



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Silenciamiento de fibrilarina en *Nicotiana tabacum*

Tesis que presenta

Jeanin Arguelles Quintal

En opción al título de

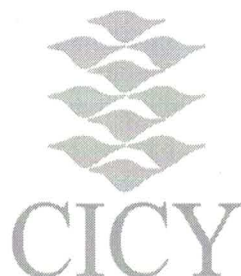
MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Jeanin Arguelles Quintal** titulado “**Silenciamiento de Fibrilarina en *N. tabacum***” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Laboratorio 23, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

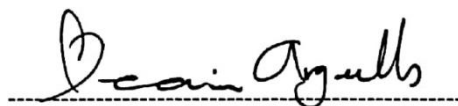
Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de noviembre de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Jeanin Arguelles Quintal

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Silenciamiento de fibrilarina en *Nicotiana tabacum*” bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (Conacyt) y a la dirección adjunta de posgrado y becas, por haberme otorgado la beca nacional para mis estudios de posgrado nivel maestría, así como al centro de investigación científica de Yucatán, por las instalaciones prestadas, tanto para el desarrollo de mi trabajo experimental como para el curso del material académico, apoyos sin los cuales la realización de esta tesis y la culminación de mis estudios de maestría habrían sido imposibles.

Al CICY por la oportunidad de cursar mis estudios de maestría y especialmente a mi asesor, el Dr. Enrique Castaño de la Serna por aceptarme en su grupo de trabajo, por sus consejos y enseñanzas, a la técnica ing. Wilma González Kantun por su tiempo y apoyo en el laboratorio.

Al Dr. Luis Carlos Rodríguez por permitirme trabajar en su laboratorio, al técnico QFB. Miguel Keb por el asesoramiento y apoyo en el laboratorio.

Amigos, compañeros, por su asesoramiento pero más importante por su amistad.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	III
LISTADO DE FIGURAS	III
Listado de Cuadros	V
RESUMEN	VI
abstract	VIII
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
1 El nucléolo	3
1.1 Estructura nuclear	3
2 Fibrilarina	4
2.1 Estructura de la fibrilarina	4
2.2 Localización de la fibrilarina y ciclo celular	5
2.3 Interacción de la fibrilarina con proteínas virales	6
3 Clonación por la tecnología Gateway	6
3.1 Mecanismos de edición del genoma	8
3.1.1 CRISPR Cas9	8
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVO GENERAL	10

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	11
CAPÍTULO II.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
4 Diseño de iniciadores	12
5 Amplificación y clonación de FIBSI EN PDONR tm 221 mediante la reacción bp	12
6 CLONACIÓN DE PDONR TM 221::FIBSI EN PK7GWIWG2 MEDIANTE LA REACCIÓN LR	13
7 TRANSFORMACIÓN DE AGROBACTERIUM CON PK7GWIWG2::FIBSI	13
8 Análisis de la secuencia de ntfib1 y ntfib2	13
9 CLONACIÓN DE Ntfib1 y Ntfib2 EN PDONR TM 221 MEDIANTE LA REACCIÓN BP	13
10 TRANSFORMACIÓN DE <i>NICOTIANA TABACUM</i> POR AGROINFILTRACIÓN	14
11 LAVADOS Y SELECCIÓN	14
12 ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSFORMADAS.....	15
13 Estrategia CRISPR Cas9	15
14 Amplificación de gRNAs.....	15
15 Clonación de gRNAs en pHSN6I01 (13088 pb)	15
CAPÍTULO III.....	16
RESULTADOS	16
16 CONSTRUCCIÓN DE VECTOR DE SILENCIAMIENTO FIBSI.....	16

17	DISEÑO DE OLIGOS	17
18	FLANQUEO DE FIBSI CON LAS CAJAS ATTB	18
19	REACCIÓN BP	18
20	REACCION LR	19
21	TRANSFORMACIÓN DE <i>nicotiana tabacum</i> pOR AGROINFILTRACIÓN	22
22	EVALUACION DE LA EXPRESION DE FIBRILARINA EN EXPLANTES INFECTADOS CON A. TUMEFACIENS.....	25
23	ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE NTFIB1 Y NTFIB2	27
24	FLANQUEO DE LAS FIRMAS DE FIB1 Y FIB2 CON LAS CAJAS ATTB.....	29
25	REACCION BP	29
26	ESTRATEGIA CRISPR Cas9: análisis del genoma de <i>Nicotiana tabacum</i>	30
27	DISEÑO Y AMPLIFICACIÓN DE gRNAS	32
28	CLONACIÓN DE gRNAS	33
	CAPÍTULO IV	34
	DISCUSIÓN.....	34
	CAPÍTULO V	36
	CONCLUSIONES	36
	PERSPECTIVAS	37
	REFERENCIAS	38
	ANEXOS	47
	Anexo I. Células Competentes (DH5 α)	47

ANEXO II. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO	48
Anexo III. pDONR™221 (4761 pb) Invitrogen	49
Anexo IV. Reacción BP, Invitrogen	50
Anexo V. pK7GWIWG2(I) (13599 pb)	51
ANEXO VI. PHSN6I01 (11088 PB)	52
anexo VII. Reacción LR, invitrogen.....	53
aANEXO VIII. TRANSFORMACIÓN DE <i>nicotiana tabacum</i> POR AGROINFILTRACIÓN ...	54

LISTADO DE ABREVIATURAS

ANA: ácido 1-naftalenacético

AT: arginina-timina

AtFib1: fibrilarina 1 de *Arabidopsis thaliana*

AtFib2: fibrilarina 2 de *Arabidopsis thaliana*

BaMV: virus del mosaico de Bamboo

BAP: 6-bencilaminopurina

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CF: componente fibrilar

CFD: componente fibrilar denso

CG: componente granular

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxinucleósidos trifosfatos

GAR: región rica en arginina y glicina

HsFib: fibrilarina de *Homo sapiens*

Int: integrasa

iRNA: ácido ribonucleico de interferencia

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MTasa: metiltransferasa

NOP: proteínas nucleolares

NOR: región de organización nucleolar

NPTII o Neo: neomicina fosfotransferasa II

NtFib: fibrilarina de *Nicotiana tabacum*

Pre-rRNA: pre-ácido ribonucleico ribosomal

PRMT1: proteína arginina N-metiltransferasa 1

rDNA: ácido desoxirribonucleico ribosomal

RNA: ácido ribonucleico

RNPsno: partículas ribonucleares pequeñas del nucléolo

RT: transcriptasa reversa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

SAM: s-adenosilmetion

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo CRISPR Cas.....	8
Figura 2 Análisis in silico de la secuencia de fibrilarina en <i>Capsicum</i>	17
Figura 3 Diseño de oligos para la amplificación de Fibsi.	17
Figura 4 Flanqueo de la secuencia Fibsi.	18
Figura 5 Extracción de DNA plasmidico y PCR de clonas seleccionadas.....	19
Figura 6 Secuenciación Fibsi..	19
Figura 7 Reacción LR.....	20
Figura 8 Amplificación de pK7GWIWG2::Fibsi..	21
Figura 9 PCR en colonia..	21
Figura 10 Periodo de infección con <i>A. tumefaciens</i> a explantes silvestres de <i>N. tabacum</i>	23
Figura 11 Efecto de la kanamicina en explantes silvestres de <i>N. tabacum</i>	24
Figura 12 Monitoreo de la agroinfiltración día 21..	25
Figura 13 Cultivo organogénico indirecto.....	25
Figura 14 Inmunodetección de fibrilarina.....	26
Figura 15 Alineamiento Ntfib1 y Ntfib2.....	27
Figura 16 Análisis del dominio GAR de Ntfib1.....	28
Figura 17 Diseño de oligos.....	28

Figura 18 Carril 1 amplificación de firma fib1 (51pb), carril 2 pcr de fib1 con oligos universales (103pb), carril 4 amplificación de fib2 (88pb), carril 5 pcr de fib2 con oligos universales (140pb).....	29
Figura 19 Extracción de DNA plasmidico y digestión de clonas..	30
Figura 20 Boxshade.....	31
Figura 21 Boxshade.....	32
Figura 22 Selección de gRNAs..	33
Figura 23 Clonación de gRNA.....	33

LISTADO DE CUADROS

Tabla 1 Estrategias de recombinación de la tecnología Gateway	7
Tabla 2 Medios de transformación de <i>A. tumefaciens</i>	14

RESUMEN

Fibrilarina (FBL) es una de las nucleoproteínas más estudiadas, está involucrada en diversos procesos celulares como la biogénesis ribosomal, ensamble de la transcripción basal, remodelación de la cromatina, procesamiento de snoRNA y snRNA. Además, una de sus funciones principales es el procesamiento del pre-RNA con metilaciones 2'O. Su secuencia es conservada a lo largo de la evolución. Estructuralmente, FBL está dividida en dos dominios, el N-terminal y el dominio metiltransferasa. El dominio N-terminal está dividido en dos regiones, la región GAR y la región BCO, con una señal de localización nuclear (NoLS) y una función no identificada, respectivamente. El dominio metiltransferasa tiene una región de unión a RNA y una región α -hélice. A pesar de que, la secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria de FBL es altamente conservada, el dominio Gar varía considerablemente de eucariotas a arqueas.

FBL es una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina, esto quiere decir que aparte de metilar ribosomas también es capaz de metilar a la histona H2A.

Interesantemente, *Arabidopsis thaliana* tiene 2 copias del gen de FBL, y ha sido demostrado que el silenciamiento de estos genes afecta el crecimiento y desarrollo de plantas. Trabajos anteriores han demostrado que FBL es requerida para completar el ciclo de infección de diversos virus de (+)ssRNA probados en plantas silenciadas. De hecho, la mayoría de estos virus, en general, interactúan con FBL. El papel de FBL en virología aun o es definida, así que, se necesitan más estudios.

Por otro lado, la sobreexpresión de FBL genera errores en el patrón de metilación afectando la fidelidad de la traducción y el inicio de la transcripción. En cáncer, Se puede detectar una sobreexpresión de FBL ya que la proteína p53 que es un regulador negativo de FBL está mutada.

En este Proyecto nos enfocamos principalmente en la construcción de vectores que orqueste el silenciamiento de FBL vía RNAi en plantas con la asistencia de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación. Discos foliares de 2 meses de edad fueron transformados y fue posible observar 21 días posteriores a la transformación, una

diferencia fenotípica entre los discos foliares no transformados. Este efecto podría deberse a la disminución en la cantidad de proteína FBL que fue corroborada por Western Blot.

ABSTRACT

Fibrillarin (FBL) is one of the most studied nucleoproteins, since it is involved in multiple cellular processes such as ribosomal biogenesis, basal transcription assembly, chromatin remodeling, snoRNA processing and snRNA to name a few. Although, the main function is the processing of pre-rRNA with 2' O methylations. Its sequence is conserved throughout evolution. Structurally, FBL is divided into two domains, the N-terminal Domain and the Methyltransferase Domain. The N-terminal domain is divided into two regions, the GAR region and the BCO region, with a nucleolar localization signal (NoLS) and an undefined function, respectively. The methyltransferase has an RNA binding region and the α -helix region. Despite the amino acid sequence and secondary structure of FBL is highly conserved, the GAR domain varies considerably from Eukaryotes to Archaeobacteria.

FBL is a methyltransferase-dependent S-adenosyl-L-methionine, this means that apart from methylating ribosomes it also methylates the histone H2A.

Interestingly, *Arabidopsis thaliana* has two copies of the FBL gene, and it has been shown that silencing one of these genes affects the growth and development of plants. Previous works has demonstrated that FBL is required to complete the infective-cycle of several (+)ssRNA viruses by testing the infectivity on FBL silenced plants. In fact, among these viruses, in general, interact with FBL. The roll of FBL in virology isn't yet defined, so more studies needs to be done.

Besides, the overexpression of FBL generates errors in the methylation pattern affecting the fidelity of the translation and the initiation of the transcription. In cancer, an overexpression of FBL can be detected since p53 protein that is a negative regulator of FBL is mutated.

This project focused primarily in the construction of vectors that orchestrate the silencing of FBL via RNAi in plants systems with the assistance of *Agrobacterium tumefaciens* as transformation vector. 2 months old foliar disks were transformed and it was possible to visualize throughout 21 days post-transformation, the phenotypic difference between foliar disks not-transformed. This effect might be due the decrease in the amount of FBL protein which was corroborated by Western Blot.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Fibrilarina es una de las nucleoproteínas más estudiadas, ya que interviene en diversos procesos celulares como: la biogénesis ribosomal, ensamble de la transcripción basal, remodelamiento de la cromatina, procesamiento del snoRNA y snRNA por mencionar algunos. Su función principal es la metilación y procesamiento del pre rRNA, es una proteína que es conservada a lo largo de la evolución. Estructuralmente fibrilarina está dividida en dos dominios, el Dominio N-terminal y el Dominio Metiltransferasa. El dominio N-terminal está dividido en dos regiones, la región GAR y la región BCO. La región GAR tiene la característica de tener una señal nucleolar, la región BCO aún no tiene una función definida. El Dominio metiltransferasa está dividido en dos regiones, región de unión a ARN y la región α -hélice. En general, la secuencia de aminoácidos y estructura secundaria de fibrilarina es altamente conservada. El dominio GAR varía considerablemente de Eucariontes a Arqueobacterias.

Fibrilarina es una S-adenosil-L-metionina dependiente de metiltransferasa, esto quiere decir que aparte de metilar ribosomas (18s y 28s) de igual manera metila moléculas como DNA, RNA y proteínas, como es el caso de la histona H2A (Loza Muller *et al.*, 2015).

En plantas como *Arabidopsis thaliana* se sabe que existen dos copias del gen de fibrilarina, y se ha demostrado que el silenciamiento de uno de estos genes afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas. De igual manera el silenciamiento de dicha proteína en plantas de *N. benthamiana* que posteriormente han sido infectadas con virus, mostraron una resistencia ante ellos, los análisis realizados a estas plantas demostraron que el dominio GAR posiblemente interactúa con las proteínas virales ayudándolas a diseminarse por la planta (Kim *et al.*, 2007). Aún no se sabe cuál es el mecanismo por el cual los virus interaccionan con fibrilarina a pesar de que tiene un papel importante en la diseminación viral.

En contra parte, la sobre expresión de fibrilarina, genera errores en el patrón de metilación generando errores en la fidelidad de la traducción, así como en el inicio de la transcripción

(Virginie Marcel *et al.*, 2013). En células cancerígenas se puede apreciar una sobre expresión de fibrilarina ya que la proteína p53 que es un regulador negativo de fibrilarina se encuentra mutada permitiendo la sobre expresión de esta.

En este proyecto se generó la construcción de vectores que permitirán el silenciamiento de fibrilarina en *N. tabacum* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vector de transformación. Discos foliares fueron transformados y fue posible monitorear el silenciamiento de fibrilarina, 21 días posteriores a la transformación, en ese punto fue posible observar una diferencia fenotípica a diferencia de los controles, atribuida a la disminución en la expresión lo cual fue corroborado mediante Western blot. Sin embargo, es preciso llegar a la regeneración de plantas para realizar estudios donde la actividad sea acentuada.

ANTECEDENTES

1 EL NUCLÉOLO

El nucléolo es un subdominio nucleolar en el cual se ensamblan las unidades ribosomales en células eucariotas, fue observado por primera vez hace 200 años, los nucléolos se ensamblan alrededor de grupos de genes de DNA ribosómico repetidos en tándem y los RNA ribosómicos 28S, 18S y 5.8S (rRNA) se transcriben como un precursor único, que se procesa y ensambla con el rRNA 5S en subunidades ribosómicas. Aunque el nucléolo se asocia principalmente con la biogénesis de los ribosomas, varias líneas de evidencia ahora muestran que tiene funciones adicionales. El nucléolo desmonta en inicio de la mitosis, sus componentes se dispersan en varias partes de la célula y el re-ensamble ocurre en la telofase. El ensamble de los ribosomas ocurre durante con el inicio de la transcripción del pre-mRNA.

El proceso de ensamble de las subunidades de los ribosomas requiere en un principio de la transcripción de los genes de rDNA por la RNA pol I, estos genes están organizados en regiones nucleares organizadas (NORs), que están localizadas en los cromosomas acrocentricos. El rRNA precursor 47s es cortado subsecuentemente por el rRNA 28s maduro, 18s y 5.8s, post-transcripcionalmente modificados por la interacción de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snoRNPs) y factores de procesamiento proteico y, finalmente ensamblados por algunas proteínas ribosomales antes de interaccionar con la maquinaria de exportación y transporte al citoplasma. Análisis bioinformáticos han demostrado que alrededor del 30% de las proteínas presentes en el núcleo están involucradas en el procesamiento de los ribosomas, sin embargo, otras proteínas nucleares están consideradas en otros procesos como control del ciclo celular, replicación del DNA y reparación de DNA (François-Michel Boisver, 2007)

1.1 ESTRUCTURA NUCLEAR

La estructura nuclear es altamente variable y depende del tipo y actividad que realiza la célula en el cual el nucléolo está incluido. El nucléolo puede ser dividido en tres tipos de

clases de acuerdo con la distribución de los componentes de las ribonucleoproteínas: nucléolo reticulado, nucléolo compactado, y nucléolo en forma de anillo (Thiry y Goessens, 1996).

Todos los nucléolos activos tienen dos componentes ribonucleoproteicos (RNP) que contienen precursores de la subunidad ribosomal: componente fibrilar denso y componente granular. El nucléolo reticular contiene redes de hebras formadas por el componente fibrilar denso y componente granular. En el nucléolo compacto existe una distribución relativamente uniforme de las estructuras de RNP y una ausencia de intersticios. Nucléolo en forma de anillo tiene un anillo periférico de componentes RNP alrededor de una zona central, es decir carece de tales estructuras, pero contiene DNA y proteínas. Las células que contienen nucléolos en forma de anillo generalmente tienen una baja tasa de síntesis ribosomal.

2 FIBRILARINA

El nucléolo es la estructura más grande dentro de la célula su función más importante es la biogénesis ribosomal, este proceso involucra la transcripción de rDNA proveniente del rRNA y el ensamblado por proteínas ribosomales. El nucléolo está conformado por: centro fibrilar (FCs), componente fibrilar denso (DFC) y un componente granular. Entre las proteínas nucleares (NOP), la fibrilarina es una proteína altamente conservada en su función y secuencia a lo largo de la evolución. Normalmente la fibrilarina puede ser detectada durante la interface en la zona de transición entre FC y DFC, donde ocurre la transcripción del rDNA, y en el DFC donde el procesamiento del rRNA tiene lugar en células eucariotas, por lo cual la fibrilarina es utilizada como un marcador molecular de la actividad transcripcional de la RNA polimerasa I. Dependiendo del organismo tiene un rango de masa de entre 34KDa y 38KDa y es originalmente descrita en el nucléolo (Christensen *et al.*, 1977).

2.1 ESTRUCTURA DE LA FIBRILARINA

La fibrilarina está dividida en dos grandes dominios: el dominio N-terminal y un dominio MTase. El dominio N-terminal está dividido en dos regiones: el dominio GAR con alrededor

de 77 aminoácidos y la región espaciadora con 66 aminoácidos. El dominio GAR es el responsable de la interacción entre diferentes células y proteínas virales y tiene una señal de retención nucleolar. (Snaar *et al.*, 2000) concluyó que el dominio GAR dirige la proteína al núcleo y está involucrado en la retención en el nucléolo. Sin embargo, para la localización nucleolar, se requiere el motivo de unión a RNA. Por otra parte, esta región no es requerida para la localización de la fibrilarina en cuerpos cajales (CBs). El dominio GAR de fibrilarina de humanos y fibrilarina de *Arabidopsis* es necesario para la localización nuclear de la proteína (Pih *et al.*, 2000; levitskii *et al.*, 2004) y es metilado en varios residuos de arginina. La fibrilarina ha sido descrita como sustrato de la metilación de arginina por la enzima arginina N-metiltransferasa1 (PRMT).

El dominio Mtase está dividido en dos regiones: región R o ventral con 87 aminoácidos y una región de 95 aminoácidos ricos en estructura α -hélice. Dentro de la región R, está el motivo de unión a RNA GCVYAVCF específico de proteínas. El dominio C terminal es caracterizado por su estructura conservada compuesta por siete hojas beta y alfa hélice, y tres aminoácidos conservados.

2.2 LOCALIZACIÓN DE LA FIBRILARINA Y CICLO CELULAR

La fibrilarina, así como otras proteínas nucleares es altamente dinámica, debido al flujo de moléculas requeridas para el proceso de la biogénesis ribosomal. El estudio de la dinámica de la fibrilarina se ha llevado a cabo marcando la proteína con proteína verde fluorescente siguiendo la recuperación de la fluorescencia después de experimentos de foto blanqueo. Las observaciones de dicho experimento muestran un rápido intercambio entre la fibrilarina en el nucléolo y el nucleoplasma, también muestran ligeras diferencias cinéticas dependiendo de la localización de la fibrilarina (Phair and Misteli, 2000; Snaar *et al.*, 2000). Bajo estas condiciones, las moléculas de la fibrilarina están presentes en CB y el nucléolo solo por corto tiempo.

La abundancia y localización de la fibrilarina durante mitosis ha sido estudiada a detalle en varios modelos, la fibrilarina está localizada en el cuerpo fibrilar denso (DFC) del núcleo durante la interfase y su concentración puede duplicar de G1 a G2 (Cerdido and Medina, 1995).

2.3 INTERACCIÓN DE LA FIBRILARINA CON PROTEÍNAS VIRALES

La fibrilarina es una proteína esencial para la vida ya que es requerida para múltiples funciones de la célula. En las plantas el efecto de silenciamiento de la expresión de la fibrilarina sugiere que, la fibrilarina está involucrada únicamente en el movimiento de los virus (Sang et al, 2007)

Las proteínas virales de diversas plantas, son capaces de generar proteínas de movimiento que pueden localizarse en el núcleo y co-localizarse en el nucléolo donde se encuentra la fibrilarina. Algunas de estas proteínas pueden interactuar directamente con la fibrilarina, se requiere de dichas interacciones para facilitar las diferentes funciones de los virus. Estas proteínas pueden llegar al nucléolo donde se encuentra la fibrilarina y reclutarla para poder llevar las proteínas virales al citoplasma tal como lo hace ORF3 del virus GRV (Kim et al., 2007a, Kim et al., 2007b, Canetta et al., 2008).

Este fenómeno se ha repetido con otros virus como PVA (virus de la papa A) donde la fibrilarina interactúa con la proteína de movimiento VPg, la cual tiene una localización nuclear y nucleolar, cuyo agotamiento reduce la acumulación de PVA (Rajamaki et al 2009).

Sin embargo, numerosos estudios correlativos han indicado que el nucléolo puede jugar un papel importante en el ciclo de infección de los virus. (Martínez and Daròs, 2014; Rossi et al., 2014; Talianky et al., 2010).

3 CLONACIÓN POR LA TECNOLOGÍA GATEWAY

La tecnología Gateway es un método de clonación universal basada en la recombinación sitio-específica del bacteriófago lambda (Landy, 1989), para facilitar la integración en cromosoma de *E. coli* y el intercambio de la vía de lítica a lisogénica. La tecnología Gateway provee una rápida y eficiente manera de clonar secuencias de DNA en diferentes sistemas de vectores, para un análisis funcional o expresión de proteínas (Hartley et al., 2000). La integración de Lambda en el cromosoma de *E. coli* ocurre a través de la recombinación de DNA intermolecular que está mediada por una mezcla de proteínas de recombinación codificadas por lambda y *E. coli* (es decir, la mezcla de enzimas Clonase™). La

recombinación ocurre entre sitios de unión específicos (att) en las moléculas de DNA que interactúan. La recombinación es conservativa y no requiere síntesis de DNA. Los segmentos de DNA flanqueados con sitios de recombinación son cambiados, después de la recombinación, los sitios att son secuencias híbridas compuestas de cada vector parental o previo, por ejemplo, los sitios attL están compuestos de secuencias provenientes de sitios attB y attP. La recombinación puede ocurrir entre DNA de cualquier tipología.

La recombinación lambda ocurre entre sitios específicos de adhesión (“attachment” (att)): attB para E. coli y AttP para Lambda. Los sitios att sirven como sitios de unión para proteínas de recombinación. Así mismo la recombinación de lambda es catalizada por un mix de enzimas que se unen a secuencias específicas (sitios att), reunir los sitios objetivo, escindirlos y unir covalentemente el DNA. Las proteínas de recombinación involucradas en la reacción difieren dependiendo de si lambda utiliza la vía lítica o lisogénica.

Tabla 1 Estrategias de recombinación de la tecnología Gateway

Pathway	Reaction	Catalyzed by...
Lysogenic	$attB \times attP \rightarrow attL \times attR$	BP Clonase™ (Int, IHF)
Lytic	$attL \times attR \rightarrow attB \times attP$	LR Clonase™ (Int, Xis, IHF)

La tecnología Gateway usa el sistema de recombinación de lambda para facilitar la transferencia de secuencias heterólogas de DNA a diferentes vectores y está basada en dos reacciones de recombinación, reacción BP y reacción LR.

Reacción BP: facilita la reacción de recombinación del sustrato de attB (producto de attB-PCR) con el sustrato attP (vector donador) para crear attL secuencia que está en el vector de entrada. Esta reacción está catalizada por B P clonasa.

Reacción LR: facilita la recombinación del sustrato attL (clona de entrada) con el sustrato attR (vector destino) para crear attB contenida en la clona de expresión. Esta reacción esta catalizada por LR clonasa.

3.1 MECANISMOS DE EDICIÓN DEL GENOMA

3.1.1 CRISPR Cas9

La tecnología CRISPR está basada en el sistema de defensa de las bacterias, es la manera que ellas evitan ser dañadas por los fagos. En el 2012 se utilizó el mecanismo que utilizan las bacterias como sistema inmune para generar una herramienta de edición, generando un RNA guía, el cual contendría la secuencia blanco del gen a editar. La proteína Cas 9 tiene la capacidad de cortar la doble hebra del DNA ya que cuenta con dos dominios, uno con actividad de DNasa y el otro con actividad de RNasaH, esto quiere decir que corta DNA unido a RNA. Cas 9 reconoce secuencias específicas para poder realizar un corte, estos sitios son conocidos como PAM (Jennifer Doudna *et al* 2012). El gRNA que lleva la secuencia específica del gen, buscará su complementariedad dentro del genoma, una vez encontrado la proteína Cas 9 podrá realizar el corte, este daño generado al DNA deberá o no ser reparado. En plantas se ha demostrado que es posible dirigir cortes en el genoma, tal es el caso de *N. benthamiana* que en un trabajo de Matsuo de 2019, donde utilizó esta técnica para mutar una proteína involucrada en el proceso de RNAi en plantas, con el objetivo de generar plantas las cuales sean capaces de producir en masa proteínas recombinantes.

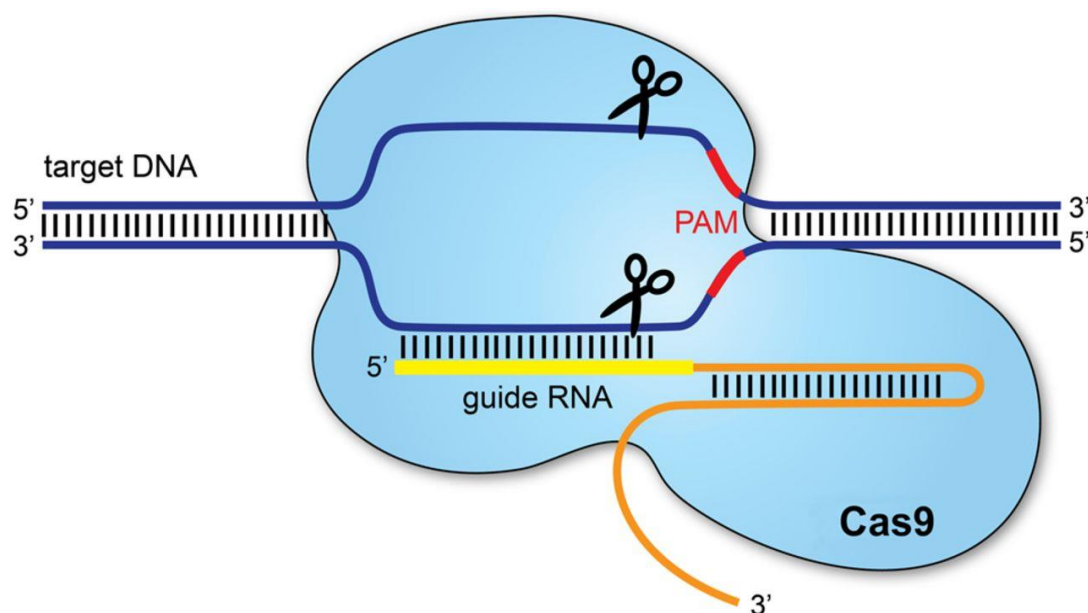


Figura 1 Mecanismo CRISPR Cas. Esquema del mecanismo de corte de DNA por Cas9. En rojo se observan los sitios PAM, secuencias adyacentes al punto de corte. En amarillo observamos el gRNA que guiara el corte

JUSTIFICACIÓN

Bajos niveles de fibrilarina en células vegetales, provocan un deterioro en el desarrollo vegetal generando plantas enanas, así mismo, bajos niveles de expresión de la fibrilarina en células vegetales han sido relacionado con el impedimento de la diseminación viral. Por lo que, el presente trabajo tiene como objetivo generar las herramientas para el silenciamiento de fibrilarina en *N. tabacum* que permita estudiar la interacción de fibrilarina con proteínas virales.

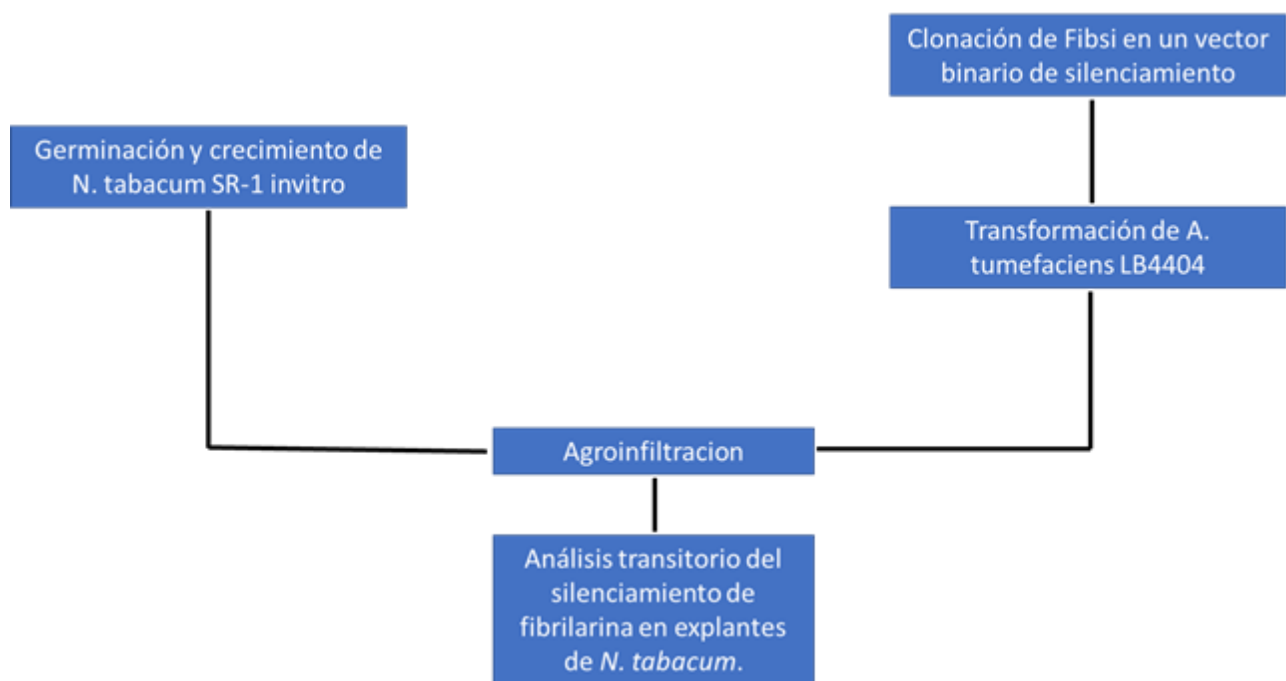
OBJETIVO GENERAL

- Silenciar fibrilarina en *Nicotiana tabacum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transformar *N. tabacum* SR-1 con *A. tumefaciens* LB4404 portador del vector de silenciamiento.
- Evaluar de manera transitoria el silenciamiento en explantes transformados con vector de silenciamiento.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

4 DISEÑO DE INICIADORES

Los iniciadores para amplificar la secuencias de Ntfib1, Ntfib2 y Fibsi fueron diseñados con base a la secuencia cds, que se encuentra en la base de datos del National Center of Biotechnology information (NCBI). Se diseñaron los cebadores con las cajas parciales con 12 pb de attB1 (AA AAA GCA GGC TNN) y attB2 (A GAA AGC TGG GTN) junto con los iniciadores NtFibsi_Fwd, NtFibsi_Rvs, Ntfi1_Fwd, Ntfib1_Rvs, Ntfib2_Fwd, Ntfib2_Rvs respectivamente.

5 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE FIBSI EN PDONR™221 MEDIANTE LA REACCIÓN BP

A partir del vector pGEM::Ccfib el cual fue utilizado para la amplificación de Fibsi. El vector donador pDONR™221 de 4761 pb (Gateway® pDONR™ Vectors, Invitrogen, cat. No. 12536-017, Carlsbad, CA) fue utilizado para clonación de Fibsi. La clonación se realizó mediante recombinación sitio específica con la tecnología Gateway®. Se diseñaron los cebadores con las cajas parciales con 12 pb de attB1 (AA AAA GCA GGC TNN) y attB2 (A GAA AGC TGG GTN) junto con los iniciadores Fibsi_Fwd y Fibsi_Rvs, respectivamente. Se utilizó como template para una segunda PCR con las cajas completas con 29 pb de attB1 (G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T) y attB2 (GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT) que recombinan con las cajas parciales de 12 pb. Se purificó una banda que correspondiera a 228 pb y se clonó en pDONR™221 por recombinación sitio específica mediante la reacción BP con las cajas attB del gen Fibsi y las cajas attP del vector donador. Se transformó el vector con células competentes de *E. coli* cepa DH5α en medio LB suplementado con kanamicina en 50 mg/mL se verificó la presencia del inserto por PCR.

6 CLONACIÓN DE PDONR™221::FIBSI EN PK7GWIWG2 MEDIANTE LA REACCIÓN LR

El vector binario pK7GWIWG2 (I) de 13599 pb (Plant System Biology) se utilizó para la clonación de Fibsi mediante la reacción LR. La recombinación sitio específica se estableció entre el pDONR™221::Fibsi y el vector pK7GWIWG2 con las cajas attL y attR, respectivamente. Se transformaron células de *E. coli* cepa DH5α en medio LB suplementado con kanamicina y se analizó la presencia del inserto por PCR y enzimas de restricción.

7 TRANSFORMACIÓN DE AGROBACTERIUM CON PK7GWIWG2::FIBSI

Se transformó la cepa EHA105 de *Agrobacterium* en el vector binario pK7GWIWG2::Fibsi por el método de choque térmico [CITATION Wan06 \l 2058]

8 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE NTFIB1 Y NTFIB2

Se analizó la secuencia de Ntfib reportada en la base de datos del National Center of Biotechnology information (NCBI). A partir de esta información ambas secuencias fueron alineadas con el fin de encontrar una región que diferenciara una de la otra.

9 CLONACIÓN DE NTFIB1 Y NTFIB2 EN PDONR™221 MEDIANTE LA REACCIÓN BP

El vector donador pDONR™221 de 4761 pb (Gateway® pDONR™ Vectors, Invitrogen, cat. No. 12536-017, Carlsbad, CA) fue utilizado para clonación de Ntfib1 y Ntfib2. La clonación se realizó mediante recombinación sitio específica con la tecnología Gateway®. Se diseñaron los cebadores con las cajas parciales con 12 pb de attB1 (AA AAA GCA GGC TNN) y attB2 (A GAA AGC TGG GTN) junto con los iniciadores Ntfib1FW, Ntfib1RV, Ntfib2FW, Ntfib2RV respectivamente. Se utilizó como template para una segunda PCR con las cajas completas con 29 pb de attB1 (G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T) y attB2 (GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT) que recombinan con las cajas parciales de 12 pb.

10 TRANSFORMACIÓN DE *NICOTIANA TABACUM* POR AGROINFILTRACIÓN

La transformación de *N. tabacum* se realizó mediante la técnica de agroinfiltración. Se utilizó la cepa EHA105 (resistente a rifampicina) de *Agrobacterium* ya transformada con el vector binario pK7GWIWG2::Fibsi (resistente a espectinomicina) para infectar el genotipo SR-1 de *Nicotiana tabacum* por agroinfiltración. El crecimiento de *Agrobacterium* transformado con pK7GWIWG2::Fibsi se mantendrá mediante rifampicina (100 mg L^{-1}) y espectinomicina (50 mg L^{-1}). Los explantes se colocarán en cajas Petri con medio de precultivo a 25°C bajo fotoperiodo de 18 horas de luz por 24 horas. Se traspasaron los explantes de las placas con medio de precultivo a los medios de cocultivo líquido con bacterias suplementado con Acetosiringona ($100 \mu\text{M}$). Colocar los explantes a una presión de 40 cm Hg constantes durante 5 min. Retirar la presión y repetir, dejando 3 minutos de reposo sin presión. Se retiran los explantes y se colocan en placas con medio de cocultivo (Acetosiringona $100 \mu\text{M}$) durante 3 días en un régimen de 18 horas de luz y a temperatura ambiente.

11 LAVADOS Y SELECCIÓN

Se lavaron los explantes con timentina (200 mg L^{-1}) y cefataxima (100 mg L^{-1}) en una solución al 0.9% (p/v) de NaCl. Posterior a los lavados, se transfieren los explantes en medio de selección suplementado con kanamicina (100 mg L^{-1}) y timentina (200 mg L^{-1}). Se transfieren los explantes a un medio de selección fresco nuevo cada dos semanas en un régimen de 18 horas de luz a temperatura ambiente (CLEMENTE, 2006).

Tabla 2 Medios de transformación de *A. tumefaciens*

Soluciones	Medio de precultivo 1L	Medio de cocultivo 1L	Medio de propagación
Macronutrientes 10X	100 mL	10 mL	100 mL
Micronutrientes 100X	10 mL	1 mL	10 mL
Fe EDTA 100X	10 mL	1 mL	10 mL
Vitaminas	10 mL	10 mL	10 mL
BAP (1mg/ mL)	1 mL	1 mL	1 mL
ANA (1mg/ mL)	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Sacarosa	30 g	30 g	30 g
PH (KOH/ HCl)	5.7	5.4	5.7
Agar	8 g	8 g	8 g

12 ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSFORMADAS

Las plantas infectadas se analizaron por su fenotipo, por la acumulación de mRNA de Fibi por Western Blot.

13 ESTRATEGIA CRISPR CAS9

Se analizó en el genoma de *Nicotiana tabacum* con el programa CRISPR Direct con el objetivo de encontrar gRNAs que permitieran generar líneas de plantas con una sola copia del gen de fibrilarina. Dichos gRNAs fueron clonados en vector pHSN6I01 (13088 pb).

14 AMPLIFICACIÓN DE GRNAS

Se diseñaron los cebadores bajo los sitios de restricción de BsaI tanto para 5'-3'. Estos sitios permitirán clonar los gRNAs en el vector pHSN6I01 (13088 pb) bajo la técnica Golden Gate Cloning.

15 CLONACIÓN DE GRNAS EN PHSN6I01 (13088 PB)

El vector donador pHSN6I01 (13088 pb) (Addgene núm. cat 50587) fue utilizado para clonación de gRNA_Ntfib1 y rRNA_Ntfib2. La clonación se realizó mediante Golden Gate Cloning, método en el cual se explotan la capacidad de las endonucleasas de restricción de Tipo IIS (REases) para escindir el DNA fuera de la secuencia de reconocimiento. Los insertos y los vectores de clonación están diseñados para colocar el sitio de reconocimiento de Tipo IIS en un lugar distal al sitio de escisión, de tal manera que la IAS Tipo IIS pueda eliminar la secuencia de reconocimiento del ensamblaje.

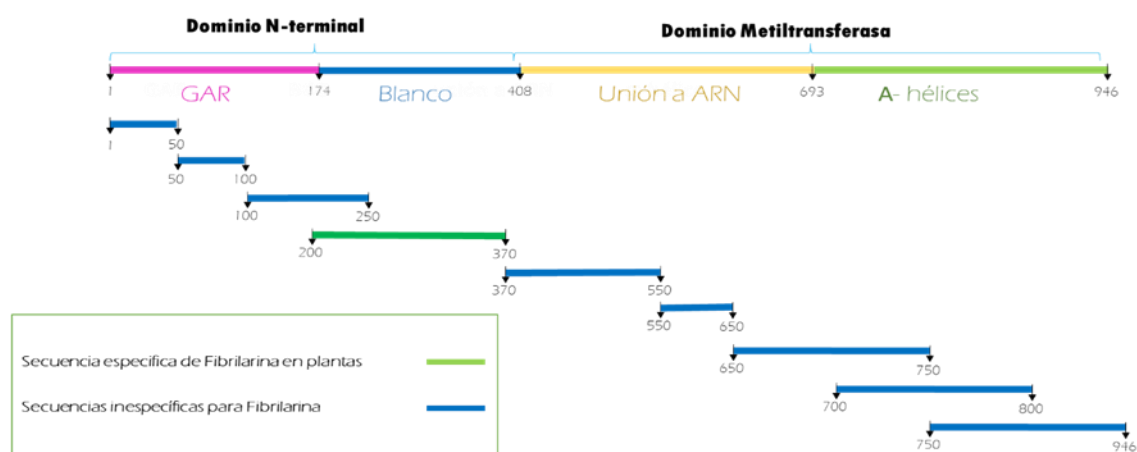
CAPÍTULO III

RESULTADOS

16 CONSTRUCCIÓN DE VECTOR DE SILENCIAMIENTO FIBSI

A partir de la secuencia de la fibrilarina de *Capsicum chinense* se realizó un análisis de la secuencia para encontrar un fragmento específico de la fibrilarina para plantas. Dicho fragmento fue encontrado en el dominio N-terminal con un tamaño 170 pb. (figura 2). Así mismo se realizó un alineamiento con Ntfib1 y Ntfib2 observando la presencia de esta firma (Fibsi) en ambos genes. Con esta firma se espera silenciar ambos genes dentro del genoma de *N. tabacum*.

A)



B)

```
Ntfib2  GGGMRGGGNVLIIPHRHEGIFLAKSKEDALVTKNLVPGVAVYNEKRISVQ
Ntfib1  GGGFKGGNKVVVEPHRHGGVFIAGKEDALCTKNLVPGEAVYNEKRISVQ
Fibsi   GGGFKGGNKVVVEPHRHGGVFIAGKEDALCTKNLVPGEAVYNEKRISVQ
      ***.:**.:*.:*  ****  *.:*:*.*.*****  *****  *****

Ntfib2  SEDGTKVĒ
Ntfib1  NEDGTKVĒ
Fibsi   NEDGTKV-
      .*****
```

Figura 2 Análisis in silico de la secuencia de fibrilarina en *Capsicum*. . A) En azul se observan secuencias inespecíficas de fibrilarina; en verde se observa secuencia específica de fibrilarina en plantas de un tamaño de 170 pb. B) Alineamiento de Fibsi contra Ntfib1 y Ntfib2.

17 DISEÑO DE OLIGOS

Se diseñaron oligos para la amplificación de la secuencia Fibsi la cual tiene un largo de 170 pb y se encuentra en el dominio N-terminal de fibrilarina específicamente en la región BCO, las cajas attB fueron agregadas (figura 3). Esta secuencia se encuentra en ambos genes de fibrilarina.

TGGGAGAGGAGGAGGCAGAGGCGGTAGAGGTGGAGGAAGGGGACGTGGTGGAGGAG
GAATBAAGGGTGGTAGTAAGGTTATAGTGGAGCCTCATAGACATGGAGGTGTGTTATTG
CTAAGGGTAAGGAAGATGCACTTTGTACCAAGAATTGGTACCTGGTGAAGCT

Oligos de FibSi con cajas attB

Fibsi Fw	• AAAAAGCAGGCTTGGGAGAGGAGGAGGCAG
Fibsi Rv	• AGAAAGCTGGGTGAGCTTCACCAGGTACCAA

Figura 3 Diseño de oligos para la amplificación de Fibsi. Los oligos fueron diseñados a partir de la secuencia encontrada, con una TM de 60°. Las cajas attB fueron agregadas.

18 FLANQUEO DE FIBSI CON LAS CAJAS ATTB

La clonación de Fibsi en el plásmido donador pDONR™ 221 se realizó mediante la tecnología de Gateway®. Se amplificó Fibsi con las cajas parciales de 12 pb attb, donde se puede observar, una banda cercana al marcador de 194 pb, que puede corresponder a los 170 pb de Fibsi, más los 24 pb de ambas cajas parciales de attB. Posteriormente se realizó una segunda PCR al fragmento amplificado con los oligos universales de attB (figura 4).

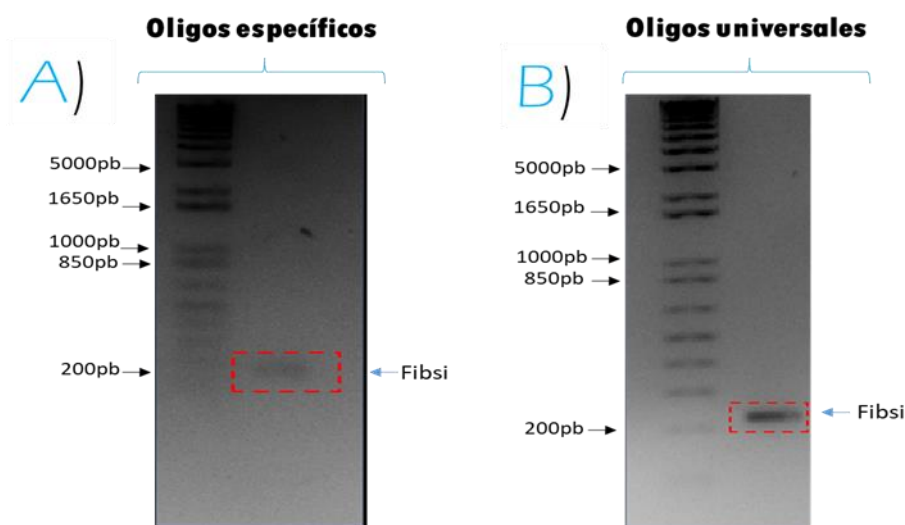


Figura 4 Flanqueo de la secuencia Fibsi. a) Amplificación con las cajas parciales attB en Fibsi (194 pb); b) Amplificación con las cajas completas attB en Fibsi (252 pb)

19 REACCIÓN BP

Se realizó la reacción BP de la tecnología Gateway Cloning Technology mediante la recombinación del NtFib flanqueado con las terminaciones attB y el vector donador; pDONR™ 221 (4761 pb). El producto de la recombinación se transformó en células competentes de *E. coli* cepa DH5α en placas con medio LB suplementado con kanamicina. Se realizó PCR de colonias posibles con la construcción con los oligos de Fibsi y se notó una banda de aproximadamente 170pb (figura 5). La construcción generada fue mandada a secuenciar y dicha secuencia corresponde a Fibsi (figura 6).

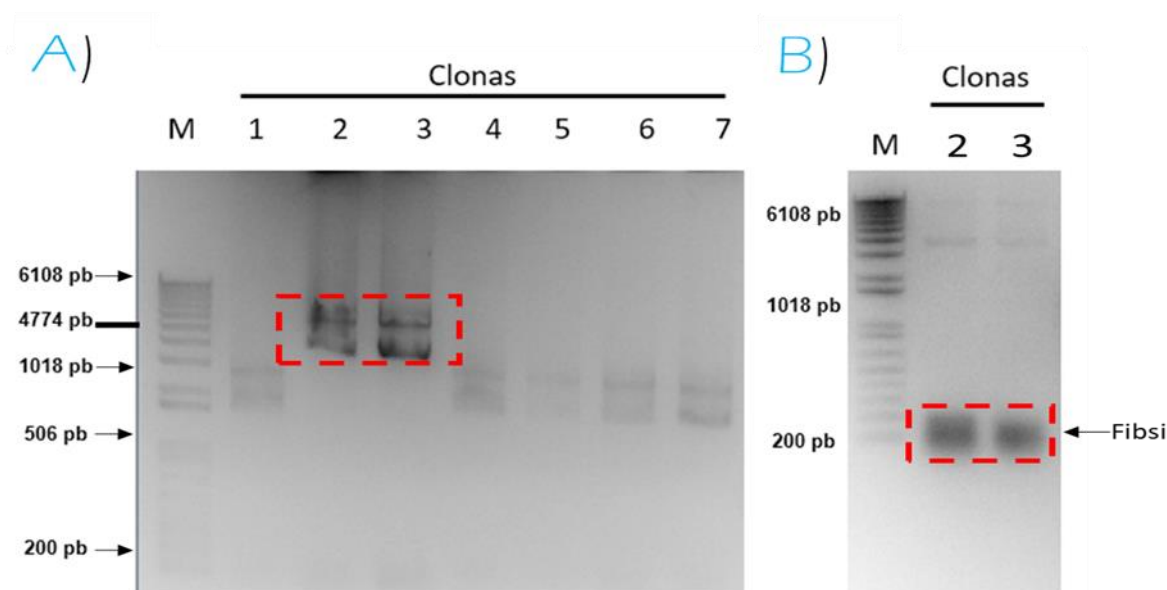


Figura 5 Extracción de DNA plasmidico y PCR de clonas seleccionadas. a) extracción de DNA plasmidico donde se pudo observar diferentes alturas, tomando las de aproximadamente 4774 que corresponderían a Fibsi+pDONR. b) Amplificación de clonas seleccionadas con oligos Fibsi_Fwd y Fibsi_Rvs.

```

clona3      AGGTGGAGGAAGGGGACGTGGTGGAGGAGGAATGAAGGGTGGTAGTAAGGTTATAGTGA
Fibsi       AGGTGGAGGAAGGGGACGTGGTGGAGGAGGAATGAAGGGTGGTAGTAAGGTTATAGTGA
clona2      AGGTGGAGGAAGGGGACGTGGTGGAGGAGGAATGAAGGGTGGTAGTAAGGTTATAGTGA
*****

clona3      GCCTCATAGACATGGaGGTGTGTTTATTGCTAAGGGTAAGGAAGATGCACTTTGTACCAA
Fibsi       GCCTCATAGACATGGAGGTGTGTTTATTGCTAAGGGTAAGGAAGATGCACTTTGTACCAA
clona2      GCCTCATAGACATGGAGGTGTGTTTATTGCTAAGGGTAAGGAAGATGCACTTTGTACCAA
*****

```

Figura 6 Secuenciación Fibsi. Resultados de la secuenciación de las clonas seleccionadas, donde se pudo observar la correcta clonación de este fragmento.

20 REACCION LR

Se realizó la reacción LR de la tecnología Gateway Cloning Technology mediante la recombinación de pDONR::Fibsi flanqueado con las terminaciones attB y el vector binario

pK7GWIWG2(I) (13599 pb). El producto de la recombinación se transformó en células competentes de *E. coli* cepa DH5 α en placas con medio LB suplementado con kanamicina. Se realizó PCR en colonia y se pudo observar la amplificación de una banda de aproximadamente 256pb correspondientes a Fibsi (figura 7). Para corroborar la correcta recombinación en sentido y anti-sentido del fragmento Fibsi, se diseñaron oligos del T35s y P35s, estos oligos en pK7GWIWG2(I) amplificarán una banda de 4283pb. Se realizó PCR de pK7GWIWG2(I)::Fibsi y se pudo observar una banda de aproximadamente 1359pb (figura 8), que corresponderían a la correcta clonación en sentido y anti-sentido del fragmento Fibsi. Una vez confirmada la clonación de Fibsi mediante PCR, el producto de la recombinación fue transformado en células competentes de agrobacterium cepa LBA4404 en placas de medio YEB suplementado con rifampicina y espectomicina. Se realizó PCR en colonia. Se pudo observar la amplificación de un fragmento de aproximadamente 170pb que pudiera corresponder a Fibsi (figura 9).

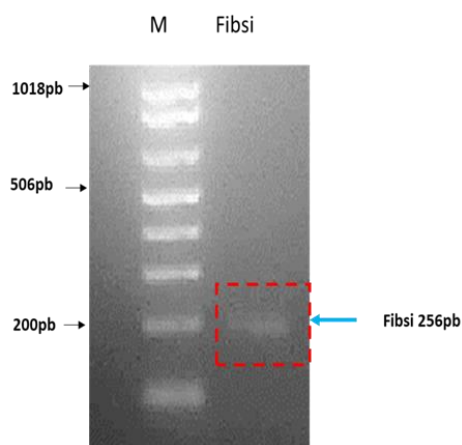


Figura 7 Reacción LR. Amplificación de secuencia Fibsi en colonia seleccionada con oligos Ntfibsi_Fwr y Ntfibsi_Rvs, donde se puede observar un fragmento de aproximadamente 256 pb correspondientes a Fibsi.

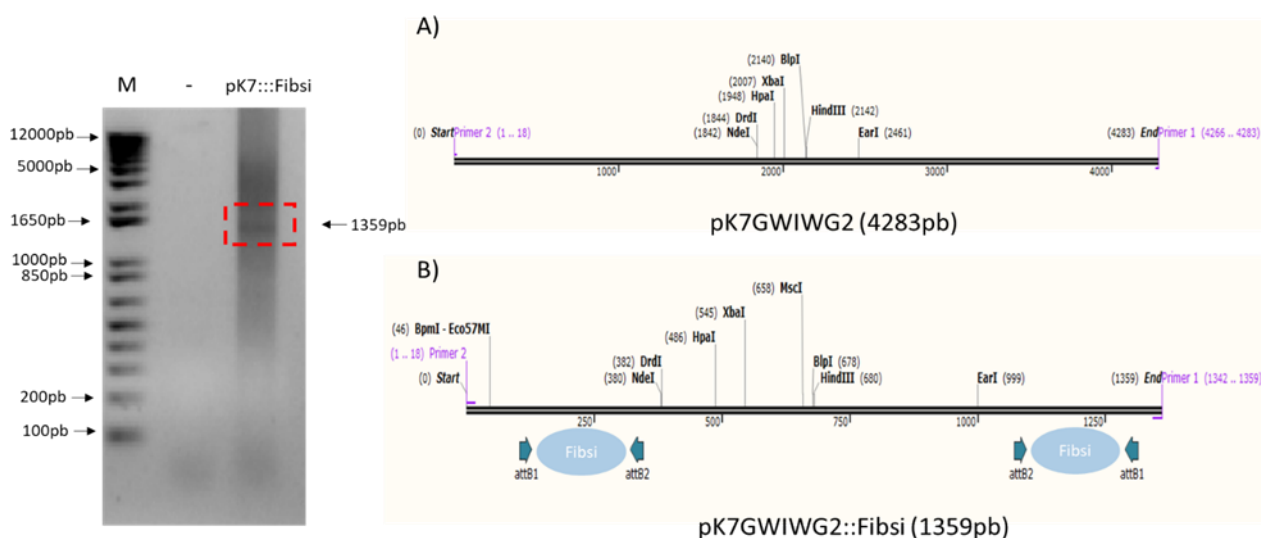


Figura 8 Amplificación de pK7GWIWG2::Fibsi. Amplificación del fragmento que va del P35s a T35s para corroborar la correcta inserción de Fibsi en sentido y anti-sentido, donde se pudo observar una banda de aproximadamente 1359pb correspondientes a la inserción de Fibsi en pK7GWIWG2(I). A) fragmento que amplifican los oligos T35s y P35s en pK7GWIWG2(I) (4283pb). B) fragmento que amplifican los oligos P35s y T35s en pK7GWIWG2::Fibsi. (1359pb).

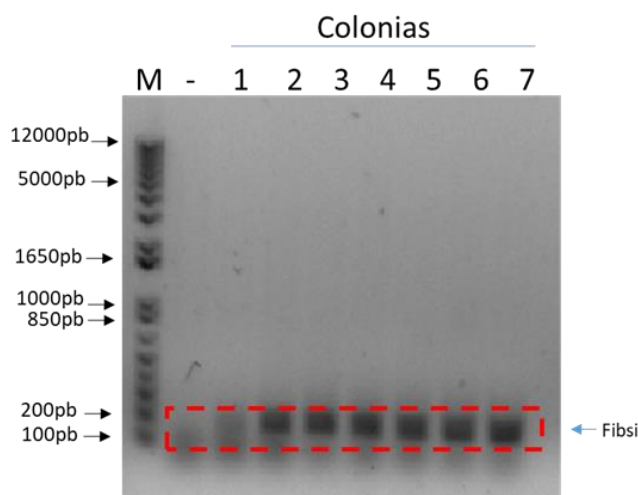


Figura 9 PCR en colonia. Se transformó el producto de la recombinación en células competentes de agrobacterium cepa LBA4404 y posteriormente se realizó una PCR y se puede observar la amplificación de una banda de aproximadamente 170 pb que corresponden a Fibsi. (- vector pK7GWIWG2 vacío) 1,2,3,4,5,6,7 colonias seleccionadas).

21 TRANSFORMACIÓN DE *NICOTIANA TABACUM* POR AGROINFILTRACIÓN

Se transformaron explantes *in vitro* de *N. tabacum* con el genotipo SR-1 mediante *A. tumefaciens* LBA4404 con el vector pK7GWIWG2::Fibsi y pK7GWIWG2 por agroinfiltración mediante el protocolo de Clemente(2006).

Se realizó solo un evento de transformación. Se prepararon tres cajas con 35 discos foliares de *N. tabacum* SR-1 silvestre para posteriormente ser inoculados con la bacteria portadora de pK7GWIWG2::Fibsi y pK7GWIWG2 respectivamente. Se creció el cultivo de *Agrobacterium* cepa LB4404 transformada con el vector pK7GWIWG2::Fibsi y vector vacío, se re suspendió el paquete celular con 50 mL de medio de cocultivo liquido suplementado con acetosiringona (100mg/mL) en hielo, seguidamente se procedió a la agro infiltración (materiales y métodos). Finalizado el tratamiento se observaron los explantes transformados durante los primeros tres días, no se contamina por bacteria, no hubo cambio de color ni cambio en la morfología.

Pasados los tres días se procedió a las etapas “lavado y selección” donde los explantes fueron desinfectados de los restos de bacterias.

A partir del día 11 se puede observar una diferencia en el fenotipo con respecto al control (figura 10), vector vacío y pK/GWIWG2::Fibsi, esta diferencia marcada entre el control y pK7GWIWG2::Fibsi sugiere el silenciamiento de fibrilarina.

Un cambio más notorio se observa a los 21 días posteriores a la agroinfiltración, los discos foliares transformados con pK7GWIWG2::Fibsi mostraron más zonas necróticas y una disminución en tamaño a diferencia del vector vacío y control, sugiriendo nuevamente que este efecto es debido a la disminución de la expresión de fibrilarina, se utilizó como referencia y a manera de normalizar los colores en las fotos una serie de círculos en diferentes tonalidades de verde (figura 12).

Se verifico que 100 mg/mL de kanamicina permitiera la selección de los explantes transgénicos según clemente (2006), por tanto, se evaluó durante 2 semanas el efecto del antibiótico sobre plantas silvestres de *N. tabacum*. En la figura11 se observa dos cajas Petri

con explantes silvestres de *N. tabacum* en medio MS y 100 mg/mL de kanamicina durante dos semanas. En el día 0 se observó un coloramiento verde fuerte en la mayoría de los explantes y con una apariencia lisa a diferencia del día 12, donde el coloramiento es amarillento o café, al igual que con apariencia rugosa. Este efecto en las hojas tratadas con kanamicina era esperado, por lo que se concluye que 100 mg/mL de antibiótico permite seleccionar plantas transgénicas.

42 días posteriores a la agroinfiltración, se puede observar ya la inducción de callo, existe una evidente diferencia entre pK7GWIWG2 y pK7GWIWG2::fibs1, tanto en la viabilidad de los explantes, color y número de callos generados, haciendo evidente un cambio posiblemente debido al silenciamiento de fibrilarina (figura 13).

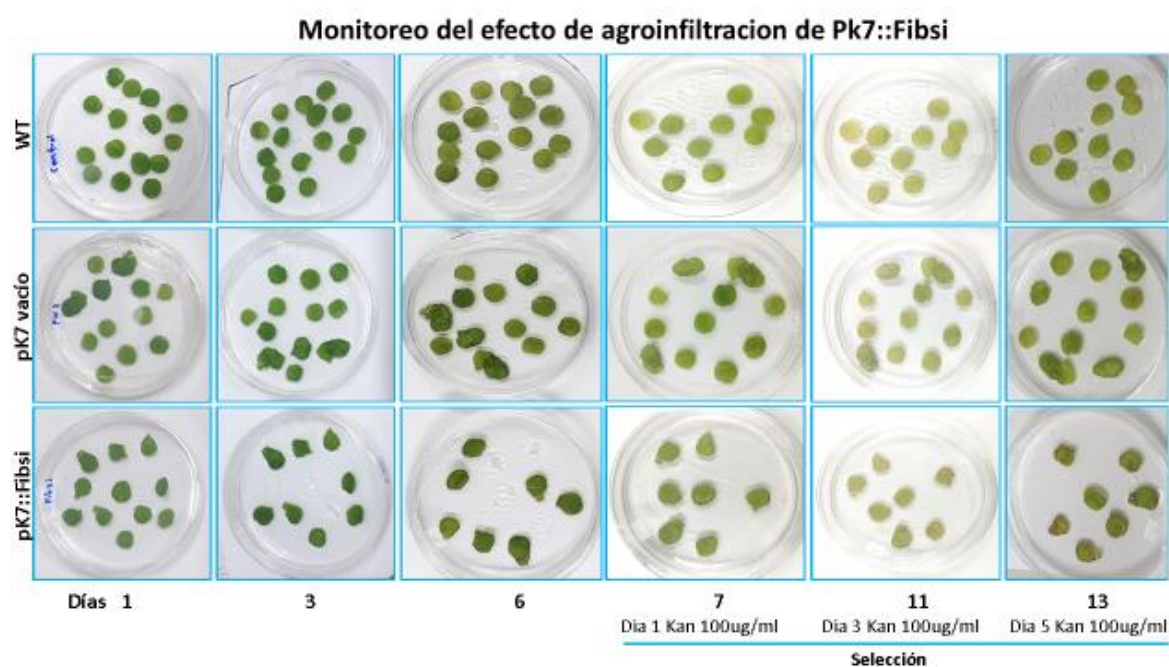


Figura 10 Periodo de infección con *A. tumefaciens* a explantes silvestres de *N. tabacum*

Efecto de la Kanamicina en explantes de *N. tabacum*

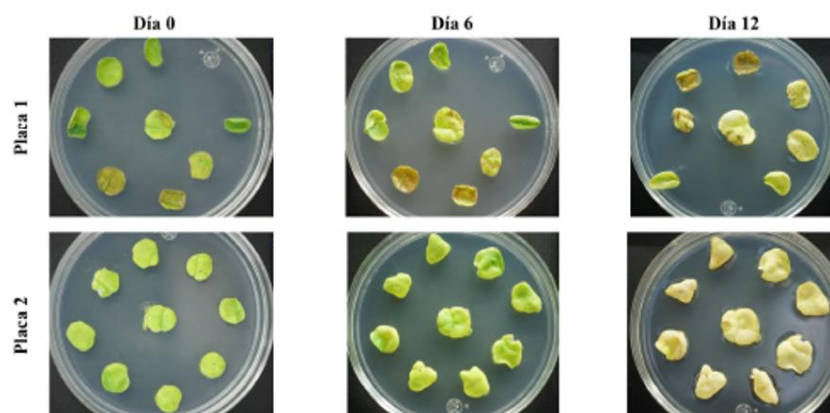


Figura 11 Efecto de la kanamicina en explantes silvestres de *N. tabacum*. Explantes silvestres de tabaco enriquecidos con medio MS y 100 mg/ml de Kanamicina durante 2 semanas.

Monitoreo del efecto de la Agroinfiltración

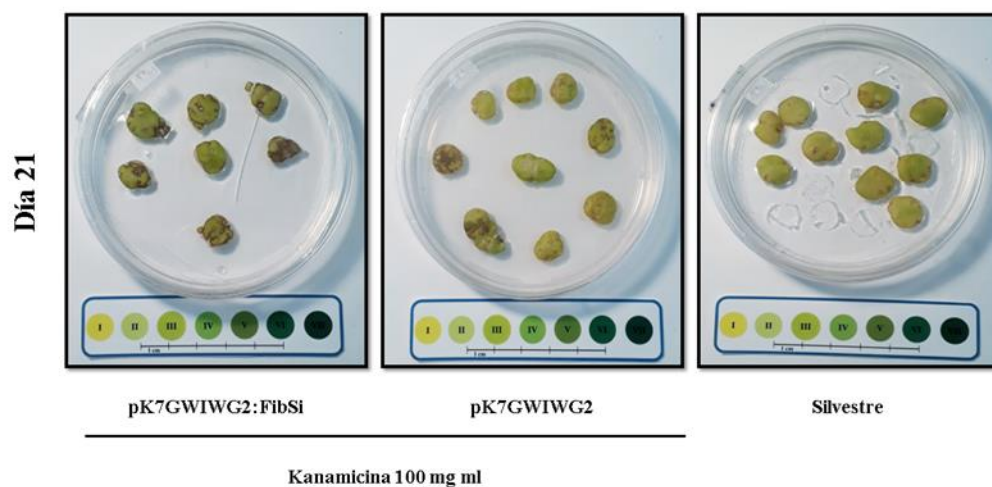


Figura 12 Monitoreo de la agroinfiltración día 21. En este punto es posible observar una diferencia en los explantes transformados con pK7GWIWG2::Fibsi. Se utilizaron discos en degrade verde, con el fin de tener una comparativa de color entre los explantes y normalizar al fotografiar.

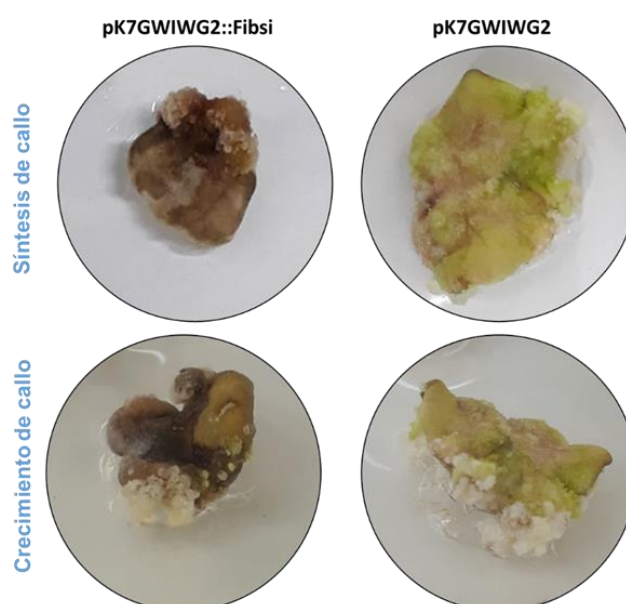


Figura 13 Cultivo organogénico indirecto. . Explantes de tabaco 42 días posteriores a infección con *A. tumefaciens* con pK7GWIWG2::Fibsi y vector vacío en medio MS enriquecido con ANA, BAP y Kanamicina.

22 EVALUACION DE LA EXPRESION DE FIBRILARINA EN EXPLANTES INFECTADOS CON *A. TUMEFACIENS*

Para evaluar si las diferencias observadas eran producto del silenciamiento de fibrilarina se realizó un western blot, para esto proteína total fue extraída de explantes 27 días posteriores a la agroinfiltración, esto se realizó con amortiguador PBS 1X (8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na_2HPO_4 , 0.2 gr KH_2PO_4 , pH 7.4) posteriormente 10 μ de cada extracto fueron cargados (pK7GWIWG2::Fibsi, pK7GWIWG2, control) en gel de acrilamida 12%. Seguidamente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y bloqueadas con 3% de BSA en PBS a temperatura ambiente por 1 hora. Después fue

incubada con anti-Fib (1/3000) por 2 horas a temperatura ambiente y una cuarta hora con anticuerpo secundario (1:4000) 2 horas a temperatura ambiente, con tres lavados entre incubaciones y revelado. En el WB se pudo observar una disminución en la señal en el extracto correspondiente a pK7GWIWG2::Fibsi (figura 14) sugiriendo que la disminución de señal se debe al efecto del silenciamiento de la fibrilarina, de igual manera como se puede observar en la figura existe una diferencia en el fenotipo de los explantes.

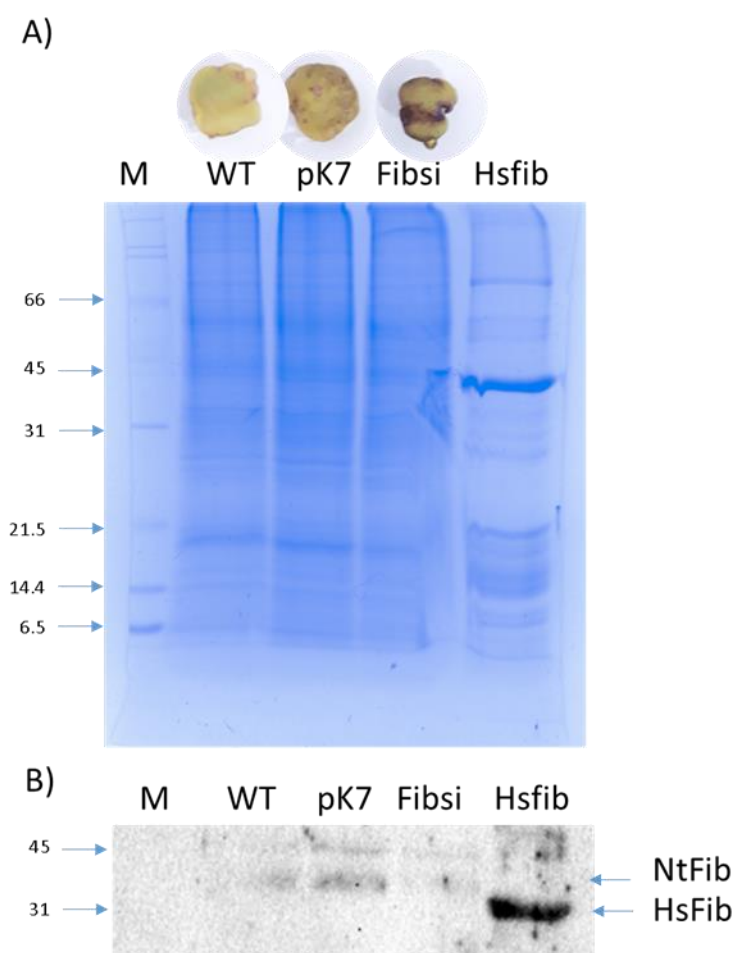


Figura 14 Inmunodetección de fibrilarina. A) perfil de proteínas de explantes transformados y control (Wt), como testigo positivo se utilizó Hsfib recombinante. B) Inmundeteccion de fibrilarina.

A partir de la secuencia de fibrilarina en *Nicotiana tabacum* reportada en National Center of Biotechnology information (NCBI) con número de acceso AB207972.1, se realizó una búsqueda dentro del genoma de *N. tabacum* con el fin de encontrar el número de copias del gen de fibrilarina. Se encontró una secuencia la cual fue alineada con las Fib2 reportadas, confirmando que esta secuencia corresponde a una posible Ntfib2 (figura 15). Estas secuencias Ntfib1 y Ntfib2 fueron alineadas con el fin de encontrar una región característica o “firma”. Esta firma será utilizada para la generación de un shRNA para el silenciamiento de dichos genes. En este análisis se pudo observar un fragmento de 27 pb localizado en Ntfib1, este fragmento no se encuentra en Ntfib2. De igual modo se analizó secuencia de Ntfib2 encontrando una secuencia de 64 pb, dichas firmas fueron encontradas en el dominio GAR (figura 16).

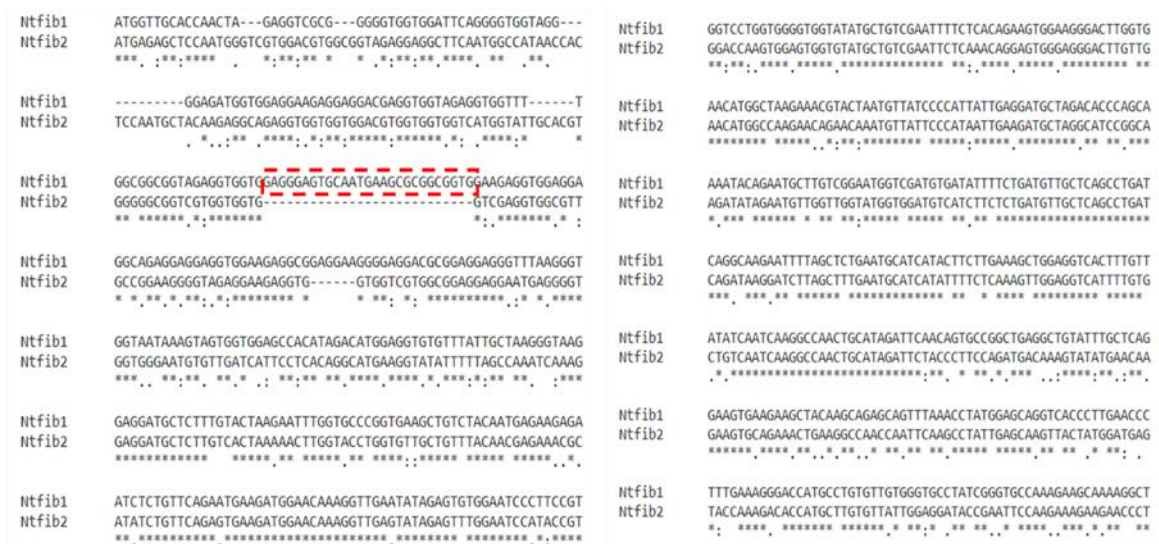


Figura 15 Alineamiento Ntfib1 y Ntfib2. Alineamiento de Ntfib1 y Ntfib2 donde se puede observar que la mayor diferencia en secuencia se encuentra dentro del dominio GAR, en rojo se puede observar un fragmento de 27pb localizado en Ntfib1 y no en Ntfib2.

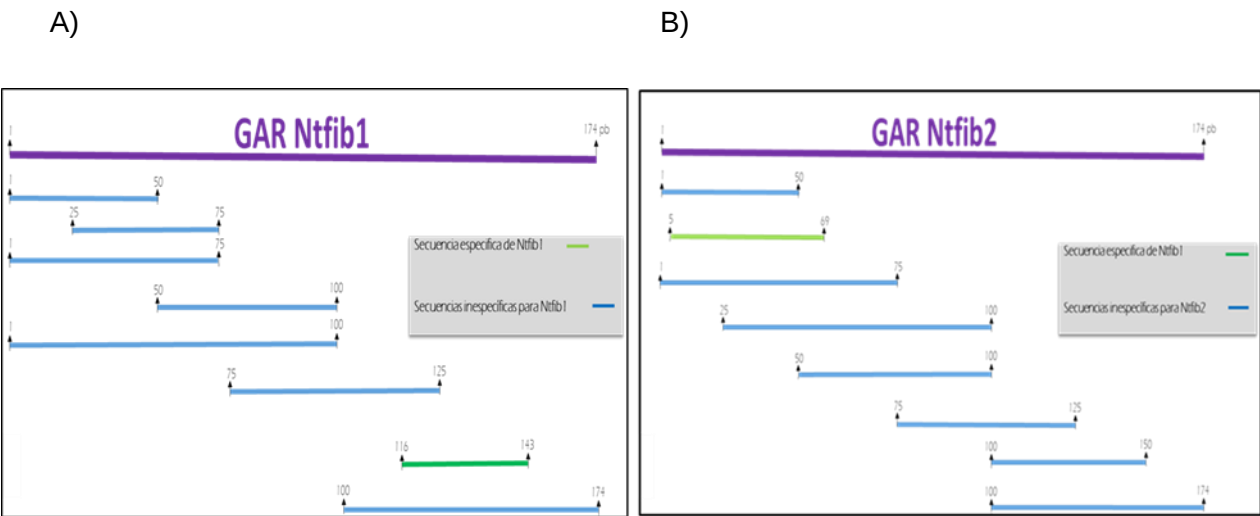


Figura 16 Análisis del dominio GAR de Ntfib1. Se realizó un análisis de la región GAR en ambos genes de fibrilarina para identificar una secuencia que nos pudiera servir para guiar un silenciamiento específico de Ntfib1 y Ntfib2, tomando en cuenta que el mayor cambio en la secuencia de nucleótidos se encuentra en la región GAR. A) En azul se pueden observar las secuencias inespecíficas para Ntfib1, en verde se observa la secuencia firma de Ntfib1. B) En azul se puede observar las secuencias inespecíficas para Ntfib2, en verde se observa la secuencia firma para para Ntfib2.

Fw Ntfib1	AAAAAGCAGGCTGAGGGAGTGCAATGA
Rv Ntfib1	AGAAAGCTGGGTACCGCCGCGCTTCATTG
Fw Ntfib2	AAAAAGCAGGCTAGCTCCAATGGGTCGTGGACGTGGCGGTAGAGG
Rv Ntfib2	AGAAAGCTGGGTAGCATTGGAGTGTTATGGCCATTGAAGCCTCCTCTA

Figura 17 Diseño de oligos. En la tabla se observan las secuencias seleccionadas flanqueadas con las cajas attB que permitirán la recombinación en el vector destino. Estos cebadores tienen una Tm de 60°. Estos cebadores son complementarios en el centro, lo que quiere decir que no se necesita un templado de DNA para la amplificación de la secuencia.

24 FLANQUEO DE LAS FIRMAS DE FIB1 Y FIB2 CON LAS CAJAS ATTB

La clonación de Fib1 y Fib2 en el plásmido donador pDONR 221 se realizó mediante la tecnología de Gateway®. Se amplificó Fib1 y Fib2 con las cajas parciales de 12 pb attb, donde se puede observar una banda de aproximadamente 40 pb correspondiente a Fib1 y una banda de aproximadamente de 76 pb que corresponderían a Fib2. Posteriormente se realizó una segunda PCR al fragmento amplificado con los oligos universales de attB (figura 18).

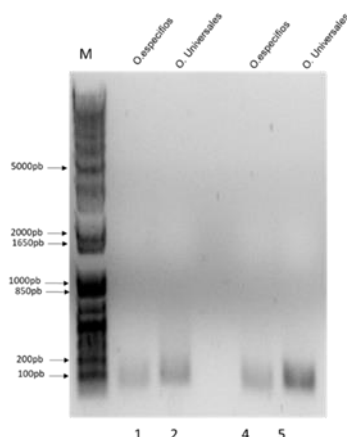


Figura 18 Carril 1 amplificación de firma fib1 (51pb), carril 2 pcr de fib1 con oligos universales (103pb), carril 4 amplificación de fib2 (88pb), carril 5 pcr de fib2 con oligos universales (140pb).

25 REACCION BP

Se realizó la reacción BP de la tecnología Gateway Cloning Technology mediante la recombinación de Fib1 y Fib2 flanqueados con las terminaciones attB y el vector donador; pDONR™ 221 (4761 pb). El producto de la recombinación se transformó en células competentes de *E. coli* cepa DH5α en placas con medio LB suplementado con kanamicina. Las clonas generadas fueron digeridas con EcoRV con el fin de linearizar, se usó como control pDNOR::Fibsi, construcción que ha sido corroborada por secuenciación. Se pudo observar en el carril 4 una banda de aproximadamente 3921 pb que correspondería pDNOR::Fib2 (figura 19).

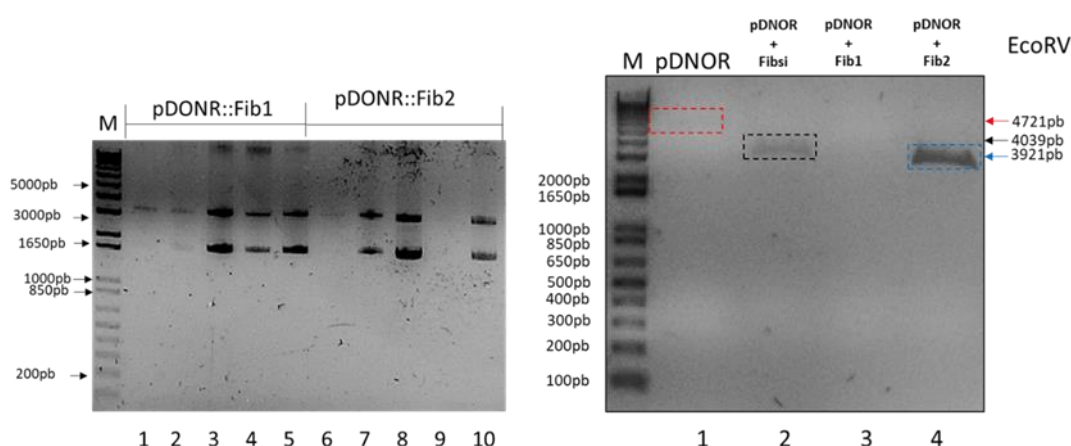


Figura 19 Extracción de DNA plasmidico y digestión de clonas. A) Extracción de DNA plasmidico donde no se pudo observar correctamente la altura del plásmido, B) Digestión de clonas seleccionadas con EcoRV, donde se pudo observar una banda de aproximadamente 3921 pb que corresponderían a pDONR::Fib2.

26 ESTRATEGIA CRISPR CAS9: ANÁLISIS DEL GENOMA DE *NICOTIANA TABACUM*

Se analizó el genoma de *Nicotiana tabacum*, encontrando dos copias del gen de fibrilarina, las cuales fueron analizadas mediante Boxshade, y como se puede observar ambos genes son funcionales ya que cuentan con los dominios característicos de fibrilarina (GAR,BCO, Mtase) y sitio catalítico reportado(figura 20). De igual manera dichos genes fueron analizados con sus homólogos en *Arabidopsis thaliana* y observamos en dominio metil transferasa como era de esperarse, conservado (figura 21).



Figura 20 Boxshade. Alineamiento de los genes de fibrilarina encontrados en el genoma de *Nicotiana tabacum*, donde podemos observar en azul el dominio GAR, rojo sitio catalítico y en naranja dominio metil transferasa.



27 DISEÑO Y AMPLIFICACIÓN DE GRNAS

32

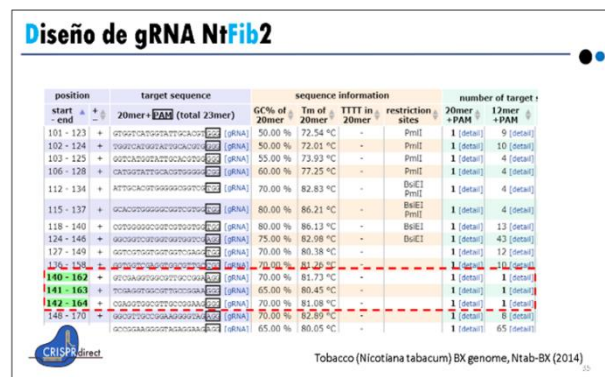


Figura 22 Selección de gRNAs. A) En negro se observa la secuencias de 20 pb seleccionada para bloquear la elongación de NtFib1; B) Se resalta en rojo los 3 posibles guías a seleccionar indicando de igual manera el match dentro del genoma.

28 CLONACIÓN DE GRNAS

Se seleccionó el vector pHSN6I01 de Addgene ya que cuenta con promotor de RNA pequeños AtU6, RNA scaffold, gen de dCAS bajo el promotor 35s y está diseñado para ser clonado bajo sitios de restricción del tipo II(Bsal).

Los gRNAs fueron amplificados mediante la técnica de PCR durante 20 ciclos, El producto de la reacción se transformó en células competentes de *E. coli* cepa DH5 α en placas con medio LB suplementado con kanamicina. Para corroborar la correcta clonación las clonas fueron digeridas bajo la enzima de restricción XbaI que corta en un punto dentro, en la imagen (A y B) se puede observar una banda de aproximadamente 13088 pb correspondiente al vector pHSN6I01 y otra banda de aproximadamente 11800 pb correspondiente al vector pHSN6I01::gRNA que ha sido clonado bajo la técnica de Golden Gate Assembly kit de NEB® en la cual sufre una pérdida de aproximadamente 1200 pb y adicionando 20 pb correspondientes al gRNA (figura 23).

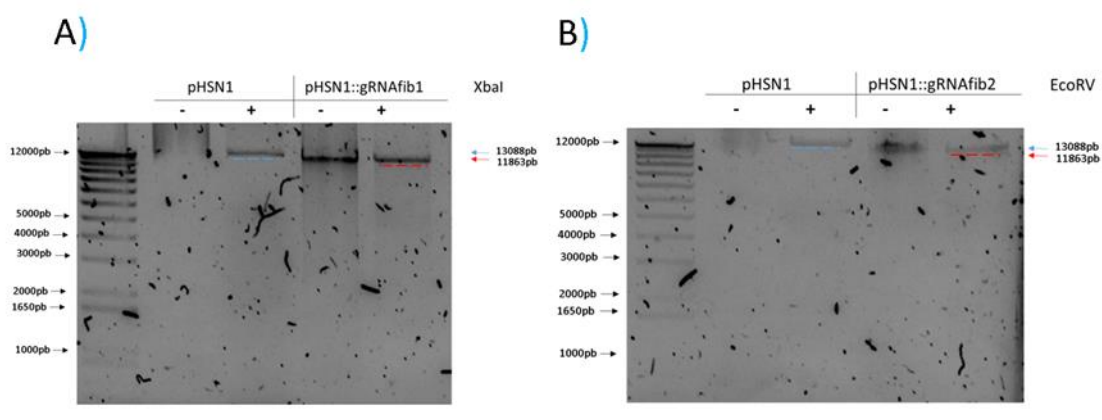


Figura 23 Clonación de gRNA. A) Digestión del constructo pHSN6I01::gRNAfib1, se observa una banda de aproximadamente 11863 pb correspondientes a la construcción. B) Digestión del constructo pHSN6I01::gRNAfib2

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En la mayoría de las plantas existen al menos dos genes de fibrilarina. En *A. thaliana* ambos genes tienen niveles altos de expresión en células transcripcionalmente activas. Existe una diferencia importante entre fibrilarina de *A. thaliana*, Atfi2 muestra actividad de ribonucleasa no observada en Atfib1 (Rodríguez-Corona et al., 2019) así como una habilidad diferente de interacción con fosfoinosítidos. Así mismo el silenciamiento de fibrilarina en *N. benthamiana* la cual cuenta con un gen de fibrilarina (Nbfi2) ha generado fenotipos enanos y necróticos (Kim et al., 2007). Además, se ha demostrado que TGB1 interactúa con Nbfi2 tal interacción tiene como rol principal la interacción célula a célula. Por lo tanto, en este trabajo se planteó como objetivo el silenciamiento de fibrilarina en *N. benthamiana*, ya que la reducción de la expresión de un gen da como resultado un fenotipo mutante, tal defecto esencialmente imita la pérdida parcial o completa de un gen (Prelich et al., 2012).

Para el silenciamiento de fibrilarina, se realizó la búsqueda de una firma, la cual se encuentre presente en genes de fibrilarina en plantas, dicha firma (Fibsi) se encuentra en todas las secuencias de fibrilarina en plantas, a diferencia con lo realizado en el trabajo de Kim en el 2007 donde se utilizaron 425 pb para silenciar el gen, Fibsi se encuentra al final del dominio GAR y parte del dominio BCO.

Las firmas encontradas en las secuencias de NtFib1 y NtFib2 permitirán hacer específico el silenciamiento, así como la posibilidad de generar anticuerpos específicos para estos genes. Así mismo, permitirán saber la función de cada ge, se propone la posibilidad de funciones diferentes ya que en el trabajo de Rodríguez-Corona en 2019, propone una actividad de RNAasa para AtFib2 que AtFib1 no mostro, así como una diferencia en la afinidad con fosfolípidos. La generación de herramientas que permitan la generación de plantas mutantes, permitirá tener más información sobre la funcionalidad y la relación que tiene fibrilarina con el crecimiento y desarrollo de los organismos. De igual manera la generación de estas herramientas permitirá a su vez probar *in vivo*, cual es el rol de fibrilarina en la diseminación viral, ya que se sabe que la fibrilarina interactúa o colocaliza con diversas proteínas virales.

La generación de un vector binario con la expresión de Fibsi bajo el promotor 35s mediante la tecnología Gateway, incluyo la generación de un clon de entrada, pDONR::Fibsi, el cual puede recombinarse con una vasta variedad de vectores con diferentes aplicaciones. Así mismo se encontraron firmas específicas en las secuencias de codificas los genes, las Ntfib1 se encontró una firma de 27 pb, este fragmento es exclusivo de fib1 ya que no se encuentra en fib2, para Ntfib2 se encontró una firma de 84pb, ambas firmas generaron un vector binario bajo el promotor 35s mediante la tecnología Gateway, las cuales incluyeron un clon de entrada, pDONR::Ntfib1 y pDONR::Ntfib2.

La transformación de especies de *Nicotiana* mediante *Agrobacterium tumefaciens* utilizando discos foliares como explantes ha servido como herramienta eficiente para análisis rápido de transgenes. En el presente trabajo se pudo monitorear el silenciamiento de manera transitoria en explantes foliares de 21 días posteriores a la agroinfiltración, los cuales en un corto periodo de tiempo mostraban un cambio en el fenotipo con respecto al control. Dichos explantes fueron analizados mediante Western Blot y fue posible observar una disminución en la señal en los explantes transformados con el vector binario con el transgen Fibsi.

Así mismo se generó una estrategia para la delección de genes mediante la tecnología CRISPR dCas, para esto se generaron gRNA con el software Crispr direct (Naito Y *et al.*, 2015) estos gRNA están diseñados para ser complementarios en GAR ya que es la región que más difiere entre los genes, para gRNAfib1 se encontró 2 off-targets, 1 en un RNA no codificante y otro en la secuencia de fib2, para gRNAfib2 no se encontró off-target, se decidió utilizar dCAS ya que a diferencia de CAS9 no generara cortes en el DNA, este corte al ser realizado dentro de la región GAR no aseguraría la delección de dichos genes, dCAS en cambio bloqueara por impedimento estérico la elongación de la transcripción de los genes. Se generaron vectores binarios con los gRNA diseñados (gRNAfib1, gRNAfib2), el vector all-in-one cuneta con promotor de RNAs pequeños AtU6 y RNA scaffold. La posibilidad de generar plantas con delección y silenciamiento de los genes de fibrilarina habré la posibilidad de un mayor entendimiento sobre las funciones que ejercen, así como la importancia en el desarrollo celular.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

La fibrilarina es una proteína nuclear altamente conservada, la cual se encuentra distribuida en el nucléolo (componente fibrilar y y componente fibrilar denso), además está presente en cuerpos CBs. esta localización se ve conservada en tre plantas y animales. En células eucariotas, fibrilarina es una proteína altamente conservada, presentando el menor porcentaje de similitud dentro del dominio GAR, dominio que se ha relacionado con el comportamiento dinámico de esta proteína.

En análisis realizado en las secuencias de fibrilarina en *N. tabacum*, mostro que era posible identificar firmas características que permitirían el silenciamiento específico de los genes, así como una posible generación de anticuerpos específicos. Así mismo el análisis de múltiples secuencias de fibrilarina en plantas permitió encontrar una firma característica de fibrilarina en plantas. Así mismo, fue posible generar gRNAs específicos, con un porcentaje de off-target nulo.

Se pudo probar la construcción generada pK7GWIWG2::Fibsi, la cual mostro resultados positivos, ya que fue posible observar una disminución en la señal de expresión de fibrilarina.

De igual manera se logró clonar los gRNAs para la edición del genoma de *N. tabacum* a través de la tecnología CRISPR cas.

PERSPECTIVAS

- El vector Pk7GWIWG2::Fibsi generado en este trabajo servirán como una herramienta para el estudio de fibrilarina de plantas, en particular con la interacción viral.
- Los vectores pDNOR::Fib1 y pDNOR::Fib2, podrán ser recombinados el vector binario Pk7GWIWG2 para su utilización en el estudio de fibrilarina en plantas, en particular, saber si los genes tienen una misma función.
- Los vectores generados pHSN1::gRNAfib1 y pHSN1::gRNAfib2, podrán ser utilizados para la edición del genoma de *N. tabacum*.
- Las metodologías establecidas y desarrolladas en este trabajo podrán ser implementadas a futuro en los siguientes trabajos de tesis del grupo de investigación, como es el caso de la búsqueda y análisis de secuencias de la fibrilarina en plantas y el vector binario de silenciamiento de la fibrilarina de *N. tabacum*

REFERENCIAS

- Canetta, E., Kim, S. H., Kalinina, N. O., Shaw, J., Adya, A. K., Gillespie, T., Taliansky, M. (2008). A Plant Virus Movement Protein Forms Ringlike Complexes with the Major Nucleolar Protein, Fibrillarin, In Vitro. *Journal of Molecular Biology*, 376(4), 932–937. doi:10.1016/j.jmb.2007.12.039
- Kim, S. H., Ryabov, E. V, Kalinina, N. O., Rakitina, D. V, Gillespie, T., Macfarlane, S., Taliansky, M. (2007). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *The EMBO Journal*, 26(8), 2169–2179. doi:10.1038/
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrazola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), 30–39.
- Breitbart, R. E., Andreadis, A., & Nadal-Ginard, B. (1987). Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 467–95. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.002343
- Gregorio-Jorge, J., Bernal-Alcocer, A., Bañuelos-Hernández, B., Alpuche-Solís, A. G., Hernández-Zepeda, C., Moreno-Valenzuela, O., Argüello-Astorga, G. R. (2010). Analysis of a new strain of Euphorbia mosaic virus with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology Journal*, 7(1), 275. doi:10.1186/1743-422X-7-275

- Lechertier, T., Grob, A., Hernandez-Verdun, D., & Roussel, P. (2009). Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. *Experimental Cell Research*, 315(6), 928–942. doi:10.1016/j.yexcr.2009.01.016
- Amin, M. A., Matsunaga, S., Ma, N., Takata, H., Yokoyama, M., Uchiyama, S., & Fukui, K. (2007). Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), 320–326. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.092
- Lipscombe, D. (2005). Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(3 SPEC. ISS.), 358–363. doi:10.1016/j.conb.2005.04.002
- Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., Talianky, M. (2007). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 11115–20. doi:10.1073/pnas.0704632104
- Rakitina, D. V., Talianky, M., Brown, J. W. S., Kalinina, N. O. (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research*, 39(20), 8869–8880. doi:10.1093/nar/gkr594
- Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., Castano, E. (2015). Fibrillarin from Archaea to human. *Biology of the Cell*, 159–174. doi:10.1111/boc.201400077

- Ishitani y Geraghty, D. E. (1992). Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9), 3947–3951. doi:10.1073/pnas.89.9.3947
- Semashko, M. A., Gonzalez, I., Shaw, J., Leonova, O. G., Popenko, V. I., Tiliansky, M. E., Kalinina, N. O. (2012). The extreme N-terminal domain of a hordeivirus TGB1 movement protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillarin. *Biochimie*, 94(5), 1180–1188. doi:10.1016/j.biochi.2012.02.005
- Rawlinson, S. M., Moseley, G. W. (2015). The nucleolar interface of RNA viruses. *Cellular Microbiology*, 17(8), 1108–1120. doi:10.1111/cmi.12465
- Hiscox, J. A. (2002). The nucleolus - A gateway to viral infection? *Archives of Virology*, 147(6), 1077–1089. doi:10.1007/s00705-001-0792-0
- Rakitina, D. V., Tiliansky, M., Brown, J. W. S., & Kalinina, N. O. (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research*, 39(20), 8869–8880. doi:10.1093/nar/gkr594

- Duan, Z., Chen, J., Xu, H., Zhu, J., Li, Q., He, L., ... Liu, X. (2014). The nucleolar phosphoprotein B23 targets Newcastle disease virus matrix protein to the nucleoli and facilitates viral replication. *Virology*, 452-453, 212–222. doi:10.1016/j.virol.2014.01.011
- Zheng, L., Du, Z., Lin, C., Mao, Q., Wu, K., Wu, J., ... Xie, L. (2015). Rice stripe tenuivirus p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with fibrillarin to promote virus systemic movement. *Molecular Plant Pathology*, 16(9), 921–930. doi:10.1111/mpp.12220
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Pnas*, 69(8), 2110–4. doi:10.1073/pnas.69.8.2110
- Wang, X., Han, C., Yu, J., & Li, D. (n.d.). Hijacking of the nucleolar protein fibrillarin by TGB1 is required for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus
- Breitbart, R. E., Andreadis, A., & Nadal-Ginard, B. (1987). Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 467–495.

Shubina, M. Y., Musinova, Y. R., & Sheval, E. V. (2016). Nucleolar Methyltransferase Fibrillarin: Evolution of Structure and Functions N terminal domain. *Biochemistry*, 81(9), 941–950. <https://doi.org/10.1134/S0006297916090030>

Wang, X., Han, C., Yu, J., & Li, D. (n.d.). No Title.

Yang, H., Wu, J. J., Tang, T., Liu, K. De, & Dai, C. (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.

Knockout, G., & Modification, G. (n.d.). Custom Plant CRISPR Ordering Form.

Wang, Q., Yang, S., Liu, J., Terecskei, K., Ábrahám, E., Gombár, A., ... Zhu, H. (2017). Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(26), 201700715. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700715114>

Zhou, X., Zha, M., Huang, J., Li, L., Imran, M., & Zhang, C. (2017). StMYB44 negatively regulates phosphate transport by suppressing expression of PHOSPHATE1 in potato. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1265–1281. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx026>

Hu, B., Li, D., Liu, X., Qi, J., Gao, D., Zhao, S., ... Yang, L. (2017). Engineering Non-transgenic Gynoecious Cucumber Using an Improved Transformation Protocol and Optimized CRISPR/Cas9 System. *Molecular Plant*, 10(12), 1575–1578. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.005>

pICH86966::AtU6p::sgRNA PDS 6552. (2013), (July), 86966.

Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>

Fusion, N., & Fusion, C. (n.d.). Primer Design for the G ATEWAY attB primers, 1–3.

- Chang, C.-H., Hsu, F.-C., Lee, S.-C., Lo, Y.-S., Wang, J.-D., Shaw, J., ... Lin, N.-S. (2016). The Nucleolar Fibrillarin Protein Is Required for Helper Virus-Independent Long-Distance Trafficking of a Subviral Satellite RNA in Plants. *The Plant Cell*, 28(10), 2586–2602. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00071>
- Cas, C., & Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy : targeted mutagenesis in model and crop plants using the, (Table 1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1746>
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., ... Qu, L. J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research*, 23(10), 1233–1236. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.123>
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Karimi, M., De Meyer, B., & Hilson, P. (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science*, 10(3), 103–105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.01.008>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Defrasnes, C., Marsh, G. A., Foo, C. H., Rootes, C. L., Gould, C. M., Grusovin, J., ... Wang, L. F. (2016). Genome-wide siRNA Screening at Biosafety Level 4 Reveals a Crucial Role for Fibrillarin in Henipavirus Infection. *PLoS Pathogens*, 12(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005478>

Shalem, O., Sanjana, E. N., Hartenian, E., & Zhang, F. (2014). 范文, 参考文献-Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout. *Science*, 343(January), 84–88. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>

Senthil-Kumar, M., Hema, R., Suryachandra, T. R., Ramegowda, H. V., Gopalakrishna, R., Rama, N., ... Mysore, K. S. (2010). Functional characterization of three water deficit stress-induced genes in tobacco and Arabidopsis: An approach based on gene down regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(1), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.09.005>

Loza-Muller, L., Rodríguez-Corona, U., Sobol, M., Rodríguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2015). Fibrillarin methylates H2A in RNA polymerase I trans-active promoters in Brassica oleracea. *Frontiers in Plant Science*, 6(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00976>

Chung, B. N., Yoon, J.-Y., & Palukaitis, P. (2013). Engineered resistance in potato against potato leafroll virus, potato virus A and potato virus Y. *Virus Genes*, 47(1), 86–92. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0904-4>

Belhaj, K., Chaparro-garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., & Nekrasov, V. (2015). ScienceDirect Editing plant genomes with CRISPR / Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.007>

Editing plant genomes with CRISPRCas9.pdf. (n.d.).

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science*, 337(August), 816–822. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41(20), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>
- Ali, Z., Abulfaraj, A., Idris, A., Ali, S., Tashkandi, M., & Mahfouz, M. M. (2015). CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biology*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0799-6>
- de Toledo Thomazella, D. P., Brail, Q., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (2016). CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *BioRxiv*, (July), 064824. <https://doi.org/10.1101/064824>
- BROAD Institute. (2015). Protocol: Cloning of oligos for sgRNA (CRISPR) or shRNA constructs. *Protocol: Cloning of Oligos for SgRNA (CRISPR) or ShRNA Constructs*, (August), 1–8. Retrieved from
- Char, S. N., Neelakandan, A. K., Nahampun, H., Frame, B., Main, M., Spalding, M. H., ... Yang, B. (2017). An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 257–268. <https://doi.org/10.1111/pbi.12611>
- Urso, S., Zottini, M., Ruberti, C., Lo Schiavo, F., Stanca, A. M., Cattivelli, L., & Valè, G. (2013). An Agrobacterium tumefaciens-mediated gene silencing system for functional analysis in grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114(1), 49–60. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0305-3>
- Sui, G., Soohoo, C., Affar, E. B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W. C., & Shi, Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5515–5520. <https://doi.org/10.1073/pnas.082117599>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>

Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. (2015)
CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites.

{Bibliography}

ANEXOS

ANEXO I. CÉLULAS COMPETENTES (DH5 α)

1. Incubar *E. coli* a 37°C por 16 horas en placas de agar LB.
2. Transferir una colonia a 3 mL de medio LB e incubar a 37°C con agitación constante a 200 rpm toda la noche (12-16 horas).
3. Transferir 0.5 mL de cultivo a 50 ml de medio LB e incubar a 37°C con agitación hasta que la densidad óptica a 590 nm sea de 0.3 a 0.4, durante 3-4 horas.
4. Transferir 50 mL de células a un tubo de propileno fío y estéril y mantenerlo por 10 min a 4°C .
5. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min.
6. Decantar el sobrenadante y re suspender el paquete celular en 25 mL de CaCl₂ estéril y frío (0.1 M).
7. Incubar el tubo en hielo durante 10 min a 4°C.
8. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min a 4°C, decantar el sobrenadante.
9. Re suspender el paquete celular en 1-2 mL de CaCl₂ estéril y frío (0.1 M).

Las células competentes pueden ser usadas inmediatamente o almacenadas por 24-48 horas a 4°C.

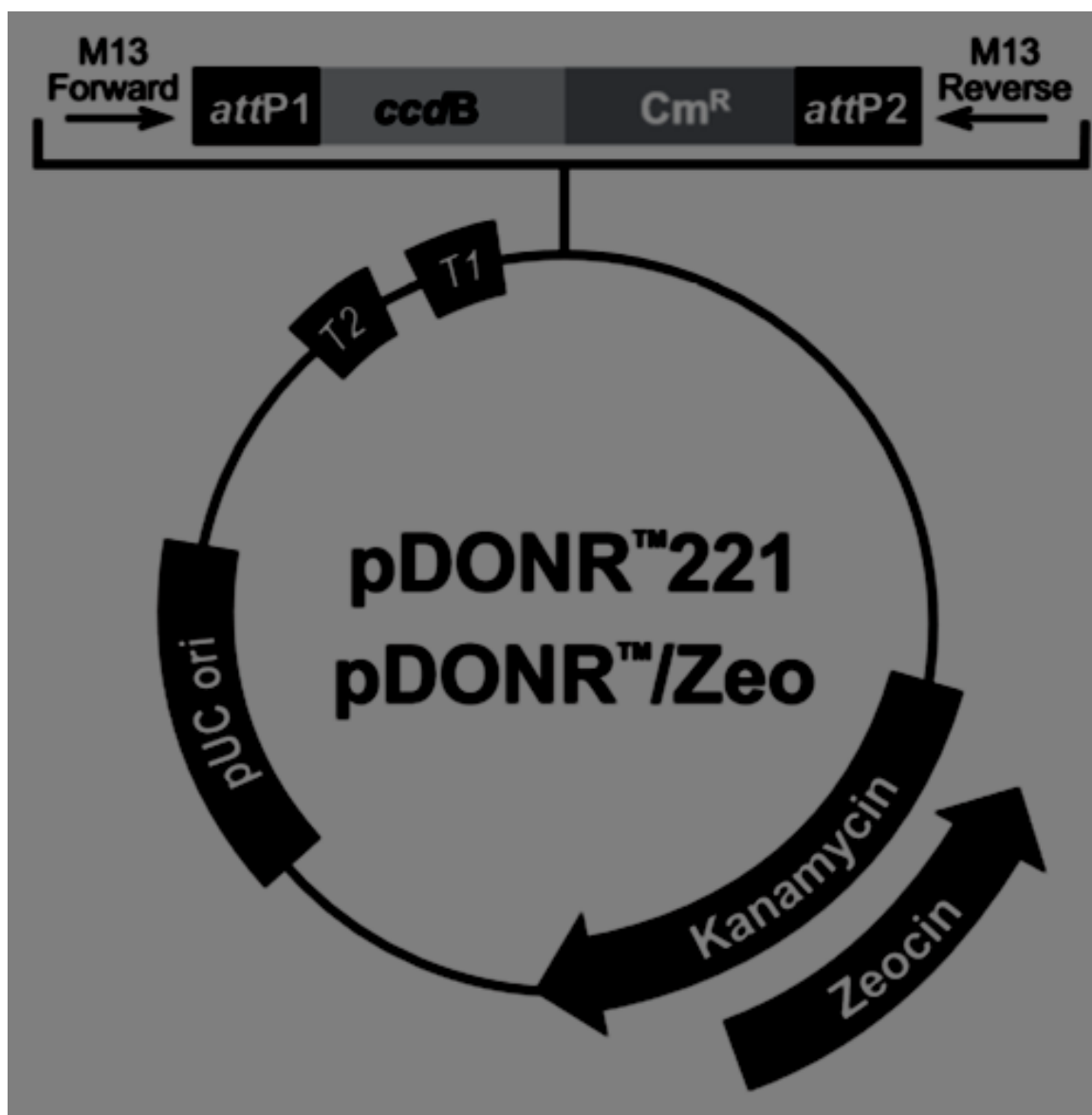
ANEXO II. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

1. Partir de 2 mL de cultivo incubado toda la noche en LB-ampicilina.
2. Centrifugar a 4500 rpm por 5 min. Remover el sobrenadante por aspiración con pipeta.
3. Re suspender el precipitado en 100 μ L solución I+1 RNAasa (10 mg/mL).
4. Agregar 100 μ L solución II fresca. Mezclar por inversión de tubos (15 veces). Dejar 5 min a temperatura ambiente.
5. Agregar 300 μ L solución III. Mezclar por inversión de tubos (15 veces), y dejar 5 min a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min.
7. Transferir sobrenadante a tubo nuevo y agregar 100 μ L de fenol y 100 μ L de cloroformo. Mezclar por inversión.
8. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min. Tomar el sobrenadante con pipeta.
9. Agregar 2.5 veces el volumen de etanol al 100% he incubar durante 2 horas a -20°C
10. Centrifugar a 12000 rpm y decantar.
11. Lavar el precipitado con 100 μ L de etanol al 75%. Centrifugar brevemente y retirar el sobrenadante con pipeta.
12. Dejar secar el precipitado y re suspender en 30 de H₂O.

Solución

I	II	III
Glucosa 50 mm	NaOH 0.2 N	Acetato de potasio 3M
Tris/Base (pH 8) 25 mm	SDS 1% (W/V)	Ac. Acético
EDTA (pH 8) 10 mm	Nota: preparar al instante.	Agua destilada

ANEXO III. PDONR™221 (4761 PB) INVITROGEN



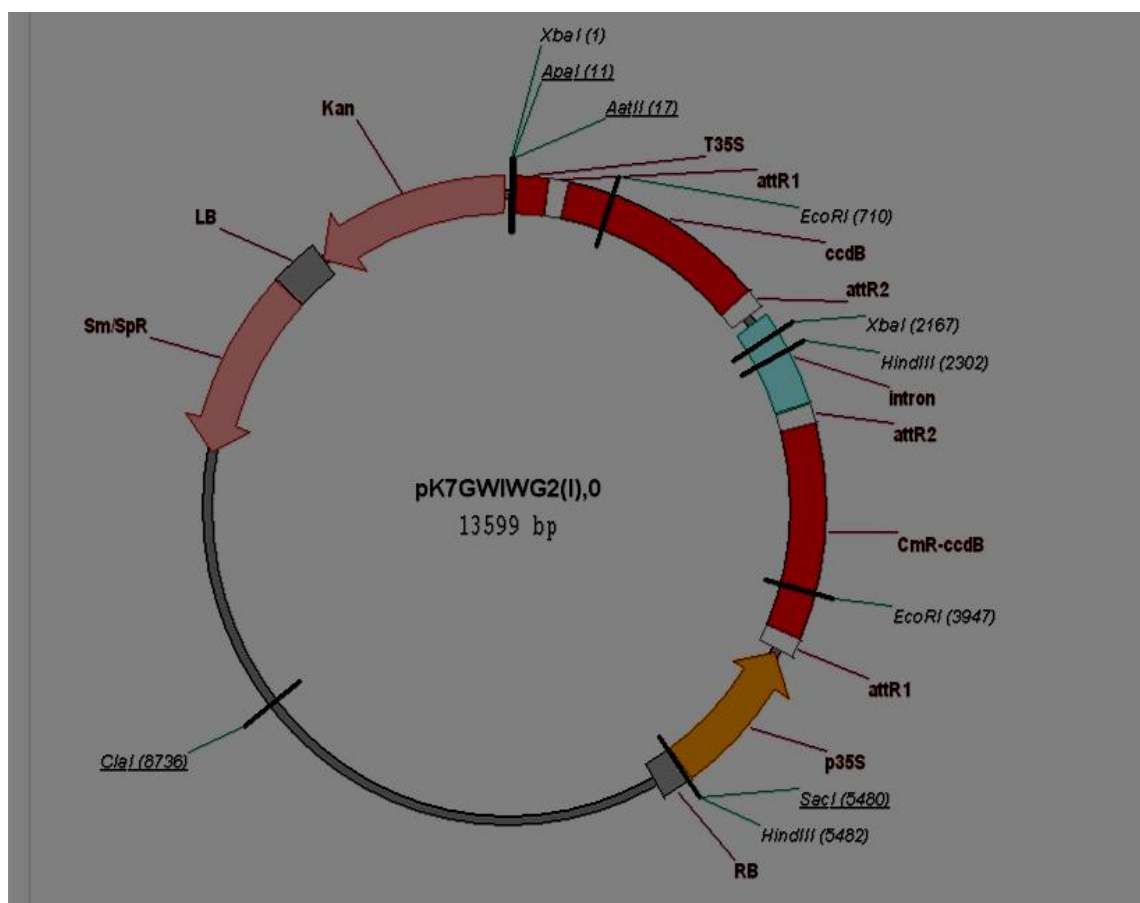
ANEXO IV. REACCIÓN BP, INVITROGEN

1. Agrega los siguientes componentes a un tubo de 1.5 mL a temperatura ambiente y mezcla:

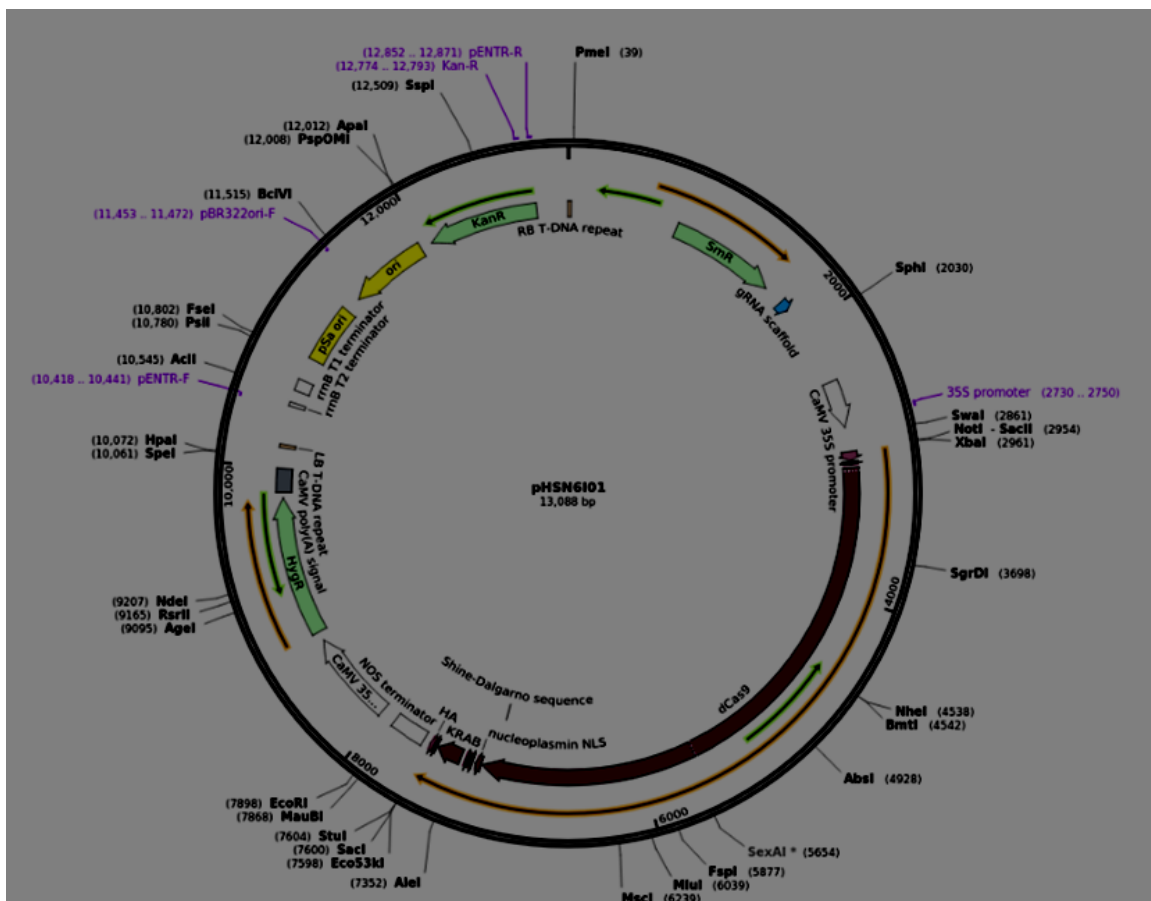
Components	Sample	Positive Control	Negative Control
<i>attB</i> PCR product or linearized <i>attB</i> expression clone (20–50 fmol)	1–7 μL	—	1–7 μL
pDONR™ vector (150 ng/ μL)	1 μL	1 μL	1 μL
pEXP7-tet positive control (50 ng/ μL)	—	2 μL	—
TE Buffer, pH 8.0	to 8 μL	5 μL	to 10 μL

2. Retira la enzima Gateway® BP Clonase® II y descongela en hielo.
3. Vortex la enzima Gateway® BP Clonase® II brevemente 2 veces.
4. Agrega 2 μL de la enzima Gateway® BP Clonase® II a la muestra.
5. Incuba la reacción a 25°C por 1 hora.
6. Agrega 1 μL de la proteinasa K e incuba durante 10 min a 37°C.

ANEXO V. PK7GWIWG2(I) (13599 PB)



ANEXO VI. PHSN6I01 (11088 PB)



ANEXO VII. REACCIÓN LR, INVITROGEN

1. Agrega los siguientes componentes a un tubo de 1.5 mL a temperatura ambiente y mezcla:

Component	Sample	Negative Control	Positive Control
Entry clone (100-300 ng/reaction)	1-10 μ l	--	--
Destination vector (300 ng/reaction)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
pENTR™-gus (50 ng/ μ l)	--	--	2 μ l
5X LR Clonase™ Reaction Buffer	4 μ l	4 μ l	4 μ l
TE Buffer, pH 8.0	to 16 μ l	10 μ l	8 μ l

ANEXO VIII. TRANSFORMACIÓN DE *NICOTIANA TABACUM* POR AGROINFILTRACIÓN

1. Preparación de los explantes de hoja.

1.1. Selecciona hojas de 5 a 10 cm de 1 a 2 meses de crecimiento en condiciones de invernadero.

1.2. Coloca las hojas seleccionadas en un vaso de precipitado con agua destilada por 20 a 30 min.

1.3. Retira el agua y cubre las hojas en una solución con 10% de cloro suplementado con 1 gota de Tween-20 por cada 50 ml. Deja en contacto a las hojas con la solución por 10 min. Enjuaga 5 veces con agua destilada.

2. Preparación del cultivo de *Agrobacterium*.

2.1. Inicia un cultivo de 2 mL de *A. tumefaciens* en medio YEP suplementado con rifampicina (100 mg L⁻¹) y espectinomicina (50 mg L⁻¹). Incuba las células a 28°C en agitación constante. Permite que el cultivo llegue a la saturación.

2.2. Sub-cultiva los 2 mL de cultivo a 50 mL de medio YEP suplementado con los antibióticos apropiados. Cultiva las células por 6 a 8 horas.

2.3. Recolecta las células por centrifugación (3000-4000g).

2.4. Suspende la pastilla celular a una OD600 final de 0.5 a 1.0 en medio de cocultivo líquido. Coloca el inóculo en hielo hasta estar listo para su uso.

3. Transformación de la planta

3.1. Transfiere el inóculo preparado de *Agrobacterium* en cajas Petri. Inocula los explantes de precultivo por 30 min.

3.2. Seguido del paso de inoculación, coloca brevemente los explantes en papel filtro estéril y posíionalos adaxial hacia arriba del medio solidificado con 0.8% de agar.

3.3. Cocultiva los explantes a 24°C, a un régimen de 18 horas de luz por 3 días.

3.4. Seguido de los 3 días de cocultivo, transfiere los explantes a medio de regeneración suplementado con el agente de selección apropiado. Cultivalos explantes a un régimen de 18 horas de luz. Transfiere los explantes a un medio de regeneración cada 2 semanas.

3.5. Los callos se formaran después de 2 semanas de selección.

3.6. Corta los brotes de forma individual una vez que hayan alcanzado una longitud de 3 mm y transfíereles al medio de enraizamiento suplementado con el agente de selección apropiado.

