

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Edición del genoma vegetal con potencial para generar variedades tolerantes a sequía.

T E S I S

Que presenta:

BIÓL. LEANDRO ALBERTO NÚÑEZ MUÑOZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

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

Ciudad de México

Agosto, 2017.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a mi persona a través de la beca 593173

RESUMEN

La sequía, frío y suelos pobres son de los principales factores abióticos que afectan la productividad agrícola, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria a nivel mundial. Una alternativa para obtención de plantas tolerantes a sequía es a través el uso de la biotecnología moderna, pero la liberación e implementación en campo de estas plantas implica marcos regulatorios complejos y genera preocupación en algunos grupos sociales, debido a la falta de información. Sin embargo, la tecnología de edición de genomas, mediada por el sistema CRISPR/Cas9 supone una nueva ventana de mejoramiento genético de variedades vegetales, que podrán contener modificaciones precisas y dirigidas del genoma, libre de secuencias exógenas. El presente trabajo pretende producir variedades resistentes a sequía a través de la modificación del gen codificante para la enzima trehalasa en *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*. Entre los resultados obtenidos destacan la obtención de una plataforma de vectores para edición de genomas vegetales monocotiledóneas y dicotiledóneas empleando la cepa hipervirulenta de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, el diseño de gRNAs para editar el gen *tre1*, obtención de transformantes y plantas editadas de *A. thaliana*; así como la caracterización de un sistema de transformación transitorio para maíz *in planta*.

ABSTRACT

Drought, extreme temperatures and poor soils are some of the main abiotic factors affecting crop productivity, risking global food security. An alternative to obtain drought-tolerant plants is the use of modern biotechnology, but the release and implementation of these plants in the field implies different and complex regulatory laws and generates concerns among some social groups due to the lack of information. However, the genome editing technology mediated by CRISPR/Cas9 provides a new strategy to the improvement of plant varieties which could contain precise modifications into the genome, considering these free of exogenous sequences. In this work, we aim to produce drought tolerant varieties through the modification of the gene coding for trehalase in *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. It has been obtained a vector for monocotyledonous and dicotyledonous plant genome editing by using a hypervirulent strain of *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. We have design the gRNAs to edit the *tre1* gene obtaining transformants and edited plants of *A. thaliana*, as well as the characterization of a transient transformation system for maize *in planta*

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	7
1.1	Naturaleza y mecanismos de modificación genética.....	7
1.1.1	Mecanismos de reparación de DNA.	8
1.1.1.1	Reparación por unión de extremos no homólogos.	8
1.1.1.2	Reparación dirigida por homología.....	9
1.2	Edición de genomas.	10
1.2.1	Sistema CRISPR/Cas9.....	11
1.2.2	Cas9: estructura variantes y ortólogos.....	11
1.2.3	Estructura, transcripción y actividad de gRNAs.	14
1.3	Trehalosa y trehalasa en plantas.	16
2	JUSTIFICACIÓN.....	21
3	HIPÓTESIS	22
4	OBJETIVOS	23
5	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1	Material biológico.....	25
6.2	Condiciones de crecimiento de material vegetal.	25
6.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	25
6.2.2	<i>Zea mays</i> y <i>Cucurbita máxima</i>	25
6.3	Análisis in silico para determinar el sitio de edición para el gen tre1.....	26
6.3.1	Análisis estructural y funcional de tre1 en plantas.	26
6.3.2	Diseño de gRNAs.	26
6.3.3	Determinación de la secuencia parcial de tre1 en <i>Z. mays</i> var. VT401.....	27
6.4	Construcción de vectores para edición de genomas.....	29
6.4.1	Adición de cassette de espectinomicina.	29
6.4.2	Intercambio de promotores para la síntesis de gRNA.	32
6.5	Verificación de la actividad del promotor ZmUbi1p en dicotiledóneas.....	33
6.5.1	Construcción del vector pBGWFS7-ZMUbi1p.....	33
6.5.2	Transformación de <i>Agrobacterium</i>	34
6.5.3	Agroinfiltración de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	34
6.5.4	Análisis de expresión para GFP.....	35
6.5.5	Western Blot para verificar la expresión de GFP.	35

6.6	Clonación de gRNA.	36
6.7	Transformación de plantas.	37
6.8	Selección y análisis de transformantes.	37
6.8.1	Extracción de DNA genómico vegetal.....	37
6.8.2	PCR punto final.	38
6.8.3	Selección de plantas mediante qPCR.....	38
6.8.4	Determinación del número de copias a través de ddPCR.	39
6.9	Determinación de la estabilidad y segregación de la transformación en maíz....	40
6.9.1	Determinación de la eficiencia de transformación.....	40
6.9.2	Determinación de la estabilidad de la transformación.....	40
6.9.3	Tinción de GUS.	40
6.9.4	Estudio de segregación.	41
6.10	Determinación de cambios genotípicos.	41
6.11	Análisis fenotípico de mutantes de <i>A. thaliana</i>	41
6.12	Cuantificación relativa de transcritos de ATTRE1	42
6.12.1	Extracción de RNA.	42
6.12.2	RT-qPCR para cuantificación relativa de transcritos para el gen ATTREH. 42	
7	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	44
7.1	Análisis in silico para determinar el sitio de edición para el gen tre1.....	44
7.2	Determinación de la secuencia parcial del gen TRE1 en <i>Z. mays</i> var. VT401. ..	47
7.3	Diseño de gRNA.....	50
7.4	Construcción de vectores para edición de genomas.....	51
7.5	Verificación de la actividad del promotor ZmUbi1p en dicotiledóneas.....	54
7.6	Transformación y selección de transformantes.....	57
7.6.1	Caracterización de transformación <i>in planta</i> de <i>Z. mays</i> var. VT401.	57
7.6.2	Selección y caracterización de transformantes de <i>A. thaliana</i>	66
7.7	Determinación de cambios genotípicos y fisiológicos	68
7.8	Análisis fenotípico de mutantes de <i>A. thaliana</i>	70
8	CONCLUSIONES	72
9	PERSPECTIVAS	73
10	BIBLIOGRAFÍA.....	74

1 INTRODUCCIÓN

La sequía es uno de los principales factores abióticos que repercute sobre la productividad de nuestros cultivos, y junto con la creciente baja disponibilidad de agua para riego y consumo, pone en riesgo la seguridad alimentaria a nivel mundial. Una alternativa para optimizar el uso eficiente del recurso hídrico en plantas de interés agrícola, es la producción de variedades tolerantes a sequía, a través del uso de técnicas de biotecnología moderna. A pesar de estas ventajas, se encuentran bajo regulación estricta por las leyes de bioseguridad y liberación de Organismos Genéticamente Modificados en muchos países y generan preocupación en algunos grupos sociales, debido a falta de información. Sin embargo, una nueva tecnología mediada por el sistema CRISPR/Cas9, supone una nueva ventana de mejoramiento genético en plantas, donde el producto final contendría modificaciones precisas y dirigidas del genoma y a su vez, sin secuencias genéticas exógenas.

Una estrategia promisoría para la obtención de variedades resistentes a sequía es disminución de la actividad de la enzima trehalasa, ya sea reduciendo la cantidad de enzima producida o su actividad. Para ello, el uso del sistema CRISPR/Cas9 puede ser una herramienta idónea; pero para ello resultaría necesaria una plataforma de vectores que permitan la modificación génica a través de transformación de diferentes especies vegetales con cepas hipervirulentas de *Agrobacterium tumefaciens*.

1.1. Naturaleza y mecanismos de modificación genética.

La selección natural, las diferencias fenotípicas intra e interespecíficas y enfermedades de origen génico como el cáncer, están cimentadas sobre un fenómeno en común: las mutaciones. Las mutaciones se definen como cambios en la secuencia de DNA de un organismo y se producen en cada ser vivo producto de fenómenos de naturaleza biológica, física o química.

Desde el punto de vista biológico, la maquinaria de replicación del DNA tiene propensión a cometer errores, siendo fuente de cambios genotípicos (Pierce, 2012). Otros agentes biológicos como bacterias, virus, bacteriófagos, transposones y

retrotransposones, son también elementos que favorecen la inducción de mutaciones en el DNA (Snustad & Simmons, 2012). Adicionalmente, algunos agentes físicos y químicos como radiación ionizante, luz UV, calor, congelamiento, agentes intercalantes, modificadores o análogos de bases nitrogenadas, especies reactivas de oxígeno, etc. actúan como mutágenos (Crueger, 1993). Desde el punto de vista biotecnológico, todos estos agentes producen de forma aleatoria mutagénesis en el material genético, por lo cual a la fecha no es posible dirigirlos para la modificación nucleotídica específica de una región de interés en el genoma. Otro mecanismo de generación de daño de la doble hebra del DNA, a través del uso de enzimas con actividad sitio dirigidas, ya sea por interacciones proteína-DNA o RNA-DNA; que se dirigen a secuencias específicas de DNA (Fig. 1).

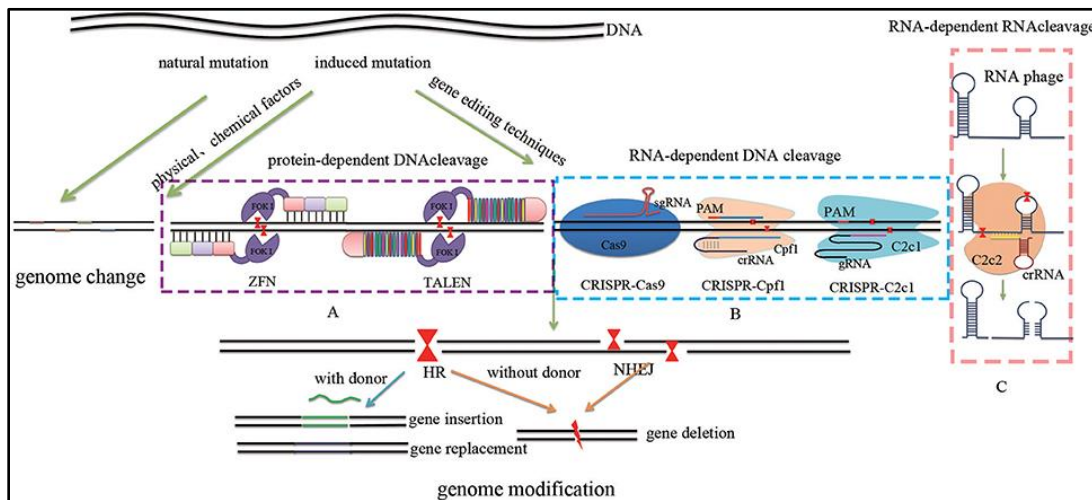


Figura 1. Mecanismos de modificación genética (Fuente: Zhang *et al.*, 2017)

1.1.1. Mecanismos de reparación de DNA.

Cuando se produce una ruptura de la doble hebra del DNA pueden ocurrir dos mecanismos principales de reparación: 1) la unión de extremos no homólogos (del inglés Non Homologous End Joining o NHEJ), o 2) reparación dirigida por homología (del inglés Homology Direct Repair o HDR) (Friedberg, 2003).

1.1.1.1 Reparación por unión de extremos no homólogos.

Ocurre cuando la maquinaria de reparación celular une la ruptura previamente generada de la doble hebra del DNA; generando inserciones o delecciones de algunos nucleótidos (Manova & Gruszka, 2015). Este fenómeno de

reparación ocurre más frecuentemente en plantas que la reparación por recombinación dirigida por homología, probablemente por las actividades enzimáticas involucradas en este proceso. La unión de extremos es usualmente asociada a deleciones de entre 1-1000 bp o a inserciones de hasta 1200 bp (Choe, 2016). A manera de dato curioso, la unión de extremos no homólogos por ligación simple sin alteración de secuencia se considera un fenómeno raro (Shen *et al.*, 2017). Si la ruptura de la doble hebra ocurre en una región codificante, las inserciones y deleciones originadas pueden ocasionar un corrimiento del marco abierto de lectura, con la posible aparición de un codón de paro prematuro y la consecuente producción de una proteína truncada, usualmente no funcional (Sun *et al.*, 2016).

Molecularmente, la unión de extremos no homólogos puede darse entre los extremos romos o cohesivos de corta longitud, y comienza con el reconocimiento y yuxtaposición de los extremos rotos, por parte del complejo DNA-PK (compuesto por las proteínas KU70, KU80 y la subunidad catalítica DNA-PK). Posteriormente, son reclutados Artemis y el heterodímero Xrcc4/DNA ligasa IV; Artemis está involucrada en la maduración de los extremos de la ruptura, el complejo Xcc4/DNA ligasa IV cataliza el sellado de los extremos y probablemente la DNA polimerasa λ rellena los nucleótidos faltantes. El heterodímero Xrcc4/DNA ligasa IV ve potenciada su actividad en presencia del complejo MRN (compuesto por Mre1, Rad50 y Nbs1), que también está implicado en la yuxtaposición de los extremos del DNA (Bleuyard *et al.*, 2006).

1.1.1.2 Reparación dirigida por homología.

La reparación dirigida por homología utiliza el intercambio de información genética entre secuencias de DNA. Este proceso guía el intercambio de regiones entre cromosomas que producen nuevas combinaciones de alelos durante la meiosis, es un proceso importante en la segregación cromosómica, participa en la reparación de telómeros incompletos y horquillas de replicación dañadas.; así como en la resolución de hebras de DNA entrecruzadas (Puchta, 2002).

Existen dos vías para la reparación mediada por recombinación de homólogos: una dependiente y otra independiente de Rad51. La etapa inicial en las dos vías es el procesamiento de la ruptura de la doble hebra para formar extremos 3´ cohesivos donde participa el complejo MRX, compuesto por Rad50, Mre11 y Xrs2. Posteriormente, Rad52 se une en los extremos de la ruptura y si las regiones monocatenarias presentan complementariedad de secuencias, Rad52 promueve su alineamiento de los extremos 3´cohesivos y dirige la reparación a través del mecanismo de alineamiento de una sola hebra (Single Strand Annealing o SSA) (Samach *et al.*, 2011). De forma alternativa, parálogos de Rad51 pueden reclutar a Rad51 en el extremo del DNA, formando un nucleofilamento de Rad51/DNA de cadena sencilla, con la participación de Brca2. Este nucleofilamento puede invadir una molécula de doble hebra de DNA con secuencias homólogas que sirve como molde para reparar la ruptura de la doble hebra mediante el mecanismo de reparación de ruptura de cadena doble (Double-strand break repair o DSB). De esta forma, DSB es una vía conservativa de reparación; mientras que SSA conlleva a la eventual pérdida de material genético. Rad54 es un miembro de la familia Swi/Snf2 que facilita la etapa de invasión de la hebra, así como en la extensión del heteroduplex formado entre dos moléculas de DNA (Bae *et al.*, 2014; Ray & Langer, 2002; San Filippo *et al.*, 2008).

1.2. Edición de genomas.

Desde el punto de vista biotecnológico, las prácticas de edición de genoma son referidas como el conjunto de técnicas desarrolladas para producir modificaciones específicas y dirigidas en secuencias nucleotídicas, permitiendo la modificación de un determinado locus mediante sustituciones, deleciones o inserciones en sitios determinados del genoma. Las tecnologías disponibles para implementar edición de genomas surgieron como herramientas promisorias para la modificación de un amplio rango de organismos, entre las cuales existen cuatro principales plataformas basadas en el uso de: 1) meganucleasas, 2) nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), 3) nucleasas efectoras tipo activadores de transcripción (TALEN) y 4) repeticiones palíndromas cortas interespaciadas y agrupadas regularmente (CRISPR)/ proteína asociada a CRISPR (Cas9). Todas

estas plataformas comparten la característica en común de utilizar nucleasas secuencia específicas, que ocasionan rupturas de la doble cadena del DNA en sitios puntuales, que son luego reparados por la maquinaria de reparación del DNA (Belhaj *et al.*, 2013)

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

1.1.2. Sistema CRISPR/Cas9.

Recientemente ha emergido una nueva tecnología basada en un sistema inmunitario natural presente en un 40% de eubacterias y un 90% de arqueas, que identifica y destruye ácidos nucleicos exógenos (como virus, fagos y plásmidos), habiéndose ya establecido como un sistema de edición de genomas en especies eucariotas vegetales como arroz, trigo, maíz, tomate, papa, lino, naranja, tomates, tabaco, soya, *N. benthamiana*, *A. thaliana* y otros. Este sistema, denominado CRISPR/Cas9, se compone de una ribonucleoproteína con actividad nucleasa denominada CRISPR associated protein 9 (Cas9) de *Streptococcus pyogenes* y un RNA guía sintético (gRNA), que dirige a Cas9 a su secuencia blanco, la cual debe estar precedida por un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) cuya secuencia es NGG en el caso de *S. pyogenes* (SpCas9). La especificidad de este sistema es determinada por una secuencia de 17-20 nucleótidos presentes en gRNA, denominada protoespaciador, y que es idéntica en secuencia a la región en la que se desea que ocurra la ruptura de la doble hebra de DNA, permitiendo una edición simple en comparación con las demás tecnologías para editar genes. Además, este sistema es útil también como herramienta eficiente en la generación de resistencia contra virus de DNA y RNA en plantas (Amitai & Sorek, 2016; Dominguez *et al.*, 2015; Doudna & Charpentier, 2014).

1.1.3. Cas9: estructura variantes y ortólogos.

La proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9): es una enzima multifuncional monomérica con un peso de 160 KDa, compuesta por 6 diferentes

dominios, de los cuales dos dominios tienen actividad endonucleasa: HNH que es responsable de la digestión de la hebra complementaria tres nucleótidos adyacentes al PAM y el dominio similar a RuvC que rompe la hebra no complementaria en una región de 3 a 8 nucleótidos adyacentes al PAM (Anders *et al.*, 2015; Doudna & Charpentier, 2014) (Fig. 2).

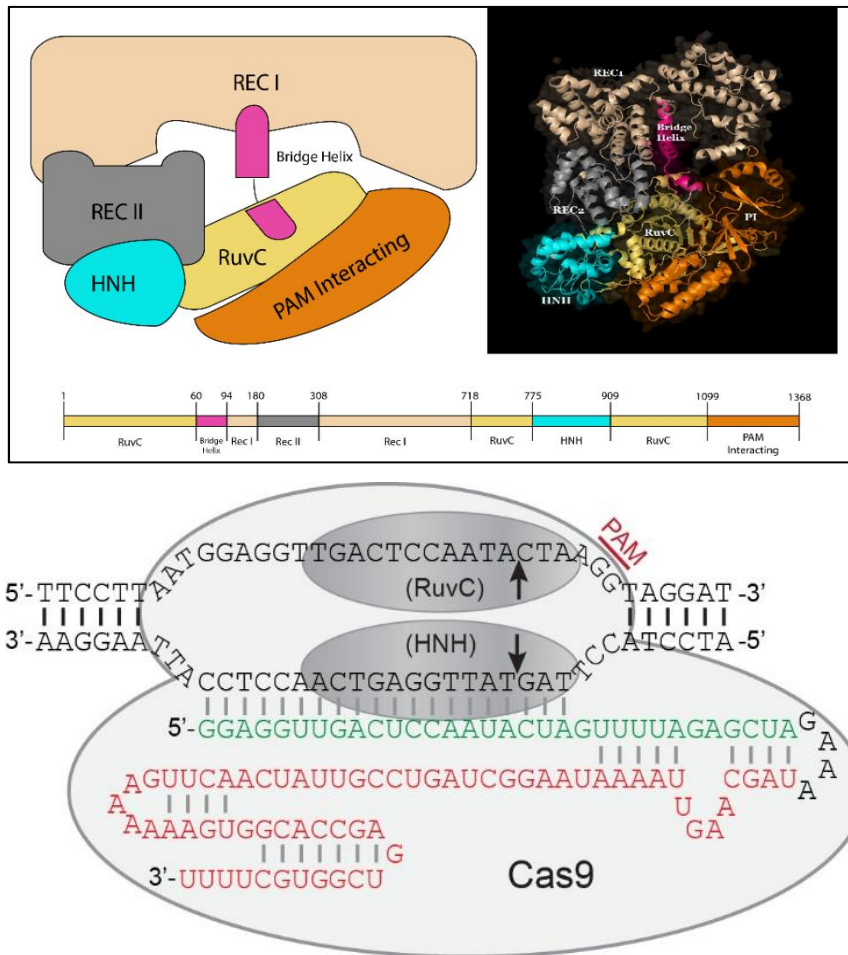


Figura 2. Estructura y actividad endonucleasa de la proteína Cas9 (Fuente: Jinek *et al.*, 2014).

Existen otras proteínas similares a SpCas9 en diferentes microorganismos, que se dividen estructuralmente en dos clases principales, 5 tipos y 16 subtipos. Ejemplos de ello son los ortólogos de Cas9 y Cpf1 de *Francisella novocida*, y C2c2 de *Leptotrichia sashii* que tienen una actividad similar a la de Cas9, pero PAMs, longitudes de gRNA diferentes (East-Seletsky *et al.*, 2016; Zetsche *et al.*, 2015), por lo cual las opciones de diseño para los sitios de edición, seguirán incrementándose

en los próximos años con el descubrimiento de proteínas similares en otros microorganismos.

Existen variantes de Cas9 que han permitido utilizar a esta enzima en otras aplicaciones biotecnológicas como las que se describen a continuación.

1) Cas9 inactiva en un dominio catalítico (nCas9): posee actividad endonucleasa únicamente en una hebra del DNA, debido a la sustitución del residuo de ácido aspártico 10 por una alanina (D10A) o de la histidina 840 por una alanina (H840A), inactivando así el dominio RuvC o HNH, respectivamente. Las rupturas de una hebra en el genoma son típicamente reparadas por el sistema de recombinación de homólogos (HDR), lo cual el uso de esta variante sería útil en el caso de que el cambio deseado sea una sustitución genética. Además, mediante la selección de dos gRNAs cercanos en hebras complementarias, se reduce el fenómeno de reconocimiento de secuencias fuera de blanco (Shen *et al.*, 2014)

2) Cas9 inactiva (dCas9). En este caso Cas9 posee mutaciones que inhiben ambos dominios catalíticos con actividad nucleasa (D10A y H840A), pudiendo emplearse entonces como sistema de anclaje a otras proteínas, y dirigiéndose a locus específicos donde sus proteínas de fusión, ejercen su función. Entre las proteínas de fusión a dCas9 producidas a la fecha, tenemos:

Represores o activadores de la transcripción: forman parte de una tecnología denominada interferencia por CRISPR (CRISPRi). En comparación con el mecanismo de interferencia por RNA (RNAi) en el que los transcritos son degradados y/o se bloquea la traducción, CRISPRi bloquea o activa la transcripción y elongación de una hebra de RNA; cuando dCas9 está fusionada a una proteína activadora de la transcripción como VP64 o VP16, o a una proteína represora como SDRX o Krüppel associated box (KRAB). (Bikard *et al.*, 2014; Dominguez *et al.*, 2015; Lupo *et al.*, 2013).

Proteínas fluorescentes: para el mapeo de promotores u otras regiones genómicas con una secuencia de interés; para la determinación la estructura,

localización y dinámica de cromosomas y locus, en células vivas (Chen & Bailey, 2016)

Dominio nucleasa de FokI: para adquirir actividad nucleasa en una hebra del DNA, de manera tal que el clivaje dependerá estrictamente de la unión de dos gRNAs con una orientación espacial definida, reduciendo así la probabilidad de reconocimiento de otros loci con similitud (target off) en el genoma (Bortesi & Fischer, 2015).

Reguladores epigenéticos: DNA demetilinas (Tet o LSD-1), DNA metilinas (DNMT3a) o proteínas modificadoras de histonas (p300), han sido reportadas como proteínas de fusión a dCas9 útiles para modificar los patrones de metilación, heterocromatina/eucromatina y promover o reprimir la transcripción de genes epigenéticamente. (Xu *et al.*, 2016).

Desaminasa de citosina: permite originar sustituciones puntuales (C→T) sin necesidad de ocasionar rupturas de la doble hebra (Shimatani *et al.*, 2017).

1.1.4. Estructura, transcripción y actividad de gRNAs.

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

Los gRNAs pueden ser funcionalmente expresados bajo promotores de RNA nucleolares pequeños o snoRNA (como los de los genes U6 o U3), que son transcritos por la RNA Polimerasa III especializada en la producción de RNAs cortos no codificantes (Doench *et al.*, 2016). Los promotores de snoRNA U3 o U6, requieren respectivamente un residuo de guanina o adenosina en su extremo 5' para llevar a cabo una óptima transcripción, lo cual puede soslayarse mediante la elección de secuencias de gRNA sin considerar la identidad de la primera base de la secuencia blanco o por la adición del nucleótido requerido para el inicio de la transcripción en el extremo 5'. En ese sentido la adición de dos guaninas en el extremo 5' de gRNAs expresados bajo el promotor U3, ha demostrado incrementar la actividad. Otros estudios han empleado promotores de RNA Polimerasa II para dirigir la síntesis de gRNAs, eliminando las restricciones del extremo 5' al final del

transcrito y permitiendo expresar simultánea y diferencialmente múltiples gRNAs debido a que su actividad puede ser específica de un tejido, etapa de desarrollo o inducible por algún agente físico o químico; con la limitación de presentar generalmente actividades menores en comparación a gRNAs expresados con promotores de RNA polimerasa III, tales como el CaMV 35S (Jia & Wang, 2014; Upadhyay *et al.*, 2013).

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

Una de las principales limitaciones del sistema CRISPR/Cas9 es que el complejo puede reconocer y cortar otras secuencias adicionales a la que se desea editar. La detección de potenciales sitios de corte fuera de blanco se puede realizar a través de secuenciación de genomas completos, secuenciación profunda dirigida o a través de inmunoprecipitación de cromatina/dCas9 seguida por secuenciación (ChIP-seq). Otros métodos están basados en la predicción *in silico* e *in vitro* de potenciales cortes fuera de blanco basados en la similitud entre la secuencia de interés y otras secuencias; demostrándose que Cas9 puede cortar en regiones similares con e incluso en secuencias con desajustes de hasta 5 nucleótidos, entre las secuencias del gRNA y el DNA. Estas herramientas han permitido determinar que inclusive PAMs diferentes al canónico 5'-NGG-3', como 5'-NAG-3', pueden también mediar la unión de Cas9 a otros locus, aunque con actividades endonucleasa inferiores (Choe, 2016).

Doench *et al.* (2014) desarrollaron un algoritmo para la estimación de la actividad en el sitio de interés, así como en otros lugares del genoma, e integrándose a diferentes herramientas web como CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu>), E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>), DESKGEN (<https://www.deskgen.com/landing/>), CRISPR RGEN Tool

(<http://www.rgenome.net/>), etc., basadas en genomas completos secuenciados y en las contribuciones individuales de cada nucleótido en la secuencia del espaciador y nucleótidos cercanos (Fig. 3). Otra derivación de este trabajo, es el empleo de secuencias de gRNAs más cortos (17 en lugar de 20 nucleótidos), haciendo un gRNA truncado que posee menos actividad fuera de la secuencia blanco.

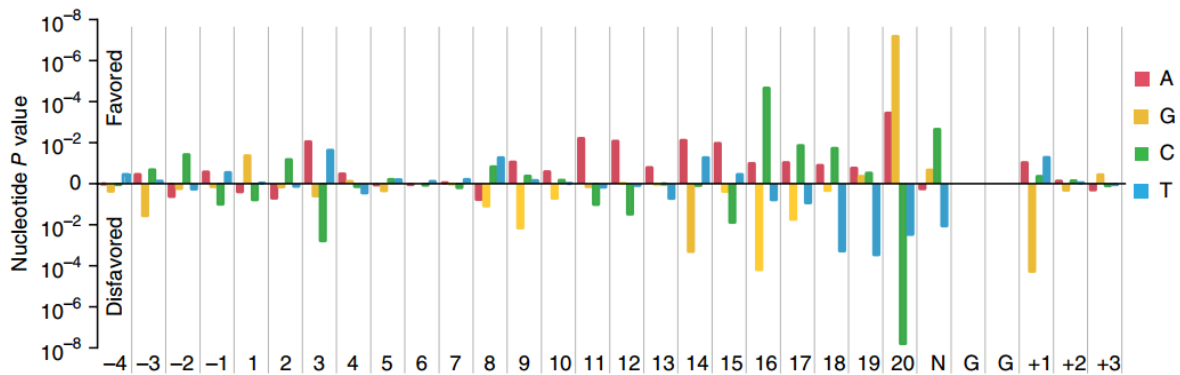


Figura 3. Contribución nucleotídica en la actividad de un gRNA (Fuente: Doench et al., 2014).

1.3. Trehalosa y trehalasa en plantas.

La trehalosa es un metabolito ubicuo en bacterias, hongos, vegetales, invertebrados e insectos; actuando como metabolito en respuesta al estrés. Su función precisa en plantas no está aún del todo esclarecida, pero algunos datos indican que juega un rol importante como molécula protectora durante el estrés abiótico (Almeida *et al.*, 2007).

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-1, 1- α -glucopiranosido; C₁₂H₂₂O₁₁ peso molecular (PM) 342.31 g/mol) es un disacárido no reductor compuesto por dos unidades de D-glucosa unidas por un enlace α , α -1,1. Las plantas poseen sólo una ruta para la biosíntesis de trehalosa, en comparación con las múltiples rutas que existen en procariontes y otros eucariontes. La ruta biosintética vegetal parte de UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato donde la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS), cataliza la formación de trehalosa 6-fosfato. Trehalosa 6-fosfato es luego convertida a trehalosa por acción de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP). En *A. thaliana* existen 11 genes codificantes para TPS y 10 genes codificantes para TPP; mientras que en *Z. mays* existen 14 genes para TPS y 11 para TPP. Curiosamente en todas las

especies vegetales, la parte catabólica de la ruta está representada por un único locus codificante para la enzima trehalasa (TRE), quien hidroliza la trehalosa en dos moléculas de glucosa (Fig. 4) (Barraza & Sánchez, 2013; Brodmann *et al.*, 2002; Figueroa-Soto *et al.* 2014).

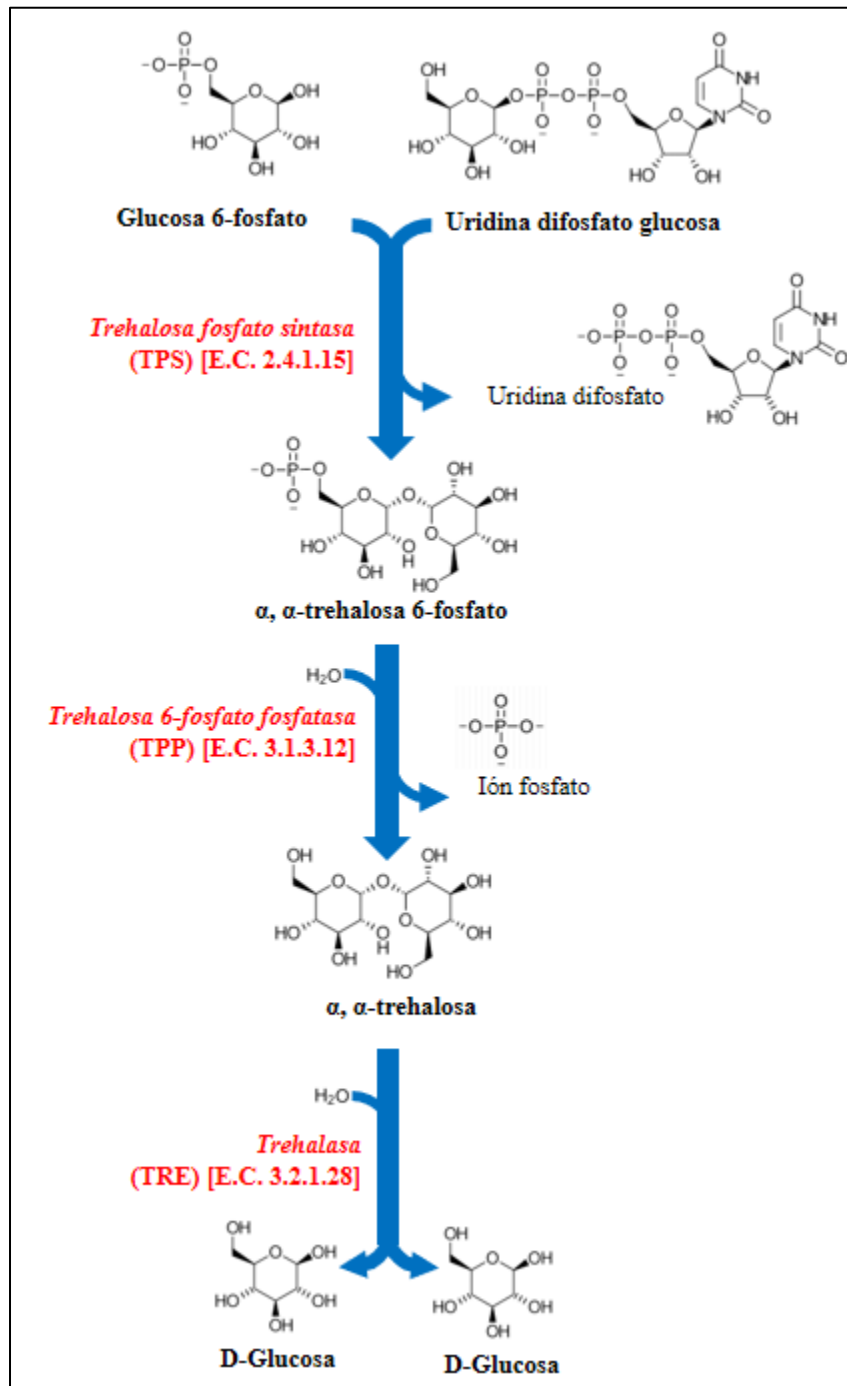


Figura 4. Ruta metabólica de la síntesis y degradación de trehalosa en plantas.

La trehalosa juega un papel importante en microorganismos como fuente de carbono y energía, así como osmoprotector ante diferentes tipos de estrés como el hídrico, osmótico, congelamiento, salinidad, oxidación y radiación. Sin embargo, sus funciones en plantas aún no terminan de esclarecerse debido a las bajas concentraciones en las que está presente la molécula en estos organismos, salvo en algunas excepciones de plantas anhidrobiontes no vasculares como *Sellagina lepidophylla* y vasculares como *Botrychium lunaria*; *Myothamnus flabellifolia* y *Sporobolus spp.*, acumulan trehalosa bajo condiciones de sequía alcanzando hasta un 20% de su peso seco, manteniendo así su viabilidad celular por diferentes mecanismos (Pampurova & Van Dijck, 2014; Van Dijck *et al.*, 2002; Yobi *et al.*, 2012). Adicional a las funciones descritas de osmolaridad y fuente de carbono, la trehalosa se fosforila, actuando como molécula señal sistémica, induciendo floración (Ruiz-Salas *et al.*, 2016).

El proceso catalítico de la enzima trehalasa se efectúa a través del hidrólisis del enlace glucosídico, originando una conversión anomérica, mediante el ataque nucleofílico por una molécula de agua (Barraza & Sánchez, 2013). Adicionalmente en plantas, la trehalosa se acumula en presencia de valindamicina A, que es un inhibidor específico para la trehalasa, sugiriendo que la trehalasa es la única vía en plantas para la degradación de la trehalosa. En plantas vasculares, los niveles de expresión de trehalasa son bajos, salvo en algunos órganos o estadios de desarrollo puntuales. En el caso de *A. thaliana* los niveles de expresión más altos se cuantifican en semillas en formación, silicuas jóvenes y órganos florales (Fig. 5), mientras que en caso de *Z. mays* se encuentra expresándose en internodos, hojas y estructuras femeninas reproductivas (Edward *et al.*, 1990; Lunn *et al.*, 2014) (Fig. 6).

La trehalasa ha sido reportada como una molécula osmoprotectora y diferentes estudios corroboran esta hipótesis en donde incrementar la síntesis de trehalosa mediante una sobreexpresión de sus genes biosintéticos o disminuir la degradación de la misma, conllevarían a un incremento en la concentración de trehalosa y por ende este carácter puede estar relacionado con una mayor tolerancia a sequía.

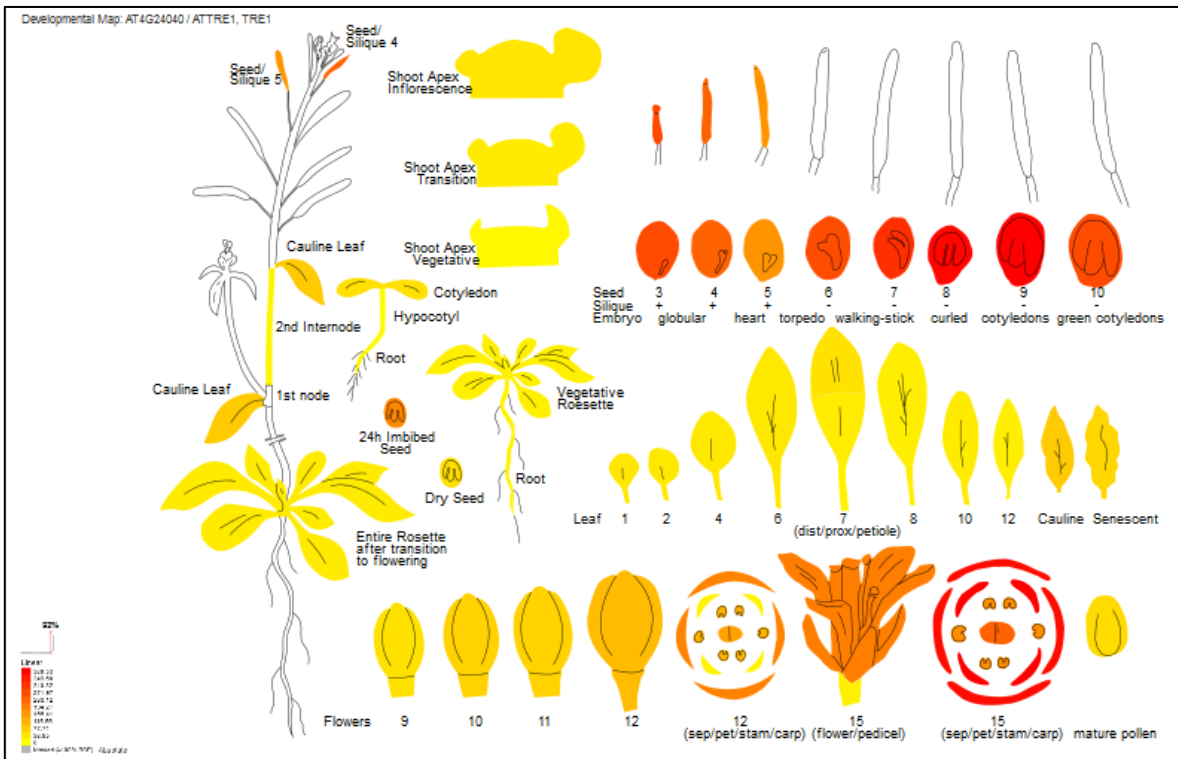


Figura 5. Perfil de expresión del gen trehalasa (*TRE1*) en *A. thaliana*.

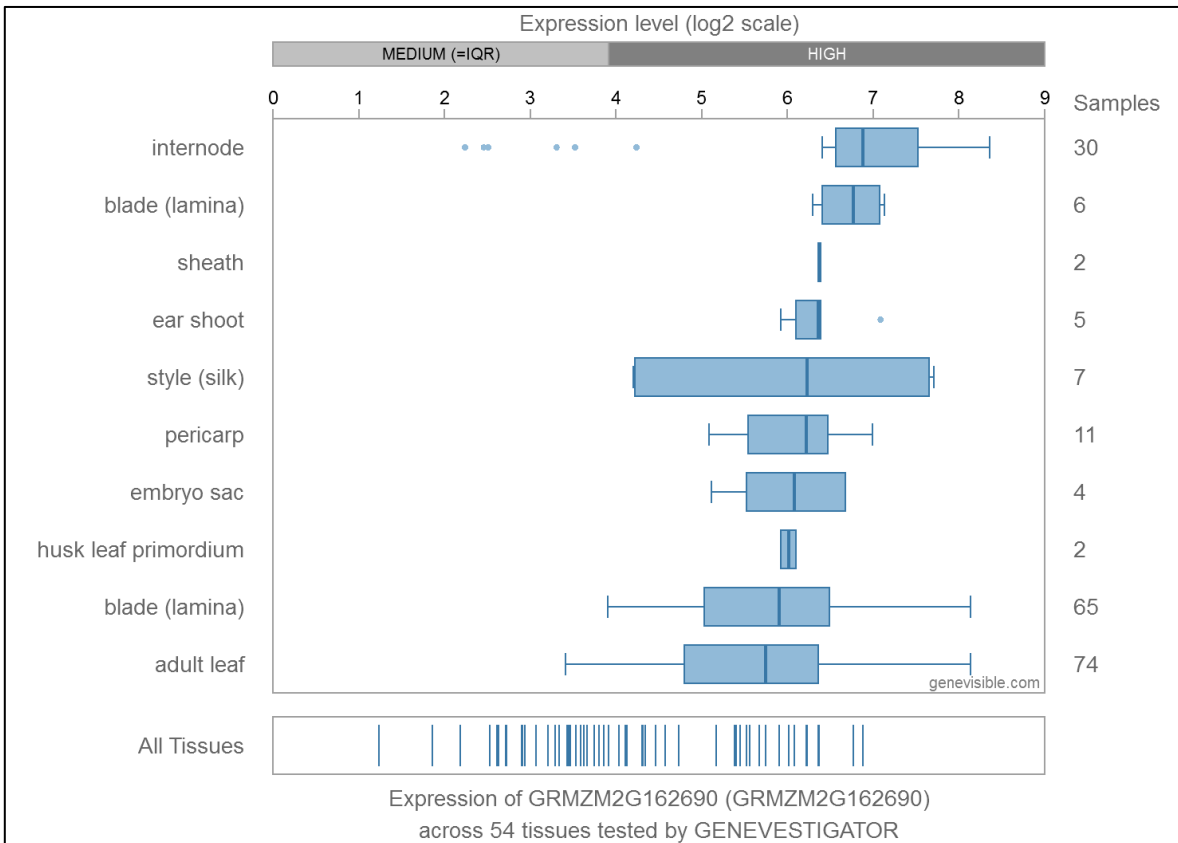


Figura 6. Perfiles de expresión del gen trehalasa (GRMZM2G12690) en Zea mays.

2 JUSTIFICACIÓN

La edición de genomas empleando el sistema CRISPR/Cas9 es una técnica novedosa que permite la modificación genética de forma precisa, selectiva y estable. La implantación de vectores que permitan llevar a cabo este proceso, así como la implementación de técnicas de transformación genéticas más accesibles a las reportadas a la fecha sin necesidad de técnicas de cultivo *in vitro*, supone una ventaja en la disminución de costos y tiempos para la obtención de transformantes. A su vez este sistema permitirá producir variedades vegetales libres de transgenes con una mayor resistencia a sequía, lo cual constituye la superación de los marcos regulatorios actuales de los cuales son objeto los organismos genéticamente modificados.

3 HIPÓTESIS

La implementación del sistema CRISPR/Cas9 en *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana* permitirá la producción de variedades potencialmente tolerantes a sequía, a través de la modificación específica y estable del gen que codifica para la enzima trehalasa, disminuyendo su actividad hidrolítica y por ende favoreciendo la acumulación de trehalosa, que es la base bioquímica de la tolerancia a sequía.

4 OBJETIVOS

Objetivo General

- Editar el gen que codifica para la enzima trehalasa en *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana*, a fin reducir su actividad enzimática.

Objetivos Específicos

- Establecer una plataforma de ingeniería genética que permita la transformación y expresión eficiente del sistema CRISPR/Cas9 empleando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.
- Determinar las secuencias de gRNA que permitan la edición del gen de la trehalasa en *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays* var. B73 y VT401.
- Producir, analizar y seleccionar genómica y fisiológicamente las plantas con potencial resistencia a sequía.

5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consta de cinco etapas (Figura 7) correspondientes a cada uno de los objetivos propuestos incluyendo el análisis *in silico* para determinar el sitio de edición para el gen *tre1*, la construcción de plásmidos para la edición de genomas vegetales, la transformación y selección de transformantes, la determinación de cambios genotípicos y fisiológicos en transformantes y la obtención de plantas segregantes libres de transgenes.

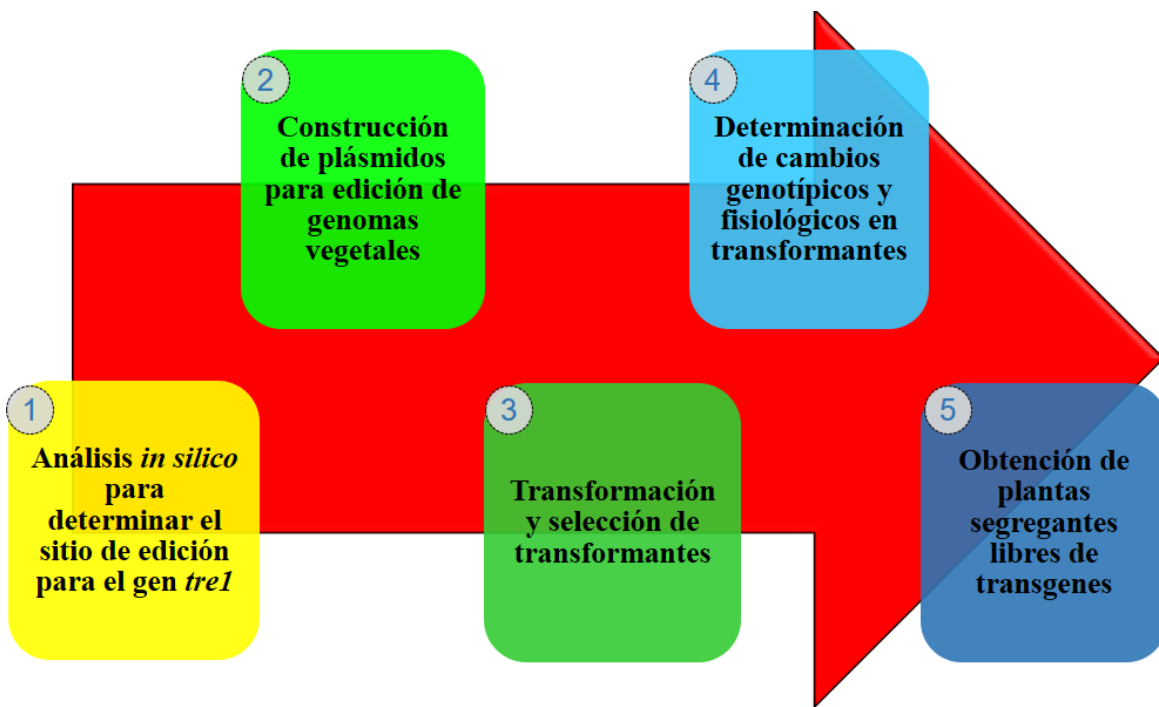


Figura 7. Estrategia experimental del proyecto.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4. Material biológico.

En este estudio se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) y las líneas mutantes SALK_147073 y SALK_151791 para el gen codificante de trehalasa (at4g24040) en la región 5'-UTR, provenientes del ABRC Stock Center (Arabidopsis Biological Resource Center). Asimismo, se emplearon semillas de *Zea mays* var. B73, *Zea mays* var. VT401, *Nicotiana benthamiana*, *Cucurbita maxima* var. Aladdin F1, *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, *Escherichia coli* MACH1™-T1 (Invitrogen).

1.5. Condiciones de crecimiento de material vegetal.

1.1.5. *Arabidopsis thaliana* y *N. benthamiana*

Las semillas de *A. thaliana* fueron sincronizadas durante 2 días en agarosa al 0.05% a 4°C y luego sembradas en pellets de turba comprimida. Para el caso de *N. benthamiana*, las semillas se sembraron directamente en pellets de turba comprimida. En ambos casos, las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento (Conviron, A1000, Winnipeg, Canadá) con humedad relativa al 70%, a 22°C, fotoperiodo 16 horas luz: 8 horas oscuridad, y riego interdiario con solución nutritiva Miracle Grow® a la concentración especificada por el fabricante.

1.1.6. *Zea mays* y *Cucurbita máxima*

Las semillas fueron embebidas en agua durante 30 minutos con agitación leve y posteriormente colocadas en un contenedor con algodón y papel estroza en cámara de crecimiento (Conviron, A1000, Winnipeg, Canadá) con humedad relativa 70%, a 24°C, fotoperiodo 16:8 (horas luz: horas oscuridad). Tras siete días, las semillas germinadas fueron sembradas en macetas con una mezcla de suelo: turba: agrolita en proporción 2:2:1; a 22-32°C con una humedad relativa de 20-40%, con riego interdiario con agua corriente y riego semanal con solución nutritiva Miracle Grow® a la concentración especificada por el fabricante.

1.6. **Análisis *in silico* para determinar el sitio de edición para el gen *tre1*.**

1.1.7. **Análisis estructural y funcional de *tre1* en plantas.**

Se realizó un análisis estructural de la enzima trehalasa en plantas, mediante revisión de la información depositada en Prosite (<http://prosite.expasy.org>), Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Una vez seleccionado e identificado el dominio de unión a sustrato en secuencia aminoacídica, se obtuvieron y compararon los marcos abiertos de lectura, correspondientes a organismos del taxón Phylum Viridiplantae, obtenidos de las bases de datos de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), Uniprot. (<http://www.uniprot.org/>), o del National Center for Biotechnological Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente se realizó un alineamiento de secuencias mediante el software MEGA 7.0 empleando el método de alineamiento de ClustalW empleando el método de Neighbor Joining con 1000 Bostraps (pairwise op: 35, Ext: 0,7; Multiple op: 15, Ext: 0,3). Las secuencias fueron utilizadas para realizar un análisis evolutivo y de identificación del mejor modelo evolutivo por medio de MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013). El análisis estadístico se realizó mediante el método de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). A partir de este análisis se realizaron inferencias evolutivas de la homología y composición de la región seleccionada codificante para el dominio de unión a sustrato. La creación de logos consenso de secuencias fue realizado con el software en línea WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) (Crooks *et al.*, 2004).

1.1.8. **Diseño de gRNAs.**

El diseño de gRNAs para la edición de este dominio se realizó empleando el software en línea DESKGEN (<https://www.deskgen.com/>) a fin de identificar los mejores candidatos para gRNAs en el gen codificante para trehalasa en *Z. mays* (GRMZM2G162690) y *A. thaliana* (AT4G24040), considerando para ello la mayor proximidad al dominio de unión a sustrato, la cercanía a aminoácidos de interés de edición, la mayor actividad del gRNA, la menor actividad off target y excluyendo

aquellos gRNAs cuya potencial actividad off target se encuentre en sitios codificantes del genoma.

1.1.9. Determinación de la secuencia parcial del gen *tre1* en *Z. mays* var. VT401.

Con la finalidad de poder iniciar estudios de diseño de gRNAs en variedades comerciales de maíz, se realizó la secuenciación y comparación del genoma de referencia para maíz (*Z. mays* línea B73) con una variedad comercial (*Z. mays* var. VT401) y una variedad ancestral (*Zea* spp.). Para la amplificación de la región del gen *tre1* que incluyera el dominio de unión a sustrato en variedades de maíz cuya secuencia nucleotídica es desconocida; se diseñaron oligos para amplificar mediante PCR punto final el sitio potencial de edición en dichas variedades. Los oligos empleados para dicha amplificación fueron diseñados sobre regiones conservadas en diferentes especies de plantas monocotiledóneas del clado Poaceae (TREH-MONOCOT-F: 5'-ACTTCCTGTCCCGCYAC TTCG-3', TREH-MONOCOT-R: 5'-AGCACAATAGYCTTTGCCGTG-3'). Los lineamientos generales seguidos en este trabajo, para la amplificación de productos de PCR mediante PCR punto final, se indican en las Tablas I (mezcla de reacción) y II (programa de temperaturas para amplificación).

Tabla I. Mezcla de reacción para PCR punto final.

Reactivo	Volumen (µL)
ddH ₂ O estéril	8.70
Buffer 10X	1.25
dNTPs (10 µM)	1.00
Primer F (100 µM)	0.25
Primer R (100 µM)	0.25
Takara Ex Tak HS	0.05
DNA (30-100 ng/µL)*	1.00
Volumen final	12.50

*=Para PCR de DNA plasmídico o genómico de *A. thaliana*, el DNA se normalizó a una concentración de 30 ng/µL. Para PCR de DNA genómico de *Z. mays*, el DNA se normalizó a una concentración de 100 ng/µL

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

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

} 30X

*= La temperatura de alineamiento dependerá de cada PCR en particular y deberá ser optimizada en función de cada par de oligos con base en su T_m .

Una vez amplificados los fragmentos por PCR punto final y visualizados en gel agarosa al 1%, dichos productos de PCR fueron clonados en el vector pDRIVE (Fig. 8), siguiendo la mezcla de reacción señalada en la Tabla III e incubados a 16 °C toda la noche. Posteriormente la mezcla de clonación fue empleada para la transformación de células comerciales de *E. coli* MACH1™-T1 (Invitrogen) mediante choque térmico siguiente las indicaciones del fabricante seleccionados. Las células se inocularon en placas de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL), X-Gal (100 µg/mL) e IPTG (50 µM) y tras incubación de las colonias se realizó el escrutinio de colonias azules y blancas.

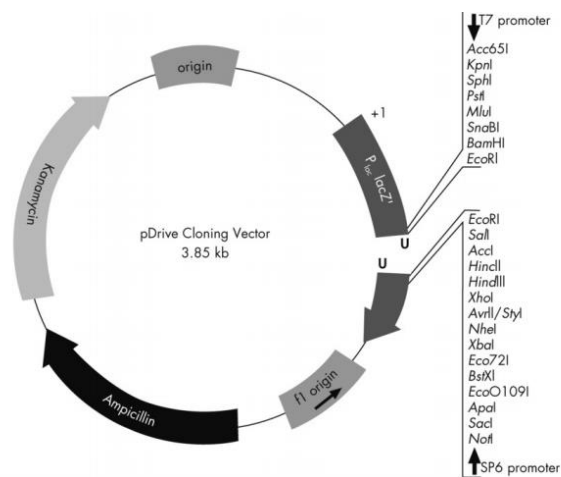


Figura 8. Mapa del vector pDRIVE, empleado para la clonación de una región del gen *tre1* en *Z. mays*

Tabla III: Mezcla de reacción para clonación en el vector pDRIVE

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

La presencia del inserto en las colonias blancas obtenidas fue verificada por PCR punto final y estas clonas fueron secuenciados para determinar su homología de secuencias nucleotídicas respecto al genoma de referencia a partir de secuenciación por el método de Sanger en el Servicio de Secuenciación de DNA del Laboratorio de Bioquímica Molecular, UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM. Las secuencias obtenidas fueron comparadas a través de un alineamiento con BLASTn para regiones genómicas de organismos del género *Zea* spp. (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

1.7. Construcción de vectores para edición de genomas.

Los vectores pBUN411 (Addgene plasmid # 50581), pBUN501 (Addgene plasmid # 50582), pBUN6111 (Addgene plasmid # 50579) (Xing *et al.*, 2014) y pCR8/GW/TOPO (Fig. 8), se utilizaron para la elaboración de vectores que permitieran la transformación eficiente de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas empleando la cepa hipervirulenta de *A. tumefaciens* AGL1.

1.1.10. Adición de cassette de espectinomicina.

Los vectores pBUN411, pBUN501 y pBUN6111 fueron resuspendidos de papel de filtro en 20 µL de TE calentado a 70°C (Tris HCl 10 mM pH 8.5, EDTA 0.1 mM) durante 20 min a temperatura ambiente. 5 µL de esta elución se emplearon para la transformación de células comerciales de *E. coli* MACH1™-T1 (Invitrogen) mediante choque térmico siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente,

las colonias obtenidas fueron crecidas en medio LB suplementado con kanamicina (50 mg/L) y espectinomicina (100 mg/L). El DNA plasmídico fue extraído con el kit ZR Plasmid Miniprep™ Classic (Zymo Research), digerido con AclI, desfosforilado con rSAP y purificado de gel de agarosa al 0.8% con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Por otra parte, se amplificó por PCR punto final el cassette de resistencia a espectinomicina proveniente del plásmido PCR8/GW/TOPO, con iniciadores que contenían un sitio de restricción para la enzima ClaI (SmRClaI-F: 5'-CC ATCGATGGAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAATC-3' y SmRClaI-R: 5'-CCATCGATGGGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC-3'). El producto de PCR fue digerido con ClaI, purificado por columna mediante el kit QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) y ligado a los vectores digeridos con AclI con ligasa T7 (New England Labs). 5 µL la mezcla de ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli* MACH1-T1 y las transformantes obtenidas se analizaron mediante codigestión con SpeI/SspI y por PCR punto final para verificar la presencia del cassette de espectinomicina (SmRClaI-F: 5'-CCATCGA TGGAGC TCTGGCCCGTGTCTCAAATC-3' y SmRClaI-R: 5'-CCATCGATGGGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC-3'); para la obtención de los vectores pBUN4U3SM, pBUN5U6SM y pBUN6U6SM.

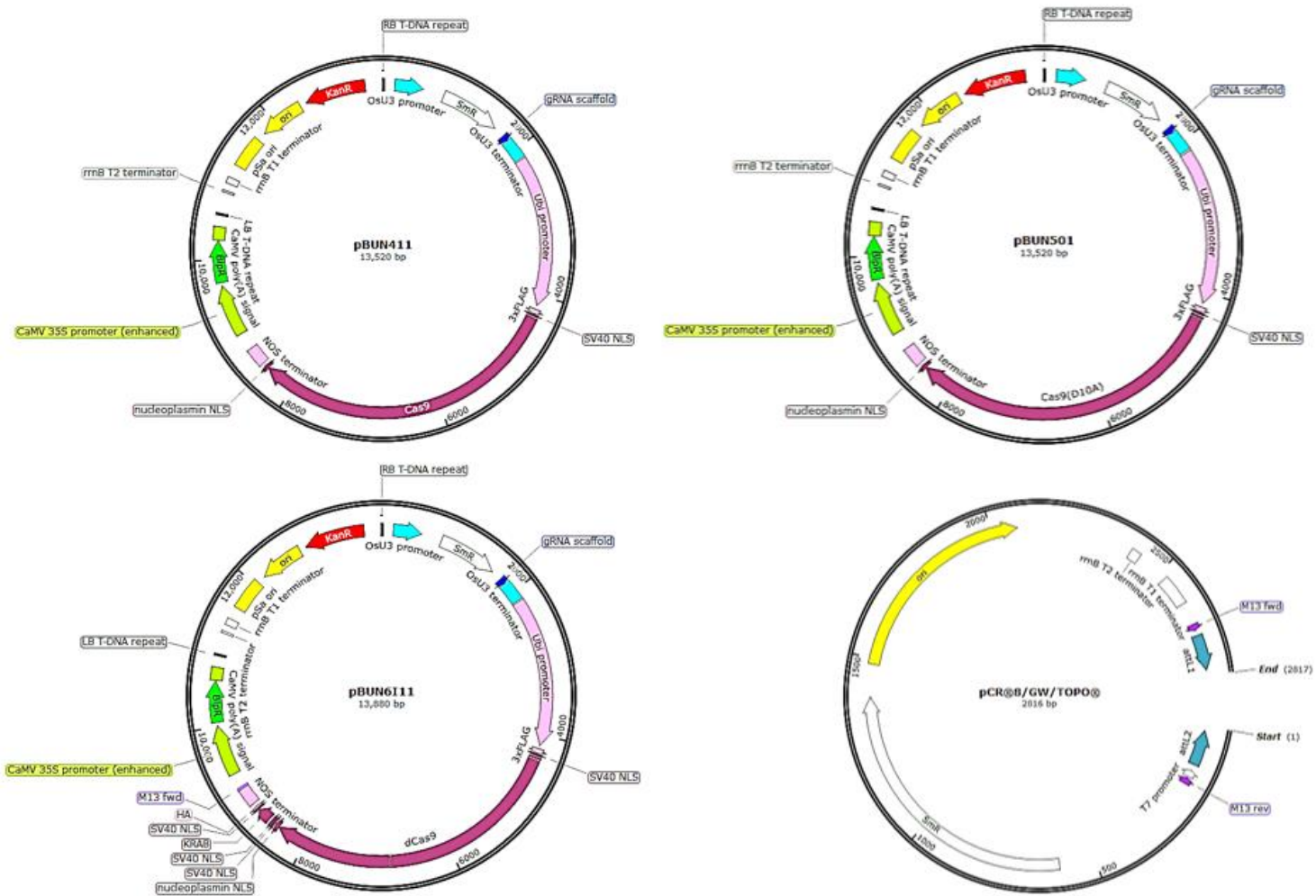


Figura 8. Plásmidos utilizados en este estudio para la construcción de vectores utilizables en la cepa hipervirulenta de *A. tumefaciens* AGL1.

1.1.11. Intercambio de promotores para la síntesis de gRNA en monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Cada uno de los vectores obtenido en el apartado 3.1 se digirieron con la enzima HindIII generando fragmentos de 122 Kb aproximadamente. El fragmento de 12 Kb se consideró como base para la construcción de nuevos vectores y el fragmento de 2 Kb fue considerado como el cassette para la síntesis del gRNA y purificados de gel de agarosa al 1%, utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Combinaciones de vectores base (150 ng) y cassettes para la síntesis de gRNA (20 ng) fueron utilizadas para la reacción de ligación con ligasa T7 (New England Labs). 5 µL la mezcla de ligación fueron empleados para transformar células de *E. coli* MACH1-T1 y las transformantes obtenidas fueron analizadas mediante codigestión con las enzimas NcoI/BsaI así como por PCR punto final para OsU3 (OsU3p-F: 5'- CAGGGACCATAGCACA AGACA-3', OsU3t-R: 5'-GCGACGGAGAAA ACTCAATG-3') o AtU6 (AtU6p-F: 5'- CCTGGGAATCTAAAGAAGAGAAG-3', AtU6t-R: 5'-CAGAA ATTGAACGCCGAAGAAC-3'), según corresponda; a fin de verificar el correcto intercambio en los promotores en los vectores pBUN4U6SM, pBUN5U3SM y pBUN6U3SM.

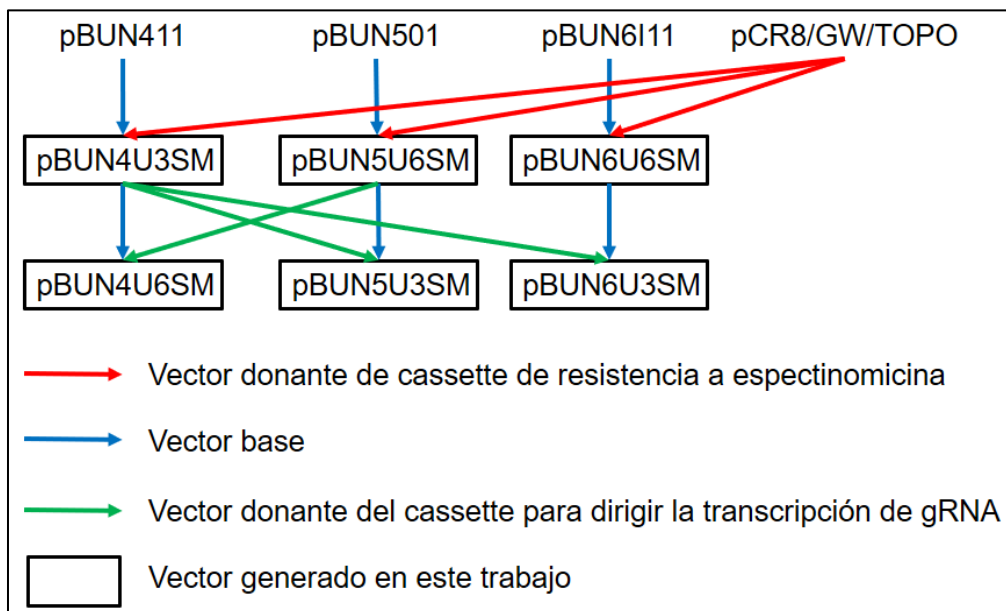


Figura 9. Representación esquemática de la construcción de los vectores para edición de genomas empleados en este trabajo.

1.8. Verificación de la actividad del promotor ZmUbi1p en dicotiledóneas.

El promotor de Ubiquitina 1 o poliubiquitina de *Zea mays* (1970 bp) dirige la síntesis del gen estructural Cas9 en los vectores obtenidos en el apartado 3.2, por lo cual resultó necesario verificar la funcionalidad de este promotor en plantas dicotiledóneas.

1.1.12. Construcción del vector pBGWFS7-ZMUb1p.

Para ello se llevó a cabo la amplificación del promotor mediante PCR punto final con los oligonucleótidos ZMUb1p-F: (5'-CGGTCGTGCCCTCTCTAGA-3') y ZMUb1p-R (5'-CTG CAGAAGTAACACCAAACA-3') tomando como DNA templado a 30 ng del plásmido pBUN411. Posteriormente se efectuó la purificación del fragmento de PCR mediante el kit QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante y posteriormente se llevó a cabo la clonación en el plásmido de entrada pPCR8/GW/TOPO (Tabla IV) incubando a 22°C toda la noche y transformando el producto de clonación en *E. coli* para obtener el vector PCR8-ZMUb1p. Este plásmido fue verificado mediante restricción con digestión con HincII, para determinar la orientación del inserto y las clonas con la orientación correcta fueron linealizadas con PvuI; y mediante recombinación con el vector destino pBGWFS7 (Karimi *et al.*, 2007) con LR Clonasa (Invitrogen) se obtuvo vector pBGWFS7-ZmUbi1p (Tabla V) tras incubación toda la noche a 22°C y posterior transformación de *E. coli*. Las colonias resultantes fueron analizadas por PCR punto final para verificar la presencia del inserto de interés.

Tabla IV: Mezcla de reacción para clonación en el vector pCR8/GW/TOPO

Componente	Volumen (µL)
H ₂ O Milli-Q estéril	2.5
Producto de PCR purificado (100 ng/µL)	2.0
Solución de Sales	1.0
pCR8/GW/TOPO	0.5

Volumen final	6.0
----------------------	------------

Tabla V: Mezcla de reacción para recombinación con clonasa LR

Componente	Volumen (µL)
Vector de entrada linealizado (30 ng/µL)	1.0
Vector binario (150 ng/µL)	1.0
LR clonasa II	0.5
Volumen final	2.5

1.1.13. Transformación de *Agrobacterium*.

0.5-1 µg del vector binario verificado fue utilizado para la transformación de 50 µL de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* AGL1 utilizando una cuveta de 0.1 cm a 1800 V, 15 µF 335 R en un equipo electroporador EquiBio EasyJect Optima (Ashford, UK). Tras incubar 3 h a 28°C a 225 rpm, se sembraron 5 µL de la mezcla de transformación en placas de LB con carbenicilina (100 mg/L), kanamicina (50 mg/L) y espectinomicina (100 mg/L) durante 2-3 días a 28 °C. Las colonias fueron transferidas a medio LB con carbenicilina (50 mg/L), kanamicina (25 mg/L) y espectinomicina (50 mg/L) e incubadas por 2 días a 28 °C, 180 rpm. Posteriormente las posibles transformantes fueron analizadas mediante PCR en colonia según lo descrito por Cubero *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Se tomó 1 mL del cultivo y fue centrifugado a 12000 g durante 5 min. La pastilla celular obtenida se lavó con 1 mL de agua Milli-Q estéril y tras centrifugación a 13000 g durante 3 min se resuspendió en 20 µL de EB. El resuspendido se incubó a 94°C durante 5 min y luego en hielo por 5 min. Se centrifugó nuevamente a 12000 g durante 2 min y 1 µL del sobrenadante se utilizó para el análisis de colonias mediante PCR punto final. Una vez verificadas las colonias de *A. tumefaciens* AGL1 se emplearon para la transformación de plantas de acuerdo al procedimiento especificado en cada caso.

1.1.14. Agroinfiltración de *A. thaliana* y *N. benthamiana*.

La cepa de *A. tumefaciens* AGL1 pBGWFS7-ZMUb1p fue utilizada para la agroinfiltración de hojas de *A. thaliana* y *Nicotiana benthamiana*. 50 mL de la

bacteria cultivada en medio LB con carbenicilina 50 mg/L, kanamicina 25 mg/L y espectinomycinina 50 mg/L a una $D.O._{600nm}=0.5-1.0$; fue incubada durante 3-4 h sin agitación con 50 μ M de acetosiringona. Tras este periodo se centrifugó la bacteria a 3000 g por 15 min a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en buffer de infiltración (10 mM MES pH 5.6, 10 mM $MgCl_2$, 200 μ M acetosiringona) ajustando a $D.O._{600nm}=1.0$. En esta suspensión se sumergieron las partes aéreas de *A. thaliana* en vacío por 3-5 min. Para el caso de *N. bethamiana*, el envés de las hojas fue infiltrado con una inyectadora de insulina sin aguja. Tras la infiltración, las plantas se colocaron en cámara de cultivo por 7 días en las condiciones de crecimiento especificadas en el apartado 2.1. y analizadas por microscopia confocal o Western Blot.

1.1.15. Análisis de expresión para GFP.

Tejido fresco foliar colocó en porciones de papa de aproximadamente 3 cm x 3 cm con una incisión central donde se colocó el tejido. Tras ello el bloque de papa con el tejido se congelo en nitrógeno líquido y se realizaron cortes transversales de 30 μ m en un micrótopo (Microm, Thermo Scientific) y montados en un portaobjetos con glicerol al 50%. Los cortes fueron visualizados en un microscopio confocal Leica TCS-SP8/MO-TANDEM o TCS-SP5/MO TANDEM (20, 40 y 60X: HCxPLAPO- blue IMM UV 0.7 NA, Leica, Germany) con un láser Tisaph 200M 2X (resolución 1024 x 1024 pixeles) a una longitud de onda entre 515-580 nm (excitación) y 525-550 nm (emisión de GFP) y 600-680 nm (emisión de autofluorescencia). Las imágenes fueron analizadas en el software ImageJ empleando el plugging LOCI.

1.1.16. Western Blot para verificar la expresión de GFP.

Para la determinación de la proteína de fusión GUS-GFP (aproximadamente 95.2 KDa), 100 mg de tejido foliar fueron congelados en nitrógeno líquido y pulverizados en un homogeneizador de tejidos TissueLyser a 50 Hz durante 2 min. El homogeneizado fue resuspendido en Buffer de Extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, SDS 2%, Glicerol 20%, DTT 200 mM, PMSF 1X). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 15% en el separador y transferidas a una membrana de PVDF toda la noche a 4°C y inmunodetectados con anticuerpos

de ratón primario Anti-GFP (1:2000) y anticuerpo Anti-IgG acoplado a peroxidasa de rábano (1:5000). Como control positivo se utilizó GFP expresada en *C. maxima* a través de agroinfiltración foliar con el vector ZYMV-GFP (Lin et al., 2007).

1.9. Clonación de gRNA.

Para la clonación del gRNA en los vectores para edición de genomas, primero se alinearon oligos con secuencias codificantes para el protoespaciador del gRNA, en un volumen final de 20 μ L, añadiendo 1 μ L de cada oligo a 100 μ M y 2 μ L de Buffer de alineamiento 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 500 mM y EDTA 10 mM). La mezcla de alineamiento se incubó a 94 °C durante 5 min, de 94-84°C a razón de -2.0 °C/s y de 84-25 °C a razón de -0.1 °C/s. El producto de alineamiento se visualizó en un gel de agarosa Nusieve al 5% y se cuantificó empleando un NanoDrop. Esta mezcla se elaboró para obtener los protoespaciadores dirigidos al sitio de unión a sustrato del gen de trehalasa tanto en *A. thaliana* como en *Zea mays*. Posteriormente, 1 μ g de los vectores pBUN4U3SM (para *Z. mays*) y pBUN4U6SM (para *A. thaliana*) fueron digeridos con la enzima Bsal-HF (NEB). De esta digestión se obtuvieron fragmentos 13 y 1.2 Kb purificándose la banda de 13 Kb y ligándose con Rapid DNA Ligation Kit (ThermoFisher Scientific) a una proporción molar de 10:1 (vector:inserto) respecto al gRNA alineado. Las clonas de *E. coli* obtenidas se verificaron mediante PCR punto final específica para el promotor AtU6 o OsU3 con gRNA-R y mediante secuenciación por Sanger. Posteriormente 1 μ g de plásmido fue transformado en células de *A. tumefaciens* AGL1 mediante electroporación. Se seleccionan 5 colonias y se verificaron mediante PCR en colonia para *Agrobacterium* específica para U6/U3F con gRNA-R.

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

13000 g a 4°C y del sobrenadante se tomó 1 µL para la realización de PCR punto final.

1.10. Transformación de plantas.

Para el caso de la transformación de *Arabidopsis thaliana* se empleó el método de inmersión de primordios florales (Clough & Bent, 1998). Para el caso de transformación maíz, se empleó el método de transformación de meristemos apicales descrito por Rivas (2016).

1.11. Selección y análisis de transformantes.

La selección inicial de plantas de *A. thaliana* se realizó tomando 100 µL de semillas F1 y diluyéndolas en 50 mL de agarosa al 0.05%. Las semillas se sembraron en una mezcla estéril de tierra: turba: agrolita (2:2:1) y tras una semana después de la siembra, se realizaron aspersiones semanales durante tres semanas de glufosinato de amonio Finale® a una concentración de 300 µM (Ingrediente activo: amonio (2RS)-2-amino-4-(metilfosfinato) ácido butírico, 13.5%, PM= 198.15 g/mol). Para el caso de maíz, en cada hoja de las plántulas F0 transformadas de un mes de edad, se delimitó una zona circular (5 cm de diámetro aproximadamente) y en esta área se depositó una solución de glufosinato de amonio Finale® al 2%.

1.1.17. Extracción de DNA genómico vegetal.

A las plantas que no presentaron amarillamiento tras la aplicación del herbicida, fue extraído su DNA genómico total 100 mg de tejido foliar fueron congelados en nitrógeno líquido y pulverizados en un homogeneizador de tejidos TissueLyser a 50 Hz durante 2 min. Tras la pulverización las muestras se incubaron en 600 µL de CTAB Buffer (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, CTAB 2%, PVP 4000 1%) a 65°C por 20 min a 300 rpm. El homogenato se mezcló en vórtex con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (12:12:1), se centrifugó y el sobrenadante se mezcló con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó nuevamente y al sobrenadante se le añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol frío, mezclando por inversión e incubando a -20°C durante 30 min. La pastilla obtenida posterior a la centrifugación se lavó dos veces con etanol frío al 70% y se secaron los tubos a 60°C, resuspendiendo el precipitado

con agua Milli-Q estéril con Rnasa A a 20 µg/mL. La integridad del DNA fue verificada en un gel de agarosa al 0.8% y teñido con bromuro de etidio (0.1 µg/mL); mientras que la concentración fue determinada con un Nanodrop (Thermo Scientific, WA).

1.1.18. PCR punto final.

Las plantas se analizaron por PCR punto final para detectar un fragmento de 424 pb correspondiente al gen codificante para Cas9 (Cas9-F: 5'-CGGCCTCGATATTGGGA CTA ACTCT-3', zCas9-R: 5'-CTTATCTGTGG AGTCCACGAGCTTC-3'), como se indica en el apartado 3.3. Tres microlitros de cada producto de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1%.

1.1.19. Selección de plantas mediante qPCR.

Con el fin de identificar las plantas transformadas se analizaron mediante qPCR con mezclas de reacción conteniendo los componentes indicados en la Tabla VI.

Tabla VI: Mezcla de reacción para la detección de fragmento BAR mediante qPCR

Componente	Volumen (µL)
ddH ₂ O estéril	13.50
Buffer 10X sin Mg ⁺²	2.00
Mg ⁺² (50 mM)	0.60
dNTPs (10 mM)	0.50
Primer F (10 µM)	0.60
Primer R (10 µM)	0.60
Sonda (5 µM)	0.72
ROX High (50X)	0.40
Taq Platinum (5 U/ µL)	0.08
DNA (100 ng/µL)	1.00
<i>Volumen final (µL)</i>	<i>20.0</i>

Cada muestra a analizar se realizó por duplicado para cada gen (HMG como endógeno y BAR como gen blanco) y se sometieron las muestras al siguiente

programa de temperaturas: denaturalización inicial a 94°C durante 5 min y 35 ciclos compuestos de desnaturalización a 94°C durante 30s y 60°C durante 1 min en un equipo Step One Plus (Applied Biosystems®), recolectando datos de variación de fluorescencia al final de cada uno de los ciclos. Aquellas muestras cuyos valores de C_{tHMG} y C_{tBAR} estuvieron entre 26-28, presetando variaciones entre duplicados menores a 0.5 Ct; se consideraron como positivas al transgén. Las secuencias de sondas y oligos utilizados, se muestran en la Tabla II.

Tabla II: Oligos y sondas utilizados para la qPCR de detección del fragmento de BAR

	SECUENCIA
HMG-AT-F	5'-CAGAAAGGTGGGAAAGAGGA-3'
HMG-AT-R	5'-TTTGGTTTGTGGGTCCTT-3'
HMG-AT-PROBE	5'-[HEX]AGGCTTCTCAGCCGGTGCCT[BHQ1]-3'
HMG-ZM-F	5'-TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3'
HMG-ZM-R	5'-GCTACATAGGGAGCCTTGTCTCT
HMG-ZM-PROBE	5'-[HEX]CAATCCACACAAACGCACGCGTA[BQH1]-3'
BAR-F	5'-GTGCTTGTCTCGATGTAG-3'
BAR-R	5'-GAGGGGATCTACCATGAG-3'
BAR-PROBE	5'-[6FAM]ACATCCGCCGTGCCACCGAG[BHQ1]-3'

1.1.20. **Determinación del número de copias a través de droplet digital PCR. (ddPCR).**

Una vez seleccionadas las plantas positivas al T-DNA codificante para Cas9, se determinó el número de copias presentes en dichas plantas, a fin de conocer y mantener aquellas con un evento de inserción de T-DNA. 1 µg de DNA genómico de plantas transformadas F1 de *A. thaliana* y F0 *Z. mays*, fue digerido con la enzima de restricción EcoRI por 1h a 37°C. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 20 µl y se utilizaron los mismos oligos y sondas que en el apartado 8.4., a una concentración final de 900 mM y 250 mM de primers y sondas respectivamente; y una concentración de 5 ng de DNA para muestras de *A. thaliana* y 100 ng de DNA para muestras de *Z. mays*. En cada reacción se procesaban aproximadamente 20,000 microgotas (Droplet generator QX-200) y se llevaban a una reacción de PCR y posteriormente a su análisis en el Droplet-reader QX200. La mezcla de reacción y condiciones de amplificación se realizó según especificaciones del

proveedor (PrimePCR™ ddPCR™ Copy Number Variation (CNV) assay – BioRad); utilizando como referencia que existen en el genoma 2 copias de HMG (una en cada alelo) a fin de identificar aquellas plantas hemíctigas con una sola inserción de T-DNA.

1.12. Determinación de la estabilidad y segregación de la transformación en maíz.

A fin de caracterizar el método de transformación reportado por Rivas (2016) para la transformación de meristemos de coleoptilos de maíz se diseñaron diferentes experimentos a fin de corroborar que dicho método de transformación fuese eficiente y estable en la segregación del transgén.

1.1.21. Determinación de la eficiencia de transformación.

Para ello se empleó la cepa de *A. tumefaciens* AGL1 pBUN4U3SM y se transformaron aproximadamente 100 coleoptilos de maíz.

1.1.22. Determinación de la estabilidad de la transformación.

En este caso se obtuvo el gen codificante para el factor de transcripción *knotted1* (KN1) de *Zea mays*, del vector pBINrolC-KN1-GFP y se clonó dicho gen en PCR8/GW/TOPO. Posteriormente se realizó la reacción de recombinación con clonasa LR en el vector destino pB7FWG2 generándose así el vector pB7FWG2-KN1. Este vector fue clonado en *A. tumefaciens* AGL1 y se verificó la eficiencia de este vector, mediante transformación de cotiledones de calabaza según lo reportado por Ramírez-Ortega *et al.* (2015). Posteriormente, la cepa se utilizó en la transformación de maíz, con la finalidad de apreciar fenotípicamente cuales hojas estuviesen modificadas y si dicho fenotipo se mantiene a lo largo de toda la fenología de la planta.

1.1.23. Tinción de GUS.

El ensayo histoquímico de GUS fue desarrollado como lo describen Weigel & Glazebrook (2002) con algunas modificaciones. Tras 5 días posteriores a la transformación de los coleoptilos, éstos fueron cortados transversalmente en fragmentos de 1 cm cerca del meristemo apical y se les realizó un corte longitudinal en la misma zona. Tras ello, fueron embebidos en solución de tinción para GUS (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico 1mM, buffer de fosfatos 100 mM

pH 7.0, Tritón X-100 0.1%, EDTA 10 mM, ferrocianato de potasio 0.5 mM, ferrocianuro de potasio 0.5 Mm, ácido ascórbico 100 Mm) e infiltrado por vacío durante 1:30 h. El tejido se incubó durante 24 h y fue desteñado con etanol: ácido acético y luego con metanol: acetona en relación 3:1 en ambos casos. Los coleoptilos se embebieron en glicerol al 50% y observadas en un microscopio de disección triocular Nikon SMZ745T8.

1.1.24. Estudio de segregación.

Se transformaron y analizaron plantas de maíz con el vector pBUN411 (que expresaría resistencia a herbicida y la proteína Cas9), a fin de establecer una línea que expresase este transgén. Posteriormente en estado de madurez reproductiva se cruzaron con plantas WT y se recolectaron las semillas tras 45 días después de la polinización. Las semillas fueron secadas a 37 °C durante 3-5 días y posteriormente germinadas en papel, sembradas y tras 3 semanas después de la siembra se asperjaron con herbicida al 2%. Tras 15 días de aplicación del herbicida, las plantas fueron analizadas a fin de observar la posible resistencia a herbicida. Los valores observados se compararon con una segregación tipo mendeliana a partir de una prueba estadística de Chi-cuadrado.

1.13. Determinación de cambios genotípicos.

Las líneas transformantes comprobadas por PCR, qPCR y Western Blot fueron utilizadas para la determinación de cambios genotípicos. Para ello, se amplificó mediante PCR punto final el fragmento correspondiente a una región del exón 1 del gen de trehalasa de *A. thaliana* y dicho amplicón fue clonado en el vector PCR8/GW/TOPO. Se analizaron 5 clonas por planta a través de secuenciación por Sanger. Las secuencias obtenidas tras la secuenciación, fueron alineadas respecto a la secuencia silvestre del gen, para determinar así, potenciales sitios de modificación en el gen.

1.14. Análisis fenotípico de mutantes de *A. thaliana*.

Las mutantes de inserción de T-DNA (líneas SALK); así como las plantas posiblemente editadas, fueron comparadas en los siguientes parámetros: tamaño de la roseta, tamaño y forma de hojas caulinares y de roseta, en el gen de interés y

con plantas silvestres. Todas las plantas en este análisis presentaron el mismo estadio de desarrollo fenológico.

1.15. Cuantificación relativa de transcritos de ATTRE1

1.1.25. Extracción de RNA.

El RNA total fue obtenido de hojas de roseta de *A. thaliana* mutantes de T-DNA (SALK_147073 y SALK_151791), en plantas F1 potencialmente editadas y silvestres todas ellas de la misma edad fenológica (meristemo floral visible en el centro de la roseta sin elongación del tallo). La extracción se realizó utilizando el kit Direct-Zol RNA miniprep (Zymo Research, Irvine CA) con digestión de DNA en columna. Las muestras se cuantificaron en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific); los productos fueron visualizados en gel para RNA al 1.4%.

1.1.26. RT-qPCR para cuantificación relativa de transcritos para el gen *Attre1*.

Las concentraciones de RNA fueron normalizadas a 30 ng/ μ L y la mezcla de reacción fue realizada utilizando Kappa Sybr-FAst qRT-PCR, de acuerdo a las especificaciones del fabricante en un volumen de 10 μ L, empleando un equipo para tiempo real One Step Plus (Applied Biosystem, Thermo Scientific), utilizando como referencia el gen de poliubiquitina 10 (UBQ10, número de acceso: At4g05320.2; UBQ10-F: 5'-GATCTTTGCCGGAAAACAATTGGAGGATGGT-3', UBQ10-R: 5'-CGACTTGTCATTA GAAAGAAAGAGATAAC AGG-3') para la cuantificación del gen *tre1* de *A. thaliana* (*TRE1*, número de acceso: at4g24040: qPCR-ATTRE-F: 5'-AGGGCAATGGCTGGATTACTGG-3', qPCR-ATTRE-R: 5'-AGCCTTCCATGTCTCAGATTCCTC-3'). La cuantificación se realizó por el método de $\Delta\Delta$ Ct, referido como expresión relativa y utilizando como referencia la cuantificación obtenida en plantas silvestres. La mezcla de reacción empleada en cada caso fue la referida en la Tabla III; mientras que el programa de temperaturas empleado se muestra en la Tabla IV.

Tabla III: Mezcla de reacción para RT-qPCR.

Componente	Volumen (uL)
H ₂ O libre de nucleasas	3.2
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	5.0
Primer Directo (10 uM)	0.2
Primer Reverso (10 uM)	0.2
ROX High	0.2
RNA (25 ng/μL)	1.0
KAPA RT Mix (50X)	0.2
Volumen final	10.0

Tabla IV: Programa de temperaturas para RT-qPCR

Etapa	Temperatura (°C)	Duración (min:s)	Ciclos
Síntesis de cDNA	42.0	05:00	-
Inactivación de la RT	95.0	05:00	-
Desnaturalización	95.0	00:05	40
Alineamiento/ Extensión	60.0	00:30	
Disociación	95.0	00:15	+1°C/s
	60.0	01:00	
	95.0	00:15	

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.16. Análisis *in silico* para determinar el sitio de edición para el gen *tre1*.

Se realizó un análisis de secuencias aminoacídicas del gen codificante para la enzima trehalasa, a fin de identificar regiones de interés que fuesen blancos potenciales de la edición, a través de la caracterización de la estructura, sitios de unión a sustrato, sitios activos y sitios estructurales conservados (Tabla V).

Tabla V. Regiones funcionales de relevancia para la funcionalidad de la enzima trehalasa.

Región	Secuencia aminoacídica
Sitios de unión a sustrato	XRFX
	XWDSX
	PNG
	RSQP
	PRPES
	SGXDF
	GEY
Residuos catalíticos	SGXDF
	XEK
Firmas conservadas	PGXRFEXYXWDSXW
	QWDXPX[GAV]W[PAS]P

De estas secuencias, se decidió analizar a detalle la firma conservada PGXRFEXYXWDSXW, debido a que en ella se encuentran un total de 4 residuos de unión a sustrato. Se realizó un análisis bioinformático y filogenético de esta región a fin de evaluar el grado de conservación de este dominio entre organismos del reino Viridiplantae. Para ello se obtuvieron las secuencias aminoacídicas que se enlistan en la Tabla VI, y se construyeron filogenias derivadas de dichas secuencias (Fig. 10).

Tabla VI: Secuencias empleadas para la construcción de árboles filogenéticos de la enzima trehalasa

Especie	Género	Número de acceso
<i>Amborella trichopoda</i>	<i>Amborellales</i>	XP_006857861
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Brassicales</i>	NP_194135
<i>Asparagus officinalis</i>	<i>Asparagales</i>	ONK56511
<i>Chlorella variabilis</i>	<i>Chlorellales</i>	XP_005846758
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Sapindales</i>	XP_006471116
<i>Coffea canephora</i>	<i>Gentianales</i>	CDP12200
<i>Cucumis melo</i>	<i>Cucurbitales</i>	XP_008437392
<i>Daucus carota</i>	<i>Apiales</i>	XP_017242937
<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Myrtales</i>	XP_010055990
<i>Fragaria vesca</i>	<i>Rosales</i>	XP_004300488
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Malvales</i>	XP_016741805
<i>Manihot esculenta</i>	<i>Malpighiales</i>	OAY59719
<i>Musa acuminata</i>	<i>Zingiberales</i>	XP_009398082
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Fabales</i>	XP_007160201
<i>Phoenix dactylifera</i>	<i>Arecales</i>	XP_008799557
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Funariales</i>	XP_001769611
<i>Picea sitchensis</i>	<i>Pinales</i>	ABR17991
<i>Selaginella moellendorffii</i>	<i>Selaginellales</i>	XP_002978773
<i>Sesamun indicum</i>	<i>Lamiales</i>	XP_011081450
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Solanales</i>	XP_004245478
<i>Spinacia oleracea</i>	<i>Caryophyllales</i>	KNA23336
<i>Vitis vinífera</i>	<i>Vitales</i>	XP_002263698
<i>Volvox carterii</i>	<i>Volvocales</i>	XP_002957229
<i>Zea mays</i>	<i>Poales</i>	XP_008673385
<i>Zostera marina</i>	<i>Alismatales</i>	KMZ72838.1

Adicionalmente se diseñaron gráficos de representación de aminoácidos de este sitio, en el cual se obtuvo una característica notable de interés en la serina cercana al extremo carboxilo del dominio; siendo esta serina sustituida por treonina en la planta resistente a sequía *Selaginella lepidophylla*. Por esto, se decidió elegir esta región como el blanco para edición del gRNA para *A. thaliana* y para *Z. mays* (Fig.11).

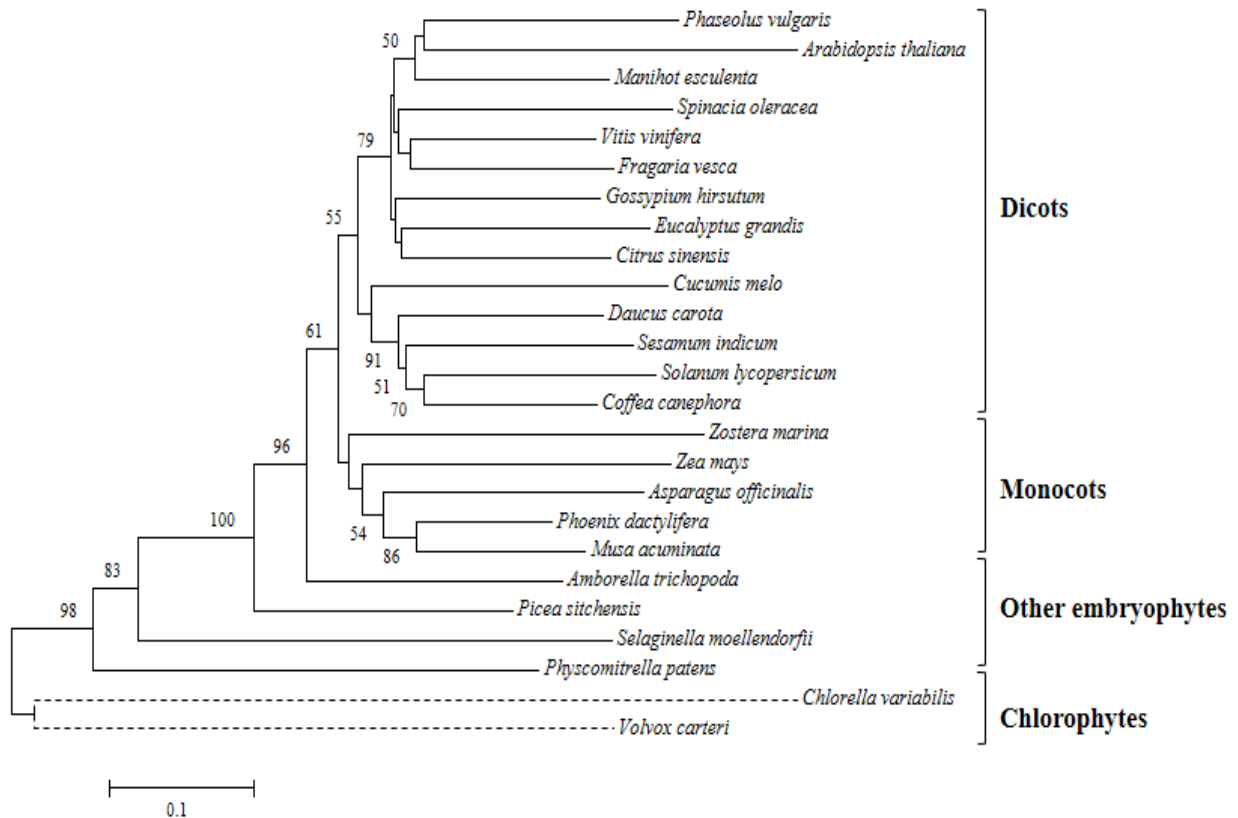


Figura 10: Filogenia del dominio de unión a sustrato del gen codificante para la enzima trehalasa en plantas.

El análisis filogenético fue realizado por el método del vecino más cercano. El árbol óptimo cuya suma de la longitud de las ramas =5.46274126 es mostrado. El porcentaje de réplicas de dicho árbol en los que los taxos asociados se agrupan en más del 50% de los casos (1000 réplicas) se muestran en los nodos del árbol. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método corregido de Poisson. El análisis se realizó con base en una secuencia de 25 aminoácidos correspondientes al dominio de unión a sustrato



Figura 11: Representación gráfica de la secuencia consenso para el dominio de unión a sustrato de la enzima trehalasa en plantas (<http://weblogo.berkeley.edu/>)

1.17. Determinación de la secuencia parcial del gen TRE1 en *Z. mays* var. VT401.

Antes de establecer la secuencia nucleotídica del gRNA fue necesario secuenciar la región correspondiente al dominio estructural del gen de la trehalasa que contiene el sitio de unión a sustrato. El gen de la trehalasa contiene 11 exones y este sitio de unión se encuentra al final del exón I, por lo cual se amplificó la región 3' del exón I, el intrón II y el extremo 5' del exón II (Fig. 12), a fin de conocer la secuencia nucleotídica en una variedad comercial de maíz mexicana, denominada VT401 y en una variedad ancestral de maíz (*Zea* spp.). Tras la amplificación del fragmento (Fig. 13), se clonó el producto de PCR en el plásmido PCR8/GW/TOPO y las clonas fueron analizadas por restricción, PCR punto final y posteriormente secuenciadas por el método de Sanger.

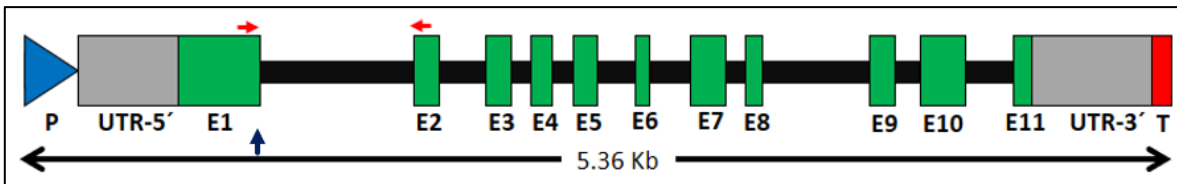


Figura 12. Estructura del gen de trehalasa en monocotiledóneas. Las flechas rojas indican la posición donde se diseñaron oligos para amplificación por PCR punto final y la flecha en color azul indica el sitio de interés para la realización de la edición genética.

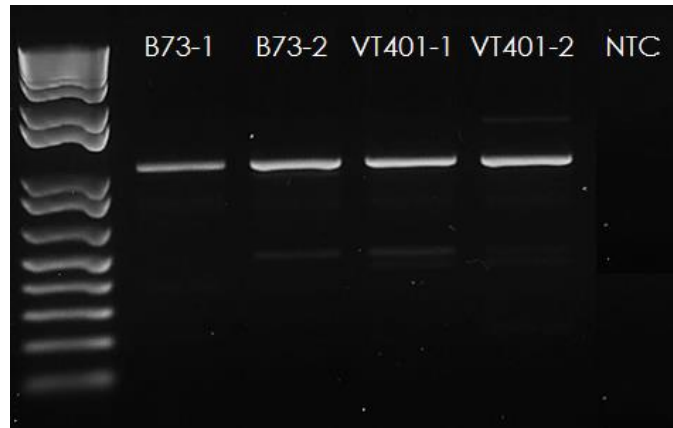


Figura 13. PCR punto final en *Z. mays* var. VT401 y *Zea* spp. para amplificación de un fragmento codificante para el gen *tre1*.

Tras la secuenciación, se obtuvo que la secuencia del gen TRE1 en *Zea mays* var. VT401 y *Zea* spp. presentan alto grado de homología (98% en *Zea* spp. y 99% en *Zea mays* var. VT401) en el sitio de unión a sustrato con la secuencia en maíz anotada (*Zea mays* var. B73).. Específicamente en el exón 1, la homología de secuencias es del 100% entre las secuencias, por lo cual a la hora de ejecutar el diseño de los gRNAs se consideró el mismo gRNA para la edición de dicho gen en todas las especies de maíz. Las secuencias obtenidas de los cromatogramas se muestran a continuación:

> VT401_ZMTREH_M13-F: 5' – 3'

```

AGCACAATAGTCTTTGCCGTGTCGTACATTTTGCTCACCAGCAATCCTC
TGCATTGAGCCATACCGCGATATAAGAAAGAAAAACGACAAGAATGGGTGTTA
GTTTCGTTCCCGATGTCCATTTGGGTGAGTGCAGTAGCTTATACAGTAGGTAC
AAAAAAAAATTAACAGACATATAACAGATCATTGGGTGAGTGCAGTAGCTTATA
CAGTAGGTACAAAAAAAAATTAACAGCCATATAACAGATCAGTAGGAACTAG
GACAGATAAAAGCAAGGACTCTTTTTCAGAAAATAATTCCAATGCCAAGGCC
ACAGCCCACAGCACGGCGGCCAGCACCCATAGAAAAGTCAGGCGTACACAG
TCTTTAACTCCTGTATGGAGATGACTAAAGGCGCACGACGAACACAAGAGACA

```


GCGATGACGAAGCATAACGACGAACAGTACAGACAAGGTGATGACAAAGCGTA
CAATGAACGCAGGAAGACACAAATGAAAATCGAGACATTGCCTTACATGTGG
GACCGCAGCAGCGACAACGCGGAGAAAGAACACGTAATATCGAACTCCAT
GTCAGGACCGACAGAGACCTGGATTCATCAATTTGCCCTCCCAAACCCCAA
TGAAAAAATAACCACGGATTATTGTACGTGATCCGGTGGGTGATCTAGA
ACTACCATTTCGTCCAAAACCTTAAATATAGTAGTAAGGAGCAAAGCGGCGATGAAA
CCAAGCGAGCGGGGGCGGATCAGGCAGGAGAAGGGGTACCTGATGACCCAA
TAGGAGTCCCAGTAGTATACCTCCCGGAACCTGGATCCCGGCACGACGGCC
CTGCCGGGCAGGGCATCAGCGTGTGCCGGTCCGGCCGCGCCGCGACGTGCG
GGCGCCACCCGCGCGCCAGGCGCTTCCACAGCGCGTGCACCTCCAGCGC
CCACGCCCGCGCCTCGGGGCTGTGGACGTGGGGCAGGAACCCGCGCGGCT
CGGGCTCGAAATCCGGTGGGACGTCCGCCACGAGATCGGACCCGGGGTCCC
CGAAGTAGCGGGACAGGAAGT

>Zea spp_ZMTREH_M13-F: 5' – 3'

AGCACAAATAGTCTTTGCCGTGTCGTACATTTTGCTCACCAGCAATCCTCTGCATTGAGCCATAC
CGCGATATAAGAAAGAAAAACGACAAGAATGGGTGTTAGTTTCGTTCCCGATGTCCATTTGGGT
CAGTGCGAGTAGCTATATACAGTAGGTACAAAAAATTAACAGACATATAACAGATCATTGGG
TCAGTGCGAGTAGCTTATACAGTAGGTAACAAAAAATTAACAGCCATATAACAGATCAGTAG
GAACTAGGACAGATAAAAGCAAGGACTCTTTTTTCAGAAAATAATTCCAATGCCAAGGCCACA
GCCCACAGCACGGCGGCCAGCACCCATAGAAAAGTCAGGGCGTACACAGTCACTCCTGTATG
GAGATGACAAAAGGCGCACGACGAACACAAGAGACAGCGATGACGAAGCATAACGACGAACAG
AACAGACTAGGTGATGACATAGCGTACAATGAACGCAGGAAGACACAAATGAAAATCGAGACA
TTGGCCTTACATGTGGGACCGCAGCAGGGACAACGCGGAGGGGAACACGTAATATCGAA
CTCCATGTCAGGACGACAGGACCTGGATTCATCAATTTGCCCTCCCAAACCCCAATGGAAAA
AATTAACCACGGATTATTGTACGTGATCCGGTGGGTGATCTAGA
ACTACCATTTCGTCCAAAAC
TTAAATATAGTAGTAAGGAGCAAAGCGGCCGATGAAACCAAGCGAGCGGGGGCGGATCAGGC
AGGAGAAGGGGTACCTGATGACCCAATAGGAGTCCCAGTAGTATACCTCCCGGAACCTGGAT
CCCGGCACGACGGCCCTGCCGGGCAGCGGCATCAGCGTGTGCCGGCTCCGGCCGCGCCGCG
GACGTGCGGGCGCCACCCGCGCGCCAGGCGCTTCCACAGCGCGTGCACCTCCAGCGCCAC
GCCCAGCGCCTCGGGGCTGTGGACGTGGGGCAGGAACCCGCGCGGCTCGGGCTCGAAATCC
GGTGGGACGTCCGCCACGAGATCGGACCCGGGGTCCCCGAAGTAGCGGGACAGGAAGT

1.18. Diseño de gRNA.

Una vez elegido el dominio de unión a sustrato como blanco para el diseño del gRNA, con la ayuda del software en línea DESKGEN, se procedió a identificar el mejor gRNA en *A. thaliana* y *Zea mays*. Los resultados de este análisis presentan a continuación (Fig. 14 y Fig. 15).

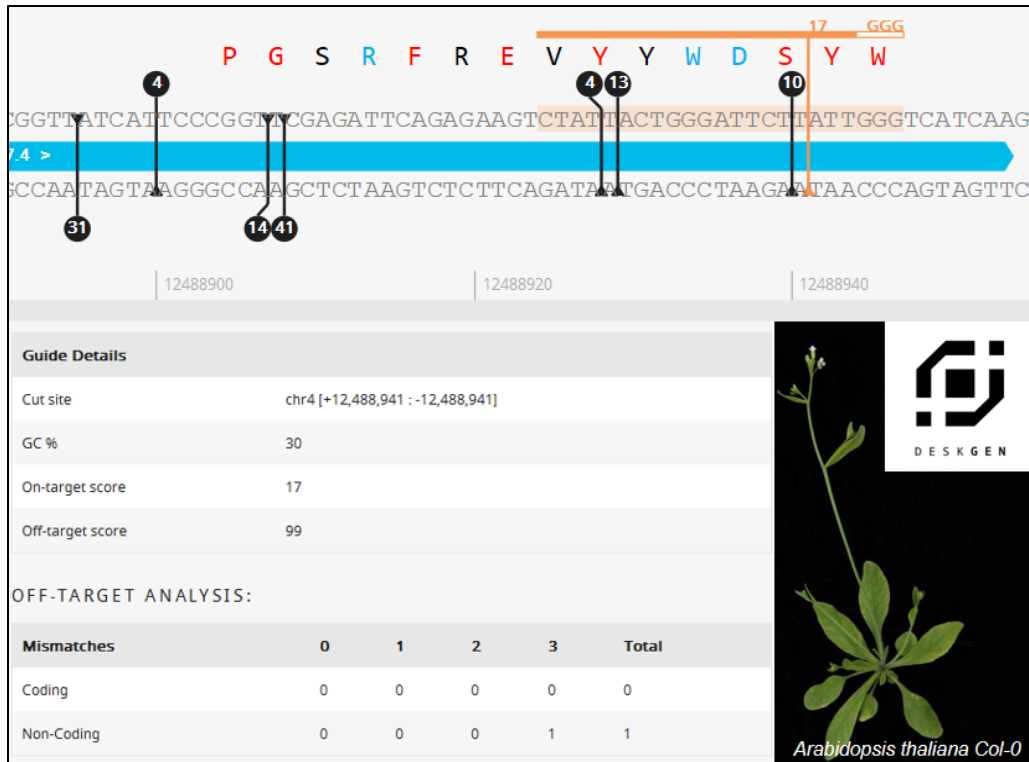


Figura 14. Diseño de gRNA para edición del gen de trehalasa en *A. thaliana*.

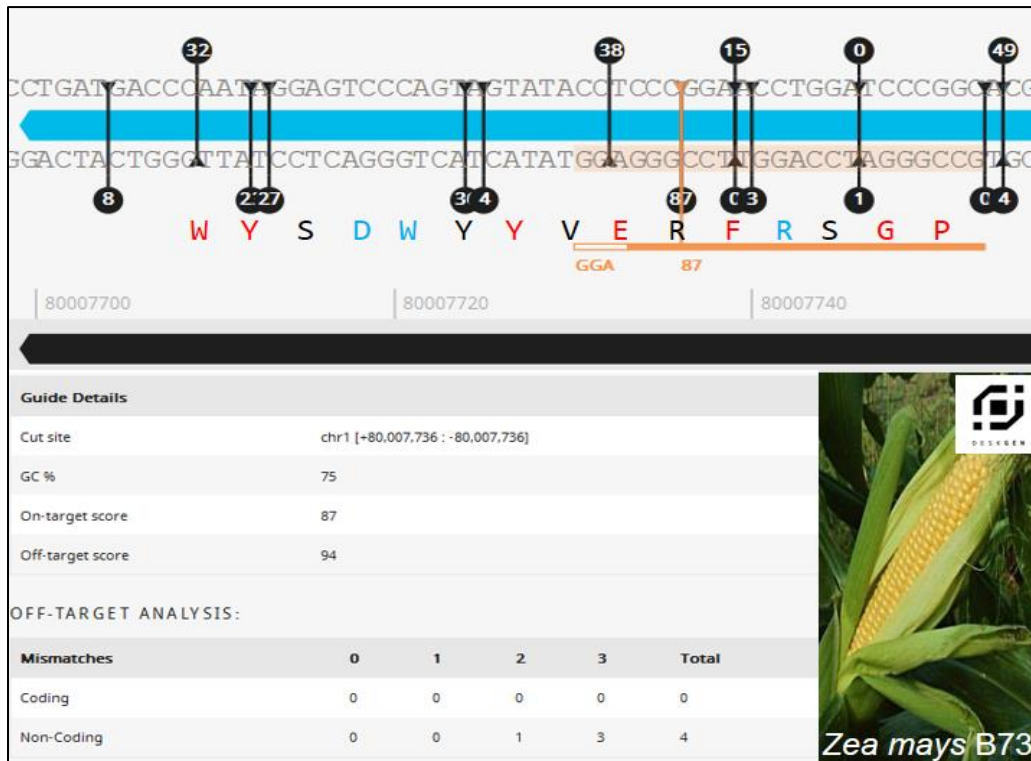


Figura 15. Diseño de gRNA para edición del gen de trehalasa en *Z. mays*.

1.19. Construcción de vectores para edición de genomas.

Los vectores pBUN411, pBUN501 y pBUN6111 poseen resistencia a kanamicina y espectinomicina. La estrategia de clonación del gRNA empleando la enzima BsaI remueve un cassette de resistencia a espectinomicina, por lo cual, resultó necesaria la modificación de los vectores añadiendo un cassette adicional de resistencia a espectinomicina, fuera del T-DNA. El razonamiento de la adición de este cassette fue para poder emplear cepas hipervirulentas de *A. tumefaciens* AGL1, quien de forma natural posee resistencia a kanamicina, por lo cual este marcador de selección no sería de utilidad para el mantenimiento del vector binario en la cepa bacteriana.

Mediante una estrategia de ligación convencional de un amplicón de PCR8/GW/TOPO quien posee resistencia a espectinomicina, a estos plásmidos se les incorporó la resistencia a espectinomicina en un sitio de corte AclI usando oligos digeribles con la enzima ClaI. ClaI y AclI tienen extremos compatibles por lo que la ligación de los vectores linealizados con el amplicón digerido, fue posible. En la

Figura 16, se muestran los resultados de PCR en colonia obtenidos de clonas recombinantes de cada uno de los plásmidos modificados. Como puede observarse fue posible obtener clonas de todos los plásmidos que portasen el cassette de resistencia a espectinomicina.

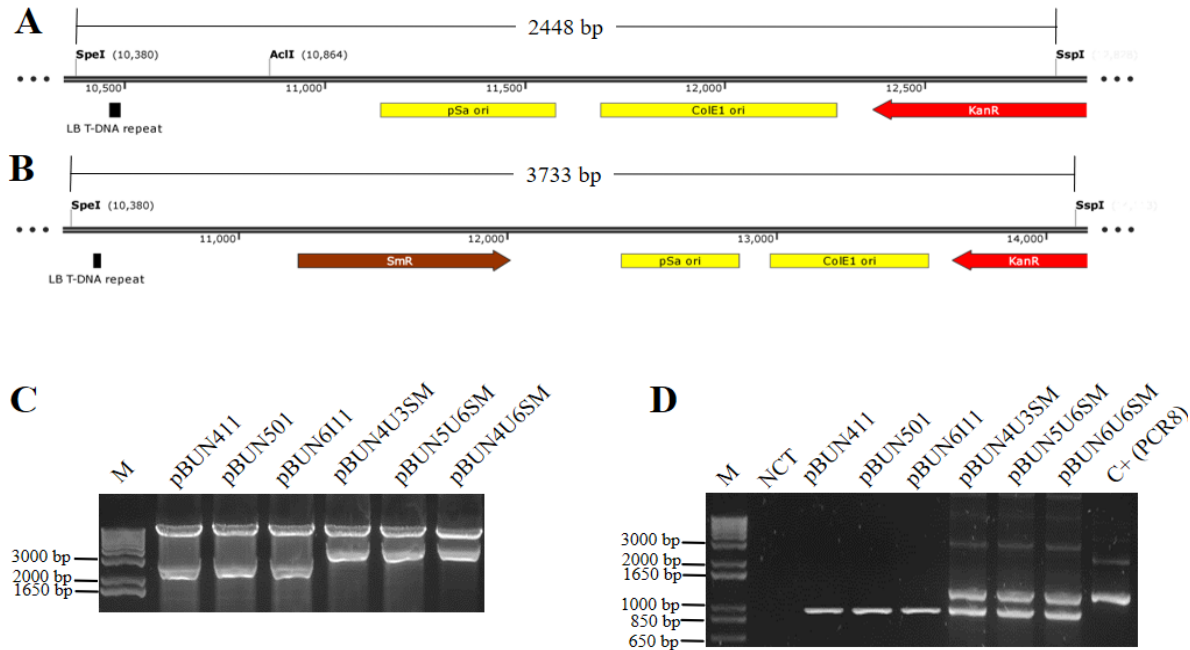


Figura 16. Adición de cassette de resistencia a espectinomicina. Patrón de restricción en codigestión SpeI/SspI en clona sin inserción (A) o con inserción (B) del cassette de resistencia a espectinomicina. C) Gel de agarosa al 1% mostrando la diferencia en los tamaños obtenidos en codigestión SpeI/SspI en las clonas obtenidas D) comprobación de la inserción del cassette mediante PCR punto final.

Tras la adición de los cassettes para espectinomicina, fuera del T-DNA, se realizó un intercambio de los cassettes de expresión para los gRNA debido a que los vectores pBUN501 y pBUN6111 poseen promotores de especies dicotiledóneas (AtU6p) y el plásmido pBUN411 poseía un promotor para especies monocotiledóneas (OsU3p). Mediante esta estrategia obtuvieron plásmidos con los vectores intercambiados, de forma tal que se tendría un grupo de plásmidos con Cas9 nativa, Cas9 mutada en uno de sus dominios de nucleasa y Cas9 inactiva fusionada a un factor de inhibición de la transcripción (KRAB) con promotores para

especies mono y dicotiledóneas. Para corroborar este intercambio realizado con la enzima HindIII y ligación con ligasa T7, se analizaron las transformantes mediante la digestión doble NcoI/BsaI, esta digestión nos permite diferenciar un fragmento 1426 bp (U3) vs 1326 bp (U6) para así comprobar el correcto intercambio entre dichos promotores (Fig. 17).

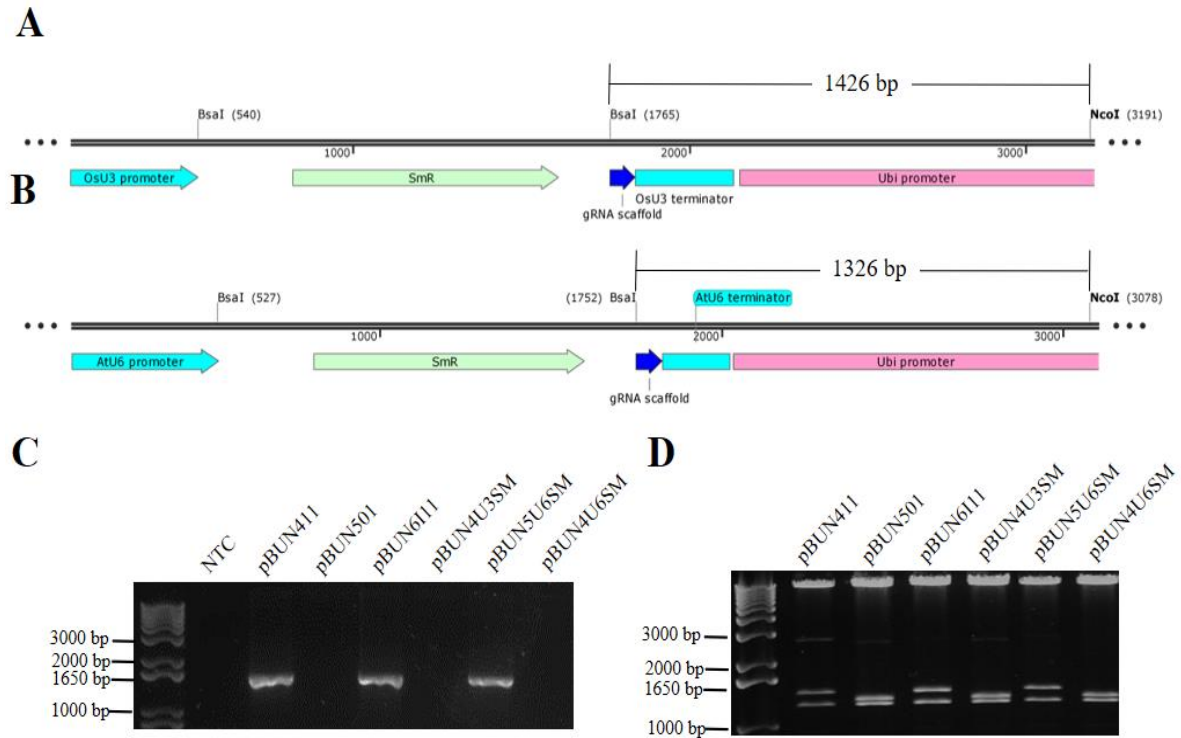


Figura 17. Intercambio de cassettes para expresión de gRNAs en vectores de expresión para plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Patrón de restricción en codigestión BsaI/NcoI en clona con el cassette de expresión de gRNA para monocotiledóneas (A) o dicotiledóneas (B). C) Comprobación de la presencia del cassette de expresión de gRNAs para monocotiledóneas (U3) mediante PCR punto final en gel de agarosa al 1%. Gel de agarosa al 1% mostrando la diferencia en los tamaños obtenidos en codigestión BsaI/Spel en las clonas obtenidas.

A fin de resumir los resultados y características de los vectores obtenidos en este apartado, se presenta la tabla VII.

Tabla VII. Lista de vectores para edición de genomas obtenidos en este estudio y compatibles con la cepa hipervirulenta de *A. tumefaciens* AGL1.

Nombre del plásmido	Marcador de selección	Promotor para gRNA	Variante de Cas9
pBUN4U3SM	Espectinomicina y Kanamicina	OsU3p	zCas9 (Cas9 nativa)
pBUN4U6SM		AtU6p	
pBUN5U3SM		OsU3p	nCas9 (Cas9 mutada, corta una sola hebra del DNA diana)
pBUN5U6SM		AtU6p	
pBUN6U3SM		OsU3p	dCas9-KRAB (Cas9 sin actividad nucleasa y fusionada al represor transcripcional Krüppel Associated Box)
pBUN6U6SM		AtU6p	

1.20. Verificación de la actividad del promotor ZmUbi1p en dicotiledóneas

Una vez obtenidos los vectores para poder llevar a cabo la edición de genes con el sistema CRISPR/Cas9, resultaba necesario determinar la efectividad del promotor que poseen estos plásmidos para Cas9, en especies dicotiledóneas, debido a que dicho promotor proviene de una especie monocotiledónea (*Zea mays*), y debido a que la homología con otros promotores de especies dicotiledóneas resulto muy baja al analizarlos mediante alineamiento simple de secuencias.

Para verificar entonces la actividad de este promotor en especies de plantas dicotiledóneas, se decidió extraer este promotor de los vectores mediante PCR y recombinado en el vector PCR8. Posteriormente, tras revisar la orientación del inserto, se recombinó empleando LR clonasa en el vector binario destino pBGWFS7 que es útil para el análisis de promotores. Los vectores desarrollados en este apartado, se muestran en la Fig. 18.

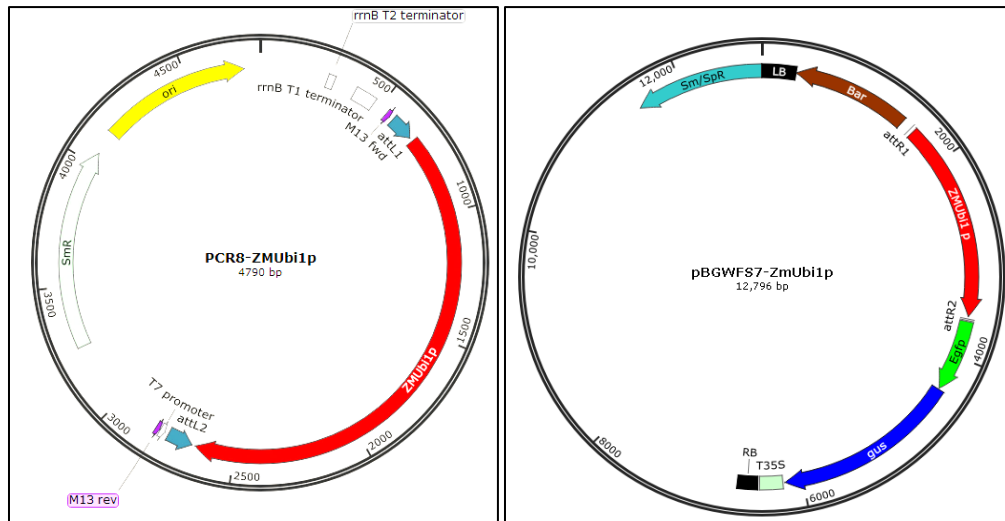


Figura 18. Vectores para la evaluación del promotor ZMubi1p en plantas dicotiledóneas.

El vector pBGWFS7-ZMubi1p fue transformado en *A. tumefaciens* AGL1 y utilizado para la infiltración de hojas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*. Las imágenes de microscopia confocal tras 7 días postinoculación se presentan en la Fig 19; mientras que el Western Blot contra GFP se presenta en la Fig. 20.

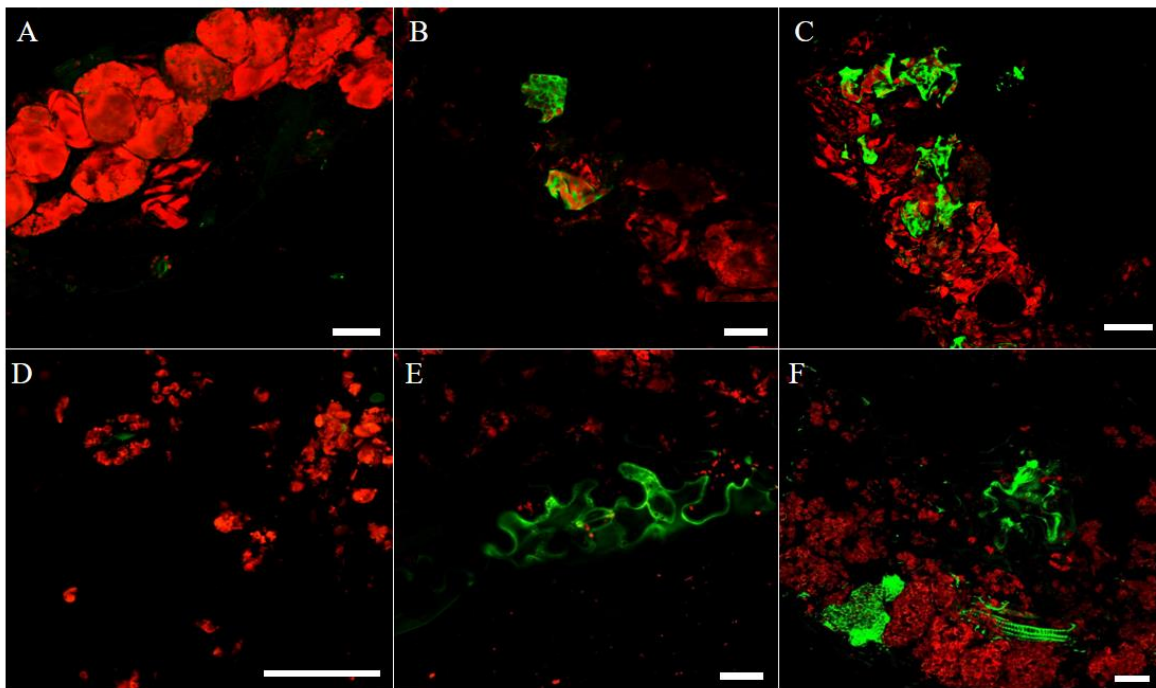


Figura 19. Análisis de expresión del gen que codifica para GFP, codificada en el vector pBGWFS7-ZMubip1 en *A. thaliana* y *N. benthamiana* mediante

microscopía confocal. A) *A. thaliana silvestre* B-C) *A. thaliana* expresando GFP. D) *N. benthamiana silvestre*. E-F) *N. benthamiana* expresando GFP. Las barras blancas son de 20 μm

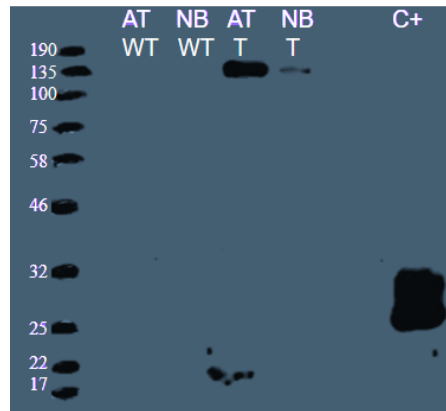


Figura 20. Western Blot para la detección de la proteína de fusión GFP-GUS expresada bajo el promotor ZmUbp1. AT: *A. thaliana*, NB: *N. benthamiana*. C+: Control positivo de GFP expresado en el vector ZYMV (Lin et al., 2007).

Ya elegidos los gRNA para ambos organismos, se procedió al diseño de los oligos que permitiría la fácil clonación del gRNA en los vectores pBUN4U6SM (para *A. thaliana*) y pBUN4U3SM (para *Zea mays*). Cada uno de estos oligos se alinean con un oligo complementario que origina extremos cohesivos y complementarios a los vectores tras digestión con BsaI. Tras el alineamiento y ligación en los vectores de edición de genomas, fue necesaria la verificación de las clonas resultantes. Para ello, se analizaron mediante una PCR punto final específica para cada gRNA. Esta PCR utiliza como cebadores ubicados en la región promotora del gRNA (U3 o U6) como oligo directo y el oligo reverso es el utilizado para complementar la secuencia del gRNA (Fig. 22).

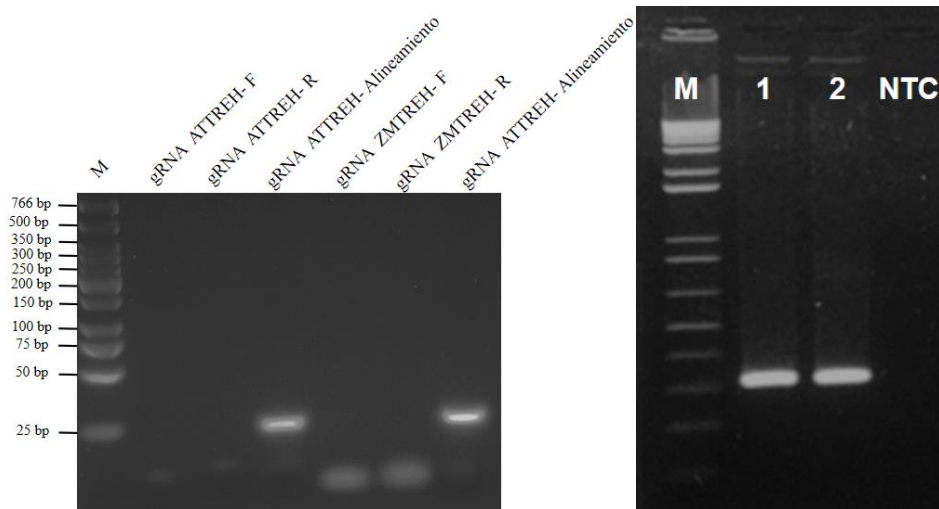


Figura 21. Clonación de gRNA a vectores de expresión del sistema de edición de genomas. A) Alineamiento de los oligos para la formación de dímero cohesivo de codificante de gRNA. B) PCR U6p-F/U3pF con gRNA-R para determinar la correcta clonación en vector binario.

1.21. Transformación y selección de transformantes

1.1.27. Caracterización de transformación in planta de *Z. mays* var. VT401.

Para el caso de *Z. mays* se implementó la metodología referida por Rivas (2016). Esta técnica de transformación de coleóptilos supone una ventaja respecto a las técnicas de transformación convencional mediante callos embriogénicos en cultivo in vitro, pero a la fecha de realización de este trabajo, aun se necesitaba corroborar la estabilidad de esta transformación. El protocolo general de corte de los coleóptilos y posterior inoculación de *A. tumefaciens* AGL1 se muestra esquemáticamente (Fig. 22). Tras un mes de la transformación, todas las plantas fueron analizadas por aplicación tópica de herbicida, seleccionándose así aquellas resistentes a glufosinato, caracterizadas por no mostrar amarillamiento o necrosis del tejido foliar en el área de aplicación (Fig. 23).



Figura 22. Transformación de coleoptilos de maíz en *Z. mays*.



Figura 23. Aplicación tónica de herbicida para selección de transformantes.

Una vez seleccionadas aquellas plantas con resistencia a herbicida, se procedió a la extracción de DNA genómico total de tejido foliar y a la identificación del transgén codificante para Cas9 mediante PCR punto final. (Fig. 24) A partir de este análisis se obtuvieron un total de 12 líneas transformantes de un total de 200 coleoptilos transformados lo cual supone un 6% de eficiencia de transformación mediante esta técnica (Tabla VIII).

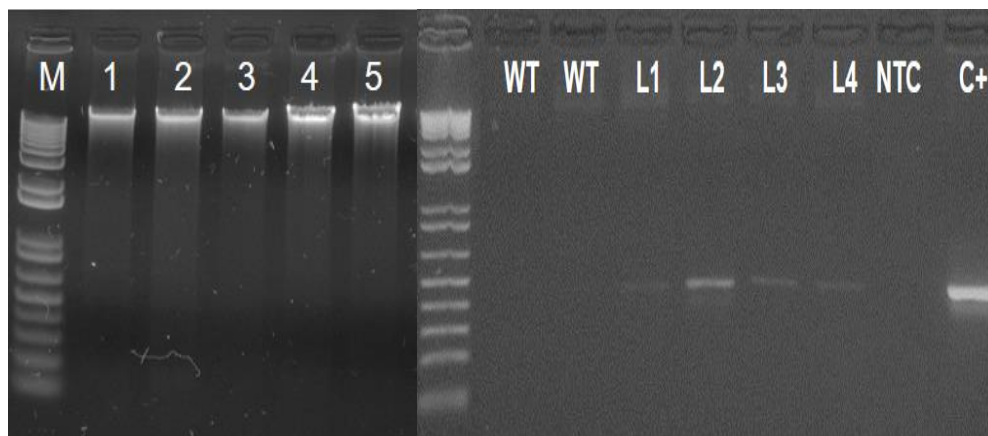


Figura. 24. Identificación de plantas transgénicas de *Z. mays* mediante PCR punto final. A) Integridad del DNA de *Z. mays* resuelto en gel de agarosa al 0.8%. B) Detección del transgén de Cas9 en plantas de *Z. mays* transformadas mediante PCR punto final en gel de agarosa al 1%.

Tabla VIII. Eficiencias de transformación obtenidas para *Z. mays*.

LOTE	Plantas inoculadas	Plantas positivas por PCR	Eficiencia de transformación (%)
A	40	3	7.5
B	40	4	10.0
C	40	0	0.0
D	40	3	7.5
E	40	2	5.0
TOTAL	200	12	6.0

Tras la determinación de la eficiente transformación de plantas de *Zea mays* con el método de transformación in planta de coleoptilos, se procedió a caracterizar dicho proceso. Para ello, *A. tumefaciens* transformando con el vector pBGWFS7-ZMUb1p fue transformado en coleoptilos e incubados con buffer de GUS para determinar la expresión de dicho gen las células transformadas (Fig. 25). Los resultados de este ensayo muestran como los coleoptilos transformados muestran una coloración azul, indicando la presencia del transgén que codifica la β -glucuronidasa.

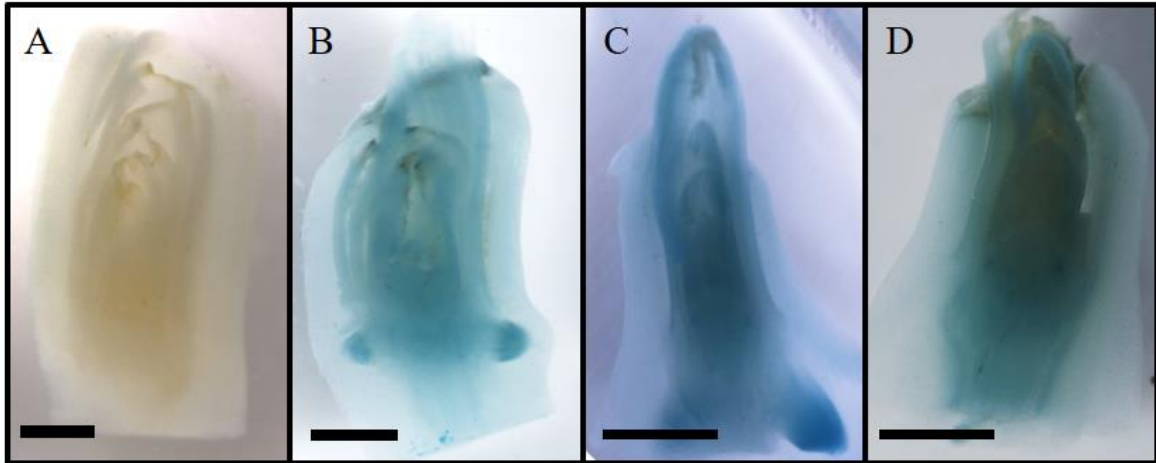


Figura 25. Análisis de expresión de β -glucuronidasa en coleoptilos de maíz expresando el vector pBGWFS7-ZMubi. A) *Z. mays* VT401 WT B-D) maíz VT401. Las barras representan 2 cm.

Posteriormente se construyó el plásmido pB7FWG2-KN1 que expresa el ORF del factor de transcripción *knotted1* de *Z. mays* fusionado a GFP. La eficiencia de este vector fue comprobada mediante la transformación de cotiledones de *C. maxima* y tras un mes de la infección las plantas fueron evaluadas fenotípicamente para verificar la presencia de un fenotipo nudoso (Fig. 26). Posteriormente se infectaron coleoptilos de *Z. mays* var. VT401 con este vector y se evaluaron mediante microscopia confocal (Fig. 27). Las observaciones del fenotipo nudoso en *C. maxima* demuestran que el vector pB7FWG2-KN1 es funcional; sin embargo, no fue posible distinguir este fenotipo en un total de 120 coleoptilos de maíz transformados, aspecto que requiere de estudios adicionales para determinar las causas de la inhibición de este fenotipo. Sin embargo, las imágenes de microscopia confocal, apuntan a corroborar la eficiente transformación mediante la técnica, al observarse núcleos expresando GFP, típicos de factores de transcripción como *knotted1* quien cumple su función en estos organelos.

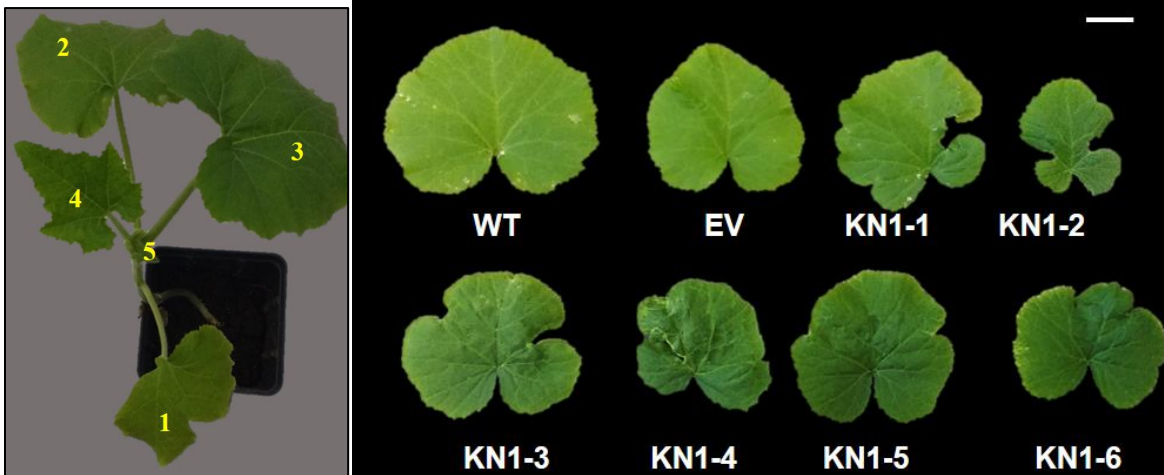


Figura 26. Análisis fenotípico en *C. maxima* sobreexpresando el gen *knotted1* de maíz. A) Expresión transitoria del transgén 35S-KN1-GFP en *C. maxima*. B) Fenotipos de plantas agroinfiltradas con el vector vacío, sin plásmido y 35S-KN1-GFP.

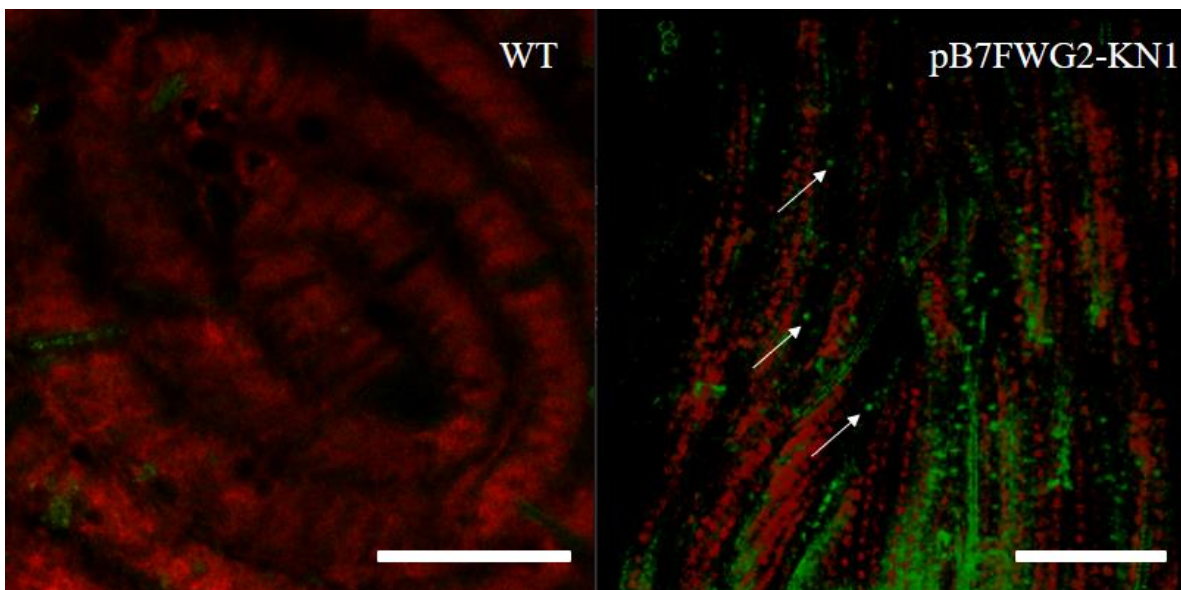


Figura 27. Análisis de microscopía de fluorescencia de coleoptilos de maíz infectados con el vector pB7FWG2-KN1. A) Corte transversal de un coleoptilo de maíz silvestre B) Corte longitudinal de coleoptilo inoculado con pB7FWG2-KN1. Las barras indican 200 μ m y las flechas en B señalan estructuras similares a núcleos.

Posteriormente una línea corroborada por PCR punto final (B02), fue monitoreada a través de su fenología para detectar la presencia del transgén en los

estadios V01 y V10, mediante qPCR (Fig.26, Tabla IX). Como puede observarse en estos resultados las plantas poseen presencia del transgén solo en periodos iniciales del desarrollo mientras que en estadios más avanzados, ninguna de las hojas muestreadas de la planta adulta presentaba la resistencia a herbicida. Esto sugiere un posible mosaicismo en las plantas que se manifiesta en periodos iniciales tras la transformación. Otro experimento que comprueba este posible mosaicismo es el de determinación de número de copias a través de ddPCR, donde se obtuvieron valores de número de copias inferiores a 1, valor que se obtiene debido a que esta determinación considera el total de células de un tejido de las cuales, en mosaicismo no todas estarán transformadas, por lo cual al establecer el cociente de cuantificación de gotas positivas al transgén/nuemod e gotas positivas al gen endógeno, resulta en un número menor a 1 (Fig. 28).

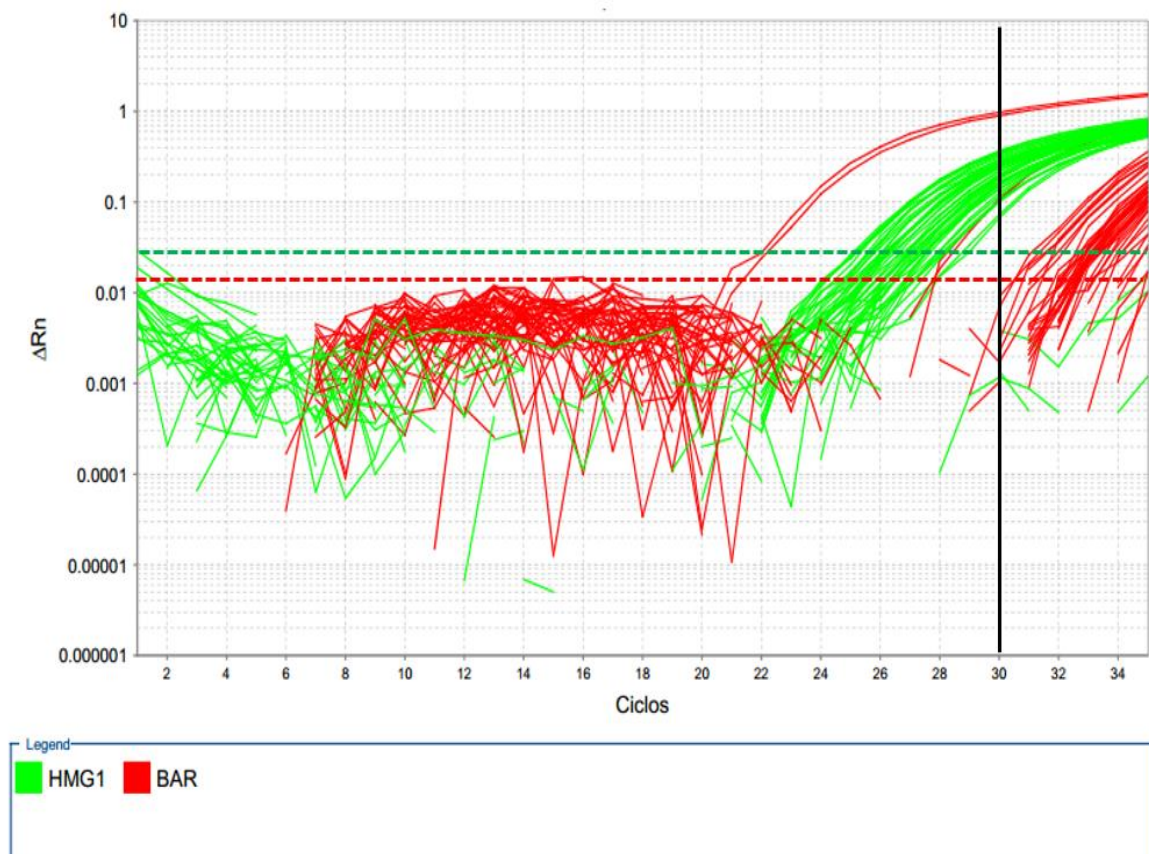


Figura 26. qPCR para HMG y BAR en *Z. mays* VT401 línea transgénica B02, en estadios fenológicos V03 y V10.

Tabla IX. Valores de Ct obtenidos mediante qPCR para evaluar la presencia del transgén en plantas de *Z. mays* transformadas con el sistema de edición de genomas.

MUESTRA	CT (PROMEDIO) ± SD	
	HMG	BAR
VT401 B02 V10-01	27.10±0.02	30.45±0.28
VT401 B02 V10-02	26.76±0.26	31.26±0.16
VT401 B02 V10-03	26.99±0.22	31.33±0.06
VT401 B02 V10-04	27.22±0.04	30.01±0.15
VT401 B02 V10-05	27.55±0.19	31.09±0.27
VT401 B02 V10-06	27.38±0.29	30.22±0.08
VT401 B02 V10-07	26.70±0.20	31.32±0.12
VT401 B02 V03-01	27.03±0.09	26.36±0.17
VT401 WT V03-01	27.10±0.03	31.42±0.08
NTC	ND	ND
Control + (1 ng)	ND	19.76±0.06

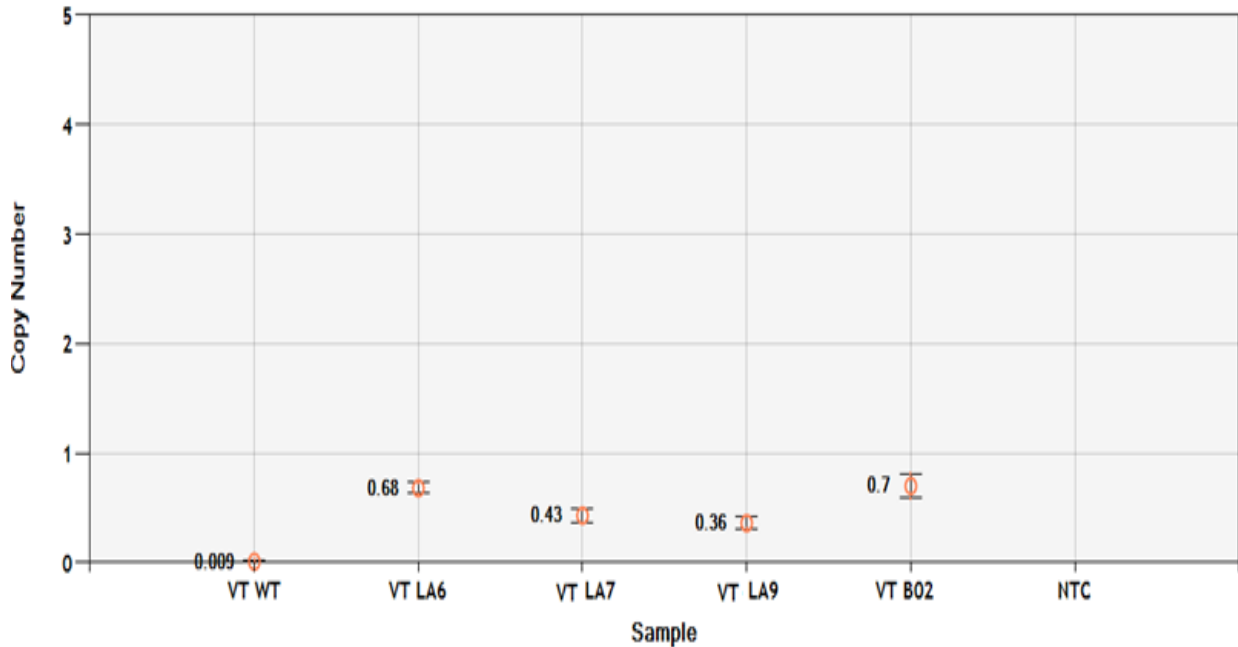


Figura 27. ddPCR para cuantificación de número de copias en *Z. mays* var. VT401.

El último experimento para corroborar esta transitoriedad y mosaicismo de las muestras se realizó al comparar el número de semillas transformadas en la F1, respecto al número de semillas esperadas, suponiendo un patrón de segregación mendeliana. Para ello, la línea A06 fue cruzada con polen de plantas silvestres y las 56 semillas obtenidas de esta cruce fueron germinadas y asperjadas con herbicida al 2%. (La estandarización de la dosis mínima de herbicida que puede causar necrosis y amarillamiento fue definida previamente en ensayos con plantas silvestres). Todas las plantas obtenidas resultaron susceptibles al herbicida tras evaluación macroscópica 15 días tras la aspersión, y se realizó un análisis estadístico de chi-cuadrado para determinar la significancia de estos resultados.



Figura 28. Analisis de fenotípico de resistencia a herbicida en plantas de *Z. mays* var. VT401, provenientes del cruce A06 xWT.

De un total de 58 plantas ninguna presentó resistencia a herbicida. Teóricamente, el valor esperado para un cruce de una planta hemíctica con una no transformada, es un 25% de plantas portadoras del alelo transgénico, que estaría representado por un total de 14.5 plantas. Al analizar estadísticamente estos resultados, se obtuvo que $\chi^2_{\text{calc}}=13.5 > \chi^2_{\text{tab}}=3.84$ ($\alpha=0.05$); por lo cual se rechaza la hipótesis nula que asume un patrón de segregación tipo mendeliano, y se corrobora que esta característica transgénica está presente sólo en plantas de la F0 siendo posiblemente un mosaico genético, al corroborarse con los resultados mostrados anteriormente (Fig. 26).

Otros autores han reportado métodos de transformación en planta en maíz que evitan el uso de técnicas de cultivo *in vitro* (Abhishek et al., 2016). Mediante el uso e implementación de este tipo de técnicas, se podrán obtener en el futuro cercano, plantas transformantes en menores tiempos y en variedades con genotipos no transformables hasta la fecha por las técnicas convencionales. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta sección indican que esta transformación implementada

la producción eficiente de plantas transgénicas sería baja. Sin embargo, a partir de la optimización de la misma, garantizando la transformación de células germinales del meristemo apical, las plantas estables podrían ser obtenidas. No obstante, esta técnica sería útil en la producción de proteínas heterólogas o bien para el estudio de genes de forma transitoria.

1.1.28. Selección y caracterización de transformantes de *A. thaliana*.

Para el caso de *A. thaliana*, las plantas portadoras de Cas9 y el gRNA fueron seleccionadas en primer lugar por aspersión con herbicida. A aquellas plantas resistentes se les extrajo DNA y posteriormente se analizaron por PCR punto final amplificando un fragmento del gen codificante para la proteína Cas9. Posteriormente se determinó el número de copias en cada planta a fin de seleccionar aquellas con solo una copia en su genoma. Estos resultados se presentan en la Fig 29.

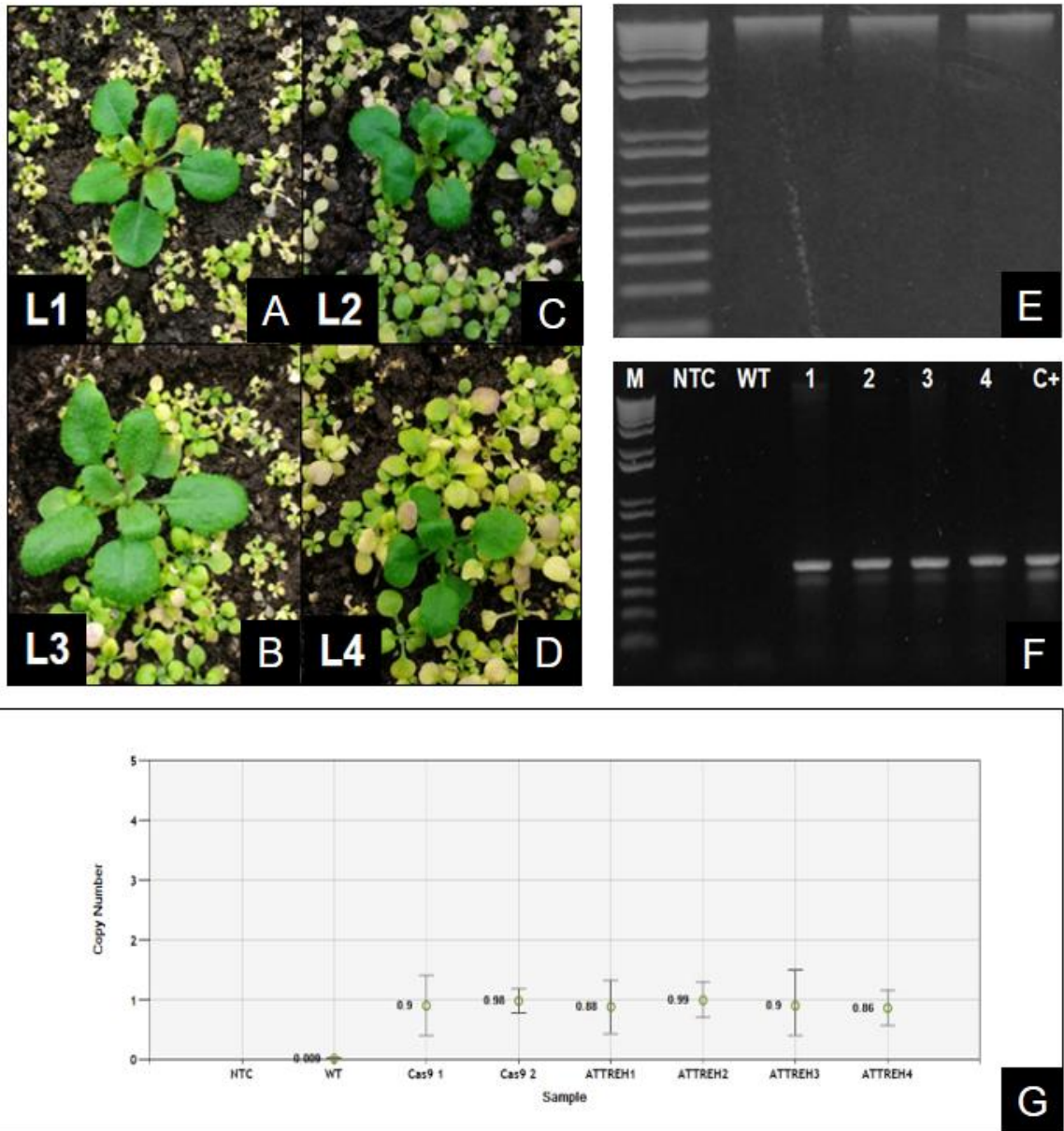


Figura 29. Selección y análisis de transformantes de *Arabidopsis*. A-D: Selección fenotípica de líneas resistentes a herbicida. E: Extracción de DNA genómico en posibles líneas transformantes. F: PCR punto final para detección del transgén codificante para Cas9. G: Determinación del número de copias líneas positivas a PCR mediante ddPCR.

1.22. Determinación de cambios genotípicos y fisiológicos:

Una vez obtenidas las líneas transformantes de *A. thaliana*, se procedió con la determinación de los posibles cambios fenotípicos presentes en el gen codificante para trehalasa, específicamente en el dominio de unión a sustrato. De cada una de las líneas obtenidas, se amplificó mediante PCR punto final una región flanqueante al potencial sitio de edición (Fig. 30). El amplicón resultante, fue clonado en el vector PCR8/GW/TOPO y al menos 5 clonas provenientes de cada línea fueron secuenciadas. Los resultados de esta secuenciación se presentan en la Figura 31, donde se muestra que de 5 líneas analizadas, una sola de ellas presenta cambios en el sitio de edición. Si se analiza la secuencia en términos de marco abierto de lectura, se puede notar que esta línea posee una sustitución de una serina por una fenilalanina.

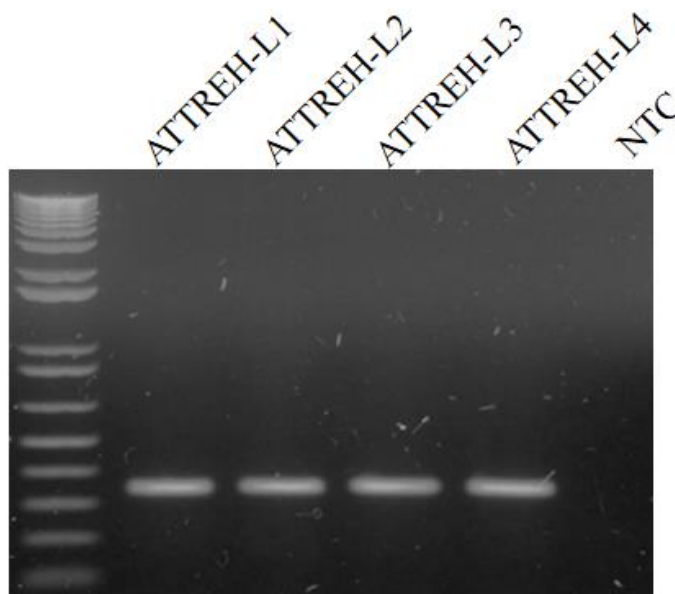


Figura 30. PCR punto final de las líneas obtenidas, en el gen codificante para PCR ATTREH en líneas de *A. thaliana* para mandar a secuenciar.

1.23. Análisis fenotípico de mutantes de *A. thaliana*.

Para el análisis comparativo de las líneas editadas en términos fisiológicos, se procedió a la obtención de líneas homocigotas mutantes por inserción de T-DNA reportadas previamente como líneas silenciadas (SALK_147073) y sobreexpresoras de trehalasa (SALK_151791) según Van Houtte *et al.* (2013) (Fig. 32-A).

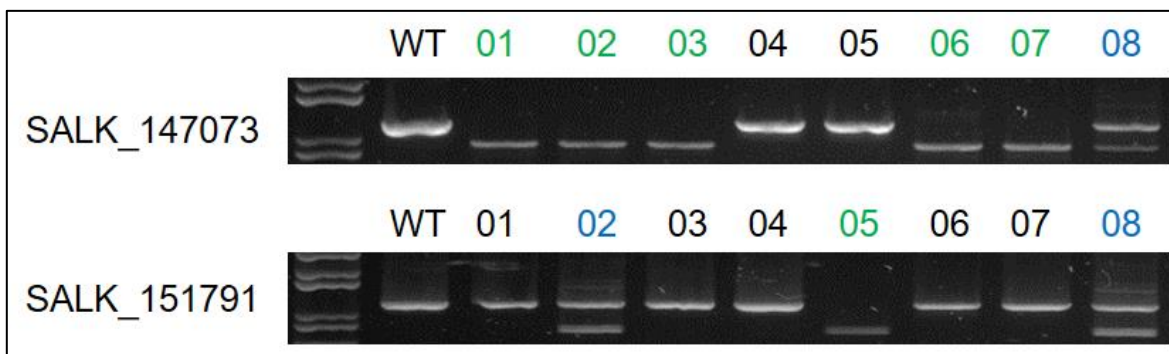


Figura 32. Genotipificación de líneas mutantes para el gen *tre1* en *A. thaliana*.

En azul se especifican las plantas heterocigotas para el transgén y en verde las plantas homocigotas.

Una vez genotipificadas las líneas se procedió a comparar fenotípicamente estas líneas basándose en caracteres morfológicos de la roseta (Figura 33-A) y las hojas caulinares (Figura 33-B).



Figura 33. Comparación fenotípica de plantas mutantes por inserción y genéticamente editadas en *Arabidopsis thaliana*.

A) Comparación de hojas de roseta. B) Comparación de hojas caulinares. La barra blanca equivale a 5 cm.

Por último las líneas mutantes por inserción de T-DNA fueron analizadas mediante RT-qPCR para determinar los niveles de expresión relativa, respecto a las plantas silvestres. Las líneas mutantes de inserción, tal como lo reporta Van Houtte *et al.*, (2013) son líneas sobreexpresoras y silenciadas respectivamente. Por su parte, las líneas genéticamente editadas, no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a las plantas silvestres. Sin embargo, este experimento deberá ser repetido con un análisis que incluya un número mayor de réplicas biológicas a fin de poder cuantificar de forma más certera las diferencias obtenidas.

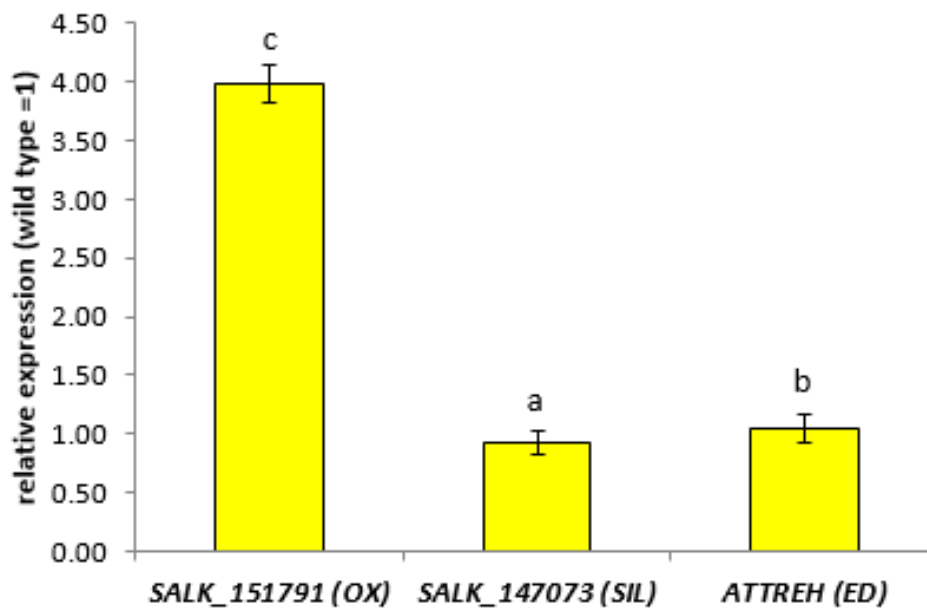


Figura 34. RT-qPCR para la cuantificación relativa del gen *tre1*.

8 CONCLUSIONES

- Se estableció un sistema de vectores para edición de genomas basado en el uso de la cepa hipervirulenta *A. tumefaciens* AGL1 que permitieron la edición efectiva del locus de trehalasa en *A. thaliana* a partir de una sustitución nucleotídica.
- La caracterización de un sistema de transformación *in planta* de maíz, indica que el sistema de transformación tiene baja preferencia, siendo esencialmente transitorio. Se propone su uso como un sistema de expresión transitoria de proteínas heterólogas.
- Comparativamente, las líneas por inserción de T-DNA muestran características fenotípicas diferentes respecto a plantas silvestres; así como las plantas posiblemente editadas. Estas líneas mutantes de inserción son una herramienta útil para la comparación y dilucidación de los efectos del incremento y disminución de los niveles de expresión del gen de trehalasa.

9 PERSPECTIVAS

En relación a la estandarización de la transformación maíz, se recomienda diseñar un vector de sobreexpresión de genes involucrados en el desarrollo y morfogénesis como indicadores de la efectiva transformación de plantas. En ese sentido, se recomienda el uso de genes homeóticos que no sean de maíz para poder evaluar su expresión en este sistema y poder visualizar posibles fenotipos

Para lograr la edición del gen codificante para trehalasa, se recomienda el uso de técnicas ya establecidas como bombardeo de callos embriogénicos o la transformación de embriones inmaduros mediante agroinfección a fin de establecer plantas portadoras del sistema de edición de genomas

Para el caso de la edición del gen *tre1* en *A. thaliana*, se recomienda obtener progenie de la línea editada para poder obtener segregantes libres de transgén y poder ensayos de tolerancia a sequía y cuantificación de trehalosa y actividad trehalasa.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Abhishek, A., Kumari, R., Karjagi, C.G., Kumar, P., Kumar, B., Dass, S., Sai Kumar, R., and Ramteke, P.W. (2016). Tissue Culture Independent Agrobacterium tumefaciens Mediated In Planta Transformation Method for Tropical Maize (*Zea mays*.L). *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* *86*, 375–384.
2. Almeida, A.M., Cardoso, L.A., Santos, D.M., Torné, J.M., and Fevereiro, P.S. (2007). Trehalose and its applications in plant biotechnology. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* *43*, 167–177.
3. Amitai, G., and Sorek, R. (2016). CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.*
4. Anders, C., Niewoehner, O., and Jinek, M. (2015). In Vitro Reconstitution and Crystallization of Cas9 Endonuclease Bound to a Guide RNA and a DNA Target. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 515–537.
5. Bae, S., Kweon, J., Kim, H.S., and Kim, J.-S. (2014). Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat. Methods* *11*, 705–706.
6. Barraza, A., and Sánchez, F. (2013). Trehalases: A neglected carbon metabolism regulator? *Plant Signal. Behav.* *8*, e24778.
7. Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* *9*, 39.
8. Bikard, D., Euler, C.W., Jiang, W., Nussenzweig, P.M., Goldberg, G.W., Duportet, X., Fischetti, V.A., and Marraffini, L.A. (2014). Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat. Biotechnol.* *32*, 1146–1150.
9. Bleuyard, J.-Y., Gallego, M.E., and White, C.I. (2006). Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Repair* *5*, 1–12.

10. Bortesi, L., and Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33, 41–52.
11. Brodmann, D., Schuller, A., Ludwig-Müller, J., Aeschbacher, R.A., Wiemken, A., Boller, T., and Wingler, A. (2002). Induction of Trehalase in Arabidopsis Plants Infected With the Trehalose-Producing Pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 15, 693–700.
12. Chen, H., and Bailey, S. (2016). Cas9, poised for DNA cleavage. *Science* 351, 811–812.
13. Choe, S. (2016). Genome editing: a technology in time for plants. 18–21.
14. Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190.
15. Crueger, A. (1993). Mutagenesis. *Biotechnology* 2, 5–46.
16. Cubero, J., Martínez, M.C., Llop, P., and López, M.M. (1999). A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumors. *J. Appl. Microbiol.* 86, 591–602.
17. Doench, J.G., Hartenian, E., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J., and Root, D.E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat. Biotechnol.* 32, 1262–1267.
18. Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., et al. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 34, 184–191.
19. Dominguez, A.A., Lim, W.A., and Qi, L.S. (2015). Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 5–15.
20. Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096–1258096.

21. East-Seletsky, A., O'Connell, M.R., Knight, S.C., Burstein, D., Cate, J.H.D., Tjian, R., and Doudna, J.A. (2016). Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature* 538, 270–273.
22. Edward, J.K., Adams, R.P., and Kartha, K.K. (1990). Trehalase activity in plant tissue culture. *Phytochemistry* 29, 2525–2528.
23. Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* 125, 1–15.
24. Figueroa-Soto, C.G., Terán-Acuña, E., and Valenzuela-Soto, E.M. Changes in trehalase activity are associated with the hydric status of *Selaginella lepidophylla* plants.
25. Friedberg, E.C. (2003). DNA damage and repair. *Nature* 421, 436–440.
26. Jia, H., and Wang, N. (2014). Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA. *PLoS ONE* 9, e93806.
27. Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., et al. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 343, 1247997.
28. Karimi, M., Bleys, A., Vanderhaeghen, R., and Hilson, P. (2007). Building Blocks for Plant Gene Assembly. *PLANT Physiol.* 145, 1183–1191.
29. Lin, M.-K., Belanger, H., Lee, Y.-J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K.-I., Miura, E., Xoconostle-Cazares, B., Gendler, K., Jorgensen, R.A., Phinney, B., et al. (2007). FLOWERING LOCUS T Protein May Act as the Long-Distance Florigenic Signal in the Cucurbits. *PLANT CELL ONLINE* 19, 1488–1506.
30. Lunn, J.E., Delorge, I., Figueroa, C.M., Van Dijck, P., and Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *Plant J.* 79, 544–567.
31. Lupo, A., Cesaro, E., Montano, G., Zurlo, D., Izzo, P., and Costanzo, P. (2013). KRAB-zinc finger proteins: a repressor family displaying multiple biological functions. *Curr. Genomics* 14, 268–278.

32. Manova, V., and Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants ? from models to crops. *Front. Plant Sci.* 6.
33. Pampurova, S., and Van Dijck, P. (2014). The desiccation tolerant secrets of *Selaginella lepidophylla*: What we have learned so far? *Plant Physiol. Biochem.* 80, 285–290.
34. Pierce, B.A. (2012). *Genetics: a conceptual approach* (New York: W.H. Freeman).
35. Puchta, H. (2002). Gene replacement by homologous recombination in plants. In *Functional Genomics*, (Springer), pp. 173–182.
36. Ramírez-Ortega, F.A., Xoconostle-Cázares, B., Toscano-Morales, R., and Ruiz-Medrano, R. (2015). A simple method for transient transformation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seedlings. *Plant Omics* 8, 37.
37. Ray, A., and Langer, M. (2002). Homologous recombination: ends as the means. *Trends Plant Sci.* 7, 435–440.
38. Rivas, I. (2016). Control de la producción de poliaminas de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus* en maíz mediante RNA antisentido. CINVESTAV.
39. Ruiz-Salas, J.-L., Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., et al. (2016). Vascular expression of trehalose phosphate synthase1 (TPS1) induces flowering in *Arabidopsis*. *Plant Omics* 9, 344–351.
40. Samach, A., Melamed-Bessudo, C., Avivi-Ragolski, N., Pietrokovski, S., and Levy, A.A. (2011). Identification of Plant RAD52 Homologs and Characterization of the *Arabidopsis thaliana* RAD52-Like Genes. *Plant Cell* 23, 4266–4279.
41. San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008). Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 229–257.
42. Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., et al. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat. Methods* 11, 399–402.

43. Shen, H., Strunks, G.D., Klemann, B.J.P.M., Hooykaas, P.J.J., and de Pater, S. (2017). CRISPR/Cas9-Induced Double-Strand Break Repair in *Arabidopsis* Nonhomologous End-Joining Mutants. *G3* 7, 193–202.
44. Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., Teramura, H., Yamamoto, T., Komatsu, H., Miura, K., et al. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* 35, 441–443.
45. Snustad, D.P., and Simmons, M.J. (2012). *Principles of genetics* (Hoboken, NJ: Wiley).
46. Strauß, A., and Lahaye, T. (2013). Zinc Fingers, TAL Effectors, or Cas9-Based DNA Binding Proteins: What's Best for Targeting Desired Genome Loci? *Mol. Plant* 6, 1384–1387.
47. Sun, Y., Li, J., and Xia, L. (2016). Precise Genome Modification via Sequence-Specific Nucleases-Mediated Gene Targeting for Crop Improvement. *Front. Plant Sci.* 7.
48. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
49. Upadhyay, S.K., Kumar, J., Alok, A., and Tuli, R. (2013). RNA-Guided Genome Editing for Target Gene Mutations in Wheat. *G3* 3, 2233–2238.
50. Van Dijck, P., Mascorro-Gallardo, J.O., De Bus, M., Royackers, K., Iturriaga, G., and Thevelein, J.M. (2002). Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem. J.* 366, 63–71.
51. Van Houtte, H., Vandesteene, L., Lopez-Galvis, L., Lemmens, L., Kissel, E., Carpentier, S., Feil, R., Avonce, N., Beeckman, T., Lunn, J.E., et al. (2013). Overexpression of the Trehalase Gene AtTRE1 Leads to Increased Drought Stress

- Tolerance in Arabidopsis and Is Involved in Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure. *PLANT Physiol.* 161, 1158–1171.
52. Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., and Lander, E.S. (2014). Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. *Science* 343, 80–84.
53. Weigel, D., and Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A laboratory manual* (New York: Cold Spring Laboratory Press).
54. Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., and Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 14, 327.
55. Xu, X., Tao, Y., Gao, X., Zhang, L., Li, X., Zou, W., Ruan, K., Wang, F., Xu, G., and Hu, R. (2016). A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discov.* 2, 16009.
56. Yobi, A., Wone, B.W.M., Xu, W., Alexander, D.C., Guo, L., Ryals, J.A., Oliver, M.J., and Cushman, J.C. (2012). Comparative metabolic profiling between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant species of *Selaginella* reveals insights into the resurrection trait: *Comparative metabolomics of desiccation tolerance*. *Plant J.* 72, 983–999.
57. Zetsche, B., Gootenberg, J., Abudayyeh, O., Slaymaker, I., Makarova, K., Essletzbichler, P., Volz, S., Joung, J., van?der?Oost, J., Regev, A., et al. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* 163, 759–771.
58. Zhang, J.-P., Li, X.-L., Neises, A., Chen, W., Hu, L.-P., Ji, G.-Z., Yu, J.-Y., Xu, J., Yuan, W.-P., Cheng, T., et al. (2016). Different Effects of sgRNA Length on CRISPR-mediated Gene Knockout Efficiency. *Sci. Rep.* 6.
59. Zhang, K., Raboanatahiry, N., Zhu, B., and Li, M. (2017). Progress in Genome Editing Technology and Its Application in Plants. *Front. Plant Sci.* 8.