

**OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN DE VARIEDADES
SELECTAS DE ARROZ PARA LA EDICIÓN GÉNICA MEDIANTE CRISPR-
Cas DEL GEN *badh2***



Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales

Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires

Pergamino, 17 de octubre del 2022.

**OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN DE VARIEDADES
SELECTAS DE ARROZ PARA LA EDICIÓN GÉNICA MEDIANTE CRISPR-
Cas DEL GEN *badh2***

Trabajo Final de Grado

del alumno

Martin Andrés Duhalde

Dra. Leticia Cecilia Baccarini

Evaluador

Dra Erika Mroginski

Evaluador

Lic. José Colazo

Evaluador

Dr. Romero Fernando Matías

Director

Dr. Maiale Santiago Javier

Co-Director

Dra. Iglesias Juliana

Tutora

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales, Universidad Nacional del
Noroeste de la Provincia de Buenos Aire**

Pergamino, 17 de octubre del 2022.

Agradecimientos:

Después de un largo recorrido desde mis comienzos en la Universidad me encuentro escribiendo estas líneas para darle un cierre a este camino. Un camino que tuvo sus idas y venidas, algunas pausas forzadas y otras por elección, pero siempre haciendo lo que creí mejor en cada momento, aunque a veces equivocado.

Quiero agradecerle profundamente a mi familia, mi papá y mamá, que si algo puedo decir es que me dieron una libertad que todos deberíamos tener en esta vida, me han dejado equivocarme, hacer y deshacer, todo a mi manera, y gracias a ustedes aprendí a vivir, ser feliz y no rendirme nunca. Gracias por apoyarme en mis estudios, elecciones y por el gran esfuerzo que han realizado para permitirnos estudiar y hoy ser profesionales.

A Ignacio, mi hermano, quien ha sido indispensable para llegar a este logro, colaborando conmigo en cada necesidad, quiero agradecerte por tu gran paciencia y buena voluntad, siempre dispuesto para los que te necesiten, es admirable.

A Florencia, la persona más especial que tuve la suerte de conocer, gracias por tu amor, tu compañía, apoyo y hacerme tan feliz, me siento muy afortunado de que estés en mi vida.

A Ramiro, un amigo entrañable, gracias por tu apoyo, y estar siempre para lo que haga falta. La alegría es fundamental para tener éxito, y vos, das mucho de eso.

Agradecerles a Matías y Santiago, director y co-director, haciendo énfasis principalmente en Matías con quien compartí la vida laboral

durante todo el 2021, has sido un excelente director, gracias por enseñarme, permitirme equivocarme, y estar dispuesto siempre a ayudarme.

A todas aquellas personas que estos años han sido indispensables para llegar a este logro, con una mención especial a Micaela, quien me dio su apoyo desinteresado desde el primer día (cursada de inmunología).

Agradecerle a la Universidad pública, al Instituto Tecnológico de Chascomús por permitir mi formación gratuita, de calidad, sintiéndome orgulloso y agradecido del país que tanto me ha dado.

Agradecerles a mis amigos, conocidos, compañeros de laboratorio y residencia, con quienes he compartido tantos momentos imposibles de plasmar en estas líneas.

ABREVIATURAS

2,4D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ANA	Ácido 1-naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BADH2	Betaína Aldehído Deshidrogenasa
CRISPR	Repeticiones palíndromas cortas regularmente espaciadas y agrupadas
crRNA	ARN CRISPR
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DO	Densidad óptica
DSB	Ruptura Doble Cadena
GB	GoldenBraid
GFP	Proteína verde fluorescente
HDR	Reparación dirigida por homología
LB	Borde izquierdo
MegN	Meganucleasas
NHEJ	Reparación por unión de extremos no homólogos
Nt	Nucleótido
pb	Pares de base s
PGR	Reguladores del crecimiento vegetal
RB	Borde derecho
SDSA	Síntesis dependiente del alineamiento de hebras
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
sgRNA	ARN de guía única
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SSN	Nucleasas específicas de secuencia
SSR	Repetición de secuencia simple
TAE	Disolución de Tris, Acetato y EDTA
TALEN	Nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción

tracrRNA	ARN trans-activador
UT	Unidad transcripcional
ZFN	Nucleasas con dedos de zinc

ÍNDICE

1. Introducción

- 1.1 Arroz
- 1.2 Cultivo *in vitro*
- 1.3 Ingeniería genética
 - 1.3.1 Transformación
 - 1.3.2 *Agrobacterium Tumefaciens*
 - 1.3.3 CRISPR-Cas
 - 1.3.3.1 Generalidades
 - 1.3.3.2 Mecanismo de acción
 - 1.3.3.3 Clasificación
 - 1.3.3.4 CRISPR-Cas9 en edición genómica
- 1.4 Biología sintética
 - 1.4.1 GoldenGate
 - 1.4.2 GoldenBraid

2. Objetivos

- 2.1 Generales
- 2.2 Específicos

3. Materiales y métodos

- 3.1 Materiales
 - 3.1.1 Material biológico
 - 3.1.2.1 Material vegetal
 - 3.1.2.2 Cepas bacterianas
- 3.2 Métodos
 - 3.2.1 Cultivo *in vitro*
 - 3.2.1.1 Descontaminación

- 3.2.1.2 Inducción de callos
- 3.2.1.3 Regeneración parte aérea
- 3.2.1.4 Regeneración raíz
- 3.2.2 Sistema CRISPR-Cas9
 - 3.2.2.1 Selección del sitio blanco y diseño de las guías
 - 3.2.2.2 Diseño del vector de expresión
- 3.2.3 Transformación
 - 3.2.3.1 Bacterias
 - 3.2.3.2 Material vegetal
- 3.2.4 Detección de transformantes
 - 3.2.4.1 Expresión de proteína verde fluorescente
 - 3.2.4.2 Extracción de ADN, ARN, síntesis de ADNc y reacción en cadena de la polimerasa.
 - 3.2.4.3 Selección mediada por antibióticos
- 3.2.5 Detección de plantas editadas.

4. Resultados y discusión

- 4.1 Optimización del cultivo *in vitro* para la variedad Don Justo
 - 4.1.1 Obtención de callos
 - 4.1.2 Regeneración parte aérea
 - 4.1.3 Regeneración raíz
- 4.2 Vector de expresión
 - 4.2.1 Diseño de la sgRNA
 - 4.2.2 Síntesis del vector de expresión
- 4.3 Transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*
 - 4.3.1 Evaluación del sistema de transformación *in vitro*
 - 4.3.2 Evaluación del sistema de transformación *in vivo*
 - 4.3.3 Evaluación de planta regenerada post selección
- 4.4 Edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas9
 - 4.4.1 Búsqueda de secuencias editadas.

5. Discusión

6. Conclusión

7. Bibliografía

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Arroz

El cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.), comenzó hace casi 10.000 años, en muchas regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. En la actualidad, se cultiva en más de un centenar de países con una producción de 505 millones de toneladas (470 millones de toneladas de arroz pulido) (FAO, 2020). La producción está concentrada geográficamente en Asia oriental con más del 90 % de la producción mundial. Brasil, es el principal productor no asiático, seguido por los Estados Unidos (Bernier *et al.*, 2008).

El arroz pertenece a la división *Angiospermae*, clase *Monocotyledoneae*, orden *Glumiflorae*, tribu *Oryzeae*, familia *Poaceae* (gramíneas), con dos especies cultivadas principalmente: *Oryza sativa* L. y *Oryza glaberrima*, ambas de reproducción autógama, con un número diploide de cromosomas ($2n=24$) (Acevedo *et al.*, 2006; Bernier *et al.*, 2008). De las especies disponibles, *O. sativa* es la de mayor importancia económica, ya que es cultivada ampliamente en todo el mundo; incluyendo Asia, América, Unión Europea, Oceanía y Centro-este de África. La especie *O. glaberrima*, se cultiva solamente en el oeste de África (Vaughan *et al.*, 2008).

La especie *O. sativa* presenta una gran diversidad genética. Dos grandes grupos de arroz han sido reconocidos en China (al menos desde la dinastía Han) (Oka, 1988), correspondientes a las subespecies: Indica y Japónica. En términos geográficos, las Indicas se conocen principalmente como arroces de tierras bajas que se cultivan en toda Asia tropical, mientras que las Japónicas se encuentran normalmente en las zonas templadas del este de Asia, zonas altas del sudeste asiático y sur de Asia (Garris *et al.*, 2005).

Durante la larga historia de domesticación del arroz, las variedades Indica y Japónica han divergido en características morfológicas, agronómicas, fisiológicas y bioquímicas; así como también en rendimiento, calidad y resistencia al estrés (Yang *et al.*, 2014). La evidencia, sugiere que, las dos

subespecies son producto de eventos de domesticación separados de la especie ancestral, *O. rufipogo*.

Mediante la utilización de SSR (Garris *et al.*, 2005) y SNP (Caicedo *et al.*, 2007) se distinguieron 5 grupos: Indica, Aus, Japónica templada, Japónica tropical y Aromática (Civáñ *et al.*, 2019).

El arroz del grupo de las aromáticas, es valorado por los consumidores debido a su fragancia especial, reflejándose en un precio de mercado superior (Qiu & Zhang, 2003). Se considera que la 2-acetil-1-pirrolidina (2-AP) es la principal determinante de la fragancia del arroz (Mahattanatawee & Rouseff, 2014), con una concentración en arroces aromáticos muy elevada de hasta 0,09 mg.kg⁻¹, 10 veces mayor que en arroces no aromáticos (<0,006–0,008 mg.kg⁻¹) (Chen *et al.*, 2006).

El alelo dominante *badh2* que codifica la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH2) inhibe la síntesis de 2-AP, mientras que, por lo contrario, el alelo recesivo induce su formación (Chen *et al.*, 2008). Se ha confirmado que *badh2* es un determinante de la fragancia del arroz. Se encuentra en el cromosoma 8, comprende 15 exones y codifica una proteína que consta de 503 aminoácidos (Chen *et al.*, 2008).

En arroces no aromáticos, *BADH2* cataliza la oxidación de 4-aminobutiraldehído, (precursor de 2-AP) lo que conduce a la inhibición de su síntesis, perdiendo de esta manera su fragancia (Kovach *et al.*, 2009). Por otro lado, en arroces aromáticos, la pérdida de función de la proteína *BADH2* no puede catalizar la oxidación, lo que resulta en la acumulación de 2-AP.

Como conclusión, la mutación con pérdida de función del gen *BADH2* conduce a la síntesis de una enzima no funcional, propia de los arroces aromáticos (Veerabhadraswamy *et al.*, 2022).

1.2 Cultivo *in vitro*

Las células vegetales poseen una propiedad distintiva muy útil para el desarrollo de las nuevas tecnologías: ser totipotentes, lo que significa que, teóricamente, cualquier parte de la planta aislada (explante) puede crecer vegetativamente y generar una planta completa. De esta manera se logra que

la manipulación de las plantas pueda reducirse a cultivos de tejidos y células en condiciones controladas y de asepsia (Gaillochet & Lohmann, 2015; Ikeuchi *et al.*, 2019).

Los cultivos *in vitro* se ven afectados por el genotipo y el tipo de explante, como así también las condiciones nutricionales y ambientales que resultan ser factores críticos para lograr una respuesta óptima de los tejidos vegetales. La composición mineral, la fuente de carbono, los reguladores del crecimiento vegetal (PGR), los agentes gelificantes, el pH, la luz, la temperatura y el ambiente gaseoso son factores a tener en cuenta para el éxito de los diferentes procesos de regeneración y propagación de plantas *in vitro* (Kumar & Reddy, 2011).

Los reguladores de crecimiento vegetal, o fitohormonas, son claves para determinar el destino de las células vegetales. El crecimiento y la morfogénesis *in vitro* están regulados por la interacción y el equilibrio entre los reguladores de crecimiento suministrados en el medio de cultivo y las sustancias de crecimiento producidas endógenamente (Gaillochet *et al.*, 2017).

Hay varias clases de reguladores del crecimiento de las plantas: citoquininas, auxinas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Las auxinas y citoquininas, juegan un papel importante en el cambio de desarrollo y la regeneración de órganos. Generalmente, una proporción alta de auxinas en comparación con citoquininas favorece la formación de callos *in vitro* y la regeneración de raíces, mientras que una proporción baja, estimula la regeneración de brotes, por lo que el equilibrio entre ambas determina el destino de los órganos regenerados (Zhao *et al.*, 2008).

Existen dos procesos morfogénicos o vías de regeneración, en los cultivos de tejidos vegetales (Adda *et al.*, 1994; Bhatia & Bera, 2015):

1. Organogénesis: producción de órganos vegetales (raíces o brotes).
2. Embriogénesis somática: es el proceso de formación y desarrollo de embriones.

Ambos procesos morfológicos se pueden dar de forma directa o indirecta. En la directa, los procesos morfológicos surgen directamente a partir de una célula o un pequeño grupo de células sin que intervenga la producción de callos. La indirecta es un proceso en el que primero se produce un callo a partir del explante para luego formar embriones u órganos a partir del tejido del callo o de un cultivo de suspensión celular (Fig. 1B y 1C).

Los callos son estructuras desorganizadas (Fig. 1 a), en los que cada célula que lo conforma tiene la capacidad de regenerar diferentes estructuras de una planta bajo condiciones de cultivo determinadas (Steward *et al.*, 1958). En arroz, las variedades Japónicas muestran un elevado porcentaje de formación de callos, en cambio, para variedades Indicas e híbridos Japónica-Indica, el porcentaje de formación de callos es bastante menor (Abe & Futsuhara, 1986).

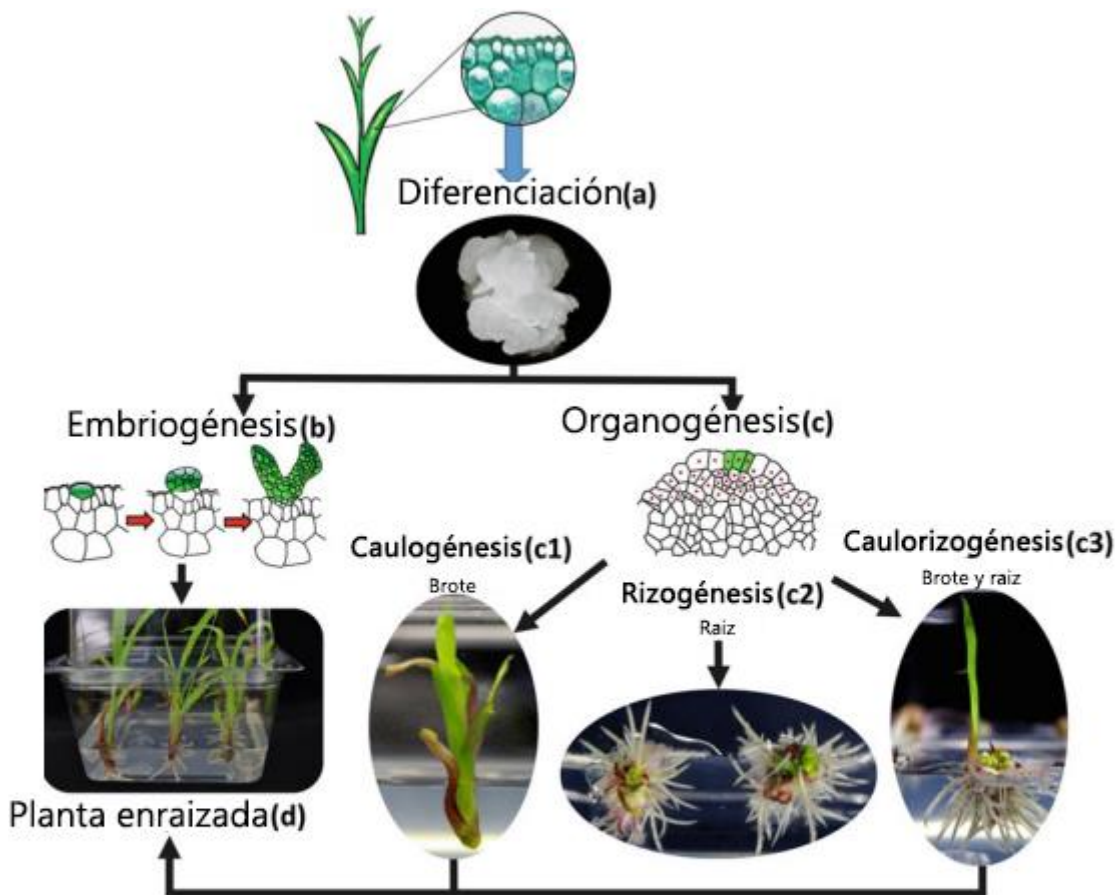


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DE LA MORFOLOGÍA VEGETAL IN VITRO.
 (a) Desdiferenciación: la aceleración inicial de la división celular en un explante aislado conduce a la formación de una masa celular indiferenciada llamada callo. (b) Desarrollo embrionario a través de una secuencia bien organizada de división, agrandamiento y diferenciación celular (c). Desarrollo de órganos como brote (c1), raíz (c2) o ambos (c3). (d) Planta enraizada. (Adaptado de Bandyopadhyay & Thilmony, 2021).

Los callos facilitan la transformación, regeneración y selección por lo que son ampliamente utilizados en biotecnología vegetal.

La regeneración de plántulas a partir de callos en cultivo *in vitro*, depende en gran medida de los genotipos y combinación de fitohormonas específicas de cada variedad (Altpeter *et al.*, 2016; Ikeuchi *et al.*, 2019).

Los cultivos *in vitro* tienen varias aplicaciones: la propagación masiva de plantas (micropropagación), obtención de plantas libres de patógenos, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, mejoramiento genético e ingeniería genética.

1.3 Ingeniería genética en plantas

La ingeniería genética abarca diferentes tipos de técnicas que como instancia final producen modificaciones en el ADN de un organismo.

La ingeniería genética de cultivos vegetales proporciona nuevas herramientas, desde poder ampliar el repertorio de genes útiles en procesos de mejoramiento, hasta la posibilidad de introducir varios genes en un único evento y en menor tiempo (Hilder & Boulter, 1999; Low *et al.*, 2018). En la práctica, se utilizan cultivos de callos, suspensiones celulares, cultivos de protoplastos, cultivos de anteras, cultivos de órganos, meristemas y plántulas enteras como material de partida para realizar modificaciones genéticas dependientes del tipo de metodología de transformación empleada.

1.3.1 Transformación génica

La transformación genética de microorganismos en el laboratorio fue descrita por primera vez en *Escherichia coli* (Hotchkiss & Gabor; 1970) resultando ser una técnica rutinaria de enorme utilidad tanto para trabajos en ingeniería genética como estudios de genética básica y aplicada (Sambrook & Russell 2001; Castañeda *et al.*, 2006).

En plantas la transformación implica la entrega de material genético extraño a las células vegetales, pudiendo ser transitoria o estable (Newell, 2000). La transformación transitoria se da cuando el transgén ingresa en la célula vegetal, pudiendo integrarse y expresarse, pero no se regenera una planta

portadora del transgén, en cambio, es estable, cuando se logra la integración del transgén en el genoma de la célula vegetal, y a partir de esto, se regenera una planta completa.

Es una herramienta fundamental de investigación en biología vegetal y una herramienta práctica para el desarrollo de plantas transgénicas. Hay muchos métodos verificados (Tabla 1) para la introducción estable de nuevos genes en los genomas nucleares de diversas especies de plantas.

Tabla 1. Técnicas para la transformación nuclear de plantas. (Adaptado de Husaini et al. 2010)

TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS SOBRESALIENTES
AGROBACTERIUM	MÉTODO MÁS UTILIZADO; TIENE UNA AMPLIA GAMA DE HUÉSPEDES (PRINCIPALMENTE PARA DICOTILEDÓNEAS); PROBLEMAS DE INCOMPATIBILIDAD ENTRE TEJIDOS DE MUCHAS ESPECIES VEGETALES.
AGROINFILTRACIÓN	PRINCIPALMENTE EN ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA
BOMBARDEO DE MICROPARTÍCULAS (BIOLISTIC GUN)	ADAPTADO A PLANTAS RECALCITRANTES A AGROBACTERIUM. DIFÍCIL DE CONTROLAR LOS PARÁMETROS AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS CAPACIDAD DE ENTREGAR ADN AL NÚCLEO, MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS. DESVENTAJA DEBIDA AL DAÑO CÉLULAR ASOCIADO ELEVADO NÚMERO DE COPIAS DEL TRANSGÉN, DIFICULTAD DE REGENERAR EL TEJIDO TRANSFORMADO
AGROLÍSTIC	COMBINACIÓN DE LO MEJOR DE AGROBACTERIUM (EFICIENCIA, BAJO NÚMERO DE TRANSGÉN) Y EL BOMBARDEO DE PARTICULAS (TRANSFORMACIÓN INDEPENDIENTE DE LA ESPECIE)
ELECTROPORACIÓN	UN PULSO ELÉCTRICO PERTURBA TEMPORALMENTE LA BICAPA FOSFOLIPÍDICA, PERMITIENDO QUE MOLÉCULAS POLARES COMO EL ADN PASEN A LA CÉLULA; PRINCIPALMENTE ES UN SISTEMA DE EXPRESIÓN TRANSITORIO, PERO A VECES SE USA PARA GENERAR PLANTAS TRANSGÉNICAS POR TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS; TAMBIÉN SE UTILIZA PARA LA TRANSFORMACIÓN DE TEJIDOS VEGETALES INTACTOS; LAS PRINCIPALES DESVENTAJAS INCLUYEN DAÑO CELULAR POR PULSOS ELÉCTRICOS Y EFECTOS DE LA ELECTROPERMEABILIDAD QUE RESULTA EN DESEQUILIBRIO IÓNICO Y MUERTE CELULAR.
MEDIANTE LIPOSOMAS	VESÍCULAS ESFÉRICAS MICROSCÓPICAS CARGADAS DE ADN; LA TRANSFECCIÓN (LIPOFECCIÓN) OCURRE A TRAVÉS DE LA FUSIÓN DE MEMBRANAS Y LA ENDOCITOSIS; UTILIZADO PARA LA TRANSFECCIÓN DE PROTOPLASTOS; ES LABORIOSO Y MENOS EFICIENTE.
MICROINYECCIÓN	EMPLEANDO UNA PIPETA DE MICROINYECCIÓN CAPILAR DE VIDRIO (MICROMANIPULADOR) PARA LA INTRODUCCIÓN DE ADN EN EL NÚCLEO O EL CITOPLASMA; PROVOCA LA LIBERACIÓN DE HIDROLASAS Y COMPUESTOS TÓXICOS DE LA VACUOLA
POLLEN-TUBE PATHWAY (PTP) METHOD	EL ADN SE APLICA A LOS ESTILOS POCO DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN PARA QUE EL ADN LLEGUE AL ÓVULO FLUYENDO POR EL TUBO POLÍNICO; BAJA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN
ELECTROFORESIS	LOS EMBRIONES COLOCADOS ENTRE LAS PUNTAS DE DOS PIPETAS CONECTADAS A ELECTRODOS Y EL ELECTRODO NEGATIVO CONTIENEN AGAR MEZCLADO CON ADN
MÉTODO QUÍMICO	TRANSFECCIÓN POR FOSFATOS DE CALCIO; MÉTODO DIFÍCIL DE REPRODUCIR Y BAJAS EFICIENCIAS DE TRANSFECCIÓN; DEGRADACIÓN ISOSOMAL DEL ADN Y FALTA DE SU TRANSLOCACIÓN AL NÚCLEO
IMBIBICIÓN	CAPTACIÓN DE ADN POR EMBRIONES COLOCADOS EN SOLUCIONES DE ADN; UTILIZADO PRINCIPALMENTE PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA TRANSITORIA
CARBURO DE SILICIO	CRISTALES DE CARBURO DE SILICIO EN MEDIO LÍQUIDO QUE CONTIENE ADN Y CÉLULAS VEGETALES; LOS CRISTALES PERFORAN FÍSICAMENTE LA PARED CELULAR FACILITANDO LA ENTRADA DEL ADN; BAJA EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN Y MENOR CAPACIDAD DE REGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS DEBIDO AL FUERTE DAÑO.

1.3.2 Transformación mediante *Agrobacterium Tumefaciens*

A. Tumefaciens es una bacteria Gram-negativa del suelo la cual infecta y causa tumores en una amplia variedad de especies de plantas, produciendo la enfermedad de la agalla de la corona (Tiwari *et al.*, 2022).

Se caracteriza por tener la capacidad de transferir material genético desde un plásmido propio hacia el genoma de diferentes especies (Tzfira & Citovsky, 2007). Dicha capacidad, se denomina virulencia y al proceso por el cual ocurre, transformación.

La propiedad de virulencia de *Agrobacterium* está determinada por sus genes de virulencia cromosómica (*chv*) y genes de virulencia del plásmido Ti (*virA*, *virB*, *virG*, *virC*, *virD* y *virE*) (He *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013).

La virulencia de *Agrobacterium* se desencadena por:

- Compuestos fenólicos secretados por las plantas en respuesta a lesiones: acetosiringona e hidroxiaacetosiringona (Stachel *et al.*, 1985).
- Condiciones ácidas (pH 5,5), que aumentan la expresión de genes *Vir* (Yuan *et al.*, 2008).
- Monosacáridos de la pared celular de la planta que son reconocidos por *Agrobacterium* mediante receptores transmembrana que, en última instancia, inducen la síntesis de genes *Vir* (Cangelosi *et al.*, 1990).

La base molecular de la transformación genética de las células vegetales mediante *Agrobacterium* es la transferencia e integración desde la bacteria (de una región determinada del plásmido Ti) al genoma nuclear de la planta. El proceso se puede resumir en una serie de 8 pasos (Fig. 2)

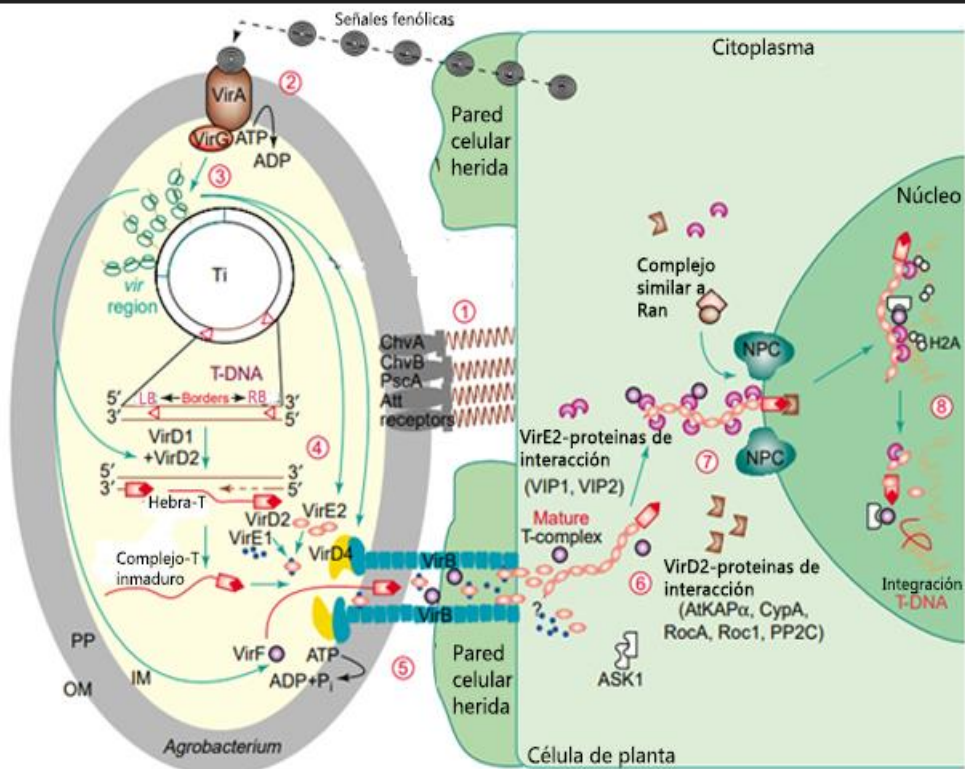


FIGURA 2. BASE MOLECULAR DEL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.

El proceso de transformación e integración se puede resumir en 8 pasos: Como respuesta a heridas en la superficie vegetal y la liberación de compuestos fenólicos y azúcares, *Agrobacterium* es quimioatraída hacia el sitio, como consecuencia de ello se desencadena el proceso de transformación. 1- Reconocimiento célula-célula: intervienen proteínas de unión (ChvA, ChvB, PscA) que reconocen y se unen a receptores propios de la superficie celular vegetal. 2- Reconocimiento de compuestos fenólicos por VirA: induce la autofosforilación que determina la transfosforilación de VirG un regulador transcripcional. 3- Activación de promotores de genes Vir: VirG un factor de transcripción, induce la activación y síntesis de genes Vir. 4- Generación de la cadena T móvil: VirD1 (helicasa) y VirD2 (nucleasa), interactúan entre sí, para formar una endonucleasa que reconoce el borde derecho (RB) e izquierdo (LB) produciendo una mella en el T-DNA, VirD2 reconoce el extremo 5' y forma un complejo con la hebra T inmaduro. 5- Transporte de la cadena T y proteínas Vir al interior celular: mediante un sistema de secreción de tipo IV(T4SS) se movilizan al interior de la célula vegetal, el complejo inmaduro (hebra T-VirD2) y varias proteínas Vir (VirD5, VirE2, VirE3 y VirF) 6- Formación de cadena T madura: en el interior de la célula vegetal, la hebra T inmadura se empaquetan en un cilindro hueco, formado por VirE2, dando como resultado la cadena T madura. 7- Importación del complejo T al núcleo mediado por AtKAPα, VIP1 y Ran: VirD2, VirE2, tienen señales de importación nuclear. 8- Transporte nuclear e integración al genoma: la cadena T en el núcleo, pasa de monohebra a ADN doble hebra. Es posible que la interacción entre VIP1/2 con VirE2 formen un complejo proteico que media el transporte intranuclear hacia zonas del cromosoma donde el ADN se encuentre más expuesto, los mecanismos de integración son poco conocidos, Gelvin (2017) propone 4 posibles mecanismos de integración. (Adaptado de Tzfira & Citovsky, 2002).

En el proceso de transformación e integración, 3 componentes son indispensables (Wijayanti *et al.*, 2021) para llevar adelante la transferencia horizontal desde *Agrobacterium* hacia células de otro reino:

-Genes de virulencia ubicados en el cromosoma de *Agrobacterium*: *chv*

-Genes de virulencia ubicados en el plásmido Ti: *Vir*

-Borde izquierdo (LB) y derecho (RB), que delimitan el ADN destinado a ser transferido, con un tamaño de 25 pb (Veluthambi *et al.*, 1988).

Los genes del plásmido Ti ubicados en la región Vir, pueden funcionar en trans, para mediar la transferencia hacia el núcleo vegetal de la región T-DNA,

delimitada por los bordes derechos e izquierdos (Hellens *et al.*, 2000). Los genes nativos de la región T, no son indispensables para el proceso de transformación e integración (Frammond *et al.*, 1983; Hellens *et al.*, 1999), por lo que se pueden eliminar y remplazar por otros, pero manteniendo los bordes, los cuales resultan ser indispensables. El diseño de *Agrobacterium* puede emplear una estrategia binaria o co-integrada. La primera aprovecha la propiedad de los genes *Vir* de funcionar en trans, ubicando dichos genes en un plásmido pequeño y un segundo plásmido que contiene la región a transferir (Fig. 3A). La estrategia co-integrada emplea un único plásmido grande que contiene todo lo necesario para la transformación en su interior (Fig. 3B).

Las características propias de *Agrobacterium* facilitan ampliamente la utilización y el diseño de vectores para transferir genes a diferentes especies del reino vegetal (Hellens *et al.*, 2000).

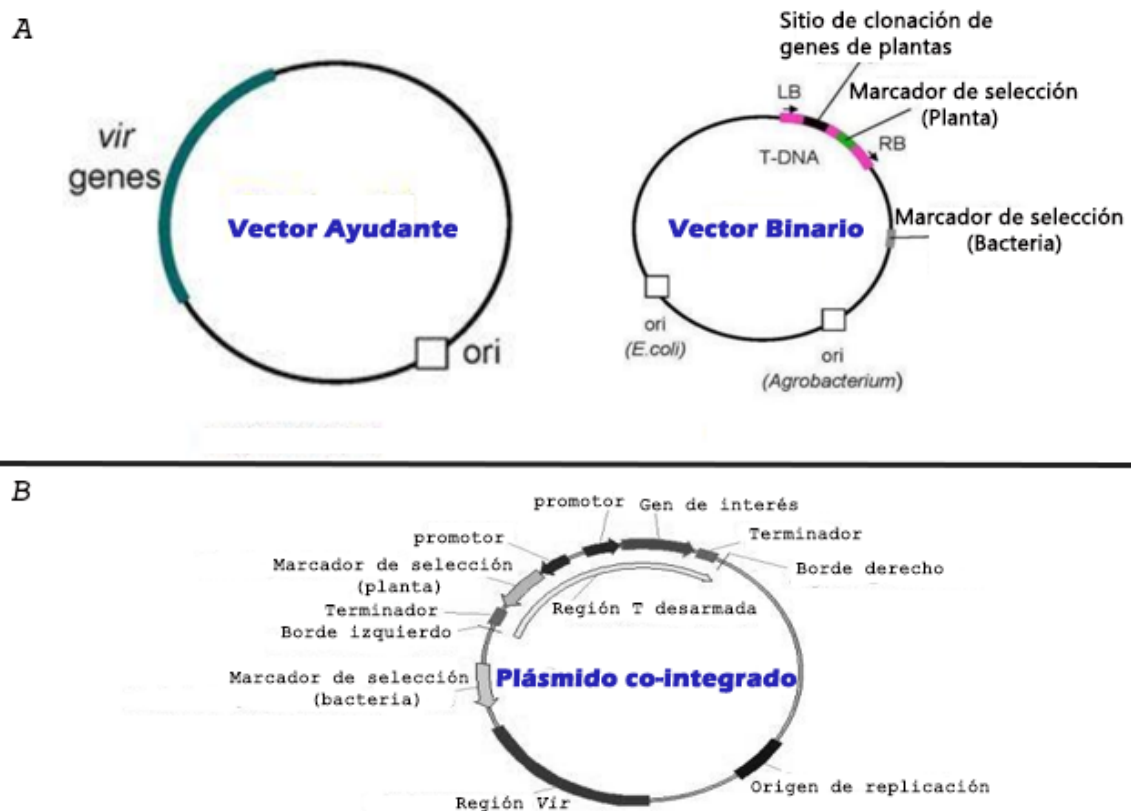


FIGURA 3. POSIBLES ESTRATEGIAS DE DISEÑO EN AGROBACTERIUM TUMEFACIENS. (A) Diseño binario, dos plásmidos,; uno portador de genes *Vir* (*Ti* plásmido) y otro portador de los genes a transferir (vector binario). (B) Diseño co-integrado, todo en uno.

1.3.3 CRISPR-Cas

1.3.3.1 Generalidades

El sistema CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated protein*), es un sistema inmunitario adaptativo (Barrangou *et al.*, 2007) mediado por ARN en bacterias y arqueas que brinda defensa contra fagos y otros elementos genéticos invasivos mediante el reconocimiento y degradación de ADN exógeno (Makarova *et al.*, 2015; Pickar-Oliver & Gersbach, 2019).

Se descubrió en 1987 en *Escherichia coli* (Ishino *et al.*, 1987), alcanzando su popularidad como sistema de edición a partir del 2012 (Jinek *et al.*, 2012), donde se demostró por primera vez que CRISPR-Cas podía programarse para la escisión de ADN *in vitro*.

Los *loci* CRISPR normalmente consisten en una matriz formada por repeticiones directas no contiguas separadas por tramos de secuencias variables llamados espaciadores (que en su mayoría corresponden a segmentos de secuencias plasmídicas y virales capturadas) que a menudo son adyacentes a genes cas (asociados a CRISPR) (Pourcel *et al.*, 2005; Bolotin *et al.*, 2005; Horvath & Barrangou, 2010; Marraffini, 2015). Precediendo a la matriz, una secuencia rica en A-T, conocida como líder, controla la transcripción de la misma (Pougach *et al.*, 2010). Los microbios pueden contener más de un *locus* CRISPR, encontrándose principalmente en los cromosomas, y en menor medida en algunos plásmidos (Mojica *et al.*, 2005).

1.3.3.2 Mecanismo de acción

Dentro de los diferentes mecanismos de defensa que presentan las bacterias para protegerse de los ácidos nucleicos exógenos (plásmidos, virus), CRISPR brinda la posibilidad de ejecutar una respuesta inmune que se puede ir adaptando continuamente (Barrangou, 2015).

El mecanismo inmunológico de CRISPR-Cas generalmente se desarrolla en 3 etapas (Makarova *et al.*, 2020):

1º. Adaptación de secuencias espaciadoras: La fase de adaptación ocurre en dos pasos; en primer lugar, proteínas diferentes a Cas identifican ADN de elementos genéticos móviles invasivos y obtienen de ellos secuencias específicas de ácidos nucleicos las cuales se denominan "protoespaciadores". En segundo lugar, se incorpora el protoespaciador en el extremo 5' de la secuencia líder en la matriz CRISPR como un "espaciador" (Fig. 4A) (Pourcel *et al.*, 2005). Los espaciadores son los responsables de desarrollar la inmunidad y memoria inmunológica.

2º. Expresión y maduración: En esta fase, la secuencia líder situada corriente arriba de la matriz CRISPR, actúa como promotor e inicia la transcripción de la misma, dando lugar a un precursor largo de ARN CRISPR o pre-crRNA que, posteriormente, es procesado para dar lugar a secuencias cortas de ARN CRISPR, conocidos como crRNA (Pougach *et al.*, 2010)(Fig. 4B).

El proceso de maduración depende de las clases de CRISPR-Cas. Las de clase I emplean una ribonucleasa dedicada exclusivamente a este proceso, mientras que las de clase II se valen de la misma maquinaria empleada en la etapa de interferencia (Nussenzweig & Marraffini, 2020).

3º. Interferencia: Durante la fase de interferencia, los crRNA maduros se combinan con una (tipo II) o varias (tipo I y III) proteínas Cas, resultando en un complejo efector que reconoce elementos genéticos móviles extraños (a través del emparejamiento de bases complementarias a la secuencia del crRNA) y, en última instancia, los cortan (Amitai & Sorek, 2016) (Fig. 4C).

Una pequeña secuencia adicional (PAM) es necesaria para ejecutar la función del complejo crRNA-Cas (Mojica *et al.*, 2009). PAM consta de unos pocos pb (2-5) y su secuencia es reconocida por Cas. Dicho complejo, despolimeriza la doble hebra de ADN y realiza el chequeo de complementariedad entre la hebra de ADN opuesta a PAM y la secuencia crRNA del complejo Cas-crRNA (Saprunauskas *et al.*, 2011; Gleditzsch *et al.*, 2019).

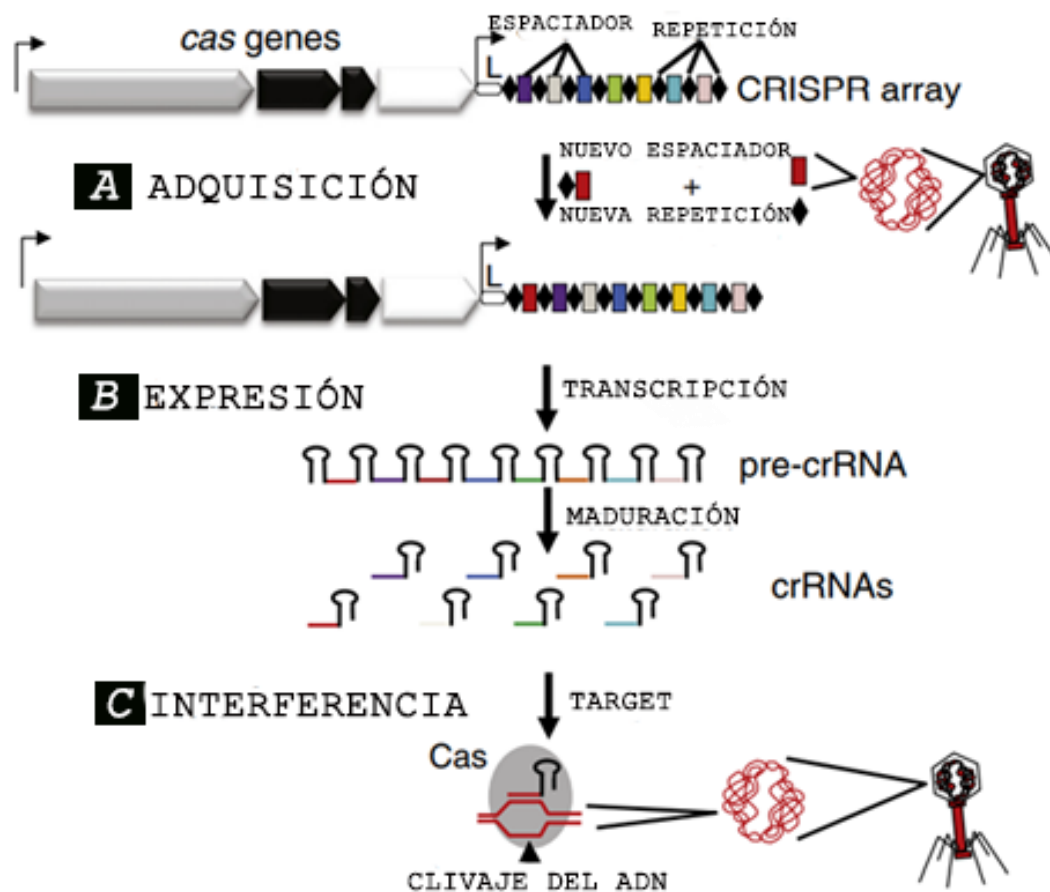


FIGURA 4. SISTEMA INMUNITARIO MEDIADO POR CRISPR.

Loci CRISPR conformado por diferentes genes Cas (rectángulo en flecha), secuencia líder en dirección 5' (L), matriz CRISPR, que consta de espaciadores (rectángulos de color) y repeticiones cortas no codificantes (rombos oscuros). (Adaptado de Barrangou 2015).

1.3.3.3 Clasificación

Los sistemas CRISPR-Cas muestran una notable diversidad en términos de: composiciones de genes, arquitectura del *locus* genómico, secuencias, e incluso entre los genes centrales (Makarova *et al.*, 2018). Por lo que para su clasificación se ha optado por realizar un enfoque múltiple, basado en su composición génica, arquitectura de *loci*, y análisis filogenético de la proteína Cas.

Los sistemas CRISPR-Cas pueden dividirse en dos clases según sus moléculas efectoras involucradas en el procesamiento e interferencia (Makarova *et al.*, 2015) (Fig. 5A):

Clase 1: Los sistemas CRISPR-Cas de clase 1 se caracterizan por la presencia de un complejo efector crRNA de múltiples subunidades. La clase incluye sistemas CRISPR-Cas de tipo I más común y diversificado, tipo III, y tipo IV (Fig. 5B).

Clase 2: Los sistemas CRISPR-Cas de clase 2 presentan una organización mucho más simple en relación a los de clase 1. Se caracterizan por la presencia de un módulo efector de crRNA de una sola subunidad grande, multidominio y multifuncional. Combina todas las actividades necesarias para la interferencia y, en algunas variantes, también las involucradas en el procesamiento de pre-crRNA. Incluyen el tipo II (con el gen característico Cas9), los tipos V (difieren entre sí por la arquitectura de dominio de sus proteínas efectoras) y VI (más raros), cada uno con una arquitectura única de la proteína efectora (Fig. 5B).

Ambas clases contienen diferentes subtipos que se expanden permanentemente (Makarova *et al.*, 2020).

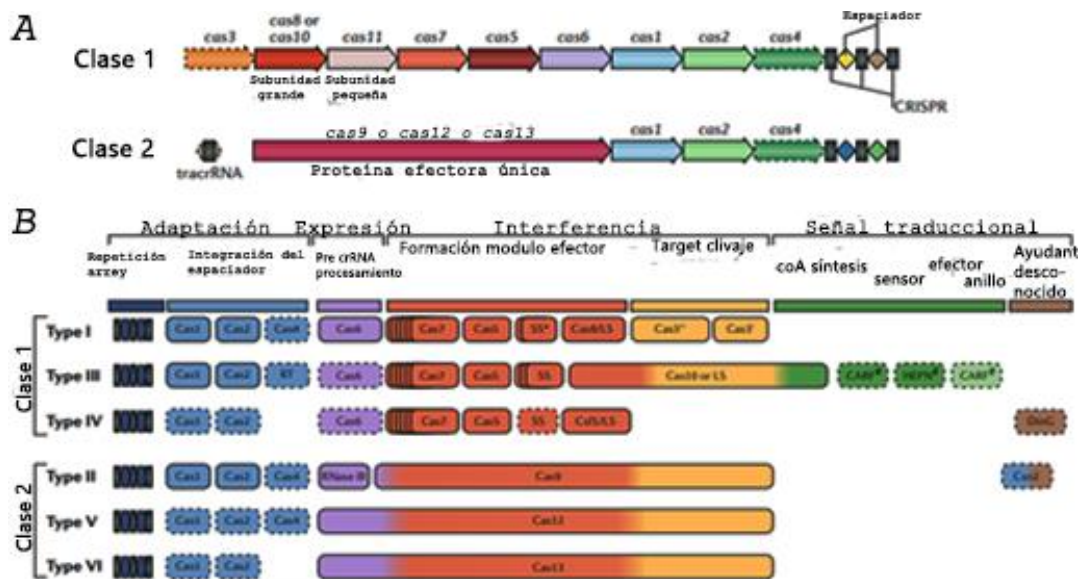


FIGURA 5. SISTEMAS CRISPR-CAS Y SU ORGANIZACIÓN. (A) Se ilustra la organización genérica de los loci CRISPR de clase 1 y 2. (B) Muestra los módulos funcionales del sistema CRISPR/Cas para los diferentes tipos (I a VI) existentes en cada una de las dos clases. El # indica que otras proteínas podrían estar implicadas en la vía. (Adaptado de Makarova *et al.* 2019).

1.3.3.4 CRISPR-Cas9 en edición genómica

La edición genómica consta de varias técnicas empleadas en la ingeniería genética que permiten incorporar modificaciones específicas de sitio en el ADN genómico empleando los mecanismos de reparación del ADN (Rodríguez *et al.*, 2019).

Las plantas editadas se diferencian de las plantas transgénicas en que no necesariamente requieren incorporar ADN extraño a su genoma, pudiendo inducir cambios de algunos pocos pares de bases en el ADN de la planta, haciendo de la edición una herramienta muy poderosa con múltiples aplicaciones (Malzhan *et al.*, 2017; Scheben *et al.*, 2017).

Desde el primer experimento dirigido a genes en protoplastos de tabaco (Paszowski *et al.*, 1988) y el descubrimiento de que las roturas en la doble hebra (DSB) del ADN pueden utilizarse para realizar mejoras genéticas (Puchta *et al.*, 1993), se han buscado desarrollar herramientas para mejorar la edición dirigida del genoma de las plantas.

Las nucleasas específicas de secuencia (SSN) inducen rotura de la doble hebra de ADN en ubicaciones específicas del genoma, estimulando los mecanismos de reparación del ADN: reparación no homóloga (NHEJ) o dirigida por homología (HDR), pudiendo introducir alteraciones en el genoma (Fig. 6) (Rudin *et al.*, 1989; Plessis *et al.*, 1992). La vía predominante en las células somáticas de plantas superiores es NHEJ; sin embargo, cuando hay secuencias homólogas disponibles en las cromátidas hermanas o cerca del sitio de ruptura, puede ocurrir a través de HDR (Puchta, 2005).

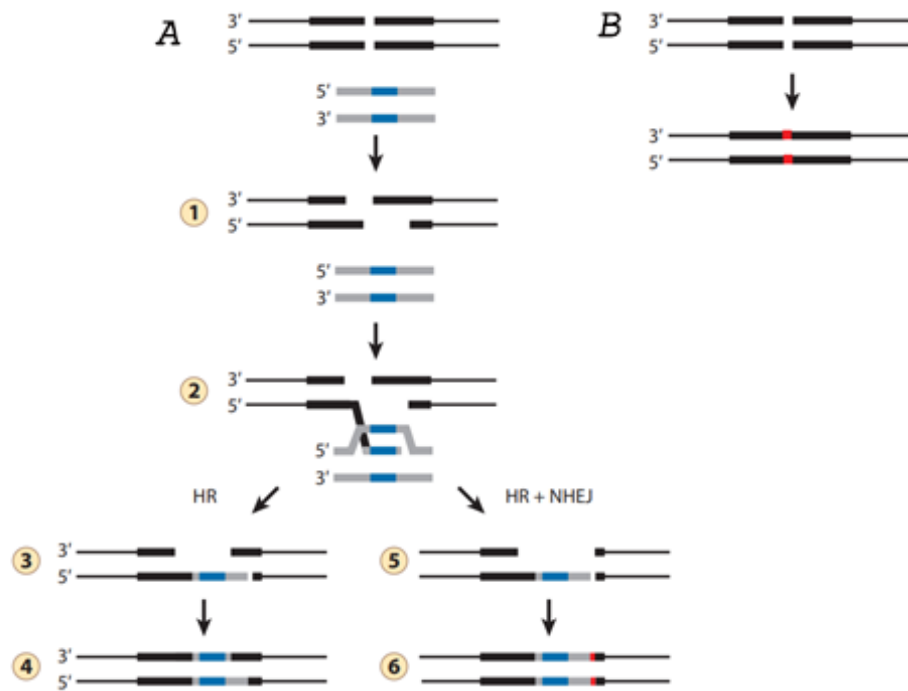


FIGURA 6. PRODUCTO GENERADO POR DSB Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE REPARACIÓN.

(A) Mecanismo de reparación SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*): Se introduce una rotura de cadena mediante una nucleasa específica, acompañado por un ADN plantilla donde las regiones azules en la plantilla de reparación representan la modificación de la secuencia que se incorporará al genoma; las regiones grises representan ADN con homología con el gen objetivo. 1: DSB genera una molécula monocatenaria con extremo 3' libre. 2: El extremo 3' libre invade la plantilla dsDNA que actúa como donante de información genética y contiene secuencias homologas al sitio de rotura. 3 y 4: El extremo 3' de la hebra invasora se alarga, utilizando la plantilla dsDNA como matriz (HR), posteriormente el extremo 3' se libera y se vuelve a reconocer con su hebra complementaria original. La molécula resultante contiene espacios que son rellenados utilizando la hebra complementaria. 5 y 6: Si el extremo 3 de la hebra invasora no puede encontrar secuencias complementarias en el objetivo roto, la ruptura se repara mediante una combinación de HR y NHEJ. Las regiones rojas denotan inserciones o eliminaciones creadas a través de NHEJ impreciso. (B) Después de la formación de DSB, NHEJ se reincorpora a la ruptura, que puede introducir inserciones o eliminaciones en el sitio de ruptura.

Existen cuatro mecanismos principales de edición del genoma que emplean la rotura de la doble hebra (Fig. 2): las meganucleasas (MegN), las nucleasas con dedos de zinc (ZFN), la nucleasa efectora TAL (TALEN) y CRISPR-Cas (Khalil, 2020).

El sistema CRISPR-Cas presenta importantes diferencias con los demás métodos, principalmente en la forma de dirigir la enzima hacia el sitio objetivo, empleando una secuencia basada en ARN lo que brinda alta versatilidad, bajo costo y facilidad de diseño (Belhaj *et al.*, 2015; Bortesi & Fischer, 2015).

El sistema CRISPR-Cas tipo II, fue el primero en demostrar que podía escindir el ADN tanto *in vitro* como en células eucariotas, brindando una

poderosa herramienta de edición genómica (Deltcheva *et al.*, 2011; Jinek *et al.*, 2012). Dicho sistema requiere solo de dos componentes, una proteína Cas9, y una sgRNA (single guide RNA) obtenida de la fusión de una molécula pequeña de ARN CRISPR (crRNA) y un ARN trans-activador (tracrRNA).

La estructura del sgRNA es simple, consta de una región constante (Fig. 7, coloración rojiza) que sirve de andamio para Cas9 y una región variable de 20 nucleótidos en el extremo 5' (Fig. 7, color naranja) que determinan el sitio de escisión.

Cas9 presenta una arquitectura bilobulada, conformada por una proteína globular de reconocimiento (REC) y un lóbulo pequeño de nucleasa (NUC) el cual consta de dos dominios nucleasa: RuvC y HNH. Ambos, cortan las cadenas de ADN, HNH la complementaria al sgRNA y RuvC la cadena opuesta (Gasiunas *et al.*, 2012; Romero & Gatica-Arias 2019).

El sitio objetivo del complejo Cas9-sgRNA se puede dividir en dos partes principales: el protoespaciador (Fig. 7, complementario a la secuencia de 20 nt del extremo 5' en el sgRNA) y el motivo adyacente del protoespaciador (Fig. 7, PAM) al cual se une Cas9 (Sternberg *et al.*, 2014; Szczelkun *et al.*, 2014). La secuencia PAM reconocida por Cas9 obtenida de *Streptococcus pyogenes* debe poseer la forma 5'-NGG-3' (existen otras proteínas Cas que reconocen otras secuencias) y debe ubicarse inmediatamente 3' de la secuencia de reconocimiento de 20 nt (Cui *et al.*, 2018).

En la naturaleza existen una gran variedad de ortólogos Cas9 con diferentes características efectoras y sitios PAM alternativos (Ran *et al.*, 2015).

En caso que el protoespaciador se empareje con la secuencia de 20 nt del extremo 5' (formación de heterodúplex ADN:ARN) y Cas9 se una con PAM, se ejecutaría la rotura de doble cadena (DSB) en un sitio específico ubicado 3 pb corriente arriba del sitio PAM (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012), induciendo la activación de los sistemas de reparación del ADN previamente explicados (Fig. 6).

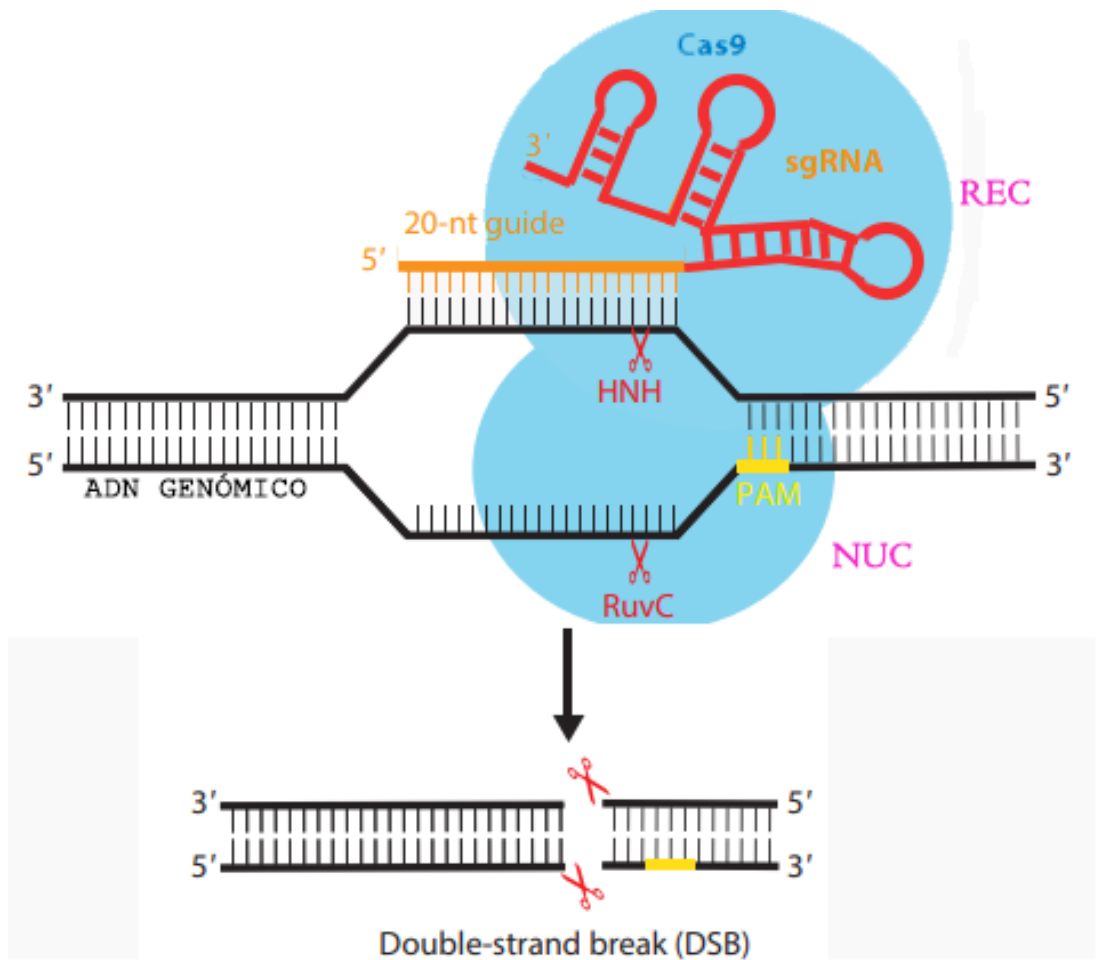


FIGURA 7. ILUSTRACIÓN DEL SISTEMA CRISPR-CAS9. Estructura bilobulada Cas9, con un lóbulo superior REC y uno inferior NUC, en este ultimo los dominios nucleasa HNH y RuvC (tijeras). Secuencia PAM en amarillo, y en naranja, la secuencia guía complementaria al protoespaciador. Sección inferior el resultado de la rotua de doble hebra. (Adaptado de Jiang et al. 2017).

1.4 Biología sintética

La biología sintética emplea principios de ingeniería para reprogramar sistemas vivos (Haseloff & Ajioka, 2009). Tiene como objetivo el diseño de formas vivas artificiales que muestren nuevos rasgos que no existen en la naturaleza. Esto se puede lograr ensamblando diferentes componentes básicos, desde los más simple (promotores, secuencias de codificación, terminadores, etc.) hasta la obtención de unidades transcripcionales (UT) complejas.

La biología sintética apunta a desarrollar sistemas estándar de ensamblaje para piezas básicas que resulten indiferentes a las identidades de las partes permitiendo la reutilización y automatización de los mismos.

1.4.1 Golden Gate

El sistema de clonado *Golden Gate* surge por la necesidad de poder clonar fragmentos de ADN sin tener que utilizar la recombinación específica de sitios (*Gateway*, *Creator cloning system*, *Univector cloning system*, etc). Dicha tecnología se basa en la utilización de enzimas de restricción del tipo II.

Las endonucleasas de restricción se encuentran en todos los procariontes, donde su función principal radica en proteger el genoma del huésped contra ADN extraño mediante la escisión dirigida (sitio específica) (Arber, 1979).

En la naturaleza se encuentran 3 tipos de enzimas de restricción: tipo I, II y III (Pingoud & Jeltsch, 2001), según las subunidades que las componen, cofactor necesario, y tipo de acción.

El principal criterio para clasificar una endonucleasa de restricción como una enzima de tipo II es que el ADN se escinda dentro o cerca de su sitio de reconocimiento y que no requiera hidrólisis de ATP para su actividad nucleolítica. Así mismo las enzimas de tipo II se pueden clasificar en diferentes subtipos según características específicas (Orlowski & Bujnicki, 2008).

Las enzimas tipo II subtipo S, son las utilizadas en el sistema de clonado *Golden Gate* ya que reconocen secuencias de ADN asimétricas y cortan por fuera de su secuencia de reconocimiento a una distancia específica dependiente de la enzima empleada. Estas características, permiten diseñar un método de clonado en un único paso-reacción, con alta eficiencia, donde un fragmento de ADN (de un clon de entrada) se agrega a un vector de expresión (Fig. 8).

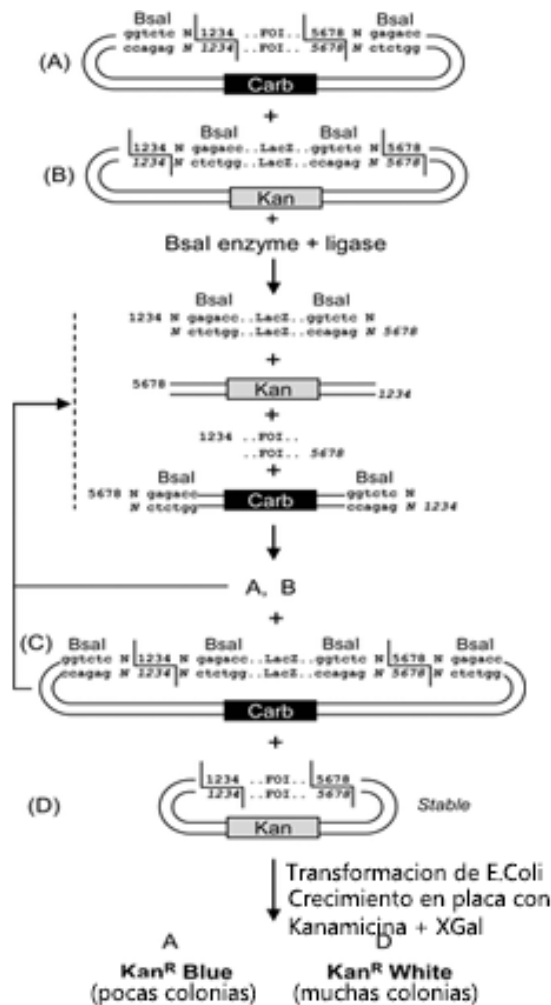


FIGURA 8. ESTRATEGIA GOLDEN GATE.

El clon de entrada (A) y el vector de expresión (B) se mezclan en un tubo junto con BsaI (ER IIS) y ligasa. De los 4 productos de ligación posibles: A a D, solo D, es estable, mientras que todos los demás se vuelven a digerir con BsaI. Los números del 1 al 8 indican variación de nucleótido y los números en cursiva indican los nucleótidos complementarios. FOI: fragmento de ADN de interés. (Adaptado de Engler et al. 2008).

El poder de este sistema proviene del hecho de que el único producto estable emitido por una ligadura de restricción es el plásmido recombinante deseado (Fig. 8D) mientras que todas las demás combinaciones son sustrato para la redigestión de BsaI (Fig. 8C).

Golden Gate sirve como andamio para el ensamblaje múltiple de diferentes partes. Aplicando un cuidadoso diseño de cortes con enzimas de restricción, se puede obtener en un único paso un ensamblaje perfecto de diferentes componentes.

1.4.2 GoldenBraid (GB)

GoldenBraid es un sistema de clonado que permite la estandarización y reutilización de *Golden Gate* para su uso en biología sintética (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2011).

Los ensamblajes de GB implican tres pasos de clonación consecutivos (Vazquez-Vilar *et al.*, 2020): domesticación (Fig. 9), ensamblaje de unidades transcripcionales multipartitas (Fig. 10) y ensamblaje multigénico binario (Fig. 11).

La secuencia de ADN de interés a clonar requiere de un proceso de adaptación al sistema GB, denominado domesticación, donde:

- Se eliminan las posibles secuencias internas reconocidas por enzimas de restricción tipo II S empleadas en el sistema GB (BsmBI y BsaI), y se adicionan colas de restricción para la enzima BsaI.

- Se suma un código de 4 nucleótidos en los extremos de las secuencias de ADN que determinará su posicionamiento en la UT.

- Se clona el producto de PCR en el plásmido de domesticación de partes pUPD.

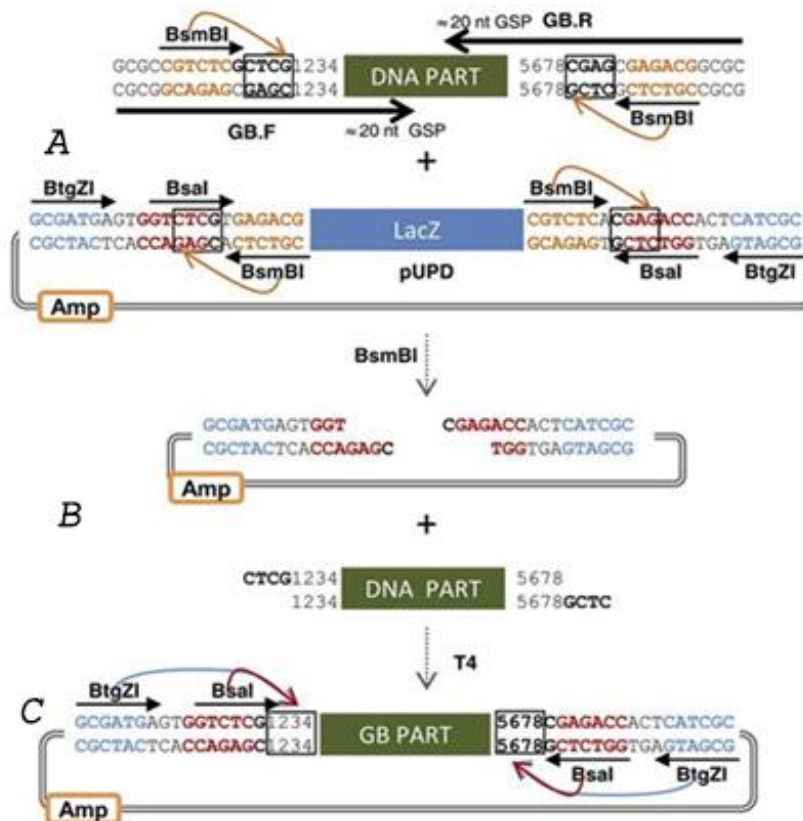


FIGURA 9. PROCESO DE DOMESTICACIÓN Y OBTENCIÓN DE GBPARTS.

La parte más básica del sistema de clonado GB se denominan GBparts, las cuales se obtienen a partir de un proceso de domesticación de la secuencia de ADN de interés (DNA PART en a). El proceso de domesticación para obtener plásmidos nivel 0 generalmente consta de: PCR del ADN de interés (DNA PART), utilizando cebadores GB (A), los cuales contienen 20 nt complementarios al ADN de interés, y agrega una cola extra que incorpora sitios de reconocimiento para BsmBI, y un código de 4 nucleótidos en cada extremo que determina su posición en construcciones de plásmidos superiores. El plásmido pUPD se digiere con BsmBI, liberando el gen reportero LacZ (B), y quedando abierto para que solo pueda ingresar el resultado de la digestión del ADN resultante de la PCR en a. Utilizando T4 ligasa, se obtiene el plásmido pUPD junto con el ADN de interés (C), flaqueado por sitios BtgZI y Bsal que pueden dar el saliente GBpart flaqueado por un código de nucleótidos específico (1234, y 5678) para realizar construcciones superiores. (Sarrion-Perdigones et al 2013).

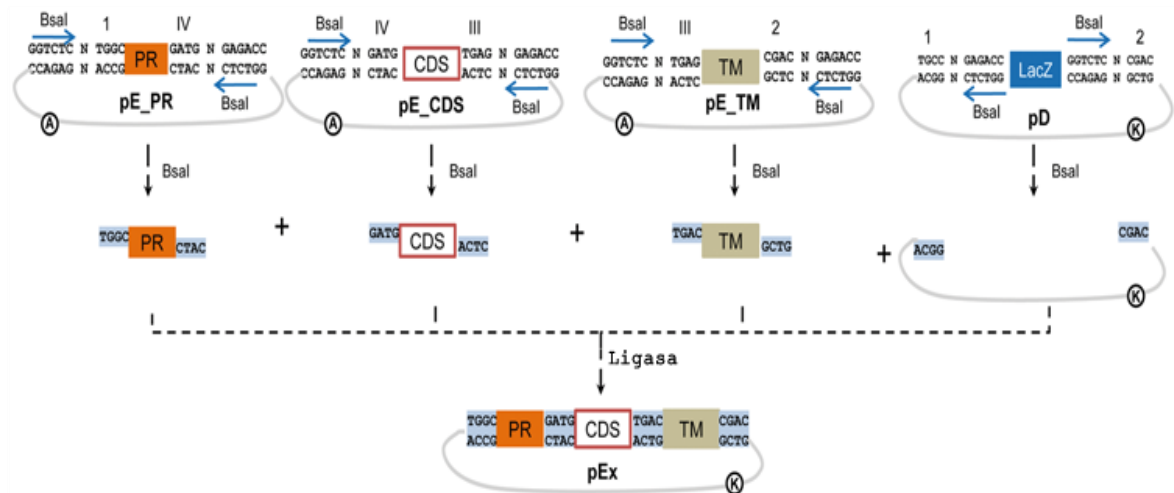


FIGURA 10. ESTANDARIZACIÓN EN EL DISEÑO DE UN VECTOR DE EXPRESIÓN A PARTIR DE ELEMENTOS NIVEL 0.

pE: plásmidos de entrada nivel 0, que contienen partes básicas como promotores (PR), secuencias codificantes (CDS), y terminadores (TM). Los salientes resultantes de la digestión por Bsal, están flaqueados por un código específico de 4 nucleótidos (1, IV, III, y 4) definidos en la domesticación. Las partes constituyentes pE, se incuban con un plásmido destino pD que contiene LacZ flaqueado por sitios de corte para Bsal, se crea un plásmido de expresión pEx (nivel 1) que contiene los elementos básicos ordenados correctamente y ausencia del gen LacZ. Una característica importante, es que en el sistema representado no permite la reutilización. (Sarrion-Perdiquones et al. 2011)

Las partes clonadas en el plásmido pUPD se denominan de nivel 0 (Fig. 9C). El plásmido de nivel 0 permite la obtención de UT incorporando elementos obtenidos por su digestión a plásmidos de destino (pDGB) dando estructuras de mayor nivel y permitiendo crear grandes construcciones multigénicas (Vazquez-Vilar et al., 2016).

Los plásmidos destino incorporan una segunda enzima de restricción BsmBI, que permite utilizar una estrategia de doble bucle (ensamblaje binario), alternando entre Bsal y BsmBI, permitiendo la reutilización (Fig. 11).

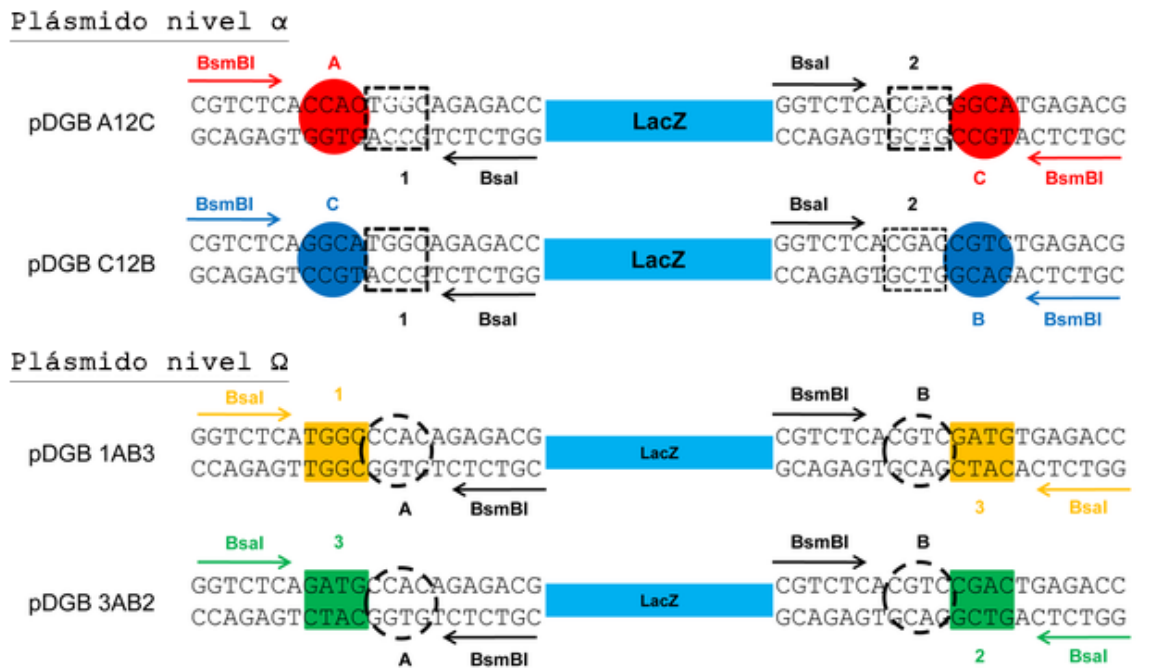


FIGURA 11. DISEÑO DE UN SISTEMA REUTILIZABLE PARA GOLDEN BRAID.

El conjunto de plásmidos GB comprende cuatro plásmidos de destino (pDGB que brindan un sistema de clonado sin fin), dos de ellos actúan como plásmidos de destino para el ensamblaje de nivel α (nivel 1) y los dos restantes funcionan como plásmidos de destino para el nivel Ω (nivel 2). Todos los vectores pDGB incorporan un casete de selección LacZ flanqueado por cuatro sitios de restricción tipo IIS (BsaI, BsmBI), pero colocados en posiciones y orientaciones invertidas, con diferentes resistencias a antibióticos que facilitan su selección (Kanamicina para nivel α y espectinomicina para Ω). Las flechas hacen referencia al sitio y sentido de reconocimiento de la enzima; los cuadros y círculos indican el sitio de corte. (Sarrion-Perdigones et al. 2011).

Han salido nuevas versiones de GB a través del tiempo, en la versión 3.0 se incorporó una web en línea, que brinda herramientas de clonado asistidas por software y un repositorio de elementos genéticos de plantas. La actualización más reciente, GB 4.0, incorpora nuevas facilidades para el desarrollo del sistema de edición génica mediante CRISPR-Cas en plantas (Vazquez-Vilar et al., 2021).

El vector que expresa el sistema CRISPR-Cas requiere como mínimo de 3 unidades transcripcionales (UT):

- Marcador de selección para planta
- Nucleasa Cas
- Una ARNs como mínimo

Se recomienda que cuando se diseña un proyecto de edición basado en CRISPR-Cas se emplee más de una guía, para lo que, se pueden diseñar diferentes UT cada uno con un promotor y ARNs específico, o bien, diseñar un

único transcripto policistrónico que posteriormente sea procesado para dar como resultado ARNs individuales.

En 2015 Xie *et al.*, presentó un método de procesamiento altamente eficaz en plantas, basado en el procesamiento de los precursores de ARNt (pre-ARNt).

En el nucleoplasma, los pre-ARNt se escinden en sitios específicos (Fig. 12A) para eliminar las secuencias adicionales 5' y 3'. Proceso realizado en eucariotas por RNasa P y RNasa Z. Dichas enzimas, reconocen la estructura del ARNt independientemente del resto de secuencias, por lo que, agregar espaciadores de ARNt entre las guías, permite el diseño de un gen policistrónico. Este sistema de procesamiento del pre-ARNt, genera guías individuales a partir de un único transcripto (Fig. 12C).

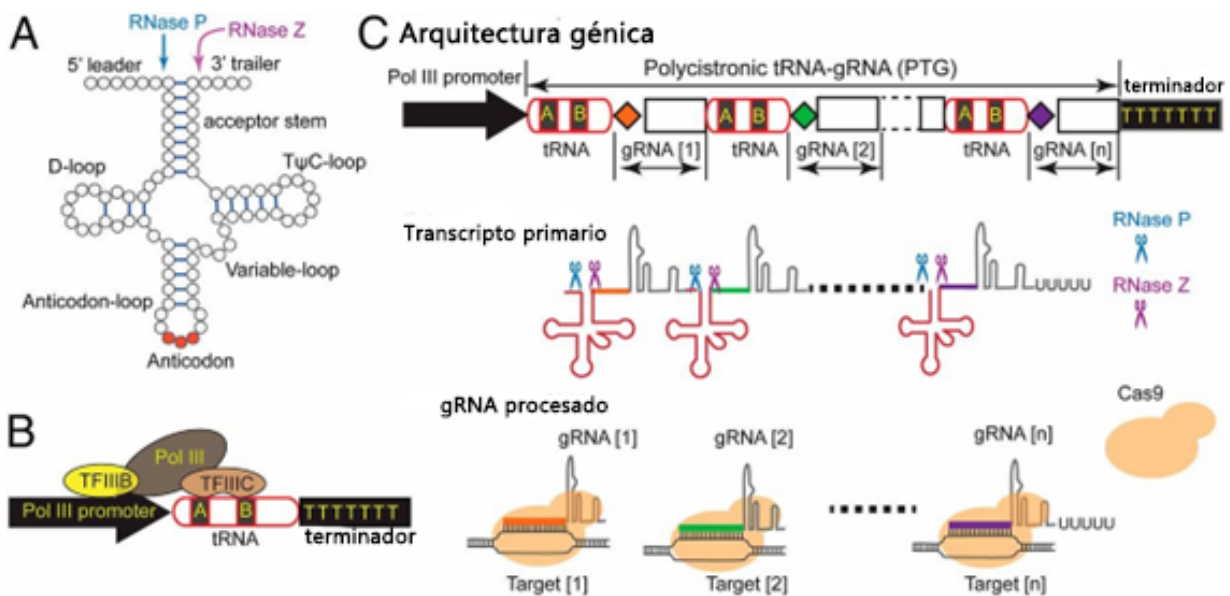


FIGURA 12. SISTEMA DE PROCESAMIENTO DE PRE-ARNt Y SU APLICACIÓN PARA OBTENER MÚLTIPLES GUÍAS.

(A) El pre-ARNt con 5' líder y 3' trailer, es escindido por RNase P y RNase Z en sitios específicos. (B) Muestra la secuencia de síntesis de ARNt y dos promotores internos (cajas A y B), que se unen a TFIIIC, para posteriormente reclutar el resto de elementos implicados en el inicio de la transcripción. (C) Esquema PTG, que consta de unidades de ARNt-ARNg dispuestas en tándem. Cada ARNg consta de espaciadores específicos (diamantes) y regiones conservadas (rectángulo). La transcripción primaria de PTG es escindida por la RNasa P y la RNasa Z endógenas (mostradas como tijeras) para liberar gRNA y tRNA maduros (líneas rojas de estructura de hoja de trébol). Los gRNA maduros extirpados dirigen Cas9 a múltiples objetivos. (Adaptado de Xie *et al.* 2015).

Empleando el sistema de clonado *GoldenBraid*, CRISPR-Cas, y el armado de transcriptos policistrónicos, se pueden obtener vectores de expresión altamente eficaces para la edición dirigida en plantas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La optimización de las técnicas de cultivo, transformación y edición permiten obtener plantas transformadas de la variedad Don Justo F.C.A y F con toda la maquinaria necesaria para editar el gen *badh2*.

2.2 Objetivo general

Obtener plantas de arroz que presenten edición del gen *badh2*.

2.3 Objetivos específicos

- A) Optimizar métodos de cultivo *in vitro* (inducción de callos embriogénicos, transformación y regeneración) para cultivares selectos de arroz.
- B) Optimizar métodos de transformación *in vivo* de semillas de arroz mediante *A. tumefaciens*.
- C) Diseñar los sgRNA para la edición génica mediante el sistema de CRISPR-Cas9 del gen *badh2* de arroz.
- D) Realizar las construcciones necesarias para la expresión del sistema CRISPR-Cas9 en arroz y transformar tejidos *in vivo* como *in vitro*.
- E) Evaluar eficacia de transformación y edición génica de plantas T0 *in vivo* e *in vitro*.

3. Materiales y Métodos

3.1 Material

3.1.1 Material biológico

3.1.1.1 Material vegetal

Todos nuestros ensayos fueron realizados utilizando semillas de la variedad Don Justo F.C.A y F (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales). Se trata de

un arroz de tipo largo fino con elevado potencial de rendimiento y calidad correspondiente al tipo “japónica tropical”. Se originó mediante un programa de mejoramiento realizado en la Universidad de La Plata por cruzamiento complementario de líneas propias del programa seleccionadas por presentar alto rendimiento, buena calidad y por el tipo de grano.

La metodología del programa de mejoramiento empleada corresponde al tipo masal–genealógico a partir de la F2, durante un período de 7 años.

El cultivar se encuentra inscripto en el registro Nacional de Propiedades de cultivos bajo el número 2836.

3.1.1.2 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se emplearon fueron:

Escherichia coli DH5α.

Agrobacterium tumefaciens ATHV.

3.2 Metodología

3.2.1 Cultivo in vitro

3.2.1.1 Descontaminación

Para descontaminar la superficie del material vegetal y conseguir desarrollar cultivos en condiciones de asepsia se optó por emplear un método clásico de descontaminación con algunas modificaciones:

1º. Descascarado de semillas: para separar las semillas de su cascarilla se empleó papel de lija, aislando de esta manera el embrión de su cascarilla protectora conformada principalmente por: fibras, celulosa, y minerales.

2º. Primera desinfección: las semillas obtenidas se colocaron en tubos Falcon de 50 mL. Es recomendable que el número de semillas no sea superior a las 200 por cada tubo. Se realizó dos inmersiones en alcohol 70% por no más de 1 minuto. Se agregó 40 mL de agua doblemente esterilizada, con 2 gotas de Tween 20 e hipoclorito de sodio

(NaOCl) al 1%. Se dejó en agitación constante a 110 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3°. Primer lavado: Bajo la cabina de flujo laminar se retiró la solución del interior del tubo Falcon por volcado evitando la pérdida de material vegetal en el proceso. Luego se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril.

4°. Segunda desinfección: Se repitió la metodología aplicada en la primera desinfección, sin embargo, la manipulación de todo el material se realizó bajo la cabina de flujo laminar.

5°. Segundo lavado: se repitió lo realizado durante el primer lavado realizando 5 lavados con agua doblemente esterilizada y aplicando agitación para eliminar los restos de Tween 20 e hipoclorito de sodio que podían quedar en las semillas generando efectos indeseados en los posteriores ensayos a realizar.

Las semillas esterilizadas se secaron con papel estéril para ser utilizadas en la formación de callos. Las destinadas a transformación de embriones permanecieron en inmersión con agua estéril durante 24 horas o 12 horas en el caso de ser utilizadas para transformar semillas.

3.2.1.2 Formación de callos

Para inducir la formación de callos utilizamos medio de proliferación (MSP) conformado por: medio *Murashige-Skoog* (Murashige & Skoog, 1962) 4,4 g l⁻¹, caseína 0,3 g l⁻¹, prolina 0,5 g l⁻¹, sacarosa 20 g l⁻¹, phytigel 5 g l⁻¹ junto a diferentes concentraciones de auxinas (1, 2, 3 y 4 mg l⁻¹).

Utilizamos ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) como auxina, esterilizado previamente por filtración, agregado al medio de cultivo durante la preparación de las placas.

Para inducir la formación de callo, colocamos 25 mL de medio de proliferación (MSP) en placas de Petri, sembrando 25 semillas por placa y por duplicado, evaluando un total de 50 semillas para cada concentración de 2,4D.

Las placas se mantuvieron en cuarto de cultivo a 23°C, en oscuridad durante 14 días.

3.2.1.3 Regenerar parte aérea

Para regenerar estructuras vegetativas a partir de callos, estos se transfirieron a placas con medio de regeneración (MSR): medio *Murashigue-Skoog* 4,4 g l⁻¹, caseína 0,1 g l⁻¹, maltosa 30 g l⁻¹, phytigel 5 g l⁻¹, suplementados con diferentes combinaciones de hormonas.

Utilizando concentraciones variables de las hormonas ácido 1-naftanelacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP), se identificó cual concedía una regeneración óptima del tejido vegetal.

Las combinaciones de hormonas puestas a prueba fueron:

- 1 ANA: 0,2 mg l⁻¹ + BAP: 1 mg l⁻¹
- 2 ANA: 0,4 mg l⁻¹ + BAP: 1 mg l⁻¹
- 3 ANA: 0,6 mg l⁻¹ + BAP: 1 mg l⁻¹
- 4 ANA: 0,6 mg l⁻¹ + BAP: 2 mg l⁻¹
- 5 ANA: 0,2 mg l⁻¹ + BAP: 2 mg l⁻¹
- 6 ANA: 0,4 mg l⁻¹ + BAP: 2 mg l⁻¹
- 7 ANA: 0,6 mg l⁻¹ + BAP: 2 mg l⁻¹
- 8 ANA: 0,6 mg l⁻¹ + BAP: 2 mg l⁻¹
- 9 ANA: 0,2 mg l⁻¹ + BAP: 3 mg l⁻¹
- 10 ANA: 0,4 mg l⁻¹ + BAP: 3 mg l⁻¹
- 11 ANA: 0,6 mg l⁻¹ + BAP: 3 mg l⁻¹
- 12 ANA: 0,6 mg l⁻¹ + BAP: 3 mg l⁻¹
- 13 ANA: 0,2 mg l⁻¹ + BAP: 4 mg l⁻¹
- 14 ANA: 0,4 mg l⁻¹ + BAP: 4 mg l⁻¹
- 15 ANA: 0,6 mg l⁻¹ + BAP: 4 mg l⁻¹
- 16 ANA: 0,8 mg l⁻¹ + BAP: 4 mg l⁻¹

Las hormonas fueron esterilizadas por filtrado antes de agregar a los medios. La manipulación de placas, preparado de medios, y sembrado de callos se realizó en cabina de flujo laminar.

Se sembraron por placa 30 callos para determinar el porcentaje y calidad de regeneración. Las placas se mantuvieron a 23 °C, con fotoperíodo de 16 horas

luz y 8 horas oscuridad. Se realizaron repiques de los callos cada 12-15 días en medio fresco.

3.2.1.4 Regeneración raíz

Los brotes verdes obtenidos por regeneración de tejido en el punto anterior se emplearon como material de partida en el proceso de regeneración de raíz.

Utilizamos medio de regeneración (MSR) complementado con diferente concentración de hormona ácido indol butírico (IBA): 1, 2, 3 y 4 mg l⁻¹.

Las placas se mantuvieron en las mismas condiciones descriptas para regeneración y se realizaron cambios de medio cada 12-15 días.

3.2.2 Sistema CRISPR-Cas9

3.2.2.1 Selección del sitio blanco y diseño de las guías

A sabiendas de que la pérdida de función del gen *badh2* se asocia con el aroma del arroz (Chen *et al.*, 2006), obtuvimos su secuencia en la especie *Oryza sativa* desde la base de datos Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

El diseño de las sgRNA contra el sitio blanco se realizó utilizando la herramienta informática Breaking Cas (Oliveros *et al.*, 2016) disponible en <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas>.

Con el fin de generar deleciones detectables, se apuntó contra dos sitios blancos que flaqueaban la región a escindir posibilitando la pérdida del fragmento y priorizando el menor porcentaje de off-targets posibles. Los sgRNA deben tener la forma 5´-(20nt) (NGG), la secuencia PAM no es parte del sgRNA, pero resulta indispensable para la enzima Cas9.

Para cada sitio target se definió una secuencia complementaria de 20 nt flaqueada en el extremo 3´ por la secuencia PAM y en cada sgRNA se incluyeron extremos cohesivos que permitían el clonado bajo el sistema GoldenBraid.

La hebra sentido se diseñó con la estructura 5'-GTGCA (20nt) -3', mientras que la molde con 5'-AAAC (20nt) T-3', para luego ser enviadas a sintetizar como oligonucleótidos.

3.2.2.2 Diseño del vector de expresión

Para diseñar el vector de expresión se empleó el sistema de clonado GoldenBraid (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013).

Se realizaron 3 reacciones de corte y ligación con diferentes plásmidos y enzimas dependiendo del nivel de reacción: 0, α y Ω (niveles propios del sistema GoldenBraid). La concentración de cada plásmido en las diferentes reacciones se definió utilizando la herramienta en línea NEBio Calculator (<https://nebiocalculator.neb.com>).

El plásmido obtenido en los diferentes niveles se clonó en cepas *DH5 α* de *E. coli* competentes, transformadas mediante shock térmico. Se seleccionaron en medios con antibióticos (plásmido dependiente) y X-gal (reportero). Luego se extrajo ADN plasmídico de colonias positivas en cada nivel utilizando el kit EasyPure Plasmid Miniprep kit (Transgen®) según las indicaciones del fabricante.

Los sgRNA como hebras simples se re-suspendieron en agua ultra pura hasta una concentración de 100 μ M. Se realizó una reacción de hibridación (annealing) entre las hebras complementarias elevando la mezcla a 95°C durante 10 minutos obteniendo sgRNA doble hebra en una concentración final de 2 μ M.

Para el ensamblaje de nivel 0, se incubó cada sgRNA con el plásmido domesticador pUPD2 (Cloranfenicol resistente), y el plásmido guía correspondiente (Tabla 2):

Tabla 2: Reacción de ensamblaje nivel 0.

pUPD2	40 ng	40 ng
Plásmido guía	Cantidad necesaria para (c.n.p.) una relación 5:1 con respecto al receptor (pVD3F)	c.n.p. una relación 5:1 con respecto al receptor (pVD3F)
sgRNA	2 μ M (sgRNA1)	2 μ M (sgRNA2)
BsmBI	0,5 μ l	0,5 μ l
T4 ligasa	0,5 μ l	0,5 μ l
Buffer 10x	1x	
H ₂ O ultrapura	c.n.p. 5 μ l	c.n.p. 5 μ l

Las reacciones de digestión/ligación consisten en 50 ciclos de 4 minutos a 37°C y 2 minutos a 16°C. El producto de estas reacciones se utiliza para transformar células competentes por el método de shock térmico.

Para la selección de los clones positivos se realizó PCR directa de colonias blancas, utilizando las sgRNA como cebadores forward (F_w) según corresponda, GBS2 (5'-GTCCCACCACTGTGGAACGG-3') como reverse (R_v).

El mix de reacción de PCR estaba compuesto por: tampón PB-L (Productos Bio-Lógicos) en concentración final de 1X, dNTPs en una concentración final de 0,32 mM, 1 unidad de Taq polimerasa PB-L, cloruro de magnesio en una concentración final de 1,5 mM y 0,2 μ M de cada oligonucleótido. En todos los casos se realizaron controles positivos y negativos en agua estéril.

El programa de PCR empleado consistió en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 35 repeticiones de 94°C 30 segundos-55°C 1 min-72°C 1 min, y finalmente una extensión final de 10 minutos a 72°C. Lo obtenido se analizó en gel de agarosa al 2%.

La reacción de nivel α_2 incluyó (Tabla 3): plásmidos nivel 0 obtenidos previamente: el plásmido pUPD-U3 (que aporta a la construcción final el

promotor de arroz U3) y pCAMBIA α_2 (Kanamicina resistente, que sirve de andamio para las construcciones):

Tabla 3: Reacción de ensamblaje nivel α_2 . Para la obtención del plásmido pCAMBIA α_2 -MD1.

pUPD2-sgRNA1	c.n.p. una relación 5:1 con respecto al receptor
pUPD2-sgRNA2	c.n.p. una relación 5:1 con respecto al receptor
pUPD-U3	c.n.p. una relación 5:1 con respecto al receptor
pCAMBIA α_2	40 ng
Bsal	5 U
T4 ligasa	2,5 U
Buffer 10x	0,5 μ l
H ₂ O ultra pura	c.n.p 5 μ l

Para obtener la construcción final, se realizó una reacción de nivel Ω (Tabla 4), la cual incluyó: el plásmido pCAMBIA α_2 -MD1 sintetizado previamente, pCAMBIA α_1 -Cas (que aporta la enzima Cas9 y el gen de resistencia a Higromicina), y como plásmido andamio, pCAMBIA Ω_1 (Espectinomicina resistente):

Tabla 4: Reacción de ensamblaje nivel Ω . Para la obtención del plásmido pCAMBIA α_2 -MD2.

pCAMBIA α_2 -MD1	c.n.p. una relación 5:1 con respecto al receptor
pCAMBIA α_1 -Cas	c.n.p. una relación 5:1 con respecto al receptor
pCAMBIA Ω_1	40 ng
BsmBI	5 U
T4 ligasa	2,5 U

Buffer 10x	0,5 μ l
H ₂ O ultra pura	c.n.p 5 μ l

En cada caso se realizó transformación de *E. coli DH5 α* y se seleccionaron los clones positivos con el antibiótico correspondiente. Se realizó extracción de ADN plasmídico y se confirmaron los plásmidos mediante cortes con enzimas de restricción específicas.

Una vez confirmada la identidad del plásmido definitivo que contiene todo el sistema de edición se transformó la cepa de *Agrobacterium Tumefaciens ATHV* que se utilizó para los ensayos de transformación de callos y embriones.

3.2.3 Transformación

3.2.3.1 Bacterias

La transformación de bacterias se realizó según lo descrito por Inoue *et al.* (1990), obteniendo cepas DH5 α de *E. coli* competentes que posteriormente se transformaron con los diferentes plásmidos mediante shock térmico. También se obtuvieron cepas ATHV de *Agrobacterium Tumefaciens* competentes aplicando lo presentado en Wise *et al.*, (2006), posteriormente transformadas con el plásmido pMD2 mediante shock térmico.

Para seleccionar bacterias transformadas se empleó la selección en antibiótico, la cual resulta ser plásmido dependiente.

3.2.3.2 Transformación material vegetal

La cepa ATHV portadora de los plásmidos p1303 o pMD2, se utilizó para transformar el material vegetal.

Se realizó cultivo de ATHV en medio *Lysogeny Broth* (LB) el cual contiene: extracto de levadura 5 g l⁻¹, tripteína 10 g l⁻¹, NaCl 10 g l⁻¹, suplementado con: Acetosiringona 20 μ M, Rifampicina 50 mg l⁻¹ y Kanamicina 50 mg l⁻¹ o Espectinomicina 100 mg l⁻¹ según correspondía. Se mantuvo en crecimiento la bacteria durante 24 horas a 28°C en agitación. Utilizando pipeta y en condiciones de asepsia, se transfirió el extracto bacteriano a tubos de 1,5 ml para posteriormente centrifugar a 8.000 rpm por 5 minutos. Se descartó por volcado el sobrenadante y el sedimento se re suspendió en medio de

transformación (medio *Murashigue-Skoog* 4,4 g l⁻¹, sacarosa 40 g l⁻¹, Acetosiringona 200mM), hasta una DO=0,8 con $\lambda=600\text{nm}$.

Esta suspensión se empleó tanto para la transformación de callos embriogénicos como también de embriones maduros y semillas.

En el caso de la transformación de callos, se seleccionaron aquellos pequeños (1-2 mm de diámetro) para ser colocados en la suspensión de transformación con agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se secaron en papel estéril para eliminar el exceso de *Agrobacterium* y se colocaron en placas con medio de co-cultivo (medio *Murashigue-Skoog* 4,4 g l⁻¹, Phytigel 5 g l⁻¹, Acetosiringona 40mM), para permanecer en cuarto de cultivo durante 3 días a 22°C y oscuridad.

La transformación de embriones se realizó a partir de embriones maduros (Hamada *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021). Para esto se desinfectaron semillas de arroz (como se describió previamente) y se conservaron a temperatura ambiente durante 48 horas en agua estéril para permitir la imbibición. De esta manera, resultaba menos complejo separar el embrión del resto de la semilla.

Los embriones, se separaron en cabina de flujo laminar con el apoyo de la lupa y del bisturí. Los mismos, fueron transformados de la misma forma que los callos. Finalmente, se dejó en co-cultivo durante 7 días en oscuridad a 22°C.

Para la transformación de semillas, se empleó el método descrito por Lin y col. (2009). Las semillas previamente desinfectadas y embebidas en agua estéril durante 24 horas, fueron punzadas en sus embriones mediante agujas humectadas con bacterias. Luego se colocaron en medio de transformación con dichas bacterias utilizando tubos plásticos de 50 ml y se sometieron a dos rondas de vacío de 15 minutos cada una.

Se eliminó el exceso de *Agrobacterium* y se co-cultivaron (como se indicó previamente en la transformación de embriones).

Finalizado el co-cultivo (independientemente del material vegetal empleado), se realizó el lavado con la finalidad de eliminar el exceso de bacterias y evitar el crecimiento excesivo. Para ello, el material vegetal se colocó en tubos de 50 ml, se realizaron tres enjuagues con agua estéril, se transfirió el material a

placas de Petri que también contaban con 20 ml de agua estéril, y se dejó en agitación durante 5 minutos. Se repitió este proceso por triplicado. Otros dos lavados se realizaron suplementando la solución de agua con Cefotaxima 0,18 mg ml⁻¹ y un último empleando 0,25 mg ml⁻¹. Ambos se dejaron 15 minutos en agitación.

Finalizado el lavado, el material se secó en papel estéril y se colocó en sus respectivos medios de crecimiento complementados con Cefotaxima 0,5 mg ml⁻¹ y Carbinicilina 0,5 mg ml⁻¹. Para callos empleamos medio de inducción de proliferación previamente descrito mientras que, para semillas-embryones, medio de cultivo vegetal (medio Murashigue-Skoog 4,4 g l⁻¹ y Phytigel 5 g l⁻¹).

3.2.4 Detección de transformantes

3.2.4.1 Expresión de proteína verde fluorescente

El plásmido pCAMBIA1303 porta el gen *GFP*, entre el borde derecho e izquierdo del plásmido Ti, que expresa la proteína verde fluorescente. Aquellas células del callo que incorporan el gen mediante el proceso de transformación y logran expresarlo, son fácilmente detectables empleando microscopía de fluorescencia.

3.2.4.2 Extracción de ADN, ARN, síntesis de ADNc y detección por PCR

La extracción de ADN a partir de material vegetal se realizó con el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB: 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM, Tris-HCl 100mM con pH=8) siguiendo el protocolo propuesto por Clarke (2011). Por otra parte, para la extracción de ARN se empleó el reactivo TRI®, siguiendo las especificaciones del fabricante (SIGMA).

Tanto el ADN como el ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría y la calidad se evaluó en gel de agarosa al 1%.

Para sintetizar ADN copia (ADNc) a partir del ARN extraído, se realizó un tratamiento con ADNasa (Ambion™) durante 30 minutos a 37°C, y el ARN purificado se empleó para la síntesis de la primera hebra complementaria mediante la transcriptasa reversa M-MLV (Promega) utilizando las cantidades y

reactivos recomendados por el fabricante. La mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos y luego para inactivar la enzima, a 95°C durante 10 minutos. Previo a la síntesis del ADNc se realizó una nueva verificación de calidad.

La confirmación de los métodos de transformación se determinó mediante diferentes reacciones de PCR utilizando 1 µl de ADN como templado y cebadores específicos dependientes del plásmido utilizado en la transformación (Tabla 5). En el caso de las transformaciones con p1303 se utilizó como blanco el gen *gfp* mientras que para el plásmido pMD2 se empleó la detección de los genes *hpt* o *Cas9*.

Tabla 5: Oligonucleótidos empleados para detectar los diferentes transgén.

Nombre	Secuencia
GFP Fw	5'-ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGG-3'
GFP Rv	5'-TTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG-3'
Cas Fw	5'-AGACACGCCAGATCACCAAG-3'
Cas Rv	5'-AGAAGCCTCCGGTCTGTACT-3'
HPT Fw	5'-ATGAAAAGCCTGAACTCACCGCGA-3'
HPT Rv	5'-TCCATCACAGTTTGCCAGTGATACA-3'

La PCR se realizó como se definió previamente con variaciones en el tiempo de desnaturalización (1 min) y Tm (69°C), los resultados se analizaron en gel de agarosa al 1%.

3.2.4.3 Selección mediada por antibióticos

La Higromicina B es un antibiótico aminociclitol que inhibe la síntesis proteica bloqueando la translocación ribosómica y evitando la ocupación del sitio A durante la elongación. Los plásmidos pMD2 y p1303 entre el borde derecho e izquierdo (zona T) contienen el gen *hpt* (higromicina fosfotransferasa) el cual, otorga resistencia al antibiótico. El gen *hpt* es utilizado en gramíneas y principalmente en arroz (Hiei & Komari, 2008). La concentración del agente selectivo se seleccionó cuidadosamente para evitar que fuese demasiado baja y, por lo tanto, permitiera el desarrollo de un número

indeseable de "escapes". De lo contrario, concentraciones excesivamente altas, podrían malograr los transformantes que expresaban niveles moderados de resistencia. Transcurridos los 7 días post lavado, los callos, semillas y embriones se colocaron en el mismo medio que se encontraban (detallado previamente) pero suplementados con Higromicina para ser seleccionados. Se ensayó con dos concentraciones diferentes del antibiótico 0,1 mg ml⁻¹ y 0,05 mg ml⁻¹, dejando en selección a 24 °C en cámara de cultivo, con renovaciones de medio cada 15 días, donde se transfirió solo el material vegetal con signos de vitalidad (color blanquecino en callos, verdoso en embriones y semillas).

3.2.5 Detección de plantas editadas

Para identificar posibles células editadas en el sitio blanco, se diseñaron dos cebadores que flaquean el segmento donde se debería producir la deleción (Fig. 13).

De esta forma, las muestras *wild type* (WT) deberían tener un tamaño aproximado de 284 pb mientras que si se produce la edición en los dos sitios predichos el fragmento amplificado debería ser de 200 pb aproximadamente, con pérdida de 84pb.

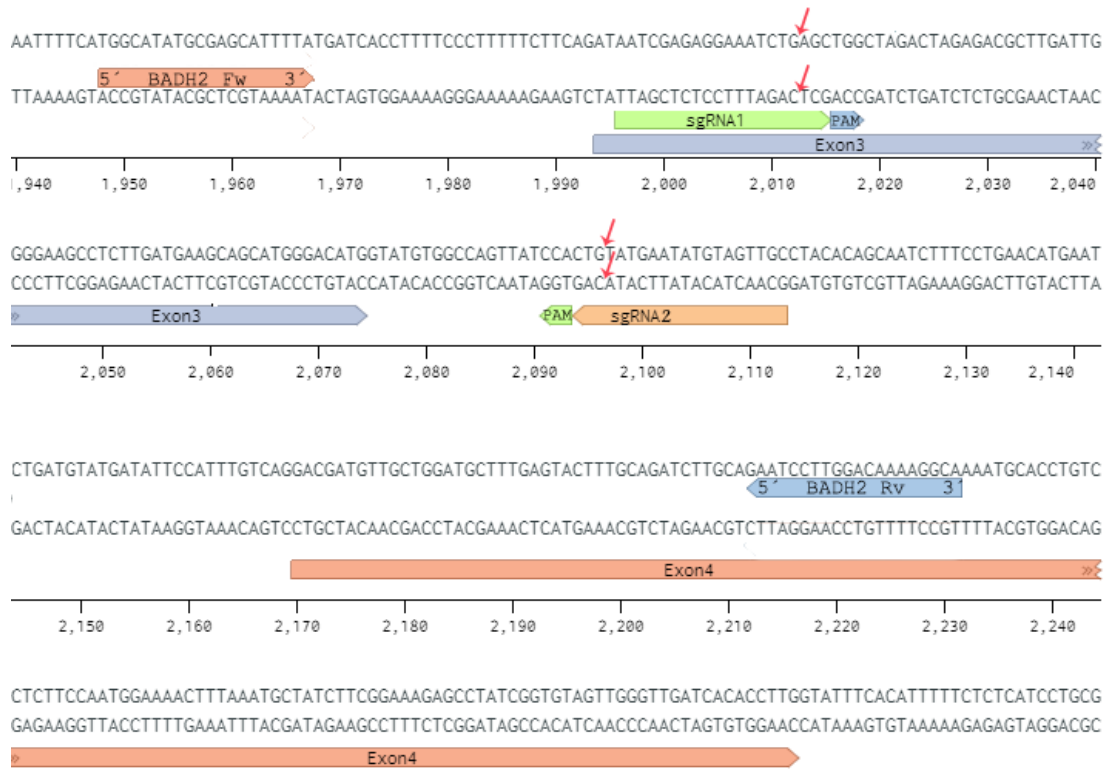


FIGURA 13. SITIO BLANCO PARA LA EDICIÓN.
 Se representa el exón 3 - 4 del gen *badh2* flaqueados por los cebadores BADH2 Fw y Rv diseñados para amplificar la región target para la edición. Las flechas indican los sitios de escisión en la doble hebra producidos por Cas9 como respuesta al correcto emparejamiento de cada sgRNA

Se realizó PCR de muestras positivas para la transformación con plásmido pMD2 el cual contenía toda la maquinaria necesaria para la edición.

Los productos de la amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y el resto se purificó empleando el kit EasyPure Quick Gel Extraction. El ADN purificado, se cuantificó por espectrofotometría y se secuenció mediante Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en INTA Castelar.

4. Resultados

4.1 Optimización del cultivo in vitro para la variedad Don Justo

4.1.1 Obtención de callos

Para la generación de callos embriogénicos se evaluaron diferentes concentraciones del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1, 2, 3 y 4 mg l⁻¹) con el fin de determinar la concentración que permitía el mayor porcentaje de formación de los mismos a partir de semillas maduras de arroz. Se observaron

porcentajes de calogénesis desde un 15 hasta un 45%, siendo las concentraciones más altas (3 - 4 mg l⁻¹) de 2,4D las que mostraron los mejores porcentajes (Fig. 14).

El análisis estadístico demuestra que a partir de 2 mg l⁻¹ no hay diferencias en el porcentaje de calogénesis, sin embargo, se eligió la concentración de 3 mg l⁻¹ para futuros ensayos para asegurar la máxima eficiencia.

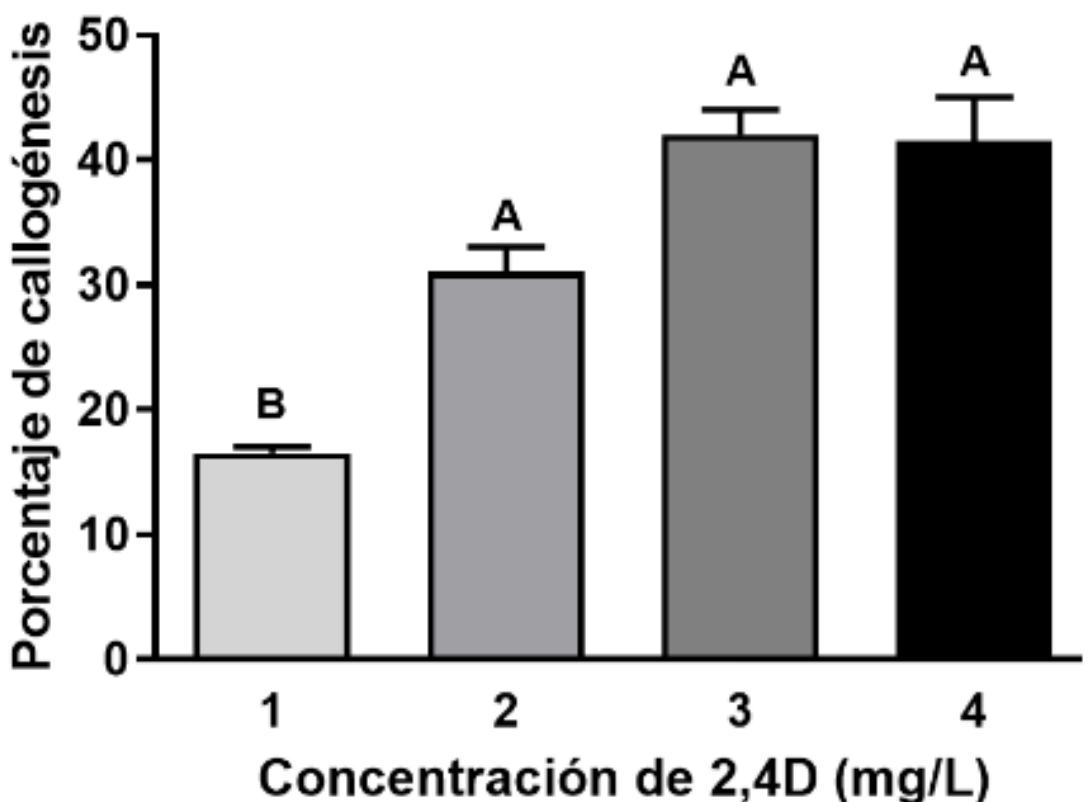


FIGURA 14. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE 2,4D EN LA FORMACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS A PARTIR DE SEMILLAS MADURAS DE ARROZ.

Los resultados son la media de dos ensayos independientes +/- SEM (error estándar de la media) y el análisis estadístico corresponde a un ANOVA de una vía con test de Tukey, $p < 0.5$.

4.1.2 Regeneración de la parte aérea

Para optimizar el método de regeneración de vástagos a partir de callos obtenidos previamente, se utilizaron 2 hormonas diferentes, ANA y BAP en diferentes combinaciones.

Se identificaron como regenerados a aquellos callos que mostraban la aparición de brotes verdes (Fig. 15A). De esta forma, los porcentajes de

regeneración variaron entre un 8 y un 77%, observándose los mejores resultados de regeneración en las combinaciones de BAP 4 mg l⁻¹ y ANA 0,8 mg l⁻¹ con un porcentaje cercano al 77% (Fig. 15B).

Para obtener una regeneración completa se necesitaron cincuenta días aproximadamente, 4 cambios de medio para renovar los nutrientes y hormonas cada 12 días.

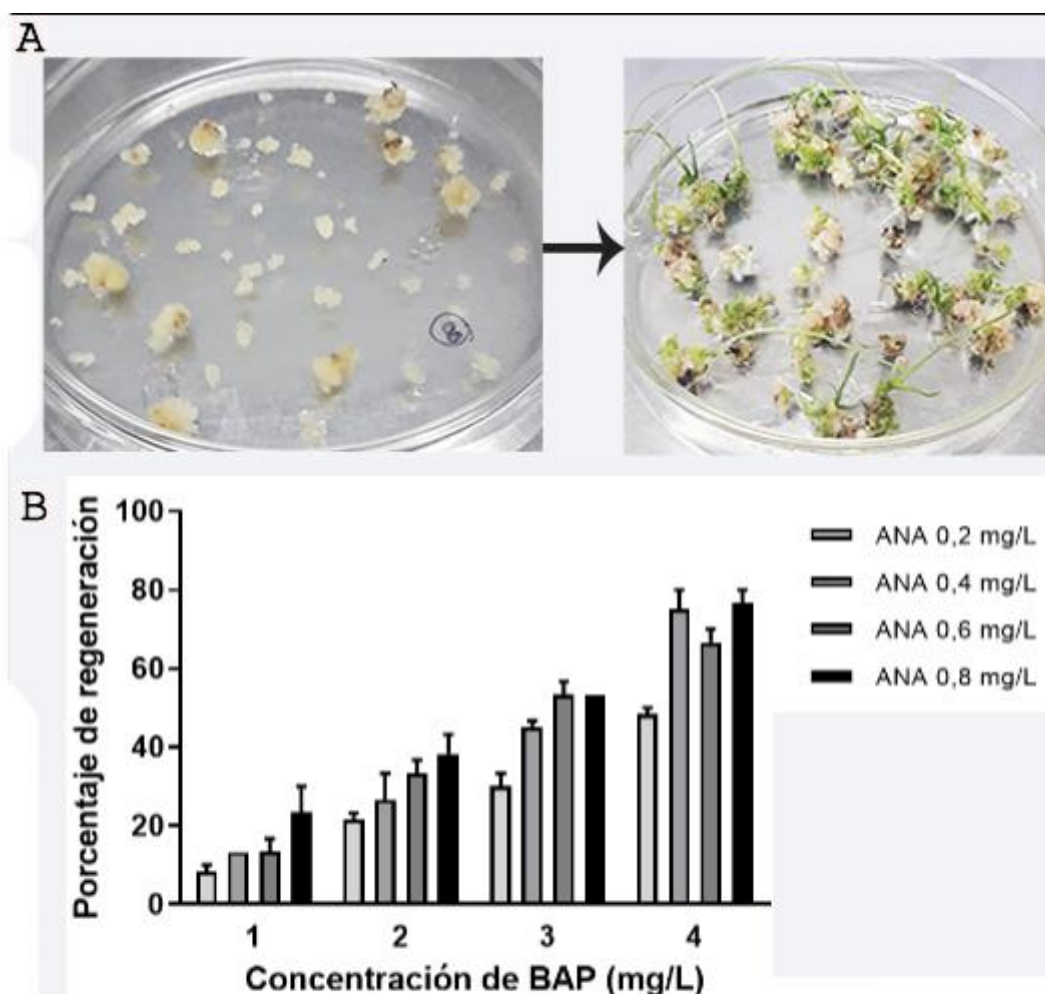


FIGURA 15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FITOHORMONAS PARA LA REGENERACIÓN DE PARTE AÉREA.

(A) Vástagos regenerados (izquierda) a partir de los callos (derecha) colocados en regeneración y transcurrido 40 días desde el inicio de la regeneración. (B) Porcentaje de regeneración de parte aérea a distintas concentraciones de BAP y ANA. Los resultados son la media de dos ensayos independientes +/- SEM.

4.1.3 Regeneración de raíz

Luego de la regeneración de la parte aérea se procedió a la regeneración de raíz. Para ello se evaluaron cuatro concentraciones de ácido indol butírico (IBA,

auxina implicada en la regulación del crecimiento vegetal). Se separaron los brotes verdes y se transfirieron a las placas con IBA.

Se observó que, al momento de ser colocados en medio de inducción de raíz, los brotes ya comenzaban a mostrar desarrollo de raíces (Fig. 16A), por lo tanto, la concentración de AIB no afectó el desarrollo de las mismas (Fig.16B).

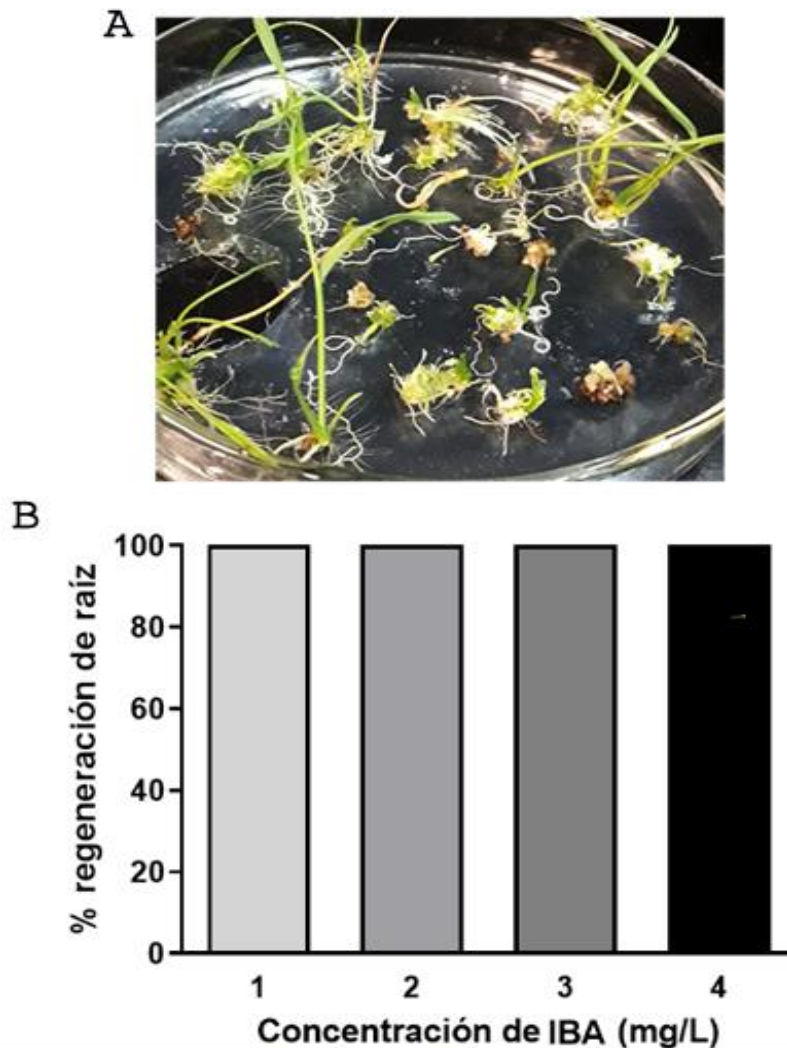


FIGURA 16. REGENERACIÓN DE RAÍZ.

(A) Brotes regenerados con formación de raíz en medio de regeneración y ausencia de la fitohormona IBA. (B) Porcentaje de regeneración de raíz a distintas concentraciones de AIB. Los resultados son la media de dos ensayos independientes +/- SEM.

4.2 Construcción del vector de expresión

4.2.1 Selección de sitio blanco y diseño de las sgRNA

La secuencia completa del gen *badh2* obtenida de Phytozome consistió en 15 exones y 14 intrones. A partir de dicha secuencia y mediante la herramienta

en línea Breaking-Cas se obtuvieron todas las posibles sgRNA. Se seleccionaron dos sgRNA caracterizadas por presentar un bajo número de off-target y elevado score. Al mismo tiempo, debían posibilitar, la delección de un fragmento de ADN detectable sobre los primeros exones del gen.

Definidas ambas sgRNA, se adaptaron al sistema de clonado GB mediante la adición de nucleótidos en ambos extremos (G1, G2 en Fig.17A).

4.2.2 Síntesis del vector de expresión

Para diseñar el vector de expresión se empleó el sistema de biología sintética GB optimizado para su uso en plantas. Se realizaron tres reacciones de diferentes niveles: 0, α y Ω (Fig. 17) para sintetizar el vector de expresión MD2 con toda la maquinaria necesaria para la edición dirigida del gen *badh2*.

Se analizó cada plásmido obtenido en las diferentes reacciones para determinar si poseía el tamaño esperado como consecuencia de un ensamblaje exitoso.

Los plásmidos nivel 0 se analizaron por PCR empleando como cebador Fw la sgRNA correspondiente y como Rv GBS2. Se estudiaron diferentes colonias blancas para encontrar aquellas que resultaran positivas para esta PCR lo que indicaría que la guía se insertó correctamente. En la figura 18A se observa un ejemplo de PCR directa de colonia, en el panel superior calle 6 se encontró colonia positiva para G1, y en la parte inferior calle 4 colonia positiva para G2.

Una vez confirmadas las construcciones de nivel 0 se procedió al ensamblado de las construcciones nivel 1 como se indica en la sección de metodología. La evaluación de estas construcciones se realizó mediante la digestión con enzimas de restricción. En este caso se utilizó la enzima HindIII que debería dar dos fragmentos, uno de 6,3 kb y otro de 800 pb (Fig. 18B izquierda). En el caso de la reacción MD2 la confirmación se realizó con la enzima BamHI que debería dar un patrón de 3 fragmentos: 6,7 - 4,9 - 3,6 kb (Fig. 18C derecha).

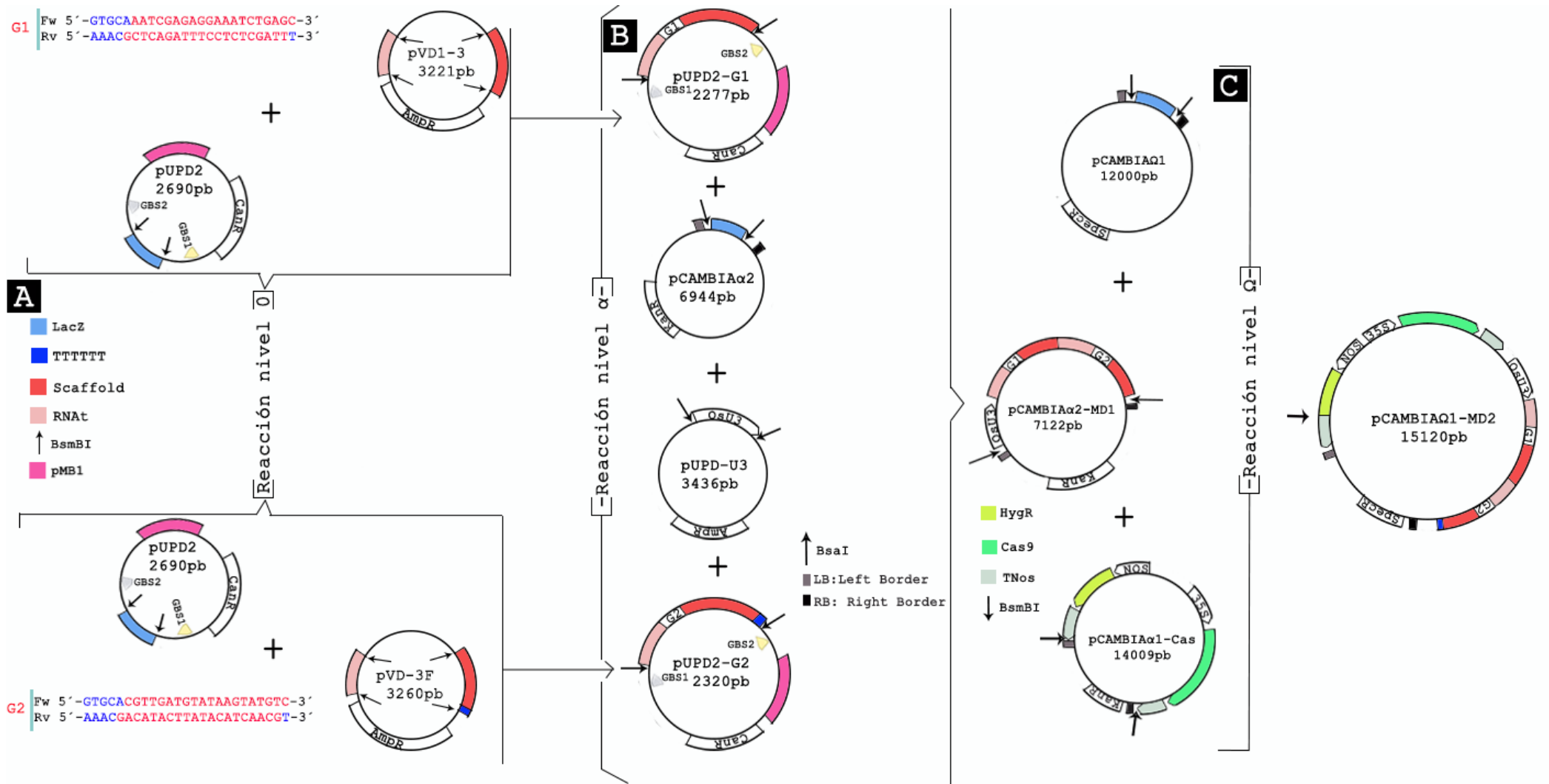


FIGURA 17. SÍNTESIS DEL VECTOR DE EXPRESIÓN

(A) Reacción nivel 0: se realizaron dos reacciones de corte y ligadura independientes empleando la enzima de restricción BsmBI para cada sgRNA (G1, G2). Se obtuvieron dos plásmidos nivel 0 (pUPD2-G1 y pUPD2-G2) caracterizados por contener cada sgRNA flanqueada por los genes RNAi (5') y scaffold (3'), un gen de resistencia a Kanamicina y dos sitios de corte BsaI para liberar la construcción de forma: 5'-RNAi-Gn-Scaffold-3'. (B) Reacción nivel α : se realizó una única reacción de corte y ligadura empleando la enzima BsaI, donde participaron ambos plásmidos nivel 0 sintetizados previamente, otro, obtenido de la colección GB (pUPD-U3) y el plásmido andamio propio del nivel α 2, sintetizando así, un plásmido de nivel α 2 denominado MD1. Este último se caracterizó por presentar cada construcción RNAi-G(n)-Scaffold posicionadas secuencialmente de forma correcta y bajo el control del promotor de arroz U3 con sitios de reconocimiento para la enzima BsmBI flanqueando en ambos extremos. (C) Reacción nivel Ω : para obtener el plásmido de expresión final, se emplearon en la reacción el plásmido MD1 sintetizado previamente, un plásmido andamio propio de este nivel y el plásmido pCambia α 1-Cas (de la colección GB) que aporta a la construcción final la enzima Cas y el gen de resistencia a higromicina. De esta manera se obtuvo la construcción MD2 de nivel Ω 1 con toda la maquinaria para editar el gen BADH2 empleando dos sgRNA diferentes y aportar el gen de resistencia a Higromicina en aquellas plantas transformadas eficientemente.

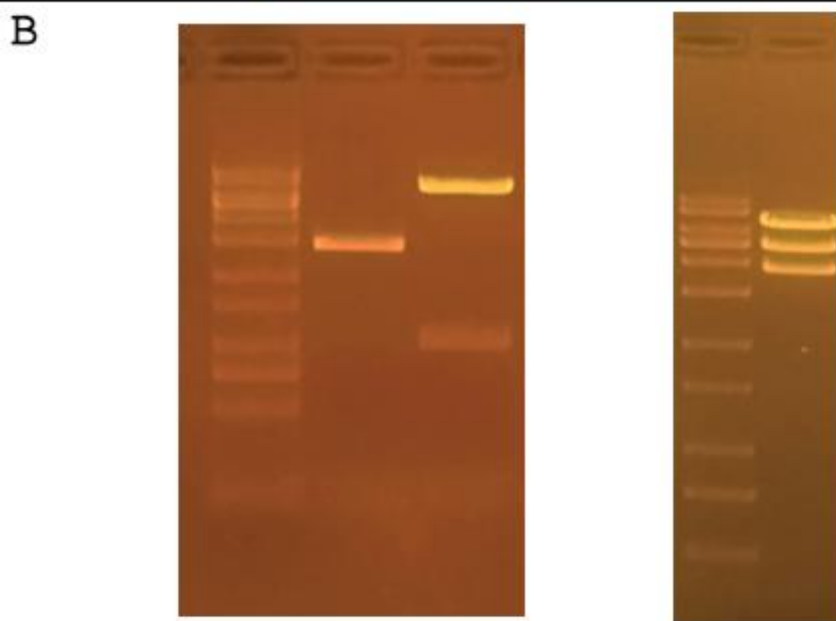
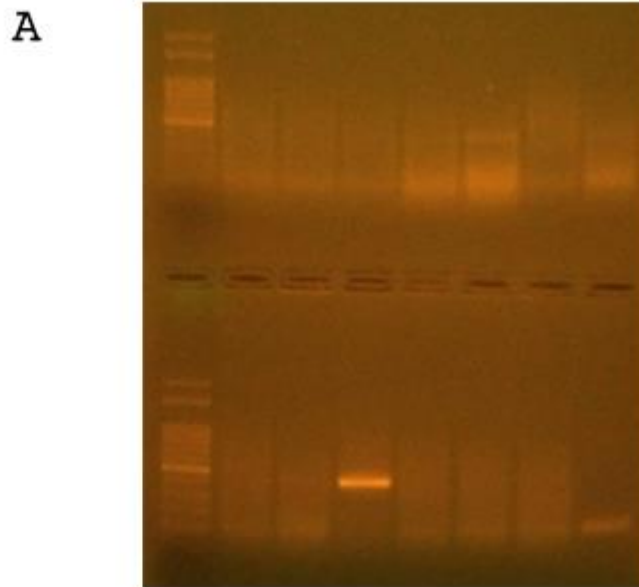


FIGURA 18. ANÁLISIS DE LOS PLÁSMIDOS OBTENIDOS EN CADA REACCIÓN GB.
 (A) Resultado de PCR directa en colonias blancas transformadas con plasmido nivel 0 portadores de G1 (panel superior) o G2 (panel inferior). En calle 1: marcador molecular 50bp. (B) A la izquierda se muestra en calle 2 plásmido MD1 sin digerir, en calle 3 lo obtenido por digestión del plásmido MD1 con enzima HindIII. A la derecha en calle 2 se revela el resultado de digestión del plásmido MD2 con enzima BamHI. En ambos casos se empleó un marcador de peso molecular 1kb Plus y gel de agarosa 1,5%.

4.3 Transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*

4.3.1 Evaluación del sistema de transformación *in vitro*

Luego de optimizar las condiciones para el cultivo de tejidos *in vitro* en la variedad Don Justo y generar bacterias de *A. tumefaciens* ATHV portadoras del plásmido pMD2 (sintetizado previamente), se procedió a la transformación de material vegetal para la obtención de plantas transgénicas. Esto último significa una herramienta importante para el mejoramiento de esta variedad, ya que permitiría obtener variedades transgénicas y/o editadas genéticamente utilizando como base una variedad desarrollada en nuestro país.

Para las pruebas de transformación se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* ATHV portando los plásmidos, p1303 o pMD2, ambos otorgan resistencia a higromicina por lo que se implementó como agente de selección.

Además, p1303 tiene como reportero el gen de la proteína fluorescente verde (*gfp*), que permite la detección visual de los callos transformados en una lupa de fluorescencia. En primer lugar, se realizó transformación con el plásmido p1303 a fin de determinar fácilmente la expresión de GFP.

En este caso, se identificó como transformado al callo que presentaba fluorescencia (Fig. 19B). De esta forma se observó un porcentaje de transformación aproximado de un 28% (Fig. 19C). Por otra parte, se realizó la transformación con el plásmido pMD2 que contenía toda la maquinaria necesaria para utilizar el sistema de edición génica mediante CRISPR (sgRNA y Cas9) además del gen de selección. En este caso, se consideró callo transformado, a aquel que sobrevivió al proceso de selección con higromicina (Fig. 19A). Se realizó extracción de ADN de los callos transformados para confirmar la presencia del gen de resistencia. En este sentido, todos los callos que resultaron resistentes a higromicina dieron positivos para el gen *hpt* mediante PCR (Fig. 19D). En cuanto al porcentaje de transformación, resultó ser más bajo, alrededor de un 14% (Fig. 19C). De esta forma, se puede observar que éste varía entre los plásmidos empleados. Cabe destacar que en ambos casos pudimos obtener callos transformados.

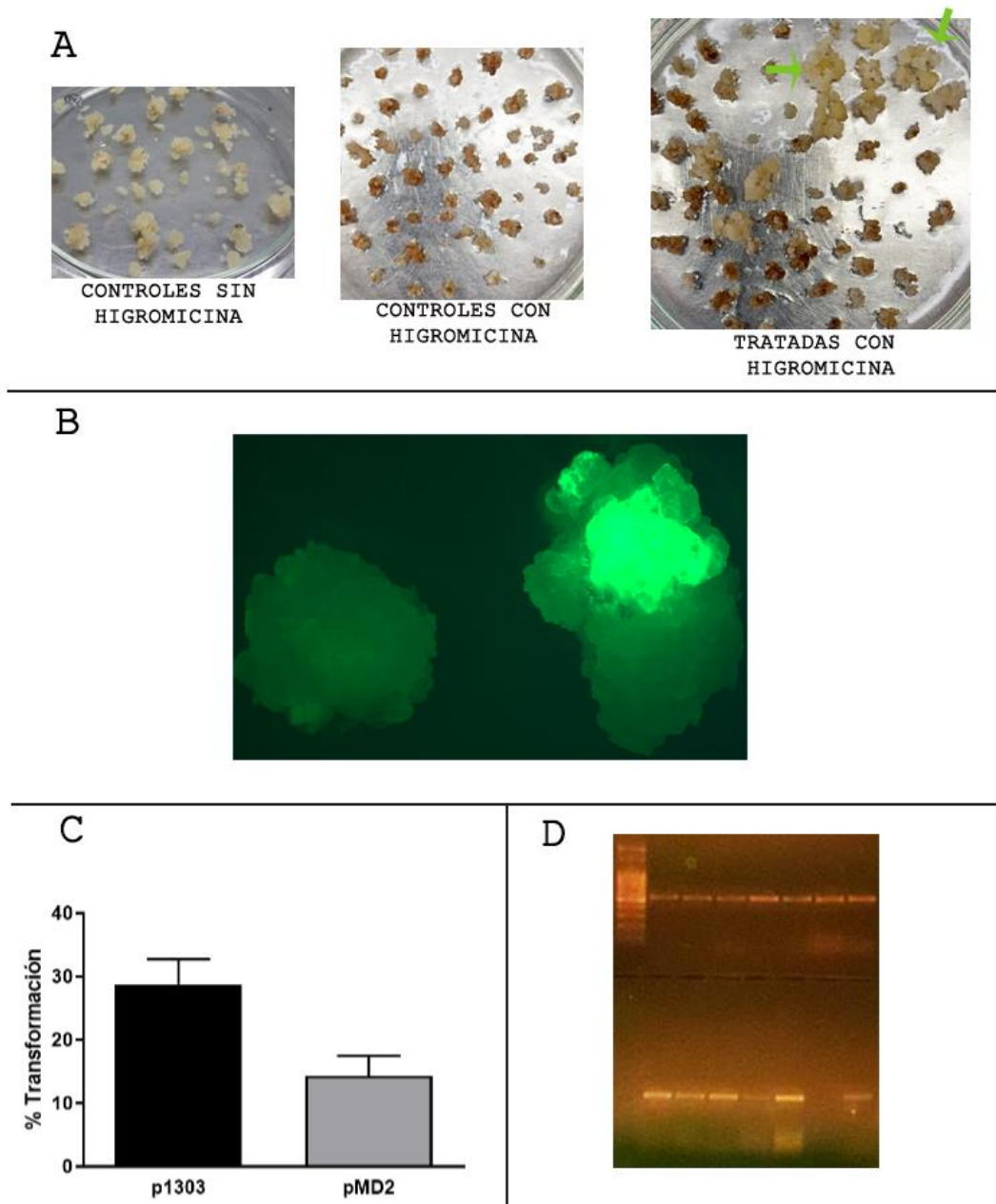


FIGURA 19. TRANSFORMACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS CON *A. TUMEFACIENS* ATHV
 (A) Callos transformados con plásmido pMD2. Los callos vivos se caracterizan por presentar una coloración blanquecina, las flechas verdes muestran algunos callos resistentes a higromicina. (B) Callos transformados con plásmido p1303, a la izquierda se observa un callo control sin transformar, a la derecha callo transformado 3 días posteriores a su transformación. (C) Porcentaje de transformación utilizando ambos plásmidos. Los resultados son la media de entre 5-7 réplicas independientes +/- SEM. (D) Resultado PCR contra el gen *hpt* de muestras de callos sobrevivientes a la selección previo a ser colocados en medio de regeneración.

4.3.2 Evaluación de sistemas de transformación *in planta*

La transformación *in planta*, evita las complicaciones y tiempo requerido durante el desarrollo de cultivos *in vitro*, como así también, las dificultades que presentan algunas variedades a este tipo de técnicas. A pesar de ello, la

selección y obtención de plantas completas portadoras del transgén o edición, sigue siendo una limitante.

Empleamos dos estrategias para llevar adelante la transformación in planta: una siguiendo lo propuesto por Lin y col. (2009) para la transformación de semillas enteras, y otra, transformando embriones maduros de arroz de forma similar a la reportada previamente para trigo (Hamada et al., 2017; Liu *et al.*, 2021) como se describió en la sección de metodología.

Para detectar plántulas positivas para la transformación, se extrajo ADN sacrificando plantas completas de unos 10 días, se conformaron grupos de muestras tratadas y no tratadas para detectar la presencia del gen de resistencia a higromicina. Solo de aquellos positivos se realizó PCR de muestras individuales para detectar *Cas9* o *gfp* dependiendo del plásmido empleado en la transformación.

En nuestras condiciones y con la variedad Don Justo FCAYF no se obtuvieron plantas transformadas valiéndose de la metodología presentada por Lin y col. (2009). Como se puede observar en la Fig. 20A en el panel inferior ninguna muestra dio positiva para el gen *gfp* mientras que los controles internos del gen de ACTINA de arroz dieron positivas (panel superior).

Sin embargo, utilizando una adaptación de la transformación de embriones maduros si fuimos capaces de detectar plantas transformadas. En la figura 20B se muestra el resultado de PCR para detectar el gen *gfp* en dos experimentos independientes transformados con plásmido p1303. El primero constaba de 30 plantas transformadas (primera imagen), donde se identificó la presencia del gen *gfp* en 8 muestras, en el segundo experimento se analizaron 47 plántulas sobrevivientes a la transformación y se encontraron 12 muestras positivas para *gfp* (segunda y tercera imagen).

El mismo protocolo se empleó para transformar 280 embriones con el plásmido pMD2, de los cuales sobrevivieron 180 y luego del armado de pools y detección por PCR del gen *hpt* en pools y muestras individuales, se realizó PCR para detectar el gen *Cas9* (Fig. 20C), encontrando amplificación en 6 de 180 embriones tratados.

Se calculó el porcentaje de transformación para ambos plásmidos teniendo en cuenta el número de plántulas que dieron PCR positivas para estos genes en relación al número total de embriones utilizados. Así, observamos que la transformación de embriones utilizando el plásmido p1303 tuvo una eficiencia de transformación del 27,4% (Fig. 20D), (estos valores son similares a los obtenidos en la transformación de callos embriogénicos empleando el mismo plásmido). Por otro lado, cuando se utilizó el plásmido pMD2, el porcentaje de transformación logrado fue de aproximadamente 3% (Fig. 20D). Estos valores fueron más bajos que los observados en la transformación de callos embriogénicos, sin embargo, se mantuvo la misma tendencia al utilizarse el pMD2, donde el porcentaje de transformación fue menor con respecto al p1303.

La transformación de embriones además mostró una pérdida importante en el porcentaje de germinación (50-60%). Para transformar se emplearon con p1303 un total de 150 semillas y con pMD2, 280.

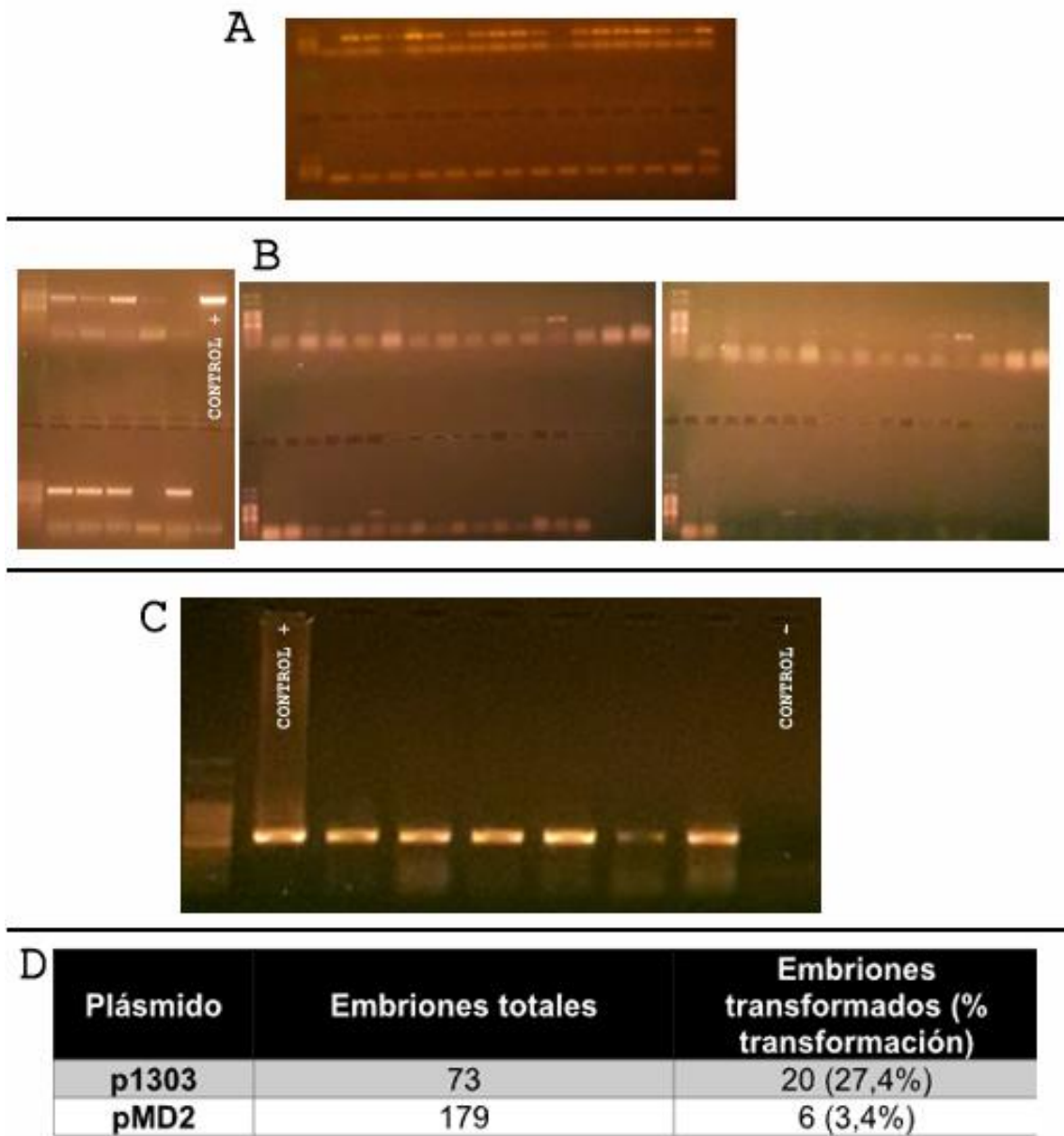


FIGURA 20 . RESULTADOS DE PCR PARA DETECTAR CÉLULAS TRANSFORMADAS EN EMBRIONES DE MUESTRAS INDIVIDUALES.

(A) Resultado de PCR para muestras obtenidas empleando metodología de punzado. Arriba PCR con cebadores para Actina, abajo, PCR empleando cebadores contra GFP, ultima calle control + con p1303. (B) Resultado de PCR empleando cebadores contra el gen *gfp* mediante la metodología de transformación por aislamiento de embriones con plásmido p1303. (C) Resultado de la PCR para detectar el gen *Cas9*, transformando embriones con plásmido pMD2. (D) Tabla con los porcentajes de transformación para cada plásmido, bajo la misma metodología.

Por otro lado, se probó un protocolo de transformación *in planta* en arroz descrito por Kumar y Sanan-Mishra (2021), tanto para semillas enteras como para embriones aislados empleando p1303 y pMD2. En este sentido se realizó co-cultivo de bacterias junto al material vegetal (semillas y embriones) como se

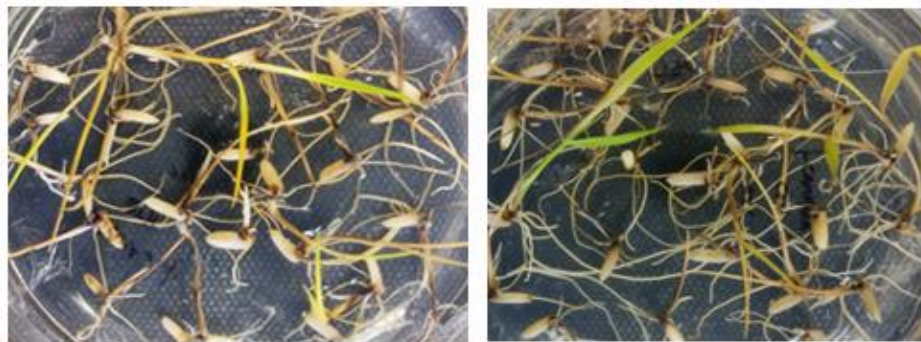
describió en la metodología, pero con la particularidad de que se realizó en oscuridad durante 16 horas, a 28°C y en agitación suave. Transcurrido lo anterior se dejaron crecer durante 3 días en oscuridad hasta obtener plántulas de 2-4 centímetros para luego ser transferidas a medio de selección.

Los medios se renovaron transcurrido los 15 días y al día 30 desde el inicio de la selección se analizaron las muestras en busca de plántulas sobrevivientes. Según nuestra experiencia y empleando la variedad Don Justo FCAyF no logramos evidenciar plántulas sobrevivientes empleando dicha metodología que combina la transformación *in planta* y la selección de transformantes (Fig.21).

A



B



C



FIGURA 21. RESULTADOS DE TRANSFORMACIÓN DIRECTA Y SELECCIÓN EN HIGROMICINA.

(A) Izquierda se muestran semillas sin tratamiento germinadas luego de 15 días en ausencia de higromicina, su contraparte (derecha), en medio de selección con antibiótico
(B) Semillas tratadas con p1303 con 15 días de germinación en medio de selección.
(C) Embriones tratados con pMD2, se observó ausencia de germinación luego de 15 días en medio selectivo.

4.3.3 Evaluación de planta regenerada post selección.

Empleando el conocimiento generado previamente, en el cual se obtuvieron porcentajes de regeneración del 77% con combinaciones de BAP 4 mg l⁻¹ y ANA 0,8 mg l⁻¹ se intentaron regenerar callos post selección con una edad aproximada de 85 días desde su formación.

Se realizaron dos pruebas de regeneración post selección, el grupo 1 constaba de una mezcla de 40 fragmentos de callos no individualizados, y el grupo 2, de 47 callos individualizados. En ambos casos se emplearon controles obtenidos a partir de callos que crecieron en ausencia de antibiótico durante la etapa de selección.

Luego de 50 días en regeneración se logró, para el grupo 1, regenerar 2 vástagos (Fig. 22A): uno obtenido de callos sobrevivientes (T0) a la selección y otro de controles (C0). En el caso del grupo 2, no se vislumbró formación de los mismos tanto para callos controles como tratados. Estos resultados demuestran que la eficiencia de la regeneración se ve severamente afectada por el proceso de selección de los callos en higromicina. Es probable que la edad de los callos y el estrés al que están sometidos durante el proceso de selección afecte su capacidad de regeneración.

Los vástagos enraizados se colocaron en macetas plásticas suplementados con sustrato estéril y aislados del medio ambiente para permitir una adaptación progresivamente a las nuevas condiciones. Luego de 60 días y a partir de las plántulas desarrolladas se tomaron muestras del material vegetal para realizar extracción de ADN.

Partiendo del ADN obtenido se realizó PCR para confirmar la presencia del transgén empleando cebadores específicos para detectar el gen *Cas9* (Tabla 5).

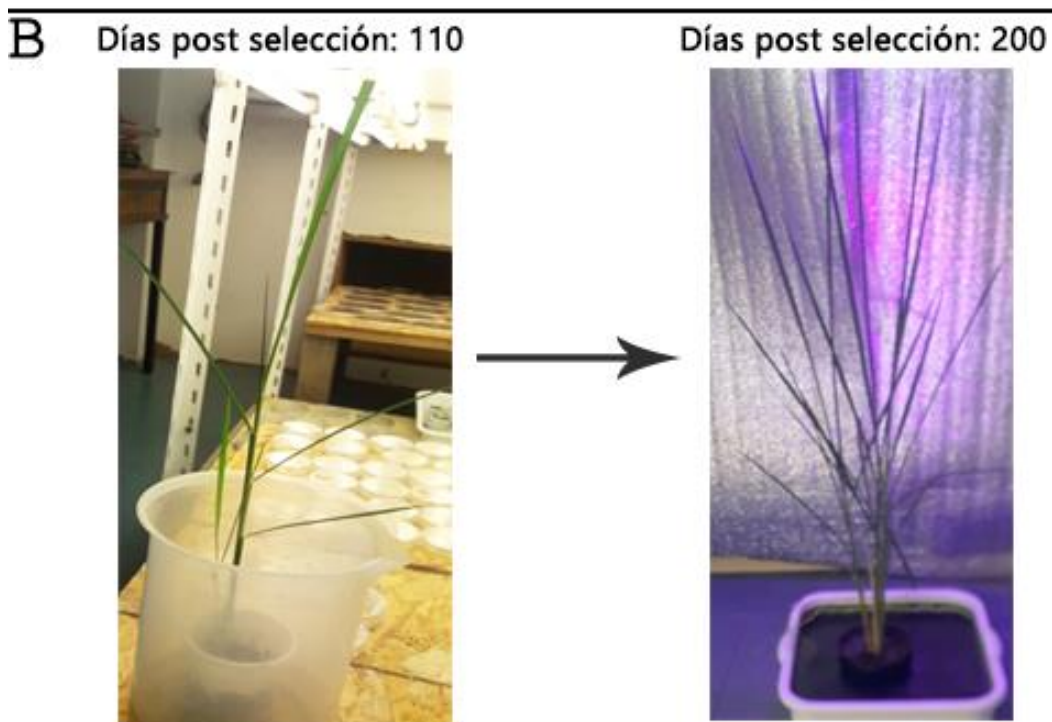


FIGURA 22. REGENERACIÓN POST SELECCIÓN Y EVALUACIÓN.
 (A) A la izquierda vástago regenerado a partir de callos transformados post selección (T0), en su contraposición, brote regenerado a partir de callos controles no transformados (C0). (B) Plántula T0. Se muestran dos estadios de desarrollo a diferentes tiempos post selección. (C) Gel de agarosa 1,5% donde se muestra: resultados de PCR para evaluar transformación a partir de muestras obtenidas de plantas regeneradas. Las 3 primeras calles corresponden PCR con cebadores contra Cas9 a partir de ADNc obtenido de plántula T0 y C0, cuarta calle muestra el resultado de PCR contra Cas9 empleando como molde ADN extraído del ápice de la 4ta hoja de la plántula T0, las siguientes 4 calles pertenecen a resultados de PCR contra el gen de Actina en muestras de ADNc (primeras 3 calles) y ADN de planta T0.

Los resultados obtenidos confirmaron la presencia del gen *Cas9* en muestras de ADN extraído a partir de material vegetal correspondiente a la sección terminal de la 4^{ta} hoja en planta T0 (Fig. 22C).

4.4 Edición génica mediante CRISPR-Cas9

4.4.1 Detección de segmentos editados

La escisión dirigida por sgRNA empleando la nucleasa *Cas9*, induce la rotura de la doble hebra de ADN. El pMD2 desarrollado en este trabajo, permite realizar dicha acción. Empleando *A.tumefaciens* *ATHV* se logró transformar eficientemente la variedad local Don Justo FCAYF, con la maquinaria necesaria para editar el gen *badh2*, empleando dos sgRNA diseñadas específicamente para inducir la delección de un segmento del exón 3 a fin de producir una proteína truncada no funcional.

Si ambas sgRNA guiaban correctamente a la nucleasa *Cas9*, se podría dar la delección de un segmento de 85 pb. Se diseñaron dos cebadores que amplificaban la región de interés a fin de evidenciar si la edición se daba con la pérdida del segmento (Fig.13).

Se amplificó la región target en muestras positivas para la transformación en embriones, planta T0 y en callos sobrevivientes al proceso de selección. Según nuestro trabajo, no se evidenciaron indicios de edición por pérdida de segmento, ya que todos los resultados de amplificación generaron bandas de 284 pb correspondientes al segmento *wild type* (WT) (Fig. 23A y B).

No obstante, consideramos que se podría dar la edición por eliminación o inserción de pb mediante el mecanismo de reparación NHEJ alterando la secuencia de ADN en algunos nucleótidos siendo inasequible detectar mediante electroforesis en gel. Por lo tanto, se decidió purificar lo obtenido por PCR para secuenciar mediante el método de Sanger empleando el cebador BADH2_{Fw}. Los fragmentos obtenidos, se alinearon contra la secuencia WT del gen *badh2* (Fig. 23C).

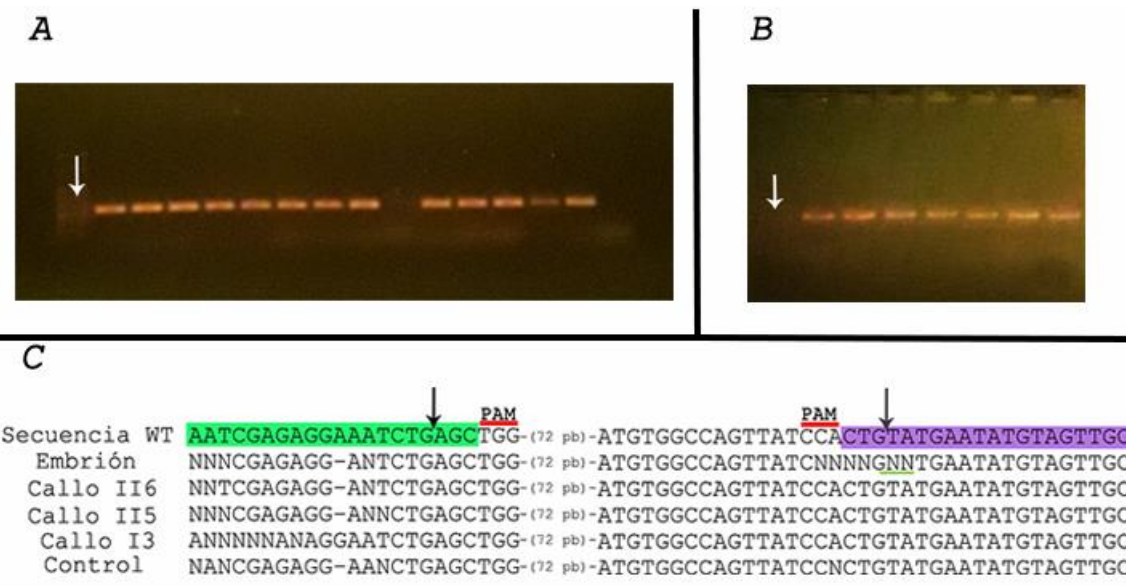


FIGURA 23. BUSQUEDA DE SEGMENTOS EDITADOS MEDIANTE CRISPR-CAS9.

(A) Gel de agarosa al 2% con resultado de amplificación del segmento BADH2 de interés para muestra de callos luego de sobrevivir a la selección, la última calle corresponde al control negativo. (B) Gel de agarosa al 2% con resultados de amplificación del segmento BADH2 de interés en muestra de embriones positivos para la transformación. En ambos gels la calle 1 corresponde al marcador molecular 50bp, la flecha blanca indica la banda de aproximadamente 284pb tamaño esperado para el fragmento wt

La principal región de interés en dicho análisis corresponde al segmento ubicado 3 nt corriente arriba del sitio PAM (sitio probable de corte por Cas). Se encontró variación en dicho segmento para la sgRNA2 en muestra de embrión transformado, pero los resultados no son concluyentes ya que la calidad de secuenciación en dicha región es baja. En el resto de las muestras no se encontraron indicios de edición. Se observó escasa calidad de secuenciación explicada principalmente por el empleo de un único cebador en la amplificación, requiriendo a futuro repetir el análisis empleando dos cebadores para mejorar la calidad.

En conclusión, se determinó que a pesar de lograr transformar eficientemente la variedad Don Justo FCAyF con la maquinaria necesaria para editar el gen *badh2*, no hallamos indicios claros de esto último. Es por esto que son necesarios más esfuerzos para verificar los posibles sitios de edición mediante secuenciación, como así también obtener un mayor número de muestras transformadas con el fin de aumentar las probabilidades de encontrar plántulas con las ediciones deseadas.

5. Discusión

El desafío de la agricultura moderna consiste en producir más y mejores alimentos minimizando el impacto ambiental, en dónde el mejoramiento genético vegetal ocupa un lugar preponderante para lograr estos objetivos (Schaart *et al.*, 2016). Una de las herramientas empleadas dentro del mejoramiento es la ingeniería genética, la cual a través de la expresión de genes foráneos mediante la transgénesis o la modificación de los propios genes por medio de la edición génica ofrece soluciones con bajo impacto ambiental a la agricultura moderna (Turnbull *et al.*, 2021). Para el caso de los cereales y del arroz en particular llegar a obtener plantas transgénicas o editadas implica el uso del cultivo de tejido y la regeneración de plantas, (procesos que son dependientes del genotipo, la composición de los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento) (Tripathy *et al.*, 2018). En nuestras condiciones utilizando la variedad local Don Justo, las concentraciones de callogénesis óptimas se encontraron entre 2 y 4 mg l⁻¹ de 2,4D, concentraciones que coinciden con las reportadas por otros autores para otras variedades (Tripathy 2021; Yaqoob *et al.*, 2021; Saba-Mayoral *et al.*, 2022). Con relación al porcentaje de callogénesis, en este trabajo obtuvimos un máximo de 45% para las concentraciones de 3 y 4 mg l⁻¹ de 2,4D, mientras que otros autores encontraron respuestas diferenciales entre 42-94% dependiendo del cultivar utilizando 2-3 mg l⁻¹ de 2,4D (Binte & Wagiran, 2018; Yaqoob *et al.*, 2021). Si bien Saba-Mayoral *et al.*, (2022) obtuvieron menores porcentajes de callogénesis (10-13%) utilizando callos de 6 y 7 días con el cultivar Bomba, la metodología utilizada por estos autores fue diferente, ya que estos callos se originaron de escutelos bombardeados con el plásmido de transformación. Por otro lado, también hay reportes de entre 72 y 89 % de callogénesis con dosis de 2,5 mg l⁻¹ de 2,4D y 0,5 mg l⁻¹ de kinetina variando las concentraciones de algunos componentes del medio como caseína, sacarosa, prolina, agente gelificante y las condiciones de luz y oscuridad durante el período de incubación (Tripathy 2021). Es importante mencionar que además de las condiciones de cultivo otro factor que influye en el proceso de callogénesis, es la edad de las semillas utilizadas como explanto (Hoquel & Mansfield, 2004). En cuanto a la tasa de regeneración, los resultados en la literatura son

variables dependiendo mucho del genotipo utilizado. Hay reportes que van desde un 40 a un 82% de regeneración en distintos cultivares utilizando una única concentración de hormonas (2 mg l⁻¹ BAP, 2 mg l⁻¹ kinetina, 0,5 mg l⁻¹ ANA) (Binte & Wagiran, 2018). Por otro lado, también se han reportado tasas de regeneración de entre 62 a 88 % considerando callos organogénicos y embriogénicos con variaciones en las concentraciones de los componentes de los medios de cultivos, pero con una dosis única de hormonas de 2 mg l⁻¹ de BAP y 0,5 mg l⁻¹ ANA (Tripathy 2021). Mientras que en el presente trabajo utilizando el cultivar Don Justo se observó una tasa de regeneración de hasta el 77 % con dosis de 4 mg l⁻¹ de BAP y entre 0,4 - 0,8 mg l⁻¹ de ANA. Estos resultados reflejan la importancia de optimizar las condiciones de cultivo, tipo y concentraciones de hormonas, fuentes de inóculos, etc. para cada variedad que se quiera utilizar como base para procesos de mejoramiento mediante técnicas de ingeniería genética.

Durante la realización de este trabajo también observamos que al intentar regenerar vástago a partir de callos que había transitado el proceso de selección con higromicina, los porcentajes de regeneración se vieron negativamente afectados. Esto puede deberse a que el proceso de selección fue relativamente largo y los callos ya tenían una edad avanzada lo que puede afectar su capacidad de regeneración. En este sentido sería importante optimizar los tiempos de callogénesis, transformación y selección para poder utilizar callos más jóvenes y de esta forma mejorar las eficiencias de regeneración posteriores a la selección.

Otro paso clave en el proceso de mejoramiento es la etapa de transformación, es decir la introducción de material genético foráneo en la especie deseada. Como se mencionó anteriormente hay diferentes métodos de transformación de material vegetal (Husaini *et al.*, 2010), siendo uno de los más utilizados la transformación mediante *A. tumefaciens*. En este trabajo se utilizó la cepa *ATHV*, mostrando porcentajes de transformación de 28 y 14 % dependiendo de la construcción utilizada. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores utilizando la misma cepa y en algunos casos el mismo plásmido (Aguilar-Bartels *et al.*, 2021). También estos autores observaron diferencias en la eficiencia de transformación con la edad del callo,

siendo mayor con callos de 6 días en comparación a callos de 10 días de edad, adjudicando la diferencia a diferentes estados y espesores de las células que condicionarían la infectividad de la bacteria (Vega *et al.*, 2009). En el presente trabajo se utilizaron semillas de 1 año lo que condicionó tanto el número de callos obtenidos como el tiempo necesario hasta la obtención de callos con tamaño adecuado (aproximadamente 15 días) y podría haber sido uno de los factores que influyeron en el menor porcentaje de callos transformados con relación a otros protocolos. Tal como se mencionó anteriormente, existen diferentes subespecies de arroz que difieren, entre otras cosas, en su capacidad para ser cultivadas *in vitro*. Es de destacar que las plantas de la subespecie Indica presentan serias dificultades para ser regeneradas desde callo (Pazuki & Sohani, 2013) y, por lo tanto, es mucho menor el número de cultivares transformados de esta subespecie en comparación con los japónicas. Entre los cultivares Indicas transformados utilizando *A. tumefaciens* pueden mencionarse Pusa Basmati, MR219, Taraori Basmati, Kasalath e IR64 entre otros, siendo la mayoría de estos transformados desde callos embriogénicos y también desde ápice del vástago como IR64 (Mohammed *et al.* 2019). Por lo tanto, se hacen numerosos esfuerzos tanto para optimizar protocolos de regeneración como para desarrollar otros métodos de transformación que no requieran el cultivo de callos. Estas técnicas se denominan transformación *in planta* o *in vivo*. Entre ellas, pueden mencionarse las referentes a la transformación de los órganos reproductivos de la planta como el caso de “floral dip” (Clough & Bent, 1998) o incluso directamente el embrión en la semilla. En arroz se han reportado el uso de estas técnicas, para el caso de floral dip se han observado porcentajes de transformación de anteras de hasta un 80% (Rod-in *et al.*, 2014; Ratanasut *et al.*, 2017), sin embargo, estos son reportes aislados que no han sido ampliamente reproducidos. La transformación de embriones y/o semillas, consiste en inocular el embrión mediante una punción con aguja embebida en *A. tumefaciens* y posterior cultivo de las semillas con la bacteria, luego estas semillas darán lugar a plantas T0 de las cuales se obtendrán semillas T1 transformadas. En arroz esta técnica fue utilizada en distintas oportunidades con resultados variables que van desde una eficiencia de transformación de 3% hasta un 30% dependiendo de los cultivares y los plásmidos utilizados (Supartana *et al.*, 2005; Lin *et al.*,

2009; Ahmed *et al.*, 2017). En nuestras condiciones experimentales esta metodología no dio resultados positivos por lo que se realizó una variante similar a la utilizada en trigo (Hamada *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021) donde los embriones fueron escindidos de las semillas y se emplearon como material de partida para la transformación. En este sentido logramos obtener 27,4% y 3,4 % de eficiencia de transformación dependiendo del plásmido utilizado. Estos porcentajes de transformación concuerdan con los reportados por otros autores para la metodología de transformación *in planta*. Los resultados obtenidos relacionados a la eficiencia de transformación tanto en cultivos *in vitro* como *in planta* nos permitirá incursionar en el mejoramiento genético de la variedad local Don Justo FCAYF por intermedio de la edición génica.

La modificación genómica dirigida en plantas se realiza desde 1980 (Paszowski *et al.*, 1988). Hasta el año 2014, las metodologías desarrolladas resultaban ser muy tediosas, laboriosas y costosas (Chen & Gao, 2014). En 2012, CRISPR-Cas surge como un nuevo sistema de edición (Jinek *et al.*, 2012), demostrando ser eficiente, rápido, y menos costoso que sus predecesores. Sin embargo, también presenta limitaciones como: la necesidad de una secuencia PAM (5'NGG para Cas9 de *Streptococcus pyogenes*) corriente abajo del sitio objetivo, mutagénesis indeseadas fuera de la secuencia de interés y sgRNA recalcitrantes para ciertas secuencias objetivo (Shan *et al.*, 2014).

En arroz, dicho sistema se comenzó a emplear desde 2013 cuando Shan *et al.* lograron editar eficientemente los genes *OsPDS* y *OsBADH2* mediante bombardeo a callos utilizando dos plásmidos diferentes: uno portador de Cas9 y otro con los sgRNA. El porcentaje de plantas editadas luego de la selección y regeneración logrados fue del 9,4% y 7,1% para cada gen respectivamente. Desde ese entonces hasta la actualidad se logró editar con CRISPR-Cas9 diferentes variedades (principalmente subespecie Japónica) en arroz, logrando frecuencias de edición muy variables que oscilan desde el 1% hasta el 77% (Shan *et al.*, 2013; Xie & Yang, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Ashokkumar *et al.*, 2020). En el presente trabajo y empleando un plásmido binario diseñado a través del sistema GoldenBraid se intentó editar el gen *badh2*, un gen

recesivo (Jodon, 1944) responsable del aroma en el arroz (Jezussek *et al.*, 2002; Sansenya *et al.*, 2018).

Previamente Shang *et al.* (2015) demostraron que editando el gen *badh2* en arroz mediante TALEN se lograba acumular la sustancia 2AP (principal responsable del aroma) tanto en mutantes heterocigóticos como homocigotos. Por otra parte, en 2020, Ashokkumar *et al.* mediante CRISPR-Cas9, lograron editar el gen induciendo inserciones y deleciones en 10 progenies T0 de 211 transformantes totales, obteniendo un porcentaje de edición del 4,7%.

En nuestro caso, no logramos detectar segmentos editados en muestras positivas para transformación, lo cual se explica principalmente por el hecho de que el número de muestras analizadas fue insuficiente (20 transformantes totales) necesitando al menos un mínimo de 300 muestras transformadas con la construcción para extraer datos concluyentes.

Finalmente, con los resultados obtenidos, se abre la posibilidad de desarrollar futuros trabajos de mejoramiento empleando ingeniería genética sobre la variedad local Don Justo FCAYF y la oportunidad de realizar el mismo experimento aumentando el número de muestras transformadas para así tal vez lograr detectar plantas editadas u obtener conclusiones más certeras. Por otro lado, la metodología de transformación *in vivo* explorada en el desarrollo de este trabajo final se muestra promisorio para realizar experimentos de transformación y/o edición génica en aquellos cultivares de la subespecie Indica los cuales suelen ser recalcitrantes al cultivo de tejidos.

6. Conclusión

La posibilidad de mejoramiento de las variedades de arroz desarrolladas en nuestro país y adaptadas a condiciones ambientales y de producción local, obedece en gran medida a la disponibilidad de protocolos para el cultivo de tejidos *in vitro*. También depende de protocolos optimizados de transformación mediante *A.tumefaciens* y ensayos de edición mediante nuevas tecnologías como CRISPR-Cas9, ya que, como se mencionó anteriormente, la mayoría de

los protocolos han sido optimizados para cultivares utilizados en investigación o comerciales que se cultivan en otros países.

En este trabajo se optimizaron las condiciones de cultivo *in vitro* de tejidos (callogénesis, regeneración aérea y regeneración radicular), se evaluaron diferentes formas de transformación *in vitro* e *in planta* con *A. tumefaciens* y se intentó editar el gen *badh2* mediante CRISPR-Cas9. Con respecto a la callogénesis, se determinó la concentración óptima de 2,4D en 3 mg l⁻¹, mientras que para la regeneración se utilizó una combinación de 4 mg l⁻¹ de BAP y 0,8 mg l⁻¹ de ANA. Al mismo tiempo, se observó que no fue necesaria la etapa de enraizamiento ya que durante la regeneración de parte aérea se observó un 100% de formación de raíces. Por otro lado, con respecto a los métodos de transformación se obtuvieron eficiencias del 3-28% dependiendo del método y del plásmido utilizado. Siguiendo estos protocolos se logró obtener una planta transgénica de la variedad Don Justo FCAyF que se confirmó mediante PCR para el gen Cas9 (Figura 21C).

Es importante recalcar en este punto la importancia de la optimización de los métodos de cultivo y transformación de variedades locales de alto rendimiento que nos permitan avanzar en el mejoramiento genético local ya sea para mejorar la productividad y/o la calidad de las variedades mejores adaptadas a las condiciones de cultivo de nuestro país. En este sentido los resultados obtenidos en este trabajo son de gran relevancia local, por eso dieron lugar a la publicación de parte de estos resultados como un trabajo original en la Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata (Duhalde *et al.*, 2022)

La regeneración de callos post selección se vio fuertemente afectada por el tiempo desde su formación a callo, siendo imprescindible acortar aún más los tiempos de selección.

A pesar de transformar eficientemente callos y embriones con toda la maquinaria necesaria para la actividad del sistema CRISPR-Cas9, no se logró hasta ahora confirmar la edición del sitio target (probablemente esto se deba al escaso número de transgénicos analizados).

7. Bibliografía

Abe, T; Futsuhara Y. 1985. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 72: 3-10.

Acevedo MA; Castrillo WA; Belmonte WC. 2006. ORIGEN, EVOLUCIÓN Y DIVERSIDAD DEL ARROZ. *Agronomía Tropical*. 56.

Adda, S; Reddy, TP; Kishor K. 1994. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Guizotia Abyssinica*. *In Vitro Cell & Developmental Biology*. 30: 104-107.

Aguilar-Bartels, C; Quirós-Segura, P; García-Piñeres, A; Gatica-Arias, A; Arrieta-Espinoza, G. 2021. Key aspects for the genetic transformation of rice (*Oryza sativa* L.) subspecies indica by *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Mesoamericana*. 32(3): 764-778.

Ahmed, T; Biswas, S; Elias, SM; Sazzadur Rahman, M; Tuteja, N; Seraj, ZI. 2017. In planta transformation for conferring salt tolerance to a tissue-culture unresponsive indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. doi:10.1007/s11627-017-9870-1

Altpeter, F; Springer, NM; Bartley, LE; Blechl, AE; Brutnell, TP; Citovsky, V; Stewart, CN. 2016. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*. 28(7): 1510-1520.

Amitai G; Sorek R. 2016. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature reviews microbiology*. 14:67–76.

Arber, W. 1979. Promotion and limitation of genetic exchange. *Science*. 205(4404): 361-365.

Ashokkumar, S; Jaganathan, D; Ramanathan, V; Rahman, H; Palaniswamy, R; Kambale, R; Muthurajan, R. 2020. Creation of novel alleles of fragrance gene OsBADH2 in rice through CRISPR/Cas9 mediated gene editing. *PLoS one* 15(8): e0237018.

Bandyopadhyay, A.; Thilmony, R. 2021. *Rice Genome Engineering and Gene Editing*. Springer US.

Barrangou, R; Fremaux, C; Deveau, H; Richards, M; Boyaval, P; Moineau, S; Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 315(5819): 1709-1712.

Barrangou, R. 2015. The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current opinion in immunology*. 32: 36-41.

Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V. 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 76– 84.

Bernier, J; Atlin GN; Serraj R; Kumar A; Spaner D. 2008. Breeding upland rice for drought resistance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88: 927-939.

Bhatia, S y Bera, T. 2015. Somatic Embryogenesis and Organogenesis. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. 209-230.

Binte Mostafiz, S; Wagiran, A. 2018. Efficient callus induction and regeneration in selected indica rice. *Agronomy*. 8(5): 77.

Bolotin, A; Quinquis, B; Sorokin, A; Ehrlich, S.D. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 151(8): 2551-2561

Bortesi L, Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* 33: 41– 52.

Caicedo AL; Williamson SH; Hernandez RD; Boyko A; Fledel-Alon A; York TL; Purugganan MD. 2007. Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. *PLoS genetics*. 3(9): e163.

Cangelosi GA; Ankenbauer RG; Nester EW. 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America*. 87(17): 6708-6712.

Castañeda, N; Chaparro, J; Castellanos, J. 2006. "Tecnología de la clonación y expresión génica en un sistema bacteriano y su aplicación en virología", *Revista de la Facultad de Medicina*. 11: 43-53.

Chen S; Wu J; Yang Y; Shi W; Xu M. 2006. The *fgr* gene responsible for rice fragrance was restricted within 69kb. *Plant Science*. 171: 505-514.

Chen S; Yang Y; Shi W; Ji Q; He F; Zhang Z; Cheng Z; Liu X; Xu M. 2008. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *The Plant cell*. 20(7):1850–1861.

Chen, K; Gao, C. 2014. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant cell reports*. 33(4): 575-583.

Civáñ P; Ali, S; Batista-Navarro R; Drosou K; Ihejieta C; Chakraborty D; Ray A; Gladioux P; Brown TA. 2019. Origin of the Aromatic Group of Cultivated Rice (*Oryza sativa* L). Traced to the Indian Subcontinent. *Genome biology and evolution*, 11(3): 832–843.

Clarke, J. D. 2009. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*.

Clough, SJ; Bent, AF. 1988. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 16(6):735-43.

Cui, Y; Xu, J; Cheng, M; Liao, X; Peng, S. 2018. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. 10(2): 455-465.

Deltcheva, E; Chylinski, K; Sharma, C.M; Gonzales, K; Chao, Y; Pirzada, Z.A; Charpentier, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 471(7340): 602-607.

Ding, D; Chen, K; Chen, Y; Li, H; Xie, K. 2018. Engineering introns to express RNA guides for Cas9-and Cpf1-mediated multiplex genome editing. *Molecular plant*. 11(4): 542-552.

Duhalde MA, Bezus R, Rodriguez AA, Maiale SJ, Romero FM. 2022. Optimización de condiciones de cultivo de tejidos y transformación in vitro e in planta de la variedad local de arroz Don Justo FCAyF. *Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de La Plata*. En prensa.

Frammond, AJ; Barton KA; Chilton, MD. 1983. Mini-Ti-: a new vector strategy for plant genetic engineering. *Bio/Technology*. 5: 262-269.

Gaillochét C & Lohmann JU. 2015. The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development*. 142(13): 2237-2249.

Gaillochét, C; Stiehl, T; Wenzl, C; Ripoll, JJ; Bailey-Steinitz, L.; Li, L; Lohmann, JU. 2017. Control of plant cell fate transitions by transcriptional and hormonal signals. *Elife*. 6: 30135.

Garris, A. J., Tai, T. H., Coburn, J., Kresovich, S., & McCouch, S. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*. 169(3), 1631–1638.

Gasiunas G; Barrangou R; Horvath P; Siksnys V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *PNAS*. 109: 2579–2586.

Gelvin S.B. 2017. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetic*. 51:195–217.

Gleditsch, D; Pausch, P; Müller-Esparza, H; Özcan, A; Guo, X; Bange, G; Randau, L. 2019. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA biology*. 16(4): 504-517.

Hamada, H; Linghu, Q; Nagira, Y; Miki, R; Taoka, N; Imai, R. 2017. An in planta biolistic method for stable wheat transformation. *Scientific Reports*. 7(1): 11443. doi:10.1038/s41598-017-11936-0.

Haseloff J and Ajioka, J. 2009. Biología sintética: historia, desafíos y perspectivas. *JR Soc Interface* 6: Suplemento 4S389–391.

- He, F; Nair, G.R; Soto, C.S; Chang, Y; Hsu, L; Ronzone, E; Binns, A.N. 2009. Molecular basis of ChvE function in sugar binding, sugar utilization, and virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 191(18):5802-5813.
- Hellens, RP; Edwards A; Leyland, NR; Bean, S; Mullineaux, PM. 1999. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*. 42: 819–832
- Hellens, RP; Mullineaux, P; Klee H. 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vector. *Trends in Plant Science*. 5(10): 446-451.
- Hellens, RP; Mullineaux, P; Klee, H. 2000. Technical Focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*. 5(10): 446-551.
- Hiei, Y. and Komari, T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature*.
- Hilder VA, Boulter D .1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance a critical review. *Crop Protection*. 18: 177-191.
- Hoekema, A; Hirsch, PR; Hooykaas, PJ; Schilperoort, RA. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303(5913): 179-180.
- Hotchkiss, RD; Gabor, M. 1970. Bacterial transformation, with special reference to recombination process. *Annual review of genetics*. 4(1): 193-224.
- Hoque, M; Mansfield, JW. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of *Indica* rice genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 78(3), 217-223.
- Horvath P; Barrangou R. 2010. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* 327, 167.
- Hu X; Zhao J; DeGrado WF; Binns AN. 2013. *Agrobacterium tumefaciens* recognizes its host environment using ChvE to bind diverse plant sugars as virulence signals. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America*. 110(2): 678-83.

Husaini, AM; Abdin, MZ; Parray, GA; Sanghera, GS; Murtaza, I; Alam, T; Khan, HN. 2010. Vehicles and ways for efficient nuclear transformation in plants. *GM crops*. 1(5): 276-287.

Ikeuchi M; Favero DS; Sakamoto Y; Iwase A; Coleman D; Rymen B; Sugimoto K. 2019. Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annual Review Plant Biology*. 70: 377-406.

Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96(1): 23-28.

Ishino Y; Shinagawa H; Makino K; Amemura M; Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 169(12): 5429–543.

Jezussek, M; Juliano, BO; Schieberle, P. 2002. Comparison of key aroma compounds in cooked brown rice varieties based on aroma extract dilution analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(5): 1101-1105.

Jiang, F; Doudna, J.A. 2017. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review Biophys*. 46(1): 505-529.

Jinek, M; Chylinski, K; Fonfara, I; Hauer, M; Doudna, J.A; Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(6096): 816-821.

Jodon, NE. 1944. Inheritance of flower fragrance and other characters in rice. *Journal of the American Society of Agronomy*.

Keshavareddy G; Kumar A.R; Ramu VS. 2018. Methods of Plant Transformation- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>

Khalil AM. 2020. The genome editing revolution: review. *Journal of Genet Engineering and Biotechnology*. 2020;18(1):68. doi: 10.1186/s43141-020-00078-y.

Kovach MJ; Calingacion MN; Fitzgerald MA; McCouch SR. 2009. The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *Biological Sciences*. 106(34): 14444-14449.

Kumar N & Reddy MP. 2011. In vitro plant propagation: a review. *Journal of forest and environmental science*. 27(2): 61-72.

Kumar, S & Sanan-Mishra, N. 2021. A Rapid Method for Stably Transforming Rice Seeds. In *Rice Genome Engineering and Gene Editing*. Humana, New York, NY. 63-68.

Lin, J; Zhou, B; Yang, Y; Mei, J; Zhao, X; Guo, X; Liu, X. 2009. Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice. *Plant Cell Reports*. 28(7): 1065-1074. doi:10.1007/s00299-009-0706-2

Liu, Y; Luo, W; Linghu, Q; Abe, F; Hisano, H; Sato, K; Imai, R. 2021. In planta genome editing in commercial wheat varieties. *Frontiers in Plant Science*. 12(388). doi:10.3389/fpls.2021.648841.

Low L; Yang S; Kok DA; Ong-Abdullah J; Tan N; Lai K. 2018. *Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method*. New Visions in Plant Science.

Ma, X; Zhang, Q; Zhu, Q; Liu, W; Chen, Y; Qiu, R; Liu, YG. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular plant*. 8(8): 1274-1284.

Mahattanatawee K & Rouseff RL. 2014. Comparison of aroma active and sulfur volatiles in three fragrant rice cultivars using GC–Olfactometry and GC–PFPD. *Food chemistry*. 154: 1-6.

Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S; Wolf, Y.I; Koonin, E.V. 2018. Classification and nomenclature of CRISPR-Cas systems: where from here?. *The CRISPR Journal*. 1(5): 325-336.

Makarova, K.S; Wolf, Y.I; Iranzo, J; Shmakov, S.A; Alkhnbashi, O.S; Brouns, S.J; Koonin, E.V. 2020. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a

burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*. 18(2): 67-83.

Malzahn, A; Lowder, L; Qi, Y. 2017. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell & bioscience*. 7(1): 1-18.

Marraffini, L.A. 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 526(7571), 55-61.

Mohammed, S., Samad, A. A., & Rahmat, Z. (2019). Agrobacterium-mediated transformation of rice: constraints and possible solutions. *Rice Science*. 26(3):133-146. doi:10.1016/j.rsci.2019.04.001

Mojica FJ; Díez-Villaseñor C; García-Martínez J; Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. 60(2):174-82.

Mojica, FJ; Díez-Villaseñor, C; García-Martínez, J; Almendros, C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 155(3): 733-740.

Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Review Microbiology*. 13(11):722-36.

Murashige T; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473–479

Newell ChA. 2000. Plant transformation technology. *Molecular Biotechnology* . 16(1): 53-65.

Nussenzweig, PM; Marraffini, L.A. 2020. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas immunity in bacteria. *Annual Review of Genetics*. 93-120.

Oka HI. 1988. Indica-Japonica differentiation of rice cultivars. In: Oka HI, editor. *Origin of cultivated rice*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press; Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 141–179.

Oliveros, JC; Franch, M; Tabas-Madrid, D; San-León, D; Montoliu, L; Cubas, P; Pazos, F. 2016. Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic acids research*. 44: 267-271.

Orlowski J; Bujnicki JM. 2008. Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses, *Nucleic Acids Research*, Volume 36 (11): 3552–3569.

Pacher M, Puchta H. 2017. From classical mutagenesis to nuclease-based breeding-directing natural DNA repair for a natural end-product. *Plant J*. 90:819–33.

Paszkowski, J; Baur, M; Bogucki, A; Potrykus, I. 1988. Gene targeting in plants. *The EMBO journal*, 7(13), 4021–4026.

Pazuki, A; Sohani, MM. 2013. Phenotypic evaluation of scutellum-derived calluses in 'Indica'rice cultivars. *Acta agriculturae Slovenica*. 101(2): 239-247.

Pickar-Oliver, A; Gersbach, C.A. 2019. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature reviews Molecular cell biology*. 20(8): 490-507.

Pingoud A, Jeltsch A. 2001. Structure and function of type II restriction endonucleases, *Nucleic Acids Research*, Volume 29 (18): 3705–3727.

Plessis, A.; Perrin, A.; Haber, J.; Dujon, B. 1992. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics* 1992, 130, 451–460.

Pougach K; Semenova E; Bogdanova E; Datsenko KA; Djordjevic M; Wanner BL; Severinov K. 2010. Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 77(6):1367-79.

Pourcel C; Salvignol G; Vergnaud G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology society*. 151(Pt 3):653-663.

Puchta H, Dujon B, Hohn B. 1993. Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 21:5034– 40.

Puchta, H. 2005. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of experimental botany.* 56(409): 1-14.

Puchta, H; Fauser F. 2013. Gene targeting in Plants: 25 years later. *The International Journal Developmental Biology.* 57: 629-637.

Qiu ZJ; Zhangs YS. 2003. Why fragrance rice produced in Thailand can be sold worldwide. *World Agric.* 2: 33-36.

Ran, F.A; Cong, L; Yan, W.X; Scott, D.A; Gootenberg, J.S; Kriz, A.J; Zhang, F. 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 520(7546): 186-191.

Ratanasut, K; Rod-In, W; Sujipuli, K. 2017. In planta *Agrobacterium* mediated transformation of rice. *Rice Science.* 24(3): 181-186. doi:10.1016/j.rsci.2016.11.001

Robb GB. 2019. Genome editing with CRISPR-Cas: an overview. *Curr Protoc Essential Laboratory Tecnology.* 19:36. <https://doi.org/10.1002/cpet.36>.

Rod-in, W; Sujipuli, K; Ratanasut, K. 2014. The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation. *Journal of Agricultural Technology.* 10(2): 467-474.

Rodriguez, R; Solís, R; Elizondo, G; Rodriguez, G; Saldaña, B. 2019. Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine.* 43(4): 1559-1574.

Romero, FM; Gatica-Arias, A. 2019. CRISPR/Cas9: Development and Application in Rice Breeding. *Rice Science.* 26(5): 265–281.

Rudin, N.; Sugarman, E.; Haber, J.E. 1989. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1989, 122, 519–534.

Saba-Mayoral, A; Bassie, L; Christou, P; Capell, T. 2022. Development of a facile genetic transformation system for the Spanish elite rice paella genotype Bomba. *Transgenic Research*. 1-16.

Sambrook, J; Russell, D. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Edition 3a, New York, Cold spring harbor laboratory press. 1:35-37.

Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74: 5463–5467.

Sansanya, S; Hua, Y; Chumanee, S. 2018. The correlation between 2-acetyl-1-pyrroline content, biological compounds and molecular characterization to the aroma intensities of Thai local rice. *Journal of Oleo Science*. 67(7): 893-904.

Sapranaukas, R; Gasiunas, G; Fremaux, C; Barrangou, R; Horvath, P; Siksnys, V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*. 39(21): 9275-9282.

Sarrion-Perdigones, A; Falconi, EE; Zandalinas, SI; Juárez, P; Fernández-del-Carmen, A; Granell, A; Orzaez, D. 2011. GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>.

Sarrion-Perdigones, A; Vazquez-Vilar, M; Palací, J; Castelijns, B; Forment, J; Ziarsolo, P; Blanca, J; Granell, A; Orzaez, D. 2013. GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. *Plant Physiology*. 162(3): 1618-1631.

Schaart, JG; Van de Wiel, CC; Lotz, LA; Smulders, MJ. 2016. Opportunities for products of new plant breeding techniques. *Trends in Plant Science*. 21(5): 438-449.

Scheben, A; Wolter, F; Batley, J; Puchta, H; Edwards, D. 2017, Towards CRISPR/Cas crops – bringing together genomics and genome editing. *New Phytol*, 216: 682-698.

Shan, Q; Wang, Y; Li, J; Zhang, Y; Chen, K; Liang, Z; Gao, C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*. 31(8); 686-688.

Shan, Q; Wang, Y; Li, J; Gao, C. 2014. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature protocols*. 9(10): 2395-2410.

Shan, Q; Zhang, Y; Chen, K; Zhang, K; Gao, C. 2015. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the Os BADH 2 gene using TALEN technology. *Plant biotechnology journal*. 13(6): 791-800.

Stachel, SE; Messens E; Van Montagu, M; Zambryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. 318(6047): 624-629.

Sternberg S. H; Redding S; Jinek M; Greene EC; Doudna JA. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 507(7490): 62–67.

Steward, FC; Mapes, MO; Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*. 45: 705-708.

Supartana, P; Shimizu, T; Shioiri, H; Nogawa, M; Nozue, M; Kojima, M. 2005. Development of simple and efficient in planta transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 100(4): 391-397. doi:10.1263/jbb.100.391

Szczelkun MD; Tikhomirova MS; Sinkunas T; Gasiunas G; Karvelis T; Pschera P; Siksnys V; Seidel R. 2014. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(27): 9798–9803.

Tang, X; Zheng, X; Qi, Y; Zhang, D; Cheng, Y; Tang, A; Zhang, Y. 2016. A single transcript CRISPR-Cas9 system for efficient genome editing in plants. *Molecular plant*. 9(7): 1088-1091.

Tiwari, M; Mishra, A.K; Chakrabarty, D. 2022. Agrobacterium-mediated gene transfer: recent advancements and layered immunity in plants. *Planta* 256 (37).

Tripathy, SK; Maharana, M; Panda, S; Sahoo, B; Sahoo, DB; Behera, SK; Chakma, B. 2018. Exploring efficient callusing and rapid regeneration system in upland rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Genomics and Genetics*.

Tripathy, SK. 2021. Optimization of culture variables for efficient callus induction and rapid plant regeneration in zinc rich rice (*Oryza sativa* L.) cv. "Chittimuthyalu". *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 9(4): 1.

Turnbull, C; Lillemo, M; Hvoslef-Eide, TA. 2021. Global regulation of genetically modified crops amid the gene edited crop boom—a review. *Frontiers in Plant Science*. 12, 630396.

Tzfira, T; Citovsky, V. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *TRENDS in Cell Biology*. 12 (3).

Tzfira, T; Citovsky, V. 2007. *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. Springer Science & Business Media.

Vaughan DA; Bao-Rong Lu; Tomooka N. 2008. The evolving story of rice evolution. *Plant Science*. 174: 394–408

Vazquez-Vilar, M; Bernabé-Orts JM; Fernandez del Carmen, A; Ziarsolo, P; Blanca, J; Granell, A; Orzaez D. 2016. A modular toolbox for gRNA–Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods* 12, 10.

Vazquez-Vilar M; Gandia M; García-Carpintero, V; Marqués, E; Sarrion-Perdigones, A; Yenush, L; Polaina, J; Manzanares, P; Marcos, JF; Orzaes, D. 2020. Multigene Engineering by GoldenBraid Cloning: From Plants to Filamentous Fungi and Beyond. *Current Protocols*.

Vazquez-Vilar M; Garcia V; Selma S; Bernabé JM; Sanchez, J; Salazar, B; Ressa, A; Carmine, P; Ajenjo, M; Quintela, JC; Fernández-del-Carmen, A; Granell, A; Orzáez, D. 2021. The GB4.0 Platform, an All-In-One Tool for CRISPR/Cas-Based Multiplex Genome Engineering in Plants. *Frontier in Plant Science*.

Veerabhadraswamy M; Sindhumole P; Deepu M; Shylaja MR; Josep J; Rehna A; James D. 2022. Molecular analysis of aroma gene (BADH2) in Biriyanicheera: a tropical aromatic rice genotype from Kerala, India. *Molecular Biology Reports*. 49: 3149–3155.

Vega, R; Vásquez, N; Espinoza, AM; Gatica, AM; Valdez-Melara, M. 2009. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). *Revista de Biología Tropical*. 57: 141-150.

Veluthambi, K; Ream, W; Gelvin, SB. 1988. Virulence genes, borders, and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal Bacteriology*. 170(4):1523-1532.

Voytas, DF. 2013. Plant Genome Engineering with Sequence-Specific Nucleases. *Annual review of Plant Biology*. 64(1):327-350.

Wang, C; Shen, L; Fu, Y; Yan, C; Wang, K. 2015. A simple CRISPR/Cas9 system for multiplex genome editing in rice. *Journal of Genetics and Genomics*. 42(12): 703-706.

Wang, J; Meng, X; Hu, X; Sun, T; Li, J; Wang, K; Yu, H. 2019. xCas9 expands the scope of genome editing with reduced efficiency in rice. *Plant biotechnology journal*. 17(4): 709.

Wijayanti N. 2021. *Agrobacterium*-Mediated Transformation Improvement in Tomato. *Journal of Biology and Today's World*. 10 (5): 01-04.

Wise, AA; Liu, Z; Binns, AN. 2006. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. In *Agrobacterium protocols*. 343: 43-54.

Xie, K; Yang, Y. 2013. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. *Molecular plant*. 6(6): 1975-1983.

Xie K; Minkenberg B; Yang Y. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,.112(11):3570-3575.

Yang Y; Zhu K, Xia H; Chen L; Chen K. 2014. Comparative proteomic analysis of indica and japonica rice varieties. *Genetics and Molecular Biology*. 37: 652-661

Yaqoob, U; Kaul, T; Nawchoo, IA. 2021. In vitro plant regeneration of some recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Vegetos*. 34(1): 102-106.

Yu SB; Xu WJ; Vijayakumar CM; Ali J; Fu BY; Xu JL; Jiang YJ; Marghirang R; Domingo J; Aquino C; Virmani SS; Li ZK. 2003. Molecular diversity and multilocus organization of the parental lines used in the International Rice Molecular Breeding Program. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 131-140.

Yuan ZC; Liu P; Saenkham P; Kerr K; Nester EW. 2008. Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *Journal of Bacteriology*. 190(2): 494-507.

Zhang, H; Zhang, J; Wei, P; Zhang, B; Gou, F; Feng, Z; Zhu, JK. 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant biotechnology journal*. 12(6): 797-807.

Zhao, XY; Su YH; Cheng ZJ; Zhang XS. 2008. Cell fate switch during in vitro plant organogenesis. *Journal Of Integrative Plant Biology*. 50: 816–824.

