antibióticos que, posteriormente, va a permitir identificar la bacteria desarmada, mientras que el plásmido foráneo con la región T-DNA es eliminado (Gelvin, 2003).

En la transferencia de genes a través de este sistema, se emplean dos tipos de vectores: los de co-integración y los binarios. Los vectores co-integrados resultan de la integración de un plásmido Ti de la cepa desarmada de *Agrobacterium*, mediante un proceso de recombinación. Los vectores más empleados son los binarios. Estos vectores, se derivan de plásmidos que se replican en *E. coli* y en *A. tumefaciens* no se necesitan integrarse al plásmido Ti y se mantienen como plásmidos independientes, dentro de la célula bacteriana. Consisten en el uso de dos plásmidos en la bacteria, uno de ellos el vector binario, contiene los bordes del T-DNA en el que incluye el casete de expresión o genes de interés y, el otro, el plásmido residente que es el contiene lo genes “Vir”, que son los encargados de mediar la transferencia efectiva del cassette de expresión hacia las células vegetales (Hellems et al., 2000).

El proceso inicia cuando se producen heridas en las células de la planta, se liberan al medio compuestos fenólicos y monosacáridos, que son reconocidos por *Agrobacterium* induciendo una unión entre la bacteria y las células vegetales. Este tipo de transformación requiere de un período de co-cultivo (período de oscuridad en medio sin antibióticos), en el cual la cepa de *A. tumefaciens* que contiene el vector con los genes de interés, es puesta en contacto con el tejido vegetal a transformar, para que se realice la transferencia de T-DNA a algunas de las células vegetales expuestas a la infección. El co-cultivo, se debe dar en un medio apropiado que favorezca el proceso de transformación, como la presencia de moléculas señal, como la acetosiringona y las heridas en el tejido vegetal que activa el sistema de virulencia de *Agrobacterium*

Después del co-cultivo, el tejido vegetal es transferido a un medio de cultivo de tejidos vegetales que propicie la regeneración, que consiste en la obtención de una planta completa a partir de una célula vegetal. Para la regeneración de plantas completas es necesaria la adición de hormonas vegetales o reguladores de crecimiento al medio de cultivo. Estos reguladores son del tipo citoquininas, que promueven la división celular en el cultivo de tejidos no meristemáticos e inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivo de tejidos o auxinas, que promueven la división y crecimiento celular, y las giberilinas involucradas en la regulación de la elongación celular específicamente auxinas y citoquininas (Pitzscheke, 2010).

Este tipo de sistema presenta varias ventajas, ya que es posible emplear diferentes tipos de tejidos vegetales, la integración del T-DNA es un proceso relativamente preciso, permite la introducción de segmentos largos de ADN.

#### **2.2.5.1.2. Vectores virales**

Algunos virus que afectan especies vegetales han sido empleados como vectores para la transformación de plantas. Los virus deben ser modificados para que sean capaces de transportar el gen de interés al interior de la célula vegetal. Se han desarrollado dos estrategias para la construcción de vectores virales. En la más empleada, el gen foráneo, es introducido dentro del virus completo, por lo general, precedido por el promotor duplicado de la proteína de la capsida del virus (promotor fuerte) o fusionado a ésta, para que el gen de interés sea expresado como un RNA subgenómico separado. La segunda estrategia y la más recientemente desarrollada, el virus es completamente reconstruido eliminando o sustituyendo regiones virales, además de la inserción del gen de interés. Finalmente, estos vectores virales pueden ser empleados en la transfección de la planta, como una partícula viral madura o como copias del vector viral (Gleba et al. 2007).

Los mayores avances se han logrado con Geminivirus y Caulimovirus, debido a que estos son virus DNA y se pueden clonar directamente; dentro de estos ha sido especialmente utilizado el virus del mosaico de coliflor, con el cual, se ha logrado transferir genes con resistencia a antibióticos (Sattar et al. 2006).

LA utilización de vectores virales facilitan la infección, el rango de hospedadores es más amplio y los genes transmitidos no se limitan a una célula, sin embargo el tamaño del gen de interés debe ser limitado para que no afecte la infectividad (Granados et al., 2012).

#### **2.2.5.2. Métodos directos**

Los métodos directos surgen debido a la dificultad de transformar monocotiledóneas por medio de *A. tumefaciens*, es por ellos que se desarrollaron sistemas de transferencia de genes, en los que se emplean procedimientos de naturaleza química, fisicoquímica y mecánica. Los liposomas, y la utilización de biobalística, por mencionar algunos, son métodos directos utilizados para la transformación vegetal (Granados et al., 2012).

##### **2.2.5.2.1. Liposomas**

Entre los métodos para transformación vegetal, la transferencia de genes, mediada por liposomas, es uno de los más difíciles y aunque en un principio éste mostró ser eficaz, su utilización ha sido muy limitada. En este método, el casete de expresión es encapsulado en una esfera lipídica (liposoma), que permite o facilita su paso, a través de la célula vegetal por endocitosis, ya sea por el plasmodesma o directamente por la pared celular, hasta el núcleo (Rao et al. 2009).

#### **2.2.5.2.2. Biobalística**

Esta técnica, se basa en la utilización de microproyectiles recubiertos del DNA que se desea transferir, que son disparados sobre los tejidos vegetales a altas velocidades, atraviesan la pared y la membrana celular y llevan al interior de la célula los genes de interés para su posterior integración en el genoma vegetal (Sanford, 2000; Vasil, 2007). El casete de expresión con los genes de interés puede ir o no en un vector, ya que no es requerido para el proceso de transformación.

Este sistema de transformación requiere de un dispositivo mecánico que permita realizar el bombardeo de los tejidos vegetales. Para que los microproyectiles puedan atravesar las membranas celulares y llegar al núcleo de las células blanco, deben ser impulsados a velocidades supersónicas. Para ello, se desarrollaron tres sistemas: por explosión de pólvora seca, por variación de fuerza de aceleración, a través de descarga eléctrica o por liberación de gas comprimido a alta presión: aire, helio, CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub> (Granados et al., 2012).

#### **2.2.5.3. Gen SCEI**

Existen especies silvestres de tomate resistentes a la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tales como *S. pimpinelifolium*, *S. peruvianum* y *S. habrochaites*. En *S. peruvianum* se observó que la expresión del gen *SCEI* incrementó durante las primeras horas de la infección en plantas, el cual codifica una enzima involucrada en la modificación de la proteína a través de la sumoilación, que es una modificación post-traducciona que conjuga covalentemente a otra pequeña proteína modificadora del tipo ubiquitina (SUMO) a lisinas en proteínas diana. Esta modificación puede alterar la localización sub-celular, la actividad y/o estabilidad de la proteína blanco (Esparza et al., 2015).

### **3. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

#### **3.1. Edición génica del gen *SCEI* en plantas de tabaco mediante CRISPR/Cas9**

##### **3.1.1. Protocolo de desinfección de semillas de *N. tabacum***

En un tubo eppendorf de 1.5 mL llenar menos de 0.1 mL con semillas de *N. tabacum*, agregar 1 mL de etanol al 70%, agitarlo por 1 min y retirar el etanol con pipeta, posteriormente hacer 2 lavados con agua destilada estéril, por último hacer un lavado con 1 mL de Cloro al 20% más una gota de Tween, en agitación constante por 10 min, realizar de 3 lavados con agua destilada. Sembrar las semillas en medio MS.

##### **3.1.2. Guías únicas utilizadas**

Las guías de ARN utilizadas fueron 2, que corresponde al gen *SCEI*, seleccionadas mediante la plataforma CRISPOR:

Guía Gscnt1

4. Forward: 5'-ATTGATCAGGTTCACTGACCCATC
5. Reverse: 5'-AAACGATGGGTCACTGAACCTGAT

Guía Gscnt2

- Forward: 5'-ATTGTATCTCTCCACAGCCAGGGG
- Reverse: 5'-AAACCCCCTGGCTGYGGAGAGATA

### 3.1.3. Hibridación de guías

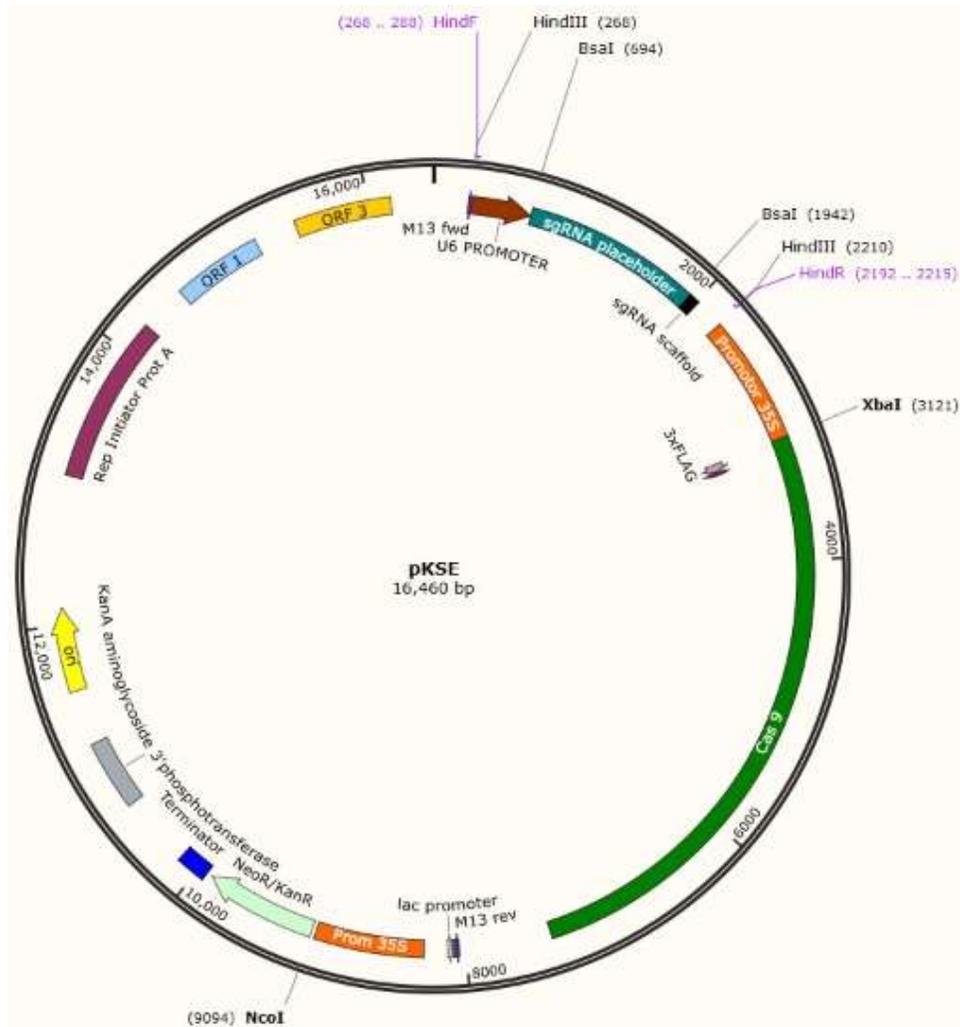
Se colocó 10 µL de cada una de las guías únicas (forward y reverse) a una concentración de 100 µM, posteriormente se colocaron en un termociclador el cual se programó desde una temperatura de 95°C hasta bajar gradualmente a los 10°C (un grado por minuto).

### 3.1.4. Ligación de guía al vector

Una vez que las guías fueron hibridadas se procedió a ligar la guía al vector, para esto se hizo una mezcla añadiendo 10 µL de la guía hibridada, 1 µL del vector pKSE (figura 4), 1.5 µL de Bsal, 1.5 µL de ligasa, 2 µL de Bsa, 2 µL del buffer de ligasa y se aforó a 20 µL con agua. Posteriormente se metió al termociclador para generar la ligación con el programa “Golden gate”.

**Cuadro 1. Protocolo de ensamblaje de “Golden Gate”.**

Componentes	Volumen	Condiciones de reacción
<b>Vector pKSE (~100 ng/µl)</b>	2 µl	-(37°C por 5 min, 16°C por 5 min) x 30 ciclos
<b>Inserto (guía hibridada)</b>	8 µl	-55°C por 5 min
<b>T4 ADN ligasa buffer (10x)</b>	2 µl	-80°C por 5 min
<b>BSA (10x)</b>	2 µl	Enzimas y reactivos de NEB
<b>T4 ADN ligasa</b>	1 µl	
<b>Bsal</b>	1 µl	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4 µl	
<b>Volumen total</b>	20 µl	



**Figura 4. Vector pKSE.**

### 3.1.5. Transformación de células calcio competentes por choque térmico

Se colocaron células calcio componentes en hielo y se dejaron reposar por 10 minutos, se le añadieron 10  $\mu$ L de la ligación y se mezclaron por pipeteo, se dejaron reposando en hielo por 30 min, posteriormente se llevó a baño maría por 1 min a 42°C, pasado este tiempo se regresaron inmediatamente a hielo por 10 min, se añadieron 200  $\mu$ L de medio LB sin antibiótico y los tubos se incubaron por 1 h a 37°C a 150 rpm, después se centrifugaron por 5 min a 8000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100  $\mu$ L de medio LB, las células recuperadas se sembraron en placas con medio LB que contenían Kanamicina a 100 mg/L, se incubaron a 37°C toda la noche (16 h aproximadamente). Por último se picaron colonias y se traspasaron a placas nuevas de medio y posteriormente se realizó PCR de las colonia picadas, se utilizaron los oligos MpxH que amplifican una región aproximadamente de 700 pares de bases (promotor U6, guía de 20 nucleotidos,

scaffold y terminador), posteriormente para corroborar que se tuviera clonada la guía se mandó a secuenciar.

### **3.1.6. Preparación de células electro competentes**

Se inoculó una dilución 1:50 del precultivo en 200 mL de medio YEP sin antibiótico y se incubó a 28°C en agitación constante aproximadamente 8 horas hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.5 y 1.0, se colocó en hielo por 15 minutos y se transfirió a tubos sorvall estériles fríos, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 20 mL de glicerol al 10% frío, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 15 min a 4 °C, esto último se repitió posteriormente 2 veces más, se eliminó el sobrenadante, se agregaron 800 µL de glicerol al 10% frío y se resuspendieron las células, como último paso se hicieron alícuotas de 80 µL en tubos eppendorf de 1.5 L previamente fríos y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **3.1.7. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación**

Se colocó 50 ng/µL de plásmido de interés mezclándose con una alícuota de 80 µL de células competentes de *A. tumefaciens*, se incubaron por 2 min en hielo y posteriormente se colocaron dentro de las celdas para electroporación, los parámetros utilizados fueron los siguiente: 2500 V, 25 µF, 400Ω, cubeta de 2 mm. Se dio un pulso y posteriormente se añadió 1 mL de medio YEP y se incubó a 28°C con agitación constante por 2 h. Pasado este tiempo se centrifugó por 5 min a 8000 rpm, se resuspendió la pastilla en 200 µL de medio y se sembró en placa de medio LB suplementado con 100 mg/L de Kanamicina y 50 mg/L de Rifampicina, se incubó en oscuridad por dos días y se realizó PCR de las colonias para comprobar que estuvieran transformadas, amplificando una banda de aproximadamente 700 pares de bases (promotor U6, guía de 20 nucleotidos, scaffold y terminador).

### **3.1.8. Transformación de hojas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum***

Para la transformación se utilizaron las guías gC1 del gen de la quelatasa que sirve como control, gS1 (mayor porcentaje de edición) y gs2 (guía con terminación GG) del gen SCEI correspondientes a guías de tomate. Se utilizaron hojas de 4 semanas de edad, se cortaron en fragmentos de 5 x 10 cm sobre papel filtro estéril y se colocaron en medio MSO para evitar la deshidratación. Posteriormente se transfirieron a 3 solución que contenía a *A. tumefaciens* que portaban el plásmido de interés durante 10 minutos. Se eliminó el exceso de bacterias con un papel filtro y se colocó en medio RMOP si antibiótico durante dos días (período de cocultivo) suplementado con ANA a 0.1 mg/L y BA 1 mg/L. Pasados los dos días se trasfirieron los explantes a medio RMOP complementado con 100 mg/L de kanamicina y 250 mg/L de cefotaxima. Se subcultivaron cada dos semanas, seleccionando sólo los explantes resistentes a la selección.

### 3.1.9. Análisis de explantes transformados

Se hicieron extracciones de ADN genómico de los explantes que previamente se habían sometido al proceso de transformación y se amplificaron con los oligos MpxH mediante PCR y se visualizaron en gel de agarosa esperando una banda de 700 pares de bases que corresponderían a plantas exitosamente transformadas.

## 3.2. EXTRACTO DE *Salvia*

### 3.2.1. Material vegetal

Se utilizaron 36 plantas de jitomate *Solanum lycoperscum* var Ailsa craig de 31 días de edad.

### 3.2.2. Microorganismo fitopatógeno

Para la posterior infección se utilizó a la bacteria fitopatógena *Calvibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) cepa AcR42.

### 3.2.3. Tratamientos

Para el experimento se montaron 6 tratamientos diferentes que se describen en el cuadro 2. Se emplearon 3 concentraciones diferentes y por cuestiones de privacidad serán identificadas como: A, B y C, donde; A es la concentración más alta, B es una concentración intermedia y C es la concentración más baja.

### Cuadro 2. Descripción de tratamientos

Nomenclatura	Descripción del tratamiento	Número de unidades experimentales
T1	Control negativo: Plantas sin infectar	6
T2	Control positivo; Plantas infectadas con <i>Cmm</i>	6
T3	Plantas infectadas y tratadas con extracto de chía a una concentración A	6
T4	Plantas infectadas y tratadas con extracto de chía a una concentración B	6
T5	Plantas infectadas y tratadas con extracto de chía a una concentración C	6
T6	Plantas infectadas y tratadas con Terra Q y Oximet	6

### 3.2.4. Infección

La bacteria *Cmm* fue cultivada 24 horas antes de la infección en medio 702. Se midió la densidad óptica y se ajustó a  $3 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente se realizó la

infección tomando 100 µL de la suspensión bacteriana y se inyectó en el primer internodo del tallo.

### **3.2.5. Preparación del extracto de *Salvia***

El extracto se disolvió en 5% de acetona (Sigma-Aldrich) tibia, posteriormente se agregó 5% del surfactante Break-Thru®.

### **3.2.6. Aplicación del extracto**

Los extractos se aplicaron después de dos días de haber infectado con *Cmm*, las plantas se asperjaron con 30 mL de cada una de las concentraciones de acuerdo al tratamiento.

### **3.2.7. Aplicación del control químico**

Se utilizó un compuesto cuproso (Terra Q®) a una concentración de 3 g/L, se aplicó 50 mL por drench por planta, y un antibiótico (Oximet) a una concentración de 1 g/L, se asperjó 3.8 mL por planta. Los dos compuestos se aplicaron al ver los primeros síntomas de la enfermedad.

### **3.2.8. Variables a medir**

Se midieron tres variables: la altura de la planta, porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad.

- La altura de la planta se midió semanalmente por seis semanas a partir de la infección con la bacteria
- El porcentaje de incidencia está dado por la siguiente formula:

$$I = \frac{\text{No. de plantas enfermas}}{\text{No. total de plantas}} \times 100$$

Donde I representa el porcentaje de incidencia.

- La severidad de la planta se realizó bajo la siguiente escala:

0 = Plantas sanas

1 = 1-2 ramas enfermas

2 = 3-4 ramas enfermas

3 = 4 a más ramas enfermas

4 = Planta muerta

### **3.2.9. Análisis de infección con *Cmm***

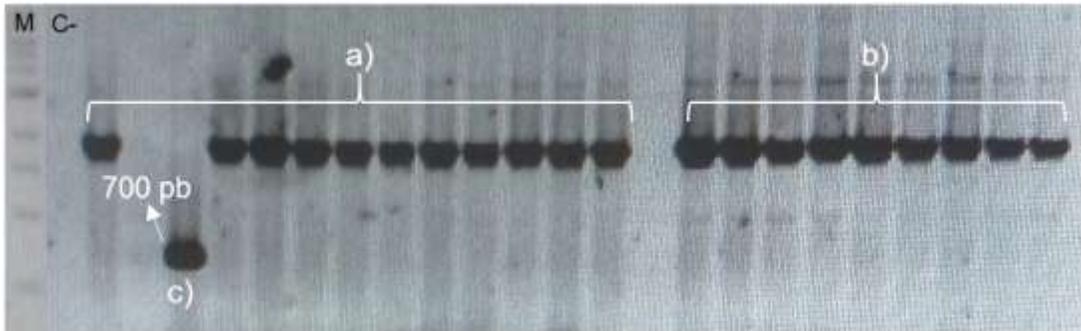
Al finalizar el experimento se realizó la extracción de ADN genómico de dos plantas de *S. lycopersicum* de cada tratamiento. Para corroborar la presencia de *Cmm* y posteriormente una PCR con los oligos *Cmm* 1 y 3, con lo cual se espera un fragmento de aproximadamente 645 pares de bases que correspondes a un fragmento del cromosoma de *Cmm*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Edición génica del gen *SCEI* en plantas de tabaco mediante CRISPR/Cas9

#### 4.1.1. Clonación del vector en células calcio-competentes

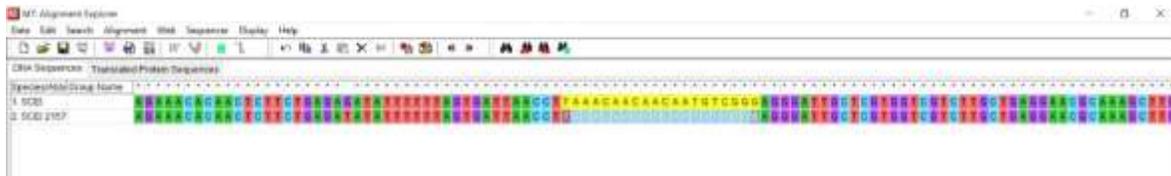
Se picaron colonias al azar para corroborar que tuvieran los plásmidos con las guías de interés (*Gscnt1* y *Gscnt2*), de las cuales sólo una de las colonias amplificó la banda de 700 pb (Figura 5c) correspondiente a la guía *Gscnt1*, mientras que las demás clonas solamente contienen el vector vacío.



**Figura 5. Electroforesis en gel de clonación de vectores. M:** Marcador de peso molecular de 1 kb. **C-:** Control negativo. **a)** Clonas de la guía *Gscnt1*. **b)** Clonas de la guía *Gscnt2*. **c)** Clona que contiene el plásmido con la construcción de interés.

#### 4.1.2. Secuenciación de guía *Gscnt1*

Una vez obtenida la clona transformada se procedió a enviar el producto de PCR de la guía *Gscnt1*, se comprobó que la guía había sido clonada exitosamente (Figura 6).



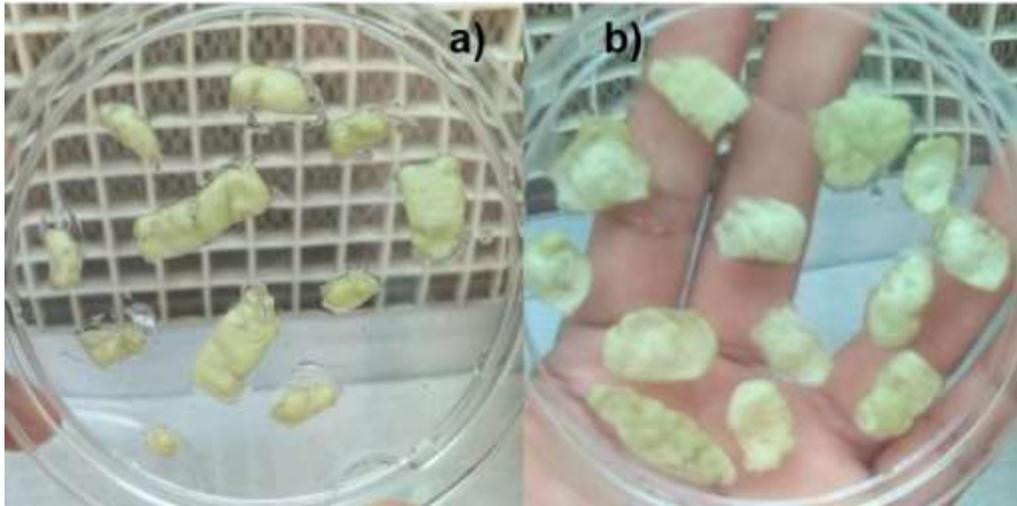
**Figura 6. Secuenciación de guía *Gscnt1* mediante el software MEGA.**

#### 4.1.3. Transformación de *A. tumefaciens* mediante electroporación

Las células electrocompetentes fueron transformadas sin éxito.

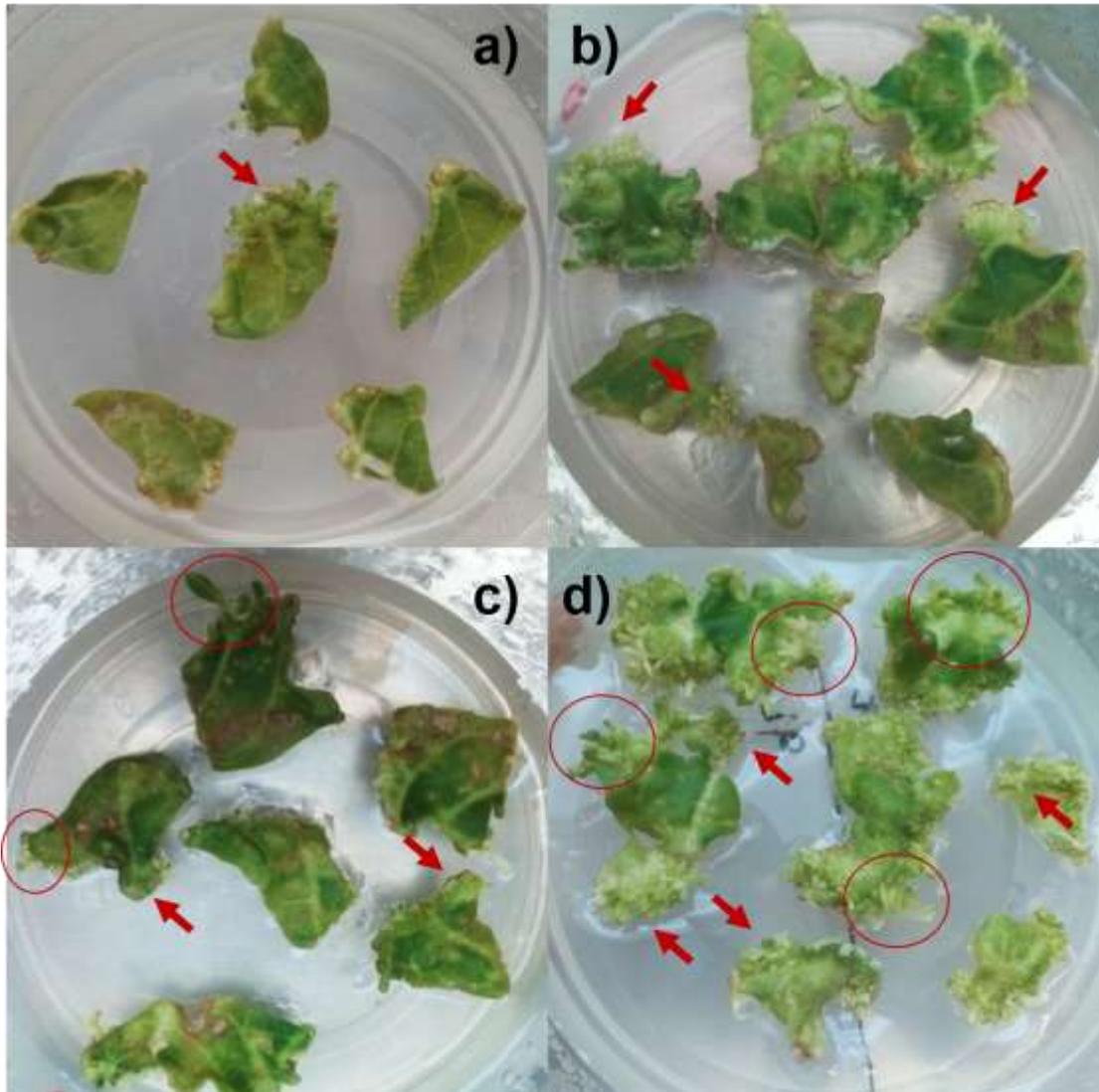
#### 4.1.4. Transformación de hojas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*

Los explantes con la guía *gS2*, presentaron oxidación en la mayoría de los explantes (Figura 7a) por el contrario, los explantes transformados con la guía *gC1* presentaron hinchazón y endurecimiento en todos los explantes (Figura 7b). Hasta el momento no se han obtenido callos.



**Figura 7. Explantes de *Nicotiana benthamiana* transformados después de 36 días. a)** Explantes transformados con la guía gS2. **b)** Explantes transformados con la guía gC1.

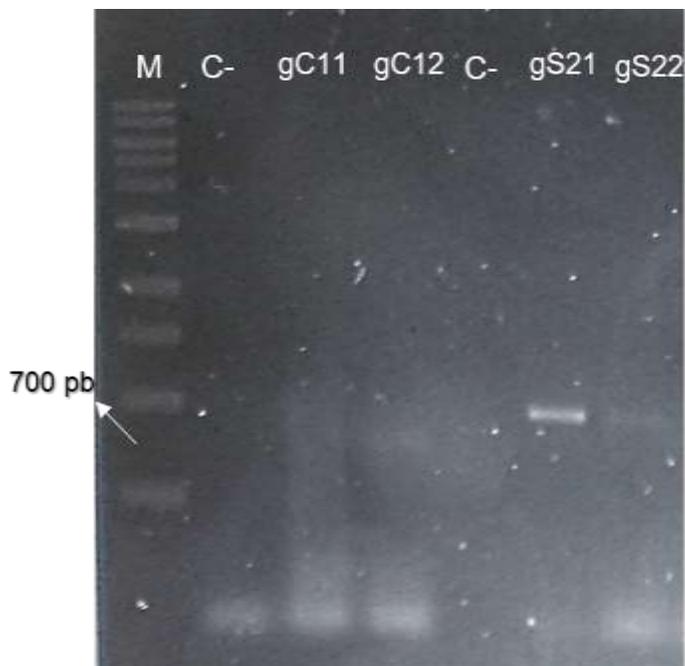
Las hojas transformadas de *N. tabacum* presentaron formación de callos en todas los explantes transformados con las diferentes guías (Figura 8b) por el contrario el control negativo presenta engrosamiento en algunas partes de la planta y sólo un explante presento formación de brotes (Figura 8a).



**Figura 8. Explantes de *N. tabacum* transformados con guías de tomate después de 26 días.** a) Control negativo sin antibiótico. b) Explantes con la guía gS1. c) Explantes con la guía gS2. d) Explantes con la guía gC1. Las flechas rojas indican la formación de callos y los círculos rojos indican formación de brotes.

**4.1.4.1. Análisis de explantes transformados con guías de tomate (gS2 y gC1) de *Nicotiana benthamiana*.**

Los extractos de *N. benthamiana* fueron analizados y los resultados de la visualización en gel de agarosa no mostraron amplificación del amplicon de 700 pb esperado (Figura 9.)

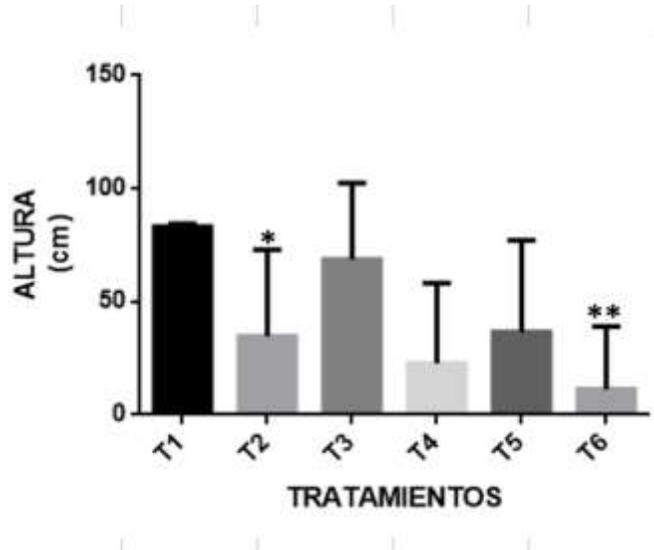


**Figura 9. Electroforesis en gel de explantes. M:** Marcador de peso molecular de 1 kilo base. **C-:** Control negativo. **gC11 y gC12:** Extractos de explantes transformados con la guía de quelatasa. **gS21 y gS21:** Extractos de explantes transformados con la guía del gen *SCEI*

## 4.2. Extracto de *Salvia*

### 4.2.1. Crecimiento de plantas

En la figura 10 se presenta la altura de las plantas después de 5 semanas de tratamiento, el tratamiento T1 (control negativo) y T3 (concentración A) mostraron un crecimiento promedio de 83 cm y 82.4 cm, respectivamente, sin embargo, los tratamientos T4 (concentración B) y T5 (concentración C) mostraron alturas promedio de 68.5 cm y 73 cm, similares a las plantas del tratamiento T2 (control positivo) que alcanzaron una altura de 69.6 cm, estos tratamientos (T1, T3, T4 y T5) mostraron una diferencia significativa con respecto a los tratamientos T2 y T6.



**Figura 10. Crecimiento de plantas 6 semanas después de infección.**  
ANOVA simple con  $p < 0.05$ .

#### 4.2.2. Severidad

La severidad de las plantas fue monitoreada cada semana. En la figura 11 se muestran las plantas sanas al inicio del experimento.

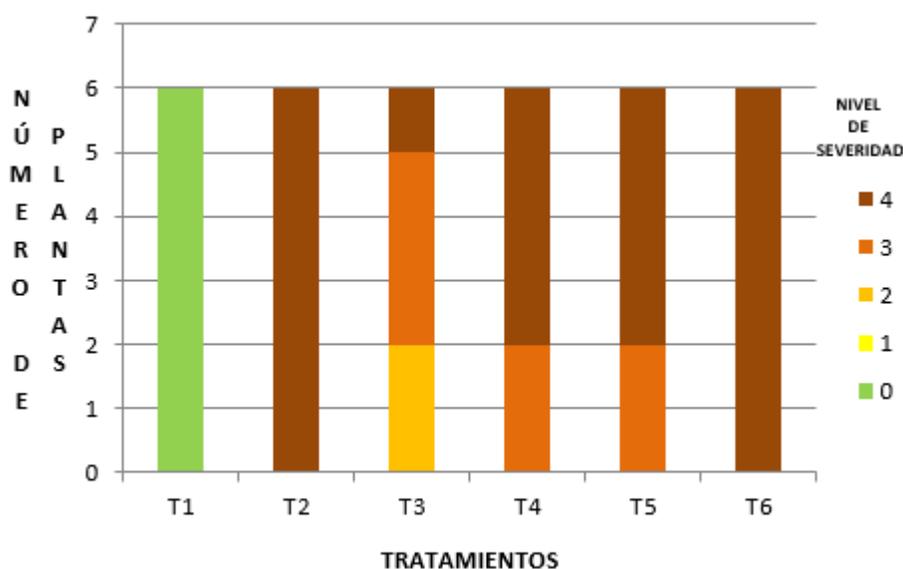


**Figura 11. Plantas de 31 días de edad.** a) Plantas sin infectar. b) Plantas infectadas con *Cmm*. c) Plantas tratadas con Oximet y Terra Q. d) Plantas tratadas con extracto de *Salvia* a concentración A. e) Plantas tratadas con extracto de *Salvia* a concentración B. f) Plantas tratadas con extracto de *Salvia* a concentración C.

En la Figura 13 se presentan los diferentes tratamientos, 6 semanas después de la infección con *Cmm*. El tratamiento T3 (Figura 13d) que fue tratado con concentración A del extracto mostró menor daño foliar, a diferencia del tratamiento T6 (Figura 13c) tratado con Oximet y Terra Q el cual tuvo un similitud con el

tratamiento T2 (Figura 13b) ya que todas las plantas en ambos tratamientos (T2 y T6) se observaron marchitas y tiempo después se observó su descenso.

Con respecto a la severidad, que indica el grado en el cual el tejido de la planta es afectado por la bacteria fitopatógena (Figura 11), las plantas infectadas tratadas a concentración A de extracto tuvieron un 33.4% de severidad 2, un 50 % severidad 3 y el 16.6 % presentaron severidad 4; para los tratamientos a concentración B y C se observó un 33.3 % de severidad 3 y un 66.6% de severidad 4. Las plantas infectadas con *Cmm* y el control químico (T6) tuvieron un 100% de severidad 4 (Figura 12). Las plantas a las que se les aplicaron los químicos mostraron severidad 4 a los 21 días posteriores, comportándose igual que el control positivo (T2). Las plantas tratadas a concentración A del extracto presentaron una disminución de la enfermedad comparadas con las otras dos dosis y con las plantas infectadas solo con *Cmm*.



**Figura 12. Severidad en plantas.**

#### 4.2.3. Incidencia

En todos los tratamientos se obtuvieron valores de incidencia del 100 % (Cuadro 3) a excepción de las plantas del tratamiento T1 (sin infectar) que se mostraron sanas hasta el fin del experimento (Figura 13a).



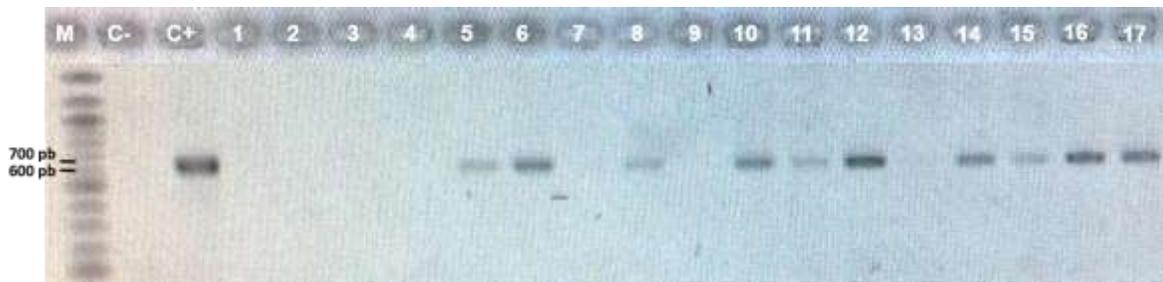
**Figura 13. Plantas 6 semanas después de la infección con *Cmm*.** a) Plantas sin infectar. b) Plantas infectadas con *Cmm*. c) Plantas tratadas con Oximet y Terra Q. d) Plantas tratadas con extracto de *Salvia* a concentración A. e) Plantas tratadas con extracto de *Salvia* a concentración B. f) Plantas tratadas con extracto de *Salvia* a concentración C.

**Cuadro 3. Porcentaje de incidencia.**

Tratamiento	Incidencia (%)
T1	0
T2	100%
T3	100%
T4	100%
T5	100%
T6	100%

#### 4.2.4. Análisis de infección con *Cmm*

Los resultados de la PCR se visualizaron en gel de agarosa (Figura 14). En la figura 14 se puede apreciar que la mayoría de los tratamientos amplificaron la región para cepas de *Cmm*, sin embargo, se obtuvieron resultados particulares, especialmente en el tratamiento T3 (concentración A de extracto de *Salvia*), en donde los extractos del tallo de la planta si amplificaron dicha región (Figura.14, carril 8 y 10) y por el contrario los extractos de las hojas de este mismo tratamiento no la amplificaron (Figura14, carril 7 y 9), de igual forma, el extracto de hoja del tratamiento T4 no presentaron amplificación (Figura 14, carril 13).



**Figura 14. Electroforesis en gel de extractos de ADN genómico de los tratamientos amplificando una región de 645 pb para identificar cepas de *Cmm*. M:** Marcador de peso molecular de 100 pb. **C-:** Control negativo. **C+:** Control positivo. **1)** Planta 1, hoja del tratamiento T1. **2)** Planta 1, tallo del tratamiento T1. **3)** Planta 2, hoja del tratamiento T1. **4)** Planta 2, tallo del tratamiento T1. **5)** Tallo del tratamiento T2. **6)** Tallo del tratamiento T6. **7)** Planta 1, hoja del tratamiento T3. **8)** Planta 1, tallo del tratamiento T3. **9)** Planta 2, hoja del tratamiento T3. **10)** Planta 2, tallo del tratamiento T3. **11)** Planta 1, hoja del tratamiento T4. **12)** Planta 1, tallo del tratamiento T4. **13)** Planta 2, hoja del tratamiento T4. **14)** Planta 2, tallo del tratamiento T4. **15)** Planta 1, hoja del tratamiento T5. **16)** Planta 1, tallo del tratamiento T5. **17)** Planta 2, tallo del tratamiento T5.

## 5. Discusión de resultados

El objetivo de la edición génica con CRISPR no se alcanzó, esto podría deberse a un error en el procedimiento o en los reactivos utilizados.

La inducción de callos en hojas de *N. benthamiana* no se obtuvieron después de 36 días, estudios anteriores en ese mismo laboratorio mostraron que los explantes transformados tienden a morir cuando estos no se transforman exitosamente. Las hojas de *N. tabacum* presentaron formación de callos y posteriormente formación de brotes, los posteriores análisis del ADN de los explantes nos mostrarán si estos presentan transformación o no.

Otro de los objetivos de este estudio fue evaluar el extracto de *Salvia* contra la enfermedad causada por *Cmm*. La cual es una enfermedad que hasta ahora ha causado grandes pérdidas económicas en cultivares de jitomate. Existen diversos estudios sobre biocontroles para reducir la enfermedad. En este estudio, por ejemplo, se evaluaron en las plantas tres factores diferentes: altura, severidad e incidencia, las cuales primeramente fueron sometidas a una infección con *Cmm* y luego tratadas con extractos de *Salvia*.

El principal objetivo de este estudio fue evaluar el extracto de *Salvia* contra la enfermedad causada por *Cmm*. La cual es una enfermedad que hasta ahora ha causado grandes pérdidas económicas en cultivares de jitomate. Existen diversos estudios sobre biocontroles para reducir la enfermedad. En este estudio, por ejemplo, se evaluaron en las plantas tres factores diferentes: altura, severidad e

incidencia, las cuales primeramente fueron sometidas a una infección con *Cmm* y luego tratadas con extractos de *Salvia*.

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una bacteria que se aloja principalmente en el xilema ocasionando de coloración en el tallo, en las hojas que se tornan de color amarillo o marrón (Sen et al., 2015). Bajo las condiciones de este estudio, las plantas tratadas con concentraciones A del extracto de *Salvia* presentaron un menor número de plantas muertas en comparación con las otras dos concentraciones, lo que sugiere que el extracto podría estar inhibiendo el crecimiento de la bacteria, mediante un mecanismo de disrupción de la integridad de la membrana de la bacteria tal como lo reporta Deans y col. (1990), por otra parte, se ha reportado que las bacterias Gram-positivas son sensibles a los componentes de aceites esenciales de *Salvia* (Pattanaik et al, 1997;Khedher et al., 2016). La ausencia de *Cmm* en hojas del tratamiento T3, igualmente sugiere que hubo una inhibición de la bacteria, aunque una inhibición en hojas podría ser un resultado alentador, se necesitan más estudios sobre el potencial del extracto, ya que la bacteria se aloja principalmente en el xilema. Las plantas que fueron tratadas con cobre y un antibiótico presentaron una respuesta desfavorable, pues se observó el descenso de estas, existen reportes sobre la resistencia de *Cmm* a compuestos cuprosos, como Tambong (2017) que reporta que las cinco especies conocidas de *Clavibacter* codifican una proteína de resistencia al cobre y una proteína de membrana conservada en la captación de cobre, creando así sistemas efectivos de homeostasis y resistencia para mantener las cantidades funcionales requeridas de metales como selenio y cobre, mientras desintoxican los excesos. Existen otros reportes que hacen referencia a que el uso de compuestos cúpricos podría resultar en efectos fitotóxicos en las plantas (Sen et al. 2015).

Lo obtenido en el presente estudio establece que con el extracto de *Salvia* a una concentración A puede inhibir del crecimiento de *Cmm* y con ello la disminución de la severidad de la enfermedad. Los resultados aquí presentados facilitarán estudios adicionales sobre el control de esta enfermedad.

## **6. CONCLUSIÓN**

Las técnicas biotecnológicas para el control de enfermedades descritas en el presente trabajo tuvieron un impacto positivo en el residente, ya que se comprobó la funcionalidad del extracto de *Salvia* contra la enfermedad del chancro bacteriano, que aparentemente logró una inhibición de la bacteria en hojas de tomate, esto representa un avance para estudios futuros sobre dicho extracto.

Aunque el objetivo de la edición génica con CRISPR/Cas9 no se completó, se obtuvieron resultados, un conocimiento amplio sobre la técnica, y se reforzaron algunas técnicas vistas en aula, como el cultivo de tejidos, preparación de medios de cultivo, técnicas de PCR, electroforesis, extracción de ADN, entre otras.

Todo lo aprendido y logrado durante la residencia profesional representa un avance hacia nuevas etapas en la vida profesional del alumno.

## **7. COMPETENCIAS DESARROLLADAS**

A continuación se enlistan las competencias desarrolladas durante la estancia en el centro de investigación.

- Adaptabilidad
- Tenacidad
- Trabajo en equipo
- Integridad
- Flexibilidad
- Energía
- Automotivación
- Compromiso
- Tolerancia al estrés

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Anand, M., Venkatesh, J., Prakash, C., Nookaraju, A., Kumar, S. y Won, S. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 51-65.

Barda, O., Shalev, O., Alster, S., Buxdorf, K., Gafni A. & Levy, M. (2015). *Pseudomonas Pseudozyma aphidis* Induces Salicylic-Acid-Independent Resistance to *Clavibacter michiganensis* in Tomato Plants. *Plant Disease*, 99(5), 621-626.

Cook, R. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 31, 53-80.

Cushnie, T., Cushnie, B. y Lamb, A. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of antimicrobial Agents*, 5(44), 377-386.

Danilova, S. (2007). The technologies for genetic transformation of Cereals. *Russian J. Plant Physiol*, 54(5), 569-581.

Deans SG, Sbodova KP. (1990) The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. *Flavour Fragrance Journal*, 5(1), 87–90.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. y Orlova, I. (2007). Plant Volatiles: Recent Advances and future perspectives. *Plant Sciences* 25(5), 417-440.

Elisha, I., Botha, F., McGaw, L. y Eloff, J. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *Complementary and Alternative Medicine*, 17 (1), 133.

El kinany, S., Haggoud, A., Benbouaza, A., Bouaichi, A. & Achbani, E. (2017). Plant growth promotion and bacterial caner control of *Lycopersicon esculentum* L. cv. Cambell 33 by biocontrol agents. *Journal of Crop Protection*, 6(2), 235-244.

El-Mougy, N. & Abdel-Kader, M. (2007). Antifungal effect of powdered spices and their extracts on growth and activity of some fungi in relation to damping-off disease control. *Journal of plant protection research*, 47(3).

Esparza, M., Bañuelos, B., Argüello, G., Lara, J., Goodin, P., Isordia, M., Castillo, R., Rougon, A. Alpuche, A. (2015). Evaluation of a SUMO E2 cojugation enzyme involved in resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* in *Solanum peruvianum*, through a tomato mottle virus VIGS assay. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1019 doi:10.3389/fpls.2015.01019

García, A. y Pérez. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), 119-145.

Gleba, Y.; Klimyuk, V.; Marillonnet S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opinion Biotechn*, 18, 134-141.

- Granados, C. y Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista Actualidad y divulgación científica*, 15(1), 49-61.
- Haziri, A., Faiku, F., Mehmeti, A., Kurteshi, K., Haziri, I. & Rudhani, I. (2018). In Vitro Antibacterial Properties of Ethanol Extract from *Salvia Officinalis* (L.) Plant Growing Wild in Kosovo. *Journal of Scientific & Technical Research*, 2(3).
- Hellens, R., Mullineaux, P. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5(10), 446-451.
- Karimi, M., Bleys, A., Vanderhaeghen, R. y Wilson, P. 2007. Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol*, 145, 1183- 1191
- Khedher, M., Khedher, S., Chaied, I., Tounsi, S. y Hammami, M. (2017). Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia. *EXCLI Journal*, 16, 160-173.
- Knobloch, K., Paul, A., Iberal, B., Weis, N. y Weigand H. (1989). Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res*, 1(1), 119– 28.
- Pitzschke, A.; Hirt, H. (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO J*, 29, 1021-1032.
- Ran, F., Hsu, P., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. y Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR/Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11).
- Rao, A., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A., Husnain, T. y Riazuddin, S. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechn. Adv*, 27, 753-763.
- Sanford, J. (2000). The development of the biolistic process. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36, 303-308.
- Sen, Y., Wolf, J., Visser, R. & Heusden, S. (2015). Bacterial canker of Tomato current Knowledge of detection, management, resistance and interactions. *Plant Disease*, 99(1), 4-13.
- Santi, L.; Huang, Z.; Mason, H. (2006). Virus like particles production in green plants. *Methods*, 40 (1), 66-76.
- Slusarski, C. (2008). Attempts at biological control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on rockwool-grown greenhouse tomatoes. *Research Institute of Vegetable Crops*, 69(1), 125-134.
- Talibi I., Amkraz N., Askarne L., Msanda F., Saadi B., Boudyach E. H., Boubaker H., Bouizgarne B. & Ait Ben Aoumar A. (2011). Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent

of tomatoes' bacterial canker. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17), 4332-4338.

Tambong, J. (2017). Comparative genomics of *Clavibacter michiganensis* subspecies, pathogens of important agricultural crops. *PLoS One*. 12(3), 1-16.

Tancos, m., Chalupowicz, L., Barash, I., Sassom, S. & Smart, C. (2013). Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through External and Internal Routes. *Journals ASM*. 79(72), 6948-6957.

Vasil, I. (2007). A short history of plant biotechnology. *Phytochem*. 7, 387-394.

## **9. ANEXOS**

### **- Medio RMOP por litro**

Vitaminas B5

Ácido naftalen Acético - 0.1 mg/L

Bencilaminopurina - 1 mg/L

Cefatoxina - 250 mg/L

Kanamicina - 100 mg/L

pH 5.8

Sales MS

### **- Medio RMOP sin antibióticos por litro (Medio de co-cultivo)**

Vitaminas B5

Sales MS

ANA – 0.1 mg/L

BA – 1 mg/L

Fitigel - 3 g

pH 5.8