

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EDICIÓN GENÉTICA CRISPR/CAS9 IN
PLANTA EN EMBRIONES MADUROS DE ARROZ (*ORYZA SATIVA* L.)
MEDIANTE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
en Biología para optar por el grado y título de Maestría Académica en Biología con
énfasis en Genética y Biología Molecular

ALEJANDRO SEBIANI CALVO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado en Biología, por la excelente formación académica recibida.

Al Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Escuela de Biología y al Laboratorio de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular por facilitar las instalaciones, equipo, reactivos y espacio para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Andrés Gatica Arias, por ser mi profesor tutor, y brindarme apoyo, motivación, y en general, un excelente acompañamiento durante el proceso de investigación. Además de estar siempre pendiente a brindar las mejores condiciones posibles para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi comité de tesis y profesores lectores, Griselda Arrieta Espinoza y Alejandro Hernández Soto, por su guía, consejos y enseñanzas.

A mis compañeros de laboratorio por la ayuda brindada y su acompañamiento durante esta etapa. Principalmente a Randall Rojas por su guía y ayuda.

A mis padres por su apoyo incondicional.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con Énfasis en Genética y Biología Molecular.”

Dr. Gilbert Brenes Camacho
Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado

Dr. Andrés Gatica Arias
Director de tesis

M.Sc. Griselda Arrieta Espinoza
Asesora

Dr. Alejandro Hernández Soto
Asesor

Dra. María Viñas Meneses
Representante del Director del Programa de Posgrado

Alejandro Sebiani Calvo
Candidato

LISTA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	ii
HOJA DE APROBACIÓN	ii
RESUMEN	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
OBJETIVOS	x
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
Edición de genomas de cultivos agrícolas mediante CRISPR/Cas9 utilizando metodologías de transformación independientes de cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.....	1
Resumen	1
Abstract	1
Introducción.....	2
Transformación <i>in planta</i>.....	2
Edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 de manera <i>in planta</i>	4
Edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 de manera <i>in planta</i> en plantas modelo	4
Edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 de manera <i>in planta</i> en cultivos de importancia agronómica	5
Métodos novedosos de edición genética independientes del cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.....	10
Desafíos de la edición de genomas de manera <i>in planta</i>	11
Conclusión y Perspectivas Futuras	12
Bibliografía.....	13
ARTÍCULO 1	19
Uso de cumarina como inhibidor de la germinación de semillas de arroz y su posible uso en transformación genética mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	19
Resumen	19
Abstract	19
Introducción.....	20
Materiales y Métodos	21
Resultados	22
Discusión.....	25
Conclusiones.....	26
Bibliografía.....	26

ARTÍCULO 2	29
Optimización de una metodología de transformación genética <i>in planta</i> de embriones maduros de arroz (<i>Oryza sativa</i> var. <i>Indica</i>).	29
Resumen	29
Abstract	29
Introducción	30
Materiales y Métodos	31
Resultados	35
Discusión	43
Conclusiones	45
Bibliografía	46
ARTÍCULO 3	51
Edición del gen de la trehalasa OSTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9 de manera <i>in planta</i>.	51
Abstract	51
Introducción	52
Materiales y Métodos	53
Resultados	54
Discusión	61
Conclusiones	62
Bibliografía	63

RESUMEN

El arroz es uno de los cultivos más importantes, es el principal alimento de más de la mitad de la población. La estabilidad en la producción de arroz es crucial para la seguridad alimentaria, sin embargo, como en todo cultivo la producción se ve afectada por factores de estrés bióticos y abióticos. Entre ellos la sequía y salinidad se consideran como los que más afectan el rendimiento en la producción de cultivos. Los programas de mejoramiento genético y grupos de investigación tienen como objetivo final, generar cultivos con mayor eficiencia de producción, mayor resistencia a estrés bióticos y abiótico, con mejoras nutricionales, y todo ocupando menor espacio de cultivo. Las herramientas de mejoramiento genético modernas como la edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 son esenciales para cumplir con dichos objetivos. El uso de CRISPR/Cas9 requiere de la entrega de sus componentes al interior de la célula vegetal, la metodología más comúnmente utilizada es la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* y la regeneración de plantas editadas mediante cultivo *in vitro* de tejidos. La transformación genética de plantas es por sí misma una herramienta importante en el mejoramiento genético de cultivos. El establecimiento de metodologías de cultivo *in vitro* de tejidos se ha identificado como una limitante y cuello de botella en el progreso de las tecnologías de transformación genética y de edición de genomas mediante CRISPR/Cas9. El objetivo principal de esta investigación fue la optimización de metodologías de transformación *in planta*, que sobrepasan las limitaciones del cultivo *in vitro* de tejidos, y facilitar la entrega de los componentes CRISPR/Cas9 para la edición de genomas de arroz. Se optimizó un protocolo altamente eficiente, rápido y fácil para la transformación genética *in planta* en embriones maduros de arroz. Se evaluaron los factores involucrados en la eficiencia de la transferencia de los vectores de expresión al interior de las células vegetales como: cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, condiciones de co-cultivo, tiempo de co-cultivo, concentración de acetosiringona y densidad óptica de la solución de *Agrobacterium*. Se realizó una comparación de la metodología *in planta* desarrollado con la metodología tradicional de transformación *in vitro* de callos embriogénicos de arroz. El método *in planta* es más rápido, menos costoso y más eficiente que el método *in vitro*. Finalmente se realizó la edición genética mediante CRISPR/Cas9 en arroz utilizando la metodología de transformación optimizada. Se confirmó la edición del gen de la trehalosa (OsTRE) en arroz con un porcentaje de eficiencia del 23,5%. La mutación obtenida mediante CRISPR/Cas9 en una de las líneas desarrolladas (C720-34) genera un cambio importante en la proteína, se da un cambio en el marco abierto de lectura que cambia secuencia de aminoácidos traducida, Se predice la traducción de una proteína trehalasa más corta y la pérdida del sitio activo, una región altamente conservada donde ocurre la hidrólisis del disacárido trehalosa en dos moléculas de glucosa. La ruta de biosíntesis de la trehalosa tiene un rol fundamental en procesos biológicos de las plantas. Se ha demostrado que la acumulación del azúcar trehalosa confiere a las plantas mayor resistencia a estrés abiótico por sequía, salinidad y bajas temperatura. Se propone utilizar esta estrategia de edición genética CRISPR/Cas9 *in planta* en el estudio de genes y generación de líneas de arroz con características de importancia agrícola y económica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrategias de edición genética CRISPR/Cas9 <i>in planta</i> . Los métodos de transformación <i>in planta</i> se pueden dividir según el tejido blanco seleccionado para la transformación. Las estrategias para la entrega de componentes CRISPR/Cas9 dentro de la célula vegetal incluyen: <i>Agrobacterium</i> , biobalística, uso de nanopartículas e infección viral. Los sistemas CRISPR/Cas9 se pueden diseñar para aplicaciones como la edición de genes, la selección de genes y la regulación de genes.	5
Figura 1. Efecto inhibitorio de la cumarina sobre la germinación de semillas de arroz. (a-b) Porcentaje de germinación acumulativo de semillas sometidas a diferentes concentraciones de cumarina (0, 1, 3, 6, 9 o 12 mM) por inmersión temporal de 1 minuto y por inmersión continua respectivamente. c Morfología de brotes a los 7 días posterior al tratamiento de inmersión temporal con cumarina 12 mM. d Morfología de brotes a los 7 días posterior al tratamiento de inmersión continua con cumarina 3 mM.	23
Figura 2. Efecto inhibitorio de la cumarina sobre el crecimiento de brotes de arroz. Longitud de los brotes 5 días después del tratamiento de inmersión con cumarina (12 mM) por 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 minutos. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar de cada tratamiento.	24
Figura 3. Tamaño del efecto del tiempo de inmersión sobre el promedio de longitud de plantas.	24
Figura 4. Efecto de la cumarina sobre el crecimiento y viabilidad de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Cultivos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> inoculados previo y posterior al tratamiento con cumarina a diferentes concentraciones (0 mM, 6 mM y 12mM) por 40 minutos.....	25
Figura 1. Mapa del plásmido pCambia1303. Fuente: SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com).	31
Figura 2. Efecto de las condiciones de co-cultivo y cepa de <i>Agrobacterium</i> en la eficiencia de transformación genética. Porcentaje promedio de área con expresión GUS de plantas transformadas mediante la combinación de los factores: método de co-cultivo (medio sólido, medio líquido), tiempo de co-cultivo (4, 6 días) y cepa de <i>Agrobacterium</i> (ATHV, GV3101).	36
Figura 3. Efecto del uso de cumarina en la eficiencia de transformación genética. a Porcentaje promedio de área con expresión GUS de plantas transformadas con diferentes tratamientos de cumarina (0 mM, 12 mM). b Porcentaje de plantas con expresión GUS en más del 90% del área para cada tratamiento de cumarina. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar de cada tratamiento.	37
Figura 4. Efecto de la concentración de acetosiringona en la eficiencia de transformación genética. a Porcentaje promedio de área con expresión GUS de plantas transformadas con diferentes concentraciones de acetosiringona (50 μ M, 100 μ M, 150 μ M). Los datos representan el valor promedio \pm error estándar de cada tratamiento.	38
Figura 5. Efecto de la densidad óptica de <i>Agrobacterium</i> en la eficiencia de transformación genética. a Porcentaje promedio de área con expresión GUS de plantas transformadas con diferentes densidades ópticas de <i>Agrobacterium</i> (0.5 DO600 nm, 1.0 DO600 nm, 1.5 DO600 nm). b Porcentaje de plantas con expresión GUS en más del 90% del área para cada tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar de cada tratamiento.	39
Figura 6. Prueba histoquímica GUS de plantas de arroz transformadas. a Plántula de arroz obtenida a partir de transformación de embriones maduros de arroz con el protocolo <i>in planta</i> optimizado. b Planta sin transformar.	40

Figura 7. Cortes longitudinales de mesocótilo, coleóptilo y primera hoja de plantas de arroz expresando actividad GUS (A, B y C respectivamente) después de 6 días de transformación y controles de plantas sin transformar (D, E y F respectivamente). Aumento 20X.....	40
Figura 8. Prueba histoquímica GUS. a Callos de arroz transformados con puntos de coloración azul indicando expresión del gen GUS. b Callos de arroz sin transformar.	41
Figura 9. Selección de callos transformados en medio suplementado con higromicina (50mg/l).	42
Figura 1. Mapa del plásmido C720. Fuente: (SnapGene® Software (from Dotmatics; Available at Snapgene.Com), n.d.).	53
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ADN de plantas transformadas. MM= GeneRuler 100bp plus (Thermo Scientific), 1-11 = ADN extraído de plantas transformadas. Agarosa 1%, 100V x 30 min. ..	55
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del gen OsTRE. MM= GeneRuler 100bp plus (Thermo Scientific), 1-6 = Plantas transformadas. Amplificación de un fragmento de 820pb del gen OsTRE a partir de ADN de muestras de plantas transformadas. Agarosa 1%, 100V x 30 min.....	56
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del gen cas9. MM= GeneRuler 100bp plus (Thermo Scientific), 1-10 = Plantas transformadas. Amplificación de un fragmento de 693pb del gen cas9 a partir de ADN de muestras de plantas transformadas. Agarosa 1%, 100V x 30 min.	56
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del gen virgG. MM= GeneRuler 100bp plus (Thermo Scientific), 1-10 = Plantas transformadas contaminadas, 11 = Planta transformada sana, C- =Control negativo. Amplificación de un fragmento de 383pb del gen virG a partir de ADN de muestras de plantas transformadas. Agarosa 1%, 100V x 30 min.....	57
Figura 6. Mutaciones en el gen OsTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9. Secuenciación de la región blanco en el exón 9 del gen OsTRE de la planta C720-2. La secuencia PAM se resalta en color verde, la secuencia complementaria al ARN guía se resalta en color rojo y el sitio de corte se resalta con una flecha roja. La mutación se representa con letra azul.....	58
Figura 7. Mutaciones en el gen OsTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9. Secuenciación de la región blanco en el exón 9 del gen OsTRE de la planta C720-38. La secuencia PAM se resalta en color verde, la secuencia complementaria al ARN guía se resalta en color rojo y el sitio de corte se resalta con una flecha roja. La mutación se representa con letra azul.....	59
Figura 8. Mutaciones en el gen OsTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9. Secuenciación de la región blanco en el exón 9 del gen OsTRE de la planta C720-64. La secuencia PAM se resalta en color verde, la secuencia complementaria al ARN guía se resalta en color rojo y el sitio de corte se resalta con una flecha roja. La mutación se representa con letra azul.....	59
Figura 9. Mutaciones en el gen OsTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9. Secuenciación de la región blanco en el exón 9 del gen OsTRE de la planta C720-111. La secuencia PAM se resalta en color verde, la secuencia complementaria al ARN guía se resalta en color rojo y el sitio de corte se resalta con una flecha roja. La mutación se representa con letra azul.....	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Ensayos de optimización del uso de cumarina como inhibidor de la germinación de semillas de arroz.	21
Cuadro 1. Lista de insumos considerados en el análisis de costos de las metodologías de transformación genética.	35
Cuadro 2. Comparación entre métodos de transformación <i>in planta</i> e <i>in vitro</i>	42
Cuadro 1. Primers específicos para el análisis molecular de plantas transformadas.	54
Cuadro 2. Cuantificación y análisis de calidad de ADN de plantas transformadas.	55
Cuadro 3. Eficiencia de integración estable del sistema CRISPR/Cas9 mediante transformación <i>in planta</i> de embriones maduros de arroz.	57
Cuadro 4. Predicción de los marcos abiertos de lectura (ORF) de los genes editados y su comparación con el gen <i>OsTRE</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico

ADN-T: ADN de transferencia

Cas9: Proteína 9 asociada a CRISPR

CRISPR: siglas en inglés de “regiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas”

GA: Giberelinas

GFP: siglas en inglés de “green fluorescent protein”

GUS: siglas en inglés de “beta-glucoronidasa”

INDEL: iglas en inglés de “mutaciones de tipo inserción/delección”

OD600nm: Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nanómetros

ORF: siglas en inglés de “marco abierto de lectura”

PAM: siglas en inglés de “motivo adyacente al protoespaciador”

SAM: siglas en inglés de “meristemas apicales de brotes”

PCR: siglas en inglés de “reacción en cadena de la polimerasa”

QTL: siglas en inglés de “locus de caracteres cuantitativos”

RNP: siglas en inglés de “complejo de ribonucleoproteína”

sgRNA: siglas en inglés de “ARN guía única”

TALEN: siglas en inglés de “nucleasa de actividad similar a activador de transcripción”

ZFN: siglas en inglés de “nucleasa de dedos de zinc”

OBJETIVOS

Objetivo general

Optimizar la eficiencia de transformación genética *in planta* en embriones maduros cigóticos de arroz mediante *Agrobacterium tumefaciens* con el fin de integrar la herramienta de edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 y desarrollar un sistema eficiente, fácil y rápido para la edición del gen de la trehalasa.

Objetivos específicos

Establecer una metodología de transformación genética *in planta* mediada por *Agrobacterium* en embriones cigóticos maduros de arroz optimizando los siguientes factores: cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, tiempo de co-cultivo, método de co-cultivo, inhibición de la germinación, concentración de acetosiringona y concentración de *Agrobacterium*.

Comparar en términos de eficiencia, tiempo y costo las diferencias entre la metodología de transformación *in planta* desarrollada con respecto a metodologías tradicionales *in vitro*.

Desarrollar un sistema de edición genética *in planta* en arroz integrando la herramienta CRISPR/Cas9 a la metodología de transformación de embriones maduros y evaluar la eficiencia de edición del gen de la trehalasa.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Edición de genomas de cultivos agrícolas mediante CRISPR/Cas9 utilizando metodologías de transformación independientes de cultivo *in vitro* de tejidos

Alejandro Sebiani Calvo^{1, 2} · Alejandro Hernández Soto³ · Andrés M Gatica-Arias^{1, 3}

¹ Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, Laboratorio de Biotecnología de plantas, San José, Costa Rica

² Programa de Posgrado en Biología (PPB), Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

³ Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología, Centro de Investigación en Biotecnología, Cartago, Costa Rica

Resumen

La tecnología de edición genética CRISPR/Cas9 está en camino de revolucionar el campo de mejoramiento genético de cultivos de importancia agrícola. Para realizar los cambios en el ADN de los genes de interés, el sistema tiene que ser introducido dentro de las células vegetales. El método más utilizado para la entrega de CRISPR/Cas9 en plantas es la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* y la regeneración de plantas a través de procedimientos de cultivo *in vitro* de tejidos. La dificultad de implementar las metodologías de cultivo *in vitro* de tejidos se ha identificado como un cuello de botella, limitando el potencial de mejoramiento genético de plantas. Se han desarrollado metodologías de transformación que sobrepasan las limitantes del cultivo de tejidos, se les conoce como *in planta*. En esta revisión se recopilan las investigaciones dirigidas a aplicar las estrategias de transformación genética *in planta* para facilitar la edición genética mediante CRISPR/Cas9, especialmente enfocado en los trabajos realizados en plantas no modelos. Se identificó que solamente 3 plantas no modelo: el algodón, el arroz, y el trigo, se han editado mediante CRISPR/Cas9 utilizando métodos de transformación *in planta*. Se identifica un espacio de investigación con un alto potencial, se han desarrollado metodologías de transformación *in planta* para una gran diversidad de plantas, lo que significa una oportunidad para grupos de investigación de países en vías de desarrollo de facilitar el acceso a la herramienta CRISPR/Cas9 y para dirigir esfuerzos en mejorar la producción de cultivos locales o regionales de importancia económica.

Abstract

CRISPR/Cas9 gene editing technology is on its way to revolutionizing the field of genetic improvement of crops. To create changes in the target gene DNA, the system must be introduced into the plant cells. The most widely used method for the delivery of CRISPR/Cas9 in plants is genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* and plant regeneration via *in vitro* tissue culture procedures. The difficulty of implementing *in vitro* tissue culture methodologies has been identified as a bottleneck, limiting the potential for plant breeding. Transformation methodologies have been developed that overcome the limitations of tissue culture, they are known as *in planta*. This review compiles the research aimed at applying *in planta* genetic transformation strategies to facilitate gene editing using CRISPR/Cas9, especially focused on the work carried out on non-model plants. Only 3 non-model plants: cotton, rice, and wheat were identified as CRISPR/Cas9 edited using *in planta* transformation methods. A research line with high potential is identified, *in planta* transformation methodologies have been developed for a great diversity of plants, which means an opportunity for research groups from developing countries to facilitate access to the CRISPR/Cas9, and to direct efforts to improve the production of local or regional crops of economic importance.

Palabras clave: *in-planta*, Cultivo de tejidos, CRISPR/cas9, Edición genética, Cultivos

Introducción

CRISPR/Cas9 es actualmente la principal herramienta de edición de genomas para el mejoramiento de plantas. Es más directo, eficiente, preciso y menos costoso en comparación con otras tecnologías como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN por sus siglas en inglés) y las nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN por sus siglas en inglés) (Afzal et al., 2020). CRISPR/Cas9 parece estar en camino de revolucionar el mejoramiento de cultivos (Wolter et al., 2019). El sistema CRISPR/Cas9 original crea cortes de doble banda (DSB por sus siglas en inglés) en el ADN genómico de manera precisa y basado en una guía de ARN (sgRNA) complementaria al sitio blanco del ADN genómico. El complejo enzimático sgRNA-Cas9 reconoce una secuencia corta al lado del sitio de corte llamada motivo adyacente al proto-espaciador o sitio PAM (por sus siglas en inglés). Una vez que se reconoce el sitio PAM, la enzima Cas9 es activada y corta el ADN (Jinek et al., 2012). La edición de genomas en plantas requiere la inserción y expresión del sistema CRISPR/Cas9 dentro de la célula vegetal. El método más utilizado y eficiente para la entrega de los componentes es la integración estable o la expresión transitoria del ADN mediante la transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens* y la regeneración de plantas a través de métodos de cultivo *in vitro* de tejidos (Zhang et al., 2021).

La transformación de plantas, junto con la ingeniería genética y la secuenciación de genomas, tendrá un impacto significativo en la seguridad alimentaria en el futuro. El papel de la transformación de plantas es esencial para los estudios de genética funcional, lo que permite descubrir procesos biológicos y rasgos a partir de los cuales se aplica la biotecnología para el mejoramiento genético de cultivos (Anjanappa y Gruissem, 2021). La transformación de plantas ha avanzado rápidamente en los últimos 25 años, pero aún tiene algunas limitaciones, dentro de las cuales se destacan el desarrollo de métodos de cultivo de tejidos.

El desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos es un proceso complejo que implica la optimización de varios factores en cada etapa. Estas etapas incluyen el aislamiento de células o tejidos especializados, el crecimiento de esas células o tejidos en condiciones asépticas definidas, el establecimiento de protocolos de transformación con *Agrobacterium* u otros métodos (biobalística, polietilenglicol o electroporación) y la regeneración de la planta transformada. Por lo tanto, la transformación genética y la regeneración de plantas mediante el cultivo de tejidos son procesos que demandan tiempo y trabajo, por ejemplo, la transformación de plantas como el arroz o el tomate puede durar de 6 a 12 meses incluso con protocolos bien establecidos (Kim, 2020). El fenómeno de variación somaclonal es otra desventaja de los métodos de cultivo de tejidos. Las células vegetales pueden experimentar cambios genéticos y epigenéticos principalmente a partir de eventos de callogénesis (Ghosh et al., 2021).

Los métodos de transformación de plantas que superan las limitaciones y desventajas del cultivo de tejidos se conocen como "*in planta*". Estos métodos recopilan la transformación de tejidos meristemáticos, tejidos reproductivos o células de línea germinal sin pasar por etapas de cultivo de tejidos (Ji et al., 2020). Las ventajas de la transformación *in planta* abren aún más las posibilidades y aplicaciones de las tecnologías de ingeniería genética de plantas. Esta revisión analiza las estrategias desarrolladas para la edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 a través de métodos de transformación *in planta*, centrados en especies de cultivos de importancia agrícola.

Transformación *in planta*

Un método de transformación genética se considera *in planta* cuando las células o tejidos de la planta sometidos a la transferencia de material genético no se obtienen ni se regeneran mediante pasos de cultivo *in vitro* de tejido. Las metodologías de transformación *in planta* requiere menos trabajo, menos tiempo, son más económicas y potencialmente más eficientes que los métodos tradicionales comúnmente utilizados como la transformación y regeneración de callos (Saifi et al., 2020). Un enfoque práctico para estudiar las estrategias de transformación *in planta* puede basarse en el tipo de explante comúnmente utilizado, los cuales son: tejidos meristemáticos, partes florales y embriones.

Transformación de partes florales

Los tejidos florales son un explante adecuado para la transformación *in planta*. La eficiente transformación de las células germinales en las flores se transmitirá a través de la progenie después de la fertilización. Es posible introducir ADN en el óvulo de las plantas durante la fertilización, la transferencia genética mediante el tubo polínico permite atravesar las capas celulares del óvulo (Kaur y Devi, 2019). Este método se basa en aplicar una solución de ADN por goteo o microinyección sobre el estilo del tejido receptor, luego el ADN es transportado a través del tubo polínico hasta el ovario. La integración ocurre en las etapas tempranas de la formación del embrión o incluso en la formación del cigoto (Ali et al., 2015). El método de transformación mediante tubo polínico se describió por primera vez en algodón por Zhou et al. (1983).

Otro método de transformación *in planta* es la inmersión floral. Consiste en simplemente sumergir la inflorescencia completa en una solución de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un surfactante fuerte, luego se recolectan las semillas y se germinan con un agente de selección para la identificación de las plantas transgénicas. El método de inmersión floral requiere de un surfactante eficiente como Silwet-77, el surfactante mejora la penetración de las células de *Agrobacterium* en los tejidos florales (Clough y Bent, 1998). El método de inmersión floral es el más utilizado para la transformación de *Arabidopsis thaliana*, además de superar las desventajas del cultivo de tejidos, el mínimo trabajo requerido permite un proceso de transformación de alto rendimiento con frecuencias de transformación de hasta el 3% (Bent, 2006).

El método de inmersión floral también es útil en cultivos de importancia agronómica como arroz (Ratanasut et al., 2017), maíz (Mamontova et al., 2010), trigo (Zale et al., 2009), tomate (Yasmeen et al., 2009) y soja (Liu et al., 2009). Otros enfoques para lograr la transformación de tejidos florales incluyen la inoculación, goteo, rociar, o inyectar la suspensión de *Agrobacterium* directamente en los tejidos reproductivos femeninos (Kaur y Devi, 2019).

Transformación de meristemas apicales de brotes (SAM)

La transformación de meristemas apicales de brotes (SAM por sus siglas en inglés) resulta en el posterior desarrollo de estructuras transformadas como hojas, tallos y flores. El método de transformación *in planta* de SAM ha ayudado a mejorar una variedad de plantas y cultivos, como se describe en el estudio de Sreevathsa (2017). La revisión incluye investigaciones realizadas en maní, garbanzo, arroz y ají para mejorar la resistencia al estrés abiótico, y en maní, garbanzo, girasol, judías, guisante y cáñamo para mejorar la resistencia al estrés biótico (Sreevathsa, 2017).

La transformación de tejidos meristemáticos no se limita a la aplicación de *Agrobacterium*, sino que también se pueden utilizar otros métodos de entrega como la biobalística. La transformación *in planta* de tejido meristemático mediante biolística se ha realizado en cultivos como trigo (Imai et al., 2020), caupí (Ivo et al., 2008) y soja (Paes de Melo et al., 2020). Una desventaja de los métodos de transformación de SAM es la producción de plantas transgénicas quiméricas, ya que es prácticamente imposible transformar la totalidad de las células dentro de los meristemas. Este obstáculo suele superarse mediante la selección de plantas transformadas en la progenie.

Transformación de embriones

El primer método de transformación *in planta* reportado se logró cultivando semillas germinantes con *Agrobacterium* (Feldmann y Marks, 1987). Se obtuvieron plantas transgénicas estables de *Arabidopsis thaliana* resistentes al herbicida G418 mediante la transferencia de un vector que contenía el gen marcador de selección npt II. Desde entonces, la transformación *in planta* ha evolucionado y mejorado (Feldmann y Marks, 1987).

Los embriones pueden ser infectados unidos al cotiledón o aislados. El método tiene como objetivo transformar el tejido meristemático apical durante el proceso de germinación mediante la imbibición de la solución de *Agrobacterium* o causando lesiones en el tejido. Este método tiene el potencial de ser independiente del genotipo, como se ha demostrado en especies como el algodón (Kesiraju et al., 2020), el guisante de Angola (Sankara-Rao et

al., 2008), el pimiento morrón (Manoj-Kumar et al., 2011) y el maní (Keshavareddy et al., 2013). Esta ventaja es significativa para desarrollar métodos de transformación para variedades recalcitrantes de especies cultivables.

El método más común de transformación de embriones consiste en perforar con una aguja estéril el tejido meristemático antes, durante o poco después de la germinación, y sumergir el tejido en una solución de *Agrobacterium* durante aproximadamente 40 minutos (Supartana et al., 2005). Este método se ha utilizado en una amplia variedad de plantas, incluyendo cultivos como el arroz (Supartana et al., 2005), el trigo (Razzaq et al., 2011), el lino (Kesiraju et al., 2021) y el tomate (Shah et al., 2015). Paes de Melo et al. (2020) desarrollaron una estrategia novedosa para transformación *in planta* de la soja utilizando biobalística para lesionar los embriones y *Agrobacterium tumefaciens* para la entrega de ADN. Aunque lograron una eficiencia de regeneración y transformación similar (9,84%) en comparación con los métodos tradicionales, informan de un método más rentable, sencillo y sin la presencia de quimeras detectadas.

Edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 de manera *in planta*

Edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 de manera *in planta* en plantas modelo

Zlobin et al. (2020) discuten la aplicación de CRISPR/Cas9 a través de la transformación *in planta* centrada en el método de inmersión floral. Debido a su simplicidad, la inmersión floral es el método de elección para la transformación de *Arabidopsis thaliana*. La edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 en *Arabidopsis thaliana* tiene una baja frecuencia de mutación y heredabilidad. Este inconveniente se relaciona con el uso de promotores con baja actividad en células germinales (Khumsupan et al., 2019). Para superar esta limitante, los investigadores han implementado promotores específicos para tejidos de óvulos, cigotos y embriones tempranos (Zlobin et al., 2020).

La mayoría de las publicaciones recientes sobre las plantas modelo *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* se centran en la mejora de la eficiencia del sistema CRISPR/Cas9. Las investigaciones incluyen la evaluación de diferentes promotores, nucleasas y estrategias de entrega de vectores (Cuadro 1). Algunas aplicaciones prácticas incluyen estudios moleculares de importantes procesos biológicos, como las vías de señalización celular, la absorción de nitrógeno y los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico (Cuadro 1).

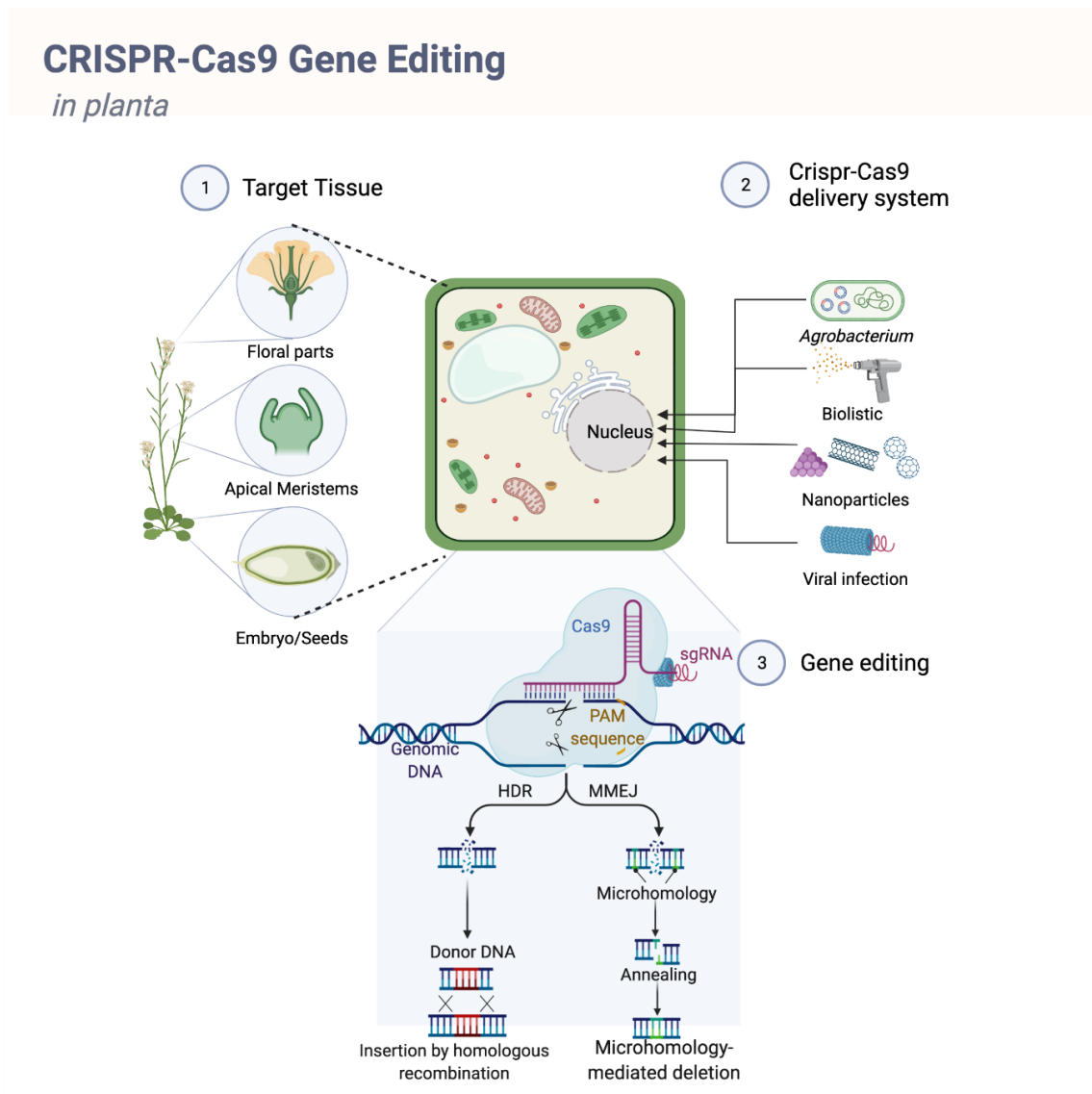


Figura 1. Estrategias de edición genética CRISPR/Cas9 *in planta*. Los métodos de transformación *in planta* se pueden dividir según el tejido blanco seleccionado para la transformación. Las estrategias para la entrega de componentes CRISPR/Cas9 dentro de la célula vegetal incluyen: *Agrobacterium*, biobalística, uso de nanopartículas e infección viral. Los sistemas CRISPR/Cas9 se pueden diseñar para aplicaciones como la edición de genes, la selección de genes y la regulación de genes. Fuente: Elaboración propia.

Edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 de manera *in planta* en cultivos de importancia agronómica

Se han desarrollado métodos de transformación *in planta* para una amplia variedad de cultivos. Sin embargo, los esfuerzos publicados que combinan los métodos de transformación *in planta* y la edición del genoma mediante CRISPR/Cas9 se limitan a algunas especies de cultivos como el trigo, el arroz y el algodón. Los detalles de las estrategias seguidas en cada una de estas especies se discuten en esta revisión (Figura 1).

Cuadro 1. Edición genética mediante CRISPR/Cas9 de manera *in planta* en organismos modelo

Especie	Método de transformación	Gen blanco	Modificación	Aplicación	Puntos clave	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>		ADHI Locus	Mutación dirigida	Mejora de protocolo	CRISPR-Cas9 <i>in planta</i> utilizando nicasas	Schimpl, Fauser, & Puchta. 2014
		LUC	Edición genética	Mejora de protocolo	Comparación de la eficiencia de diferentes nucleasas Cas	Johnson et al. 2015
		FT	Edición genética	Mejora de protocolo	Uso de promotor de tejido específico (<i>INCURVATA2</i>)	Hyun et al. 2015
		N/A	Mutación dirigida	Protocolo	Protocolo de CRISPR-Cas9 <i>in planta</i>	Schimpl, Fauser, & Puchta. 2017
		Als	Mutación dirigida	Mejora de protocolo	Evaluación de promotores controlados por desarrollo celular y diferentes nucleasas	Wolter, Klemm, Puchta. 2018
	Inmersión floral	PDS3	Edición de bases	Mejora de protocolo	Uso de Cas9 nicasa fusionada a una adenina deaminasa	Kang et al. 2018
		PPO	Mutación dirigida	Protocolo	Transgénesis mediante CRISPR-Cas9 y una secuencia molde de reparación integrada de manera ectópica	de Pater, Klemann, & Hooykaas. 2018
		gII	Mutación dirigida	Mejora de protocolo	Comparación de la disponibilidad de una secuencia molde para reparación entre replicones virales y mutación dirigida <i>in planta</i>	Hahn et al. 2018
		Als	Mutación dirigida	Mejora de protocolo	Mejoramiento de edición genética mediante CRISPR/Cas12a	Wolter, & Puchta. 2019
		IAMT	Edición genética	Mejora de protocolo	Identificación de plantas editadas libres de transgén mediante fluorescencia	Aliaga-Francoet al. 2019
	Als	Mutación dirigida	Protocolo	Uso de Cas12 tolerante a temperatura	Merker, Schindele, & Puchta. 2020	
	PDS	Mutación dirigida	Mejora de protocolo	Comparación de la eficiencia de diferentes promotores	Wolabu et al. 2020	
	UGT	Edición genética	Estudio molecular	Estudio del rol de UGT en el mecanismo de Resistencia a estrés abiótico	Li et al. 2017	
	AP2M	Edición genética	Estudio molecular	Estudio de mecanismo de incompatibilidad en Brassicaceae	Yamamoto et al. 2018	
		NiR	Edición genética	Estudio molecular	Rol del gen nir en la absorción de nitrógeno	Costa-Broseta et al. 2020

Continuación...

Continuación...

Especie	Método de transformación	Gen blanco	Modificación	Aplicación	Puntos clave	Referencia
		Bs3 promoter	Regulación genética	Prueba de concepto	Desarrollo de protocolos para la activación y represión de la transcripción génica utilizando Cas9 fusionado con dominios efectores EDLL y TAL.	Piatek et al. 2015
		XT1 and XT2	Regulación genética	Mejoramiento de protocolo	Adaptación del flujo de trabajo de clonación CRISPR/cas9 al estándar GoldenBraid	Vazquez-Vilar et al. 2016
		PDS3	Edición genética	Mejoramiento de protocolo	Evaluación de la actividad Cas12 en diferentes loci y plantas modelo	Bernabé-Orts et al. 2019
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Agroinfiltración	GFP	Edición genética	Mejoramiento de protocolo	Ingeniería de un vector basado en virus de ARN de plantas para la entrega de CRISPR-Cas9 libre de ADN	Ma et al. 2020
		GFP	Edición genética	Estudio molecular	Estudio del mecanismo de procesamiento de guía única de ARN en planta	Cody and Scholthof. 2020
		B-galactosidase genes	Edición genética	Estudio molecular	Estudio del mecanismo de N-glicosilación en plantas para la producción de proteínas recombinantes	Kriechbaum et al. 2020
		AGO1	Edición genética	Estudio molecular	Estudio del mecanismo de las proteínas argonautas en las vías de silenciamiento del ARN	Ludman and Fátýol. 2021
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Discos de hoja	RDR6	Edición genética	Mejoramiento de rendimiento	Producción de proteína recombinante en plantas.	Matsuo and Atsumi. 2019
		NtALS	Edición genética	Estudio molecular	Mecanismo de biosíntesis de moléculas de defensa acilazúcares	Chang et al. 2020

Algodón

El primer reporte del uso de CRISPR/Cas9 en algodón se logró mediante transformación con *Agrobacterium* utilizando ápices de brotes como tejido blanco (Chen et al., 2017). Este método *in planta* permite la selección de líneas transgénicas en un período de 3-4 semanas después de la transformación genética. Los ápices de brotes desnudos de plántulas de algodón se lesionaron con un bisturí, luego se colocó una pequeña bola de algodón con la suspensión de *Agrobacterium* que contenía el vector CRISPR/Cas9 en el ápice lesionado. Posteriormente, se les aplicó vacío y se co-cultivaron. Finalmente, las plantas se trasladaron a un invernadero y se seleccionaron líneas transgénicas mediante resistencia a antibióticos.

Este estudio informó la edición exitosa de los genes Cloroplastos alterados 1 (GhCLA1) y pirorifosfatasa H⁺-vacuolar (GhVP) con una eficiencia del 47,6% y 81,8%, respectivamente (Chen et al., 2017). Esto demuestra la viabilidad del sistema CRISPR/Cas9 para la mutagénesis dirigida en algodón y su potencial para avanzar la investigación de la genómica funcional y mejoramiento genético de algodón.

Arroz

El primer método de transformación *in planta* en arroz fue descrito por Supartana et al. (2005). Este método de transformación mediado por *Agrobacterium* utilizó embriones maduros de arroz como explantes. Los embriones maduros embebidos en agua fueron perforados con una aguja previamente sumergida en la solución de *Agrobacterium* y luego colocados sobre papel filtro estéril sobre vermiculita húmeda durante 9 días. La eficiencia de transformación estable de las plantas T_1 fue del 40%, determinada mediante PCR. A partir de este método, otros grupos de investigación han desarrollado protocolos similares utilizando embriones maduros como explantes con algunas modificaciones, como sumergir el tejido en la solución bacteriana (Hanjagi et al., 2011), uso de infiltración por vacío (Lin et al., 2009), adición de acetosiringona para mejorar la eficiencia de infección de *Agrobacterium* (Naseri, 2012) y uso de surfactantes como Tween20 para mejorar la penetración de las bacterias (Ahmed et al., 2018). Estos métodos reportan diferentes tasas de eficiencia que van del 8% al 40%.

En nuestro laboratorio, recientemente realizamos experimentos de optimización para mejorar la eficiencia de la transformación *in planta* mediada por *Agrobacterium* de embriones maduros de arroz, como se informó por primera vez en el estudio de Supartana et al. (2005). Evaluamos factores como el tiempo de imbibición de las semillas, cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, método de co-cultivo, tiempo de co-cultivo, método de lesión y aplicación de inhibidores de germinación de semillas. Los resultados no publicados muestran una alta eficiencia de transformación y reproducibilidad. Nuestro objetivo es utilizar el método optimizado para la edición génica de arroz mediante CRISPR/Cas9, superando las limitaciones del cultivo de tejidos.

El método de inmersión floral también se ha utilizado para la transformación de arroz. Sujipuli y Ratanasut (2014) cortaron espiguillas de la inflorescencia de arroz y las sumergieron en una solución de *Agrobacterium* durante 1 minuto. Se logró una eficiencia del 12.73% de las espiguillas incluyendo tejidos reproductivos masculinos y femeninos, determinada mediante pruebas de tinción GUS. Este método se ha utilizado también para la transformación de variedades de arroz negro indonesio (Susanto et al., 2020).

A pesar de la disponibilidad de métodos de transformación *in planta* de arroz desde hace varios años, solo se encontró un artículo publicado que apunta a la edición del genoma mediante CRISPR/Cas9.

Sin embargo, los métodos de transformación *in planta* de arroz se han utilizado en combinación con otras tecnologías modernas de ingeniería genética, como microARN (Faisal et al., 2017) e interferencia de ARN (Wahyuningtyas et al., 2016).

Se utilizó una metodología de transformación *in planta* para la entrega de un sistema CRISPR/Cas9 en arroz indica dirigido al gen de reparación de errores de emparejamiento de ADN MSH2 (Karthika et al., 2021). Los meristemas apicales de plántulas pregerminadas fueron perforados con una aguja y se incubaron en una solución de *Agrobacterium* suplementada con acetosiringona (150 μ M) durante 1 hora. Las plántulas infectadas recuperadas se colocaron sobre arena de cuarzo estéril saturada con higromicina. Las plántulas sobrevivientes (16,25%) se seleccionaron como transformadas y, por lo tanto, plantas posiblemente editadas en la T_0 . El mismo paso de selección con higromicina se realizó para la descendencia T_1 derivada de las plantas sobrevivientes y se confirmó la integración exitosa del transgen mediante PCR. Un total de 27 plantas en T_1 se confirmaron como transgénicas estables y mostraron una amplia variedad de fenotipos alterados. La interrupción del gen MSH2 conduce a una reducción en los eventos de reparación de errores de emparejamiento en el ADN y, posteriormente, a la creación de mutaciones de tipo INDELSs. Se obtuvieron líneas mutantes caracterizadas como altas, enanas, con un alto número de macollos, con un menor número de macollos, con alta biomasa, con baja biomasa, con panícula larga y con panícula corta.

Las líneas mutantes de arroz indica generadas por la interrupción del gen MSH2 pueden actuar como líneas donantes para estabilizar características agronómicas en el proceso de entrecruzamiento (Karthika et al., 2021). Esta investigación es un ejemplo de un enfoque innovador que aprovecha las ventajas de los métodos de transformación *in planta* y las tecnologías de edición del genoma CRISPR/Cas9.

Trigo

A pesar de ser un alimento de importancia mundial, el trigo es de los cereales importantes más difíciles de transformar genéticamente. En comparación con cultivos como el arroz y el maíz, la aplicación de la ingeniería genética en el trigo está rezagada (Hamada et al., 2017). Ante este escenario, se han realizado esfuerzos para desarrollar alternativas para la transformación del trigo, especialmente para cultivares comerciales de élite que han demostrado ser recalcitrantes al cultivo *in vitro* de tejidos.

Se desarrolló un método de transformación por biobalística *in planta* utilizando meristemas apicales de brotes como células blanco y vectores de expresión génica entregadas mediante partículas de oro (Hamada et al. 2017). El bombardeo se realizó cuatro veces utilizando una presión de helio de 1100-1350 psi con una distancia de 6,0 cm desde la placa. La expresión transitoria exitosa, la integración estable y la herencia del ADN de interés se confirmó en el cultivar de trigo modelo 'Fielder' y en el cultivar de élite japonés 'Haruyokoi'. Posteriormente, se utilizó este método para desarrollar un procedimiento de edición genética *in planta* mediante la entrega de vectores que contienen CRISPR/Cas9 (Hamada et al., 2018). La edición del gen TaGASR7, involucrado en el control del peso y la longitud del grano, se confirmó en el 5,2% (11) de las plantas T_0 regeneradas a partir de embriones bombardeados. Debido a la presencia de quimeras, todas las semillas de la T_1 se analizaron. Las plantas de 3 de las 11 plantas editadas mostraron mutaciones alélicas heterocigotas en el gen TaGASR7 en una combinación de los genomas A, B o D (ya que el trigo es una especie triploide). Se identificaron tres individuos de la T_1 como mutantes homocigotos en los tres genomas. Este método de biobalística *in planta* también se probó para la entrega de complejos ribonucleoproteicos (RNP)

de CRISPR/Cas9 para la edición del genoma libre de ADN en trigo, y también se obtuvieron plantas editadas con una eficiencia del 3% (Imai et al., 2020).

Más recientemente, el mismo protocolo se utilizó para la edición del genoma de cultivares de trigo elite japoneses comercialmente relevantes como 'Haruyokoi', 'Yumechikara' y 'Kitanokaori' (Liu et al., 2021). El estudio fue dirigido al gen TaQsd1, involucrado en la latencia de las semillas, y se confirmaron alelos mutados en el 2,51% (9) de los embriones bombardeados. Debido a la presencia de quimeras, todas las plantas T_1 se analizaron, se identificó un individuo como heterocigoto para los tres genomas (genotipo AaBbDd). Se identificó un individuo como homocigoto en la T_2 , y mostró el fenotipo esperado, que es un retraso de más de 7 días en la germinación de las semillas en comparación con el tipo salvaje. El gen blanco se describió anteriormente como uno de los loci QTL más efectivos en la cebada, afecta el rendimiento de los cultivos de cereales y la calidad de las semillas debido a la germinación previa a la cosecha.

Este grupo de investigadores logró desarrollar una mejora práctica de los cultivares elite de trigo de una manera rápida y eficiente, aprovechando las ventajas de la transformación *in planta* y CRISPR/Cas9. Esta estrategia debería considerarse para otros cultivos importantes.

Métodos novedosos de edición genética independientes del cultivo *in vitro* de tejidos

Edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 a través de inducción *de novo* de meristemos

Maher et al. (2020) propusieron un enfoque novedoso para superar las limitantes de la edición de genomas asociadas al cultivo *in vitro* de tejidos. El punto de partida se basa en el potencial de inducir meristemos *de novo* en células somáticas mediante la expresión ectópica de reguladores de crecimiento como WUSCHEL2 (Wus2) y SHOOT MERISTEMLESS (STM). La co-expresión de reguladores de crecimiento y componentes de CRISPR/Cas9 permite realizar edición genética en células somáticas y al mismo tiempo reprogramarlas para inducir meristemos y su posterior regeneración. El estudio se realizó inicialmente utilizando *N. benthamiana*.

Los aspectos destacados de la investigación incluyen el desarrollo del método Fast-TrACC (cocultivo de *Agrobacterium* de rápido tratamiento), que consiste en un método de transformación de *Agrobacterium* rápido y altamente eficiente para la expresión transitoria y la prueba de 12 combinaciones diferentes de vectores de expresión de genes de reguladores de crecimiento junto con un reportero de luciferasa. La mayor tasa de crecimiento de estructuras similares a meristemos (30%) se logró con la combinación de (Wus2/STM). Luego, se logró la edición del genoma incorporando sgARN dirigidas al gen fitoeno desaturasa (PDS por sus siglas en inglés) mediante replicones virales en plantas transgénicas que expresan la enzima Cas9. Inicialmente, la regeneración de las plantas editadas se realizó en un medio de enraizamiento en condiciones asépticas. Se desarrolló una segunda estrategia con el objetivo de inducir brotes editados genéticamente en plantas que expresan Cas9 y crecen en suelo. Esta vez, se inyectó una solución de *Agrobacterium* en el tejido dañado

donde previamente se habían eliminado los meristemos naturales. Se indujeron nuevos brotes que mostraban un fenotipo de foto-decoloración (15%) esperado debido a la interrupción del gen PDS. La regeneración de brotes verdes con alelos mutantes heterocigotos confirmados y posterior análisis de las semillas demostraron la heredabilidad de las mutaciones.

Además de los experimentos en *N. benthamiana*, los investigadores generaron con éxito brotes transgénicos *de novo* en tomate, papa y uva utilizando el método de transformación Fast-TrACC y una combinación de construcciones que expresaban reguladores de crecimiento. Se prevé que la inducción de meristemos *de novo* se pueda lograr mediante otros métodos de entrega para ampliar las metodologías de transformación *in planta* y la edición genética a una mayor variedad de especies vegetales (Maher et al., 2020).

Edición de genomas mediante CRISPR aplicado como aerosol

Un método sencillo para la edición de genomas mediante aerosol es el objetivo de un informe publicado como preimpresión por Doyle et al. (2019). Este enfoque tiene un enorme potencial como un método simple, rápido, económico y posiblemente universal para la edición genética de plantas. El trabajo describe el uso de nanoestructuras de puntos de carbono recubiertas con un plásmido codificando los componentes CRISPR/Cas9, que se entrega mediante aerosol en las hojas de las plantas.

Los complejos de puntos de carbono-plásmido contenían un gen GFP con una secuencia de localización nuclear como marcador, un gen Cas9 y un gRNA dirigida a los genes SPO11 en el trigo. Después de la entrega de los complejos mediante aerosol foliar, se confirmó la transformación transitoria al observar el tejido fluorescente. La eficiencia de transformación en trigo fue del 27,74%, y la expresión transitoria también se confirmó en maíz, cebada y sorgo. Se confirmó la mutación en los genes SP011 en trigo, una delección de -250pb, mediante PCR y secuenciación de ADN.

La versatilidad de este método es enorme, se ha confirmado que los complejos de puntos de carbono-ADN pueden ser transportados a células somáticas maduras de plantas para la transformación transitoria simplemente aplicando aerosol sobre ellas. La entrega de componentes de edición de genomas CRISPR/Cas9 mediante nanopartículas es un tema de investigación en curso (Alghuthaymi et al., 2021). Se ha logrado mediante varios materiales de nanopartículas y ciertamente es un campo prometedor para la biotecnología vegetal y el mejoramiento de cultivos de importancia agrícola.

Desafíos de la edición de genomas de manera *in planta*

Revisiones recientemente publicadas sobre la edición del genoma de plantas mediante CRISPR/Cas ponen en perspectiva el progreso de la tecnología, sus aplicaciones, desafíos y posibilidades futuras en el ámbito agrícola. Los desafíos de CRISPR/Cas9 incluyen el desarrollo de métodos de entrega eficientes, superar la dependencia de especies y genotipos en la transformación, encontrar genes de interés prometedores, mejorar la eficiencia de los eventos de edición, mejorar la eficiencia de los eventos de edición múltiple, minimizar los efectos “off-target”, desarrollar procedimientos reglamentarios estandarizados y aceptados para pruebas y aprobación, y mejorar la aceptación pública de la tecnología en la agricultura

(Yang 2020; Anjanappa y Gruissem 2021; Zhang et al. 2021; Kumar et al. 2021; Le et al. 2021). La entrega de reactivos CRISPR/Cas y la regeneración de plantas destacan como los principales obstáculos discutidos. El avance en métodos de entrega eficientes que eviten los pasos de cultivo *in vitro* de tejidos se menciona comúnmente como invaluable para el progreso de la edición del genoma.

Los métodos de transformación *in planta* tienen limitaciones asociadas que deben tenerse en cuenta. El método de inmersión floral tiene una baja frecuencia de transformación, especialmente en especies de plantas con baja producción de semillas. Algunos protocolos de transformación *in planta* tienen baja reproducibilidad, por lo que se requiere investigación adicional sobre los factores involucrados en la eficiencia de la transformación para su optimización y estandarización.

El mecanismo de edición CRISPR/Cas9 ocurre de forma independiente al método de entrega como un evento de una sola célula. Existe una alta probabilidad de obtener quimerismo al transformar embriones y tejidos meristemáticos mediante métodos *in planta*. Se deben desarrollar marcadores de selección que faciliten la selección de plantas editadas.

La co-selección de mutaciones inducidas por CRISPR tanto en el gen de interés como en un gen marcador es un enfoque útil (Rinne et al. 2021). En este estudio, se utilizó un sistema multiplex CRISPR/Cas9 dirigido al gen MAR1 como gen marcador que confiere resistencia a kanamicina. La selección de plantas mediante la resistencia inducida a kanamicina facilita la selección de mutaciones en un segundo gen blanco (Rinne et al. 2021). Otra estrategia de selección es el uso de fenotipado automatizado de alto rendimiento mediante imágenes (Sorrentino et al. 2021). Creemos que podría ser posible utilizar este enfoque cuando la edición del gen objetivo resulte en un fenotipo alterado.

Conclusión y Perspectivas Futuras

La transformación de plantas sigue siendo una herramienta poderosa para la biotecnología y el mejoramiento de plantas, además sigue siendo esencial para la edición de genomas mediante CRISPR/Cas.

La entrega eficiente de los componentes CRISPR/Cas y la regeneración de plantas evitando los pasos de cultivo de tejidos podrían ser un avance significativo. Superar este obstáculo técnico permitirá abordar otros desafíos. Los esfuerzos pueden centrarse en minimizar los eventos “off-target”, desarrollar sistemas de edición múltiple, mejorar la eficiencia de la edición y desarrollar nuevas herramientas moleculares para regular la expresión génica.

Los métodos de transformación *in planta* se han desarrollado para una amplia diversidad de especies de plantas, generalmente como alternativa para especies o genotipos recalcitrantes. Hay poca investigación publicada que combine las ventajas de los métodos de transformación *in planta* y la edición de genomas mediante CRISPR/Cas en especies que no sean las plantas modelo *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* mediante inmersión floral. Los casos presentados en esta revisión: algodón, arroz y trigo; muestran el potencial de implementar esta estrategia en cultivos de importancia agronómica.

Los métodos de transformación *in planta* también abren la posibilidad de desarrollar la edición de genomas y aplicaciones biotecnológicas en una mayor variedad de especies de plantas. CRISPR/Cas podría volverse aún más fácil de aplicar y más accesible para grupos de investigación en países en

desarrollo. Así, la transformación *in planta* puede potenciar el uso de la tecnología de edición del genoma para resolver problemas locales y crear oportunidades en el contexto agrícola de cada país.

Bibliografía

Afzal S, Sirohi P, Singh NK (2020) A review of CRISPR associated genome engineering: application, advances and future prospects of genome targeting tool for crop improvement. *Biotechnol Lett* 42:1611–1632.

Ahmed T, Biswas S, Elias SM, Sazzadur Rahman M, Tuteja N, Seraj ZI (2018) *In planta* transformation for conferring salt tolerance to a tissue-culture unresponsive indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(2):154–165.

Aliaga-Franco N, Zhan, C, Presa S, Srivastava AK, Granell A, Alabadí D, Sadanandom A, Blázquez MA, Minguet EG (2019) Identification of Transgene-Free CRISPR-Edited Plants of Rice, Tomato, and Arabidopsis by Monitoring DsRED Fluorescence in Dry Seeds. *Frontiers in plant science* 10.

Alghuthaymi MA, Ahmad A, Khan Z, Khan SH, Ahmed F. K, Faiz S, Nepovimova E, Kuča K, Abd-Elsalam K A (2021) Exosome/liposome-like nanoparticles: New carriers for CRISPR genome editing in plants. *In International Journal of Molecular Sciences* 22(14)

Ali A, Bang SW, Chung SM, Staub JE (2015) Plant Transformation via Pollen Tube-Mediated Gene Transfer. *Plant Molecular Biology Reporter* 33(3):742–747.

Anjanappa RB, Gruissem, W (2021) Current progress and challenges in crop genetic transformation. *Journal of Plant Physiology* 261

Bent A (2006) Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. *Methods in molecular biology* 343:87–103.

Bernabé-Orts JM, Casas-Rodrigo I, Minguet EG, Landolfi, V, Garcia-Carpintero V, Gianoglio S, Vázquez-Vilar M, Granell A, Orzaez D (2019) Assessment of Cas12a-mediated gene editing efficiency in plants. *Plant biotechnology journal* 17(10):1971–1984.

Chang AX, Chen B, Yang AG, Hu RS, Feng QF, Chen M, Yang XN, Luo CG, Li YY, Wang YY (2020) The trichome-specific acetolactate synthase NtALS1 gene, is involved in acylsugar biosynthesis in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta* 252(1):13.

Chen X, Lu X, Shu N, Wang S, Wang J, Wang D, Guo L, Ye W (2017) Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 7.

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* -mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 16(6):735–743.

Cody WB, Scholthof HB (2020) Native Processing of Single Guide RNA Transcripts to Create Catalytic Cas9/Single Guide RNA Complexes *in planta*. *Plant physiology* 184(2):1194–1206.

Costa-Broseta Á, Castillo M, León J (2020) Nitrite reductase 1 is a target of nitric oxide-mediated post-translational modifications and controls nitrogen flux and growth in Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences* 21(19):1–13.

- de Pater S, Klemann BJ, Hooykaas, PJ (2018) True gene-targeting events by CRISPR/Cas-induced DSB repair of the PPO locus with an ectopically integrated repair template. *Scientific Reports* 8(1).
- Doyle C, Higginbottom K, Swift T, Winfield M, Bellas C, Benito-Alifonso D, Fletcher T, Galan MC, Edwards K, Whitney H (2019) A simple method for spray-on gene editing *in planta*. *bioRxiv*.
- Faisal A, Biswas S, Zerín T, Rahman T, Seraj ZI (2017) Downregulation of the DST Transcription Factor Using Artificial microRNA to Increase Yield, Salt and Drought Tolerance in Rice. *American Journal of Plant Sciences* 08(9):2219–2237.
- Feldmann KA, Marks M (1987) *Agrobacterium* -mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *MGG Molecular & General Genetics* 208(1–2):1–9.
- Ghosh A, Igamberdiev AU, Debnath SC (2021) Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: a review. *Molecular Biology Reports* 48(1):823–841.
- Naseri G (2012) *In planta* transformation of rice (*Oryza sativa*) using thaumatin-like protein gene for enhancing resistance to sheath blight. *African Journal of Biotechnology* 11(31).
- Hahn F, Eisenhut M, Mantegazza O, Weber APM (2018) Homology-directed repair of a defective glabrous gene in *Arabidopsis* with cas9-based gene targeting. *Frontiers in Plant Science* 9.
- 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).
- Hamada H, Liu Y, Nagira Y, Miki R, Taoka N, Imai R (2018) Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables *in planta* genome editing in wheat. *Scientific Reports* 8(1).
- Hanjagi PS, Sashidhar V, Radhakrishnan V, Awaji SM, Sreevathsa R (2011) Improvement of Salt Tolerance in Putatively Transgenic Rice Plants Overexpressing AVP1, a Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase. *Transgenic Plant Journal* 5:43-49.
- Hyun Y, Kim J, Cho SW, Choi Y, Kim JS, Coupland G (2015) Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta* 241(1):271–284.
- Imai R, Hamada H, Liu Y, Linghu Q, Kumagai Y, Nagira Y, Miki R, Taoka N (2020) *In planta* particle bombardment (IPB): A new method for plant transformation and genome editing. *Plant Biotechnology* 37(2):171–176.
- Ivo NL, Nascimento CP, Vieira LS, Campos FAP, Aragão FJL (2008) Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant Cell Reports* 27(9):1475–1483.
- Ji X, Yang B, Wang D (2020) Achieving Plant Genome Editing While Bypassing Tissue Culture. *Trends in Plant Science* 25(5):427–429.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096):816–821.
- Johnson RA, Gurevich V, Filler S, Samach A, Levy AA (2015) Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency *in planta*. *Plant molecular biology* 87(1-2):143–156.

Kang BC, Yun JY, Kim ST, Shin YJ, Ryu J, Choi M, Woo JW, Kim JS (2018) Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nature Plants* 4(7):427–431.

Karthika V, Chandrashekar BK, Kiranmai K, Shankar AG, Makarla U, Ramu VS (2021) Disruption in the DNA Mismatch Repair Gene MSH2 by CRISPR- Cas9 in Indica Rice Can Create Genetic Variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69(14):4144–4152.

Kaur RP, Devi S (2019) *In planta* Transformation in Plants: A Review. *Agricultural Reviews* 40(3).

Keshavareddy G, Rohini S, Ramu SV, Sundaresha S, Kumar ARV, Kumar PA, Udayakumar M (2013) Transgenics in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) expressing cry1AcF gene for resistance to *Spodoptera litura* (F.). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19(3):343–352.

Kesiraju K, Mishra P, Bajpai A, Sharma M, Rao U, Sreevathsa R (2020) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *in planta* transformation strategy for development of transgenics in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with GFP as a visual marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 26(11):2319–2327.

Kesiraju K, Tyagi S, Mukherjee S, Rai R, Singh NK, Sreevathsa R, Dash PK (2021) An Apical Meristem-Targeted *in planta* Transformation Method for the Development of Transgenics in Flax (*Linum usitatissimum*): Optimization and Validation. *Frontiers in plant science* 11.

Khumsupan P, Donovan S, McCormick AJ (2019) CRISPR/Cas in Arabidopsis: overcoming challenges to accelerate improvements in crop photosynthetic efficiencies. *Physiologia Plantarum* 166(1):428–437.

Kim SG (2020) The way to true plant genome editing. *Nature Plants* 6(7):736–737.

Kriechbaum R, Ziaee E, Grünwald-Gruber C, Buscaill P, van der Hoorn R, Castilho A (2020) BGAL1 depletion boosts the level of β -galactosylation of N- and O-glycans in *N. benthamiana*. *Plant biotechnology journal* 18(7):1537–1549.

Kumar S, Rymarquis LA, Ezura H, Nekrasov V (2021) Editorial: CRISPR-Cas in Agriculture: Opportunities and Challenges. *Frontiers in plant science* 12.

Le VT, Kim M, Jung Y, Knag K, Cho Y (2021) Research trends and challenges using CRISPR/Cas9 for improving rice productivity. *Agronomy* 12(164).

Li P, Li YJ, Zhang FJ, Zhang GZ, Jiang XY, Yu HM, Hou BK (2017) The Arabidopsis UDP-glycosyltransferases UGT79B2 and UGT79B3, contribute to cold, salt and drought stress tolerance via modulating anthocyanin accumulation. *Plant Journal* 89(1):85–103.

Lin J, Zhou B, Yang Y, Mei J, Zhao X, Guo X, Huang X, Tang D, 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.

Liu M, Yang J, Cheng YQ, An LJ (2009) Optimization of soybean (*Glycine max* L. Merrill) *in planta* ovary transformation using a linear minimal gus gene cassette. *Journal of Zhejiang University: Science B* 10(12):870–876.

Liu Y, Luo W, Linghu Q, Abe F, Hisano H, Sato K, Kamiya Y, Kawaura K, Onishi K, Endo M, Toki S, Hamada H, Nagira Y, Taoka N, Imai R (2021) *In planta* Genome Editing in Commercial Wheat Varieties. *Frontiers in Plant Science* 12.

Ludman M, Fátyol K (2021) Targeted inactivation of the AGO1 homeologues of *Nicotiana benthamiana* reveals their distinct roles in development and antiviral defence. *The New phytologist* 229(3):1289–1297.

Ma X, Zhang X, Liu H, Li Z (2020) Highly efficient DNA-free plant genome editing using virally delivered CRISPR-Cas9. *Nature plants* 6(7):773–779.

Maher MF, Nasti RA, Vollbrecht M, Starker CG, Clark MD, Voytas DF (2020) Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nature Biotechnology* 38(1):84–89.

Mamontova EM, Velikov VA, Volokhina IV, Chumakov MI (2010) *Agrobacterium* -mediated *in planta* transformation of maize germ cells. *Russian Journal of Genetics* 46(4):501–504.

Manoj-Kumar A, Reddy KN, Manjulatha M, Arellano ES, Sreevathsa R, Ganeshan G (2011) A rapid, novel and high-throughput identification of putative bell pepper transformants generated through *in planta* transformation approach. *Scientia Horticulturae* 129(4):898–903.

Merker L, Schindele P, Huang TK, Wolter F, Puchta H (2020) Enhancing *in planta* gene targeting efficiencies in *Arabidopsis* using temperature-tolerant CRISPR/LbCas12a. *Plant Biotechnology Journal* 18(12):2382–2384.

Merker L, Schindele P, Puchta H (2020) Using CRISPR/ttLbCas12a for *in planta* Gene Targeting in *A. thaliana*. *Current protocols in plant biology* 5(3).

Matsuo K, Atsumi G (2019) CRISPR/Cas9-mediated knockout of the RDR6 gene in *Nicotiana benthamiana* for efficient transient expression of recombinant proteins. *Planta* 250(2):463–473.

Paes de Melo B, Lourenço-Tessutti IT, Morgante CV, Santos NC, Pinheiro LB, de Jesus Lins CB, Silva MCM, Macedo LLP, Fontes EPB, Grossi-de-Sa MF (2020) Soybean Embryonic Axis Transformation: Combining Biolistic and *Agrobacterium* -Mediated Protocols to Overcome Typical Complications of *In vitro* Plant Regeneration. *Frontiers in Plant Science* 11.

Piatek A, Ali Z, Baazim H, Li L, Abulfaraj A, Al-Shareef S, Aouida M, Mahfouz MM (2015) RNA-guided transcriptional regulation *in planta* via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant biotechnology journal* 13(4):578–589.

Ratanasut K, Rod-In W, Sujipuli K (2017) *In planta* *Agrobacterium* -Mediated Transformation of Rice. *Rice Science* 24(3):181–186.

Razzaq A, Hafiz IA, Mahmood I, Hussain A (2011) Development of *in planta* transformation protocol for wheat. *African Journal of Biotechnology* 10(5):740–750.

Rinne J, Witte CP, Herde M (2021) Loss of MAR1 Function is a Marker for Co-Selection of CRISPR-Induced Mutations in Plants. *Frontiers in genome editing* 3.

Saifi SK, Passricha N, Tuteja R, Kharb P, Tuteja N (2020) *In planta* transformation: A smart way of crop improvement. In Tuteja N, Tuteja R, Passricha N, Saifi SL (eds), *Advancement in Crop Improvement Techniques*, Woodhead Publishing, pp 351–362.

Sankara-Rao K, Sreevathsa R, Sharma PD, Kumar UM (2008) *In planta* transformation of pigeon pea: a method to overcome recalcitrancy of the crop to regeneration *in vitro*. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 14(4).

Schimpl S, Fauser F, Puchta H (2014) The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 80(6):1139–1150.

Schimpl S, Fauser F, Puchta H (2017) CRISPR/Cas-Mediated *In planta* Gene Targeting. *Methods in molecular biology* 1610:3–11.

Shah SH, Ali S, Jan SA, Jalal-Ud D, Ali GM (2015) Piercing and incubation method of *in planta* transformation producing stable transgenic plants by overexpressing DREB1A gene in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 120(3):1139–1157.

Sorrentino M, De Diego N, Ugena L, Spíchal L, Lucini L, Miras-Moreno B, Zhang L, Roupheal Y, Colla G, Panzarová K (2021) Seed Priming With Protein Hydrolysates Improves Arabidopsis Growth and Stress Tolerance to Abiotic Stresses. *Frontiers in plant science* 12.

Sreevathsa R (2017) Apical Meristem-Targeted *In planta* Transformation Strategy: an Overview on its Utility in Crop Improvement. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal* 8(2).

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

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.

Susanto FA, Wijayanti P, Fauzia AN, Komalasari RD, Nuringtyas TR, Purwestri YA (2020) Establishment of a plant tissue culture system and genetic transformation for agronomic improvement of Indonesian black rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 141(3):605–617.

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).

Wahyuningtyas W, Miftahudin M, Widyastuti U, Tjahjoleksono A (2016) Construction of RNA Interference Vector to Silence Aluminum Tolerance Gene Candidate in Rice cv Hawara Bunar. *HAYATI Journal of Biosciences* 23(2):79–84.

Wolabu TW, Park JJ, Chen M, Cong L, Ge Y, Jiang Q, Debnath S, Li G, Wen J, Wang Z (2020) Improving the genome editing efficiency of CRISPR/Cas9 in Arabidopsis and *Medicago truncatula*. *Planta* 252(2).

Wolter F, Klemm J, Puchta H (2018) Efficient *in planta* gene targeting in Arabidopsis using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 94(4):735–746.

Wolter F, Puchta H (2019) *In planta* gene targeting can be enhanced by the use of CRISPR/Cas12a. *Plant Journal* 100(5):1083–1094.

Wolter F, Schindele P, Puchta H (2019) Plant breeding at the speed of light: The power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. *BMC Plant Biology* 9(1).

Yamamoto M, Nishio T, Nasrallah JB (2018) Activation of self-incompatibility signaling in transgenic *Arabidopsis thaliana* is independent of AP2-based clathrin-mediated endocytosis. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 8(7): 2231–2239.

Yang B (2020) Grand Challenges in genome editing in plants. *Frontier in genome editing* 2(2).

Yasmeen A, Mirza B, Inayatullah S, Safdar N, Jamil M, Ali S, Choudhry MF (2009) *In planta* transformation of tomato. *Plant Molecular Biology Reporter* 27(1): 20–28.

Zale JM, Agarwal S, Loar S, Steber CM (2009) Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 28(6): 903–913.

Zhang D, Zhang Z, Unver T, Zhang B (2021) CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *Journal of Advanced Research* 29:207–221.

Zhou G, Weng J, Zeng Y, Huang J, Qian S, Liu G (1983) Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in enzymology* 101: 433–481.

Zlobin NE, Lebedeva MV, Taranov V (2020) CRISPR/Cas9 genome editing through *in planta* transformation. *Critical Reviews in Biotechnology* 40(2):153–168

ARTÍCULO 1

Uso de cumarina como inhibidor de la germinación de semillas de arroz y su posible uso en transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Alejandro Sebiani Calvo 1,2.

¹ Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, Laboratorio de Biotecnología de plantas, San José, Costa Rica

² Programa de Posgrado en Biología (PPB), Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Resumen

El desarrollo de protocolos de transformación genética es una de las líneas de trabajo del Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Escuela de Biología. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la cumarina como inhibidor de la rápida germinación de semillas de arroz y su posible uso en la optimización de un protocolo de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*. El efecto del método de aplicación y la concentración de cumarina se determinó mediante mediciones de la longitud de los brotes y porcentajes de germinación. El tiempo de germinación de arroz CR5272 aumentó en 24 horas al usar una concentración de coumarina 12mM con una inmersión temporal de 20 a 60 minutos. La germinación se mantuvo en un 90% a las 48 horas en el control en comparación con el tratamiento que logró una germinación del 90% a las 72 horas. La longitud de los brotes disminuye en 2.34 mm a los cinco días al usar una concentración de coumarina 12mM con una inmersión temporal de 20 a 60 minutos. La disminución en el tiempo de germinación de 24 horas y de 2.33mm en el crecimiento de los brotes favorecía la transformación debido a la posibilidad de una mayor interacción entre *Agrobacterium tumefaciens* y las células meristemáticas del brote de arroz. Se propone una inmersión de semillas de arroz en una solución de cumarina 12 mM por 40 minutos como punto de partida para optimizar la transformación con *A. tumefaciens*. En esta concentración y tiempo de inmersión se inhibe por 24 horas el crecimiento de los brotes de arroz sin causar letalidad y en ensayo preliminares no se observa un efecto negativo de coumarina en el crecimiento de la bacteria. La inmersión constante en coumarina resulta en letalidad aún en concentraciones bajas de 3 a 12mM. Este es el primer reporte que plantea el uso de coumarina con el fin de optimizar los protocolos de transformación *in planta*.

Abstract

The development of genetic transformation protocols is one of the lines of work of the Plant Biotechnology Laboratory of the School of Biology. The objective of this study was to evaluate the effect of coumarin as an inhibitor of the rapid germination of rice seeds and its possible use in the optimization of a genetic transformation protocol using *Agrobacterium tumefaciens*. The effect of the application method and the coumarin concentration was determined by measuring the shoot length and germination percentages. The germination time of CR5272 rice was increased by 24 hours when using a 12mM coumarin concentration with a temporary immersion of 20 to 60 minutes. Germination was maintained at 90% at 48 hours in the control compared to the treatment that achieved 90% germination at 72 hours. The length of the shoots decreased by 2.34 mm at five days when using a

12mM coumarin concentration with a temporary immersion of 20 to 60 minutes. The decrease in germination time of 24 hours and 2.33mm in shoot growth might favor the transformation due to the possibility of greater interaction between *Agrobacterium tumefaciens* and the meristematic cells of the rice shoot. An immersion of rice seeds in a 12 mM coumarin solution for 40 minutes is proposed as a starting point to optimizing transformation with *A. tumefaciens*. At this concentration and immersion time, the growth of rice sprouts is inhibited for 24 hours without causing lethality and in preliminary tests, no negative effect of coumarin on the growth of the bacteria is observed. Constant immersion in coumarin results in lethality even at low concentrations of 3 to 12mM. This is the first report that proposes the use of coumarin to optimize *in planta* transformation protocols.

Palabras clave Cumarina, germinación, arroz, ácido abscísico

Introducción

El proceso de germinación inicia con la absorción de agua por parte de las semillas secas, seguido del crecimiento del embrión y finaliza cuando la radícula atraviesa las estructuras periféricas como el endospermo y la cubierta de la semilla (Bewley, 1997). El paso del estado de dormancia a germinación inicia con el contacto con el agua y requiere condiciones óptimas de temperatura y luz. Durante la germinación se activan procesos metabólicos en el interior de la semilla, regulados por la actividad de fitohormonas en un equilibrio muy preciso (Farooq et al., 2022).

Las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) tienen un papel fundamental en regular la inducción, mantenimiento y transición del estado de dormancia a germinación. El ácido abscísico (ABA) regula la inducción y mantenimiento de la dormancia, mientras que giberelinas (GA) promueve la transición y el inicio de la germinación (Tuan et al., 2018).

La germinación de semillas de arroz requiere una disminución en el contenido de ácido abscísico (ABA) (Zhu et al., 2009). La glucosa inhibe o retrasa la germinación de arroz mediante la supresión de la degradación ABA, la aplicación de glucosa exógena inhibe la expresión de los genes OsABA8ox que codifican para las enzimas ABA 8'-hydroxylasas. La expresión de los mismos genes, OsABA8ox, también se inhibe por la aplicación del compuesto cumarina (Chen et al., 2019), resultando en la disminución de la degradación de ABA e inhibición de la germinación de arroz. Además, la cumarina disminuye el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS), necesarias para desprender la pared celular de las semillas durante la germinación.

El efecto inhibitorio de la cumarina sobre la germinación de semillas de arroz es un fenómeno estudiado desde hace tiempo (Misra & Patnaik, 1959) y se ha estudiado también en otras especies como lechuga, soja, trigo, rábano y rye-grass (Abenavoli et al., 2006; Araniti et al., 2022; M Besrie et al., 1967; Tavares Colpas et al., 2003; Yang et al., 2023).

El nombre cumarina viene del término Frances, *coumarou*, utilizado para llamar a las semillas de frijol Tonka (*Dipteryx odorata*), planta de la cual se aisló por primera vez el compuesto en 1820 (Matos et al., 2015). También se encuentra en altas concentraciones en Alestas (*Anthoxanthum odoratum*), trébol de olor (*Melilotus* sp.), canela Cassia (*Cinnamomum cassia*), extractos de *Justicia pectoralis*, y en árboles de flor de cereza (Sharifi-Rad et al., 2021).

El objetivo de esta investigación es evaluar el potencial de la cumarina para optimizar un protocolo de transformación genética *in planta* de semillas de arroz. Las condiciones idóneas para su aplicación y el efecto sobre la viabilidad de *Agrobacterium tumefaciens*.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Se utilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa* L. Indica var. CR-5272) que se mantienen almacenadas a 4°C en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (UCR). Las semillas se activarán a 37°C por 7 días y se pelaron manualmente antes de cada ensayo.

Pruebas de Inhibición de Germinación

Las semillas se desinfectaron con cloro comercial (NaClO 3.5%) y una gota de Tween-20 en agitación continua (150 rpm) por 20 min, luego se lavaron con agua destilada estéril 3 veces. Se repitió la desinfección con cloro comercial NaClO 3.5%) y una gota de Tween-20 en agitación continua (150 rpm) por 20 min y finalmente se lavaron 5 veces hasta eliminar trazas de cloro. Las semillas se sometieron a los diferentes tratamientos con el compuesto cumarina (Sigma-Aldrich) como se representa en el Cuadro 1. Luego de cada tratamiento, las semillas se germinaron en frascos con medio de cultivo (4,4 g/l Medio basal Murashige & Skoog + 10 g/l sacarosa + 5 g/l gelificante Gelzan, pH 5.6) a una temperatura de 25°C y un fotoperiodo de 12h luz/12h oscuridad. Se realizaron mediciones de porcentaje de germinación y de la longitud de los brotes a los 4 días de germinación.

Cuadro 1. Ensayos de optimización del uso de cumarina como inhibidor de la germinación de semillas de arroz.

I Etapa. Efecto de la cumarina sobre la germinación de semillas de arroz		
Variable	Valor de Tratamiento	Tratamientos
Método de aplicación	-Inmersión temporal -Inmersión continua	10
Cumarina (mM)	0 - 3 - 6 - 9 - 12	
II Etapa. Efecto de la cumarina sobre el desarrollo		
Variable	Valor de Tratamiento	Tratamientos
Cumarina (mM)	0 - 12	6
Tiempo de Inmersión (min)	5 - 10 - 5	
II Etapa. Efecto de la cumarina sobre el desarrollo		
Variable	Valor de Tratamiento	Tratamientos
Cumarina (mM)	12	7
Tiempo de Inmersión (min)	0 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 60	
Total de Tratamientos		23

Sensibilidad de *Agrobacterium* a Cumarina

Se evaluó el efecto de la cumarina sobre el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::pCambia1303. Se inocularon 20ul de un stock de glicerol en 50 ml de medio LB con sus respectivos antibióticos y se incubó a 28°C en agitación constante por 48h. Se midió la densidad óptica (DO600nm) inicial de los cultivos y a partir de esta se preparó una dilución utilizando LB suplementado con cumarina. Se realizaron los cálculos necesarios para obtener soluciones de *Agrobacterium* con una densidad óptica de 0.5 DO600 conteniendo cumarina a concentraciones de 0mM, 6mM y 12mM y se incubaron por 40 min con agitación constante. Se prepararon diluciones seriales (1, 1:10, 1:100 y 1:1000) de las soluciones de *Agrobacterium* tratadas con cumarina a diferentes concentraciones y se inocularon en placas Petri con medio LB sólido suplementado con los respectivos antibióticos.

Resultados

Inhibición de Germinación

Para determinar el método de aplicación más adecuado, tratamos las semillas de arroz con cumarina a diferentes concentraciones (0, 1, 3, 6, 9 y 12 mM) mediante inmersión temporal (1 min) e inmersión continua (72 h), adicionando la solución de cumarina sobre el medio de cultivo. La inmersión continua retrasa significativamente la germinación de las semillas (Figura 1). Sin embargo, la totalidad de los brotes obtenidos mueren a los 7 días incluso con las dosis más bajas de 1 mM y 3mM. Por otro lado, se observó que la inmersión temporal (1 min) de las semillas de arroz en cumarina a dosis relativamente altas (12 mM) retrasa la germinación de las semillas comparado al control y dosis más bajas, sin afectar la viabilidad de los brotes.

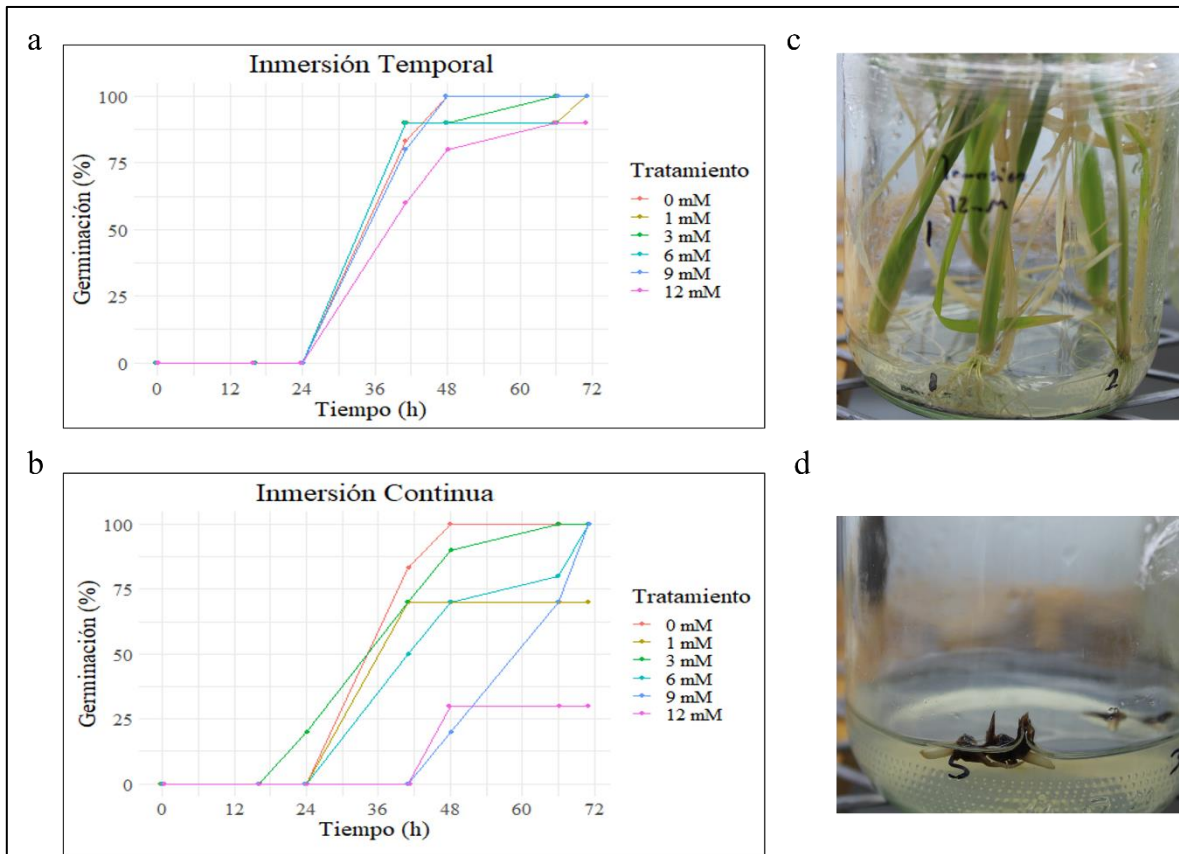


Figura 1. Efecto inhibitorio de la cumarina sobre la germinación de semillas de arroz. **(a-b)** Porcentaje de germinación acumulativo de semillas sometidas a diferentes concentraciones de cumarina (0, 1, 3, 6, 9 o 12 mM) por inmersión temporal de 1 minuto y por inmersión continua respectivamente. **c** Morfología de brotes a los 7 días posterior al tratamiento de inmersión temporal con cumarina 12 mM. **d** Morfología de brotes a los 7 días posterior al tratamiento de inmersión continua con cumarina 3 mM.

Se evaluó el efecto de tiempos de inmersión más largos sobre la elongación de los brotes de arroz. Se realizó la inmersión de semillas de arroz en cumarina a 12 mM por 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos y se midió la longitud de los brotes después de 5 días (Figura 2). Se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos y se encontró diferencia estadística significativa para decir que la longitud de las plantas de arroz no es igual entre los diferentes tratamientos ($p=0.01$), sin embargo, una comparación de medias por medio de la prueba de Tukey, no encontró diferencia estadísticamente significativa entre pares de tratamientos. De todas maneras, un estudio del tamaño del efecto permite cuantificar los resultados observados. A partir de los 40 minutos de inmersión, se observa una disminución en la longitud promedio de los brotes de 2,34 mm con respecto al control (Figura 3).

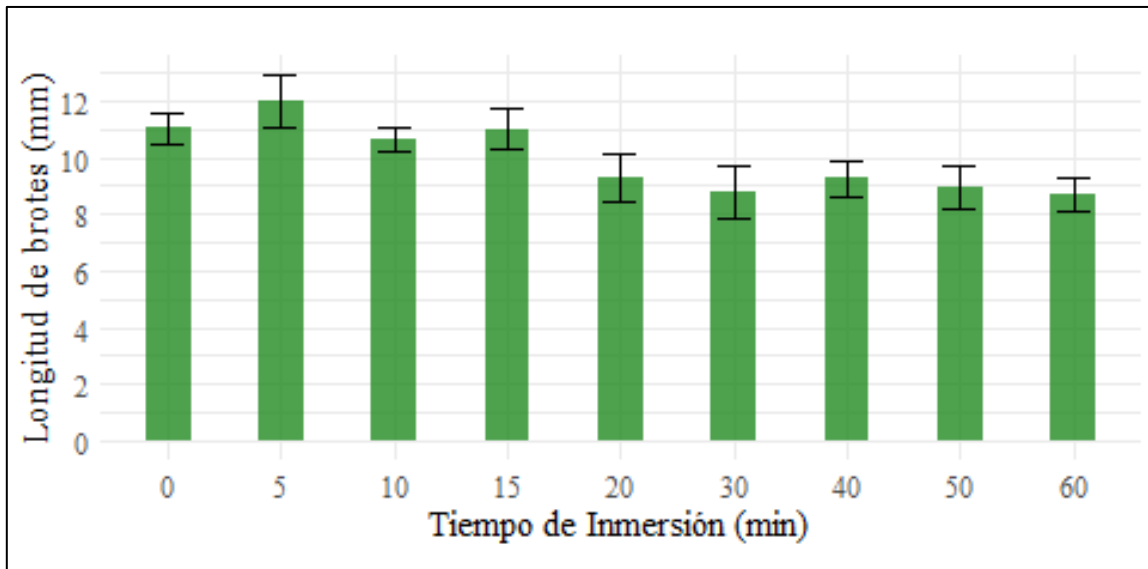


Figura 2. Efecto inhibitorio de la cumarina sobre el crecimiento de brotes de arroz. Longitud de los brotes 5 días después del tratamiento de inmersión con cumarina (12 mM) por 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o 60 minutos. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar de cada tratamiento.

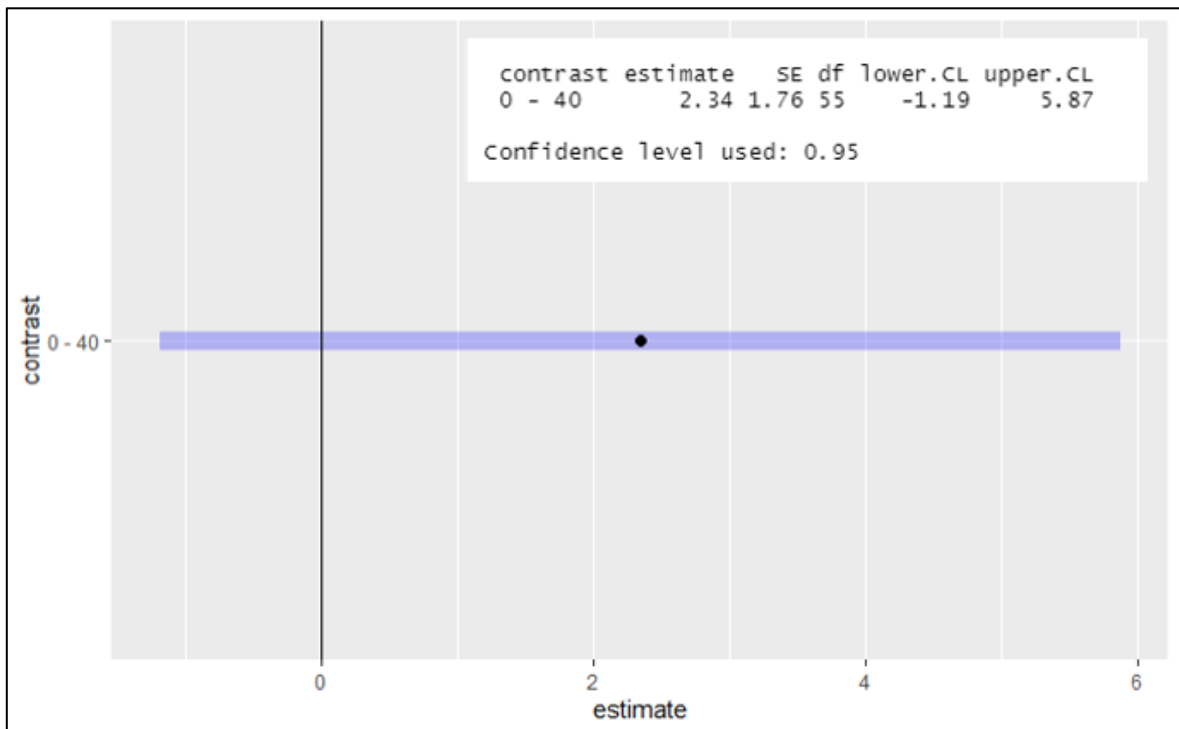


Figura 3. Tamaño del efecto del tiempo de inmersión sobre el promedio de longitud de plantas.

Sensibilidad a Cumarina

Se evaluó el efecto de la cumarina sobre la viabilidad de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV. Se inoculó en medio sólido una solución de *Agrobacterium tumefaciens* previo y posterior al tratamiento con cumarina a 0, 6 y 12 mM por 40 minutos. Se realizaron diluciones seriadas para poder observar el crecimiento de colonias. No se observó inhibición de crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* posterior al tratamiento con cumarina (Figura 3).

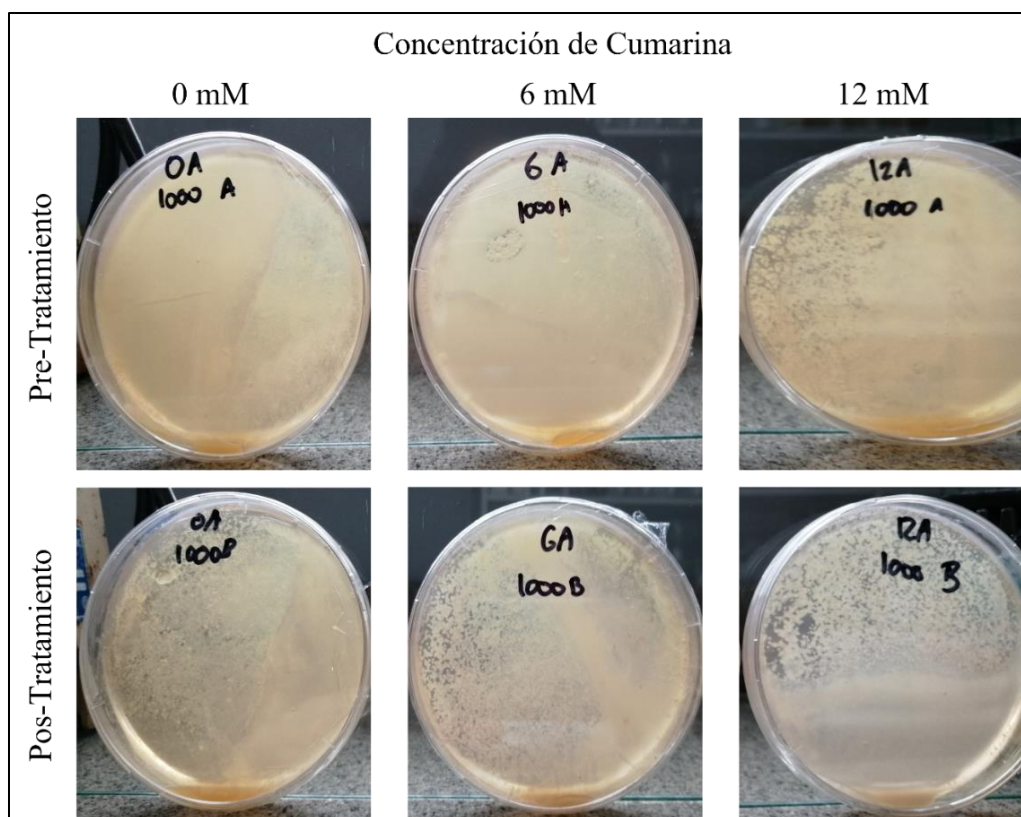


Figura 4. Efecto de la cumarina sobre el crecimiento y viabilidad de *Agrobacterium tumefaciens*. Cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* inoculados previo y posterior al tratamiento con cumarina a diferentes concentraciones (0 mM, 6 mM y 12mM) por 40 minutos.

Discusión

El efecto inhibitorio de la cumarina sobre la germinación de semillas de arroz es un fenómeno estudiado desde hace tiempo (Misra & Patnaik, 1959) y se ha estudiado también en otras especies como lechuga, soja, trigo, rábano y rye-grass (Abenavoli et al., 2006; Araniti et al., 2022; M Besrie et al., 1967; Tavares Colpas et al., 2003; Yang et al., 2023).

El efecto de la cumarina sobre la germinación y elongación de semillas de arroz está relacionado al metabolismo del ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés). Se ha encontrado que la cumarina inhibe el catabolismo del ácido abscísico, resultando en una acumulación de este, además disminuye el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) e incrementa la actividad de catalasa y superóxido dismutasa en los embriones de arroz (Chen et al., 2019).

De acuerdo con lo observado en la literatura y en esta investigación, el uso de la cumarina como inhibidor puede ser optimizado para tener un efecto leve, moderado o alto. El objetivo de esta

investigación es el potencial uso de la cumarina dentro de un protocolo de transformación genética de semillas arroz mediante *Agrobacterium tumefaciens*. A partir de este objetivo se definieron los ensayos y criterios de evaluación.

La medición de la longitud de los brotes se realizó a los 5 días, debido a que este es el tiempo de cultivo con *Agrobacterium* establecido en el protocolo de transformación genética de arroz y es de nuestro interés observar el efecto a este determinado momento. De la misma manera los tiempos de inmersión evaluados (0 – 60 min) coinciden con los tiempos de inoculación de semillas de arroz con *Agrobacterium tumefaciens*.

La actividad de compuestos derivados de la cumarina ha sido ampliamente estudiada y se han encontrado moléculas bioactivas prometedoras como agentes antimicrobianos, también una amplia gama de agentes con diversas propiedades farmacológicas (Al-Majedy et al., 2016; Sahoo et al., 2021). Sin embargo, la molécula madre cumarina, utilizada en este estudio, presenta muy baja actividad antimicrobiana (Reen et al., 2018).

La cumarina se ha estudiado como agente inductor de los genes de virulencia de *Agrobacterium tumefaciens* (Cha et al., 2011). A pesar de que el estudio no evaluó la toxicidad de cumarina sobre *Agrobacterium*, no se reportaron efectos adversos, y si se reportó un incremento en la eficiencia de transformación genética de microalgas utilizando cumarina como una alternativa al uso de acetosiringona.

Conclusiones

Se corroboró el efecto de la cumarina como inhibidor de la germinación en semillas de arroz. Tanto el método como la concentración de los tratamientos debe ser optimizada, ya que pueden observarse efectos letales en el desarrollo de las semillas. El uso de cumarina al 12 mM y realizando inmersión de las semillas por 40 min, tiene un efecto leve en la germinación y en el crecimiento de la planta. Es posible acoplar este procedimiento dentro de un protocolo de transformación genética con *Agrobacterium*, se descartó que la cumarina tenga un efecto negativo en el crecimiento de las células de *Agrobacterium tumefaciens*.

Bibliografía

- Abenavoli, M. R., Cacco, G., Sorgonà, A., Marabottini, R., Paolacci, A. R., Ciaffi, M., & Badiani, M. (2006). The inhibitory effects of coumarin on the germination of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum, CV. Simeto) seeds. *Journal of Chemical Ecology*, 32(2), 489–506. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9011-x>
- Al-Majedy, Y. K., Kadhum, A. A. H., Al-Amiery, A. A., & Mohamad, A. B. (2016). Coumarins: The antimicrobial agents. In *Systematic Reviews in Pharmacy* (Vol. 8, Issue 1, pp. 62–70). <https://doi.org/10.5530/srp.2017.1.11>
- Araniti, F., Prinsi, B., & Espen, L. (2022). The Delay of *Raphanus raphanistrum* subsp. sativus (L.) Domin Seed Germination Induced by Coumarin Is Mediated by a Lower Ability to Sustain the Energetic Metabolism. *Plants*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/plants11070843>

- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. In *The Plant Cell* (Vol. 9). American Society of Plant Physiologists.
- Cha, T. S., Chen, C. F., Yee, W., Aziz, A., & Loh, S. H. (2011). Cinnamic acid, coumarin and vanillin: Alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium* -mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of Microbiological Methods*, *84*(3), 430–434. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.005>
- Chen, B. X., Peng, Y. X., Gao, J. D., Zhang, Q., Liu, Q. J., Fu, H., & Liu, J. (2019). Coumarin-induced delay of rice seed germination is mediated by suppression of abscisic acid catabolism and reactive oxygen species production. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00828>
- Farooq, M. A., Ma, W., Shen, S., & Gu, A. (2022). Underlying Biochemical and Molecular Mechanisms for Seed Germination. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23158502>
- Lanka, R. (2014). DNA Sequencing Analysis Software for Sanger Data-Sets: Comparisons of Basic features Useful for Mutational Studies. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, *8*, 11–17. <https://www.researchgate.net/publication/272352955>
- Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N., Gai, J., & Li, Y. (2017). Optimization of *Agrobacterium* -mediated transformation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00246>
- Lin, J., Zhou, B., Yang, Y., Mei, J., Zhao, X., Guo, X., Huang, X., Tang, D., & 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. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0706-2>
- M Besrie, A. M., Parker, W., Knjigifis, B. A., & Hendrie, M. R. (1967). STUDIES ON LETTUCE SEED GERMINATION-I. COUMARIN INDUCED DORMANCY. *Phytochemistry*, *7*, 567–573.
- Matos, M. J., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O. A., Molina, E., & Yordi, E. G. (2015). Coumarins — An Important Class of Phytochemicals. In *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. InTech. <https://doi.org/10.5772/59982>
- Misra, G., & Patnaik, S. (1959). Effect of Coumarin on the Germination and Growth of Rice Seedlings. *Nature*, *183*, 989–990. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/183989b0>
- Reen, F. J., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Parages, M. L., & O’Gara, F. (2018). Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 5, pp. 2063–2073). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8787-x>
- Sahoo, C. R., Sahoo, J., Mahapatra, M., Lenka, D., Kumar Sahu, P., Dehury, B., Nath Padhy, R., & Kumar Paidesetty, S. (2021). Coumarin derivatives as promising antibacterial agent(s). In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 14, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.102922>

- Sharifi-Rad, J., Cruz-Martins, N., López-Jornet, P., Lopez, E. P. F., Harun, N., Yeskaliyeva, B., Beyatli, A., Sytar, O., Shaheen, S., Sharopov, F., Taheri, Y., Docea, A. O., Calina, D., & Cho, W. C. (2021). Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/6492346>
- Tavares Colpas, F., Orika Ono, E., Rodrigues, D., Raimundo, J., & Passos, S. (2003). BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY A N I N T E R N A T I O N A L J O U R N A L Effects of Some Phenolic Compounds on Soybean Seed Germination and on Seed-borne Fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(2), 155–161.
- Tuan, P. A., Sun, M., Nguyen, T. N., Park, S., & Ayele, B. T. (2018). Molecular mechanisms of seed germination. In *Sprouted Grains: Nutritional Value, Production, and Applications* (pp. 1–24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00001-4>
- Yang, N., He, X., Ran, L., Yang, F., Ma, C., Chen, H., Xiang, D., Shen, G., Zhang, P., He, L., & Qian, K. (2023). The mechanism of coumarin inhibits germination of ryegrass (*Lolium perenne*) and its application as coumarin–carbon dots nanocomposites. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.7397>
- Zhu, G., Ye, N., & Zhang, J. (2009). Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 50(3), 644–651. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp022>

ARTÍCULO 2

Optimización de una metodología de transformación genética *in planta* de embriones maduros de arroz (*Oryza sativa* var. *Indica*).

Alejandro Sebiani Calvo 1,2

¹ Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, Laboratorio de Biotecnología de plantas, San José, Costa Rica

² Programa de Posgrado en Biología (PPB), Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Resumen

El desarrollo de metodologías de cultivo *in vitro* de tejidos es de los principales cuellos de botella para el avance de la transformación genética de plantas. Las metodologías *in planta* ofrecen una alternativa prometedora para sobrepasar las limitantes del cultivo de tejidos y facilitar el mejoramiento genético de cultivos de importancia agrícola. En esta investigación se realizó la optimización de una metodología de transformación *in planta* en arroz, con miras a su uso en sistema de edición CRISPR-Cas9. Los embriones maduros de semillas de arroz indica var CR-5272, sin ningún pretratamiento, fueron perforados con una aguja e infectados con *Agrobacterium tumefaciens*. Se logró optimizar un protocolo de transformación de arroz indica var CR-5272 con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV *in planta* con una eficiencia de transformación transitoria en promedio 96% del área transformada. El protocolo consiste en una inmersión de 40 minutos en una solución de *A. tumefaciens* ATHV con densidad óptica de 1.0 DO_{600 nm}, suplementada con acetosiringona 76 µM, posterior co-cultivo en medio sólido por 6 días. El protocolo es altamente eficiente con un 8.3% de transformación estable en comparación con la transformación en callo de menor del 1%. La cantidad de explantes con expresión GUS es del 100% *in planta* y tan sólo del 56% en callo. La transformación *in planta* disminuye el costo en aproximadamente el 44% y reduce el tiempo necesario para la obtención de plantas transformadas en 80 días, en comparación con el método *in vitro*.

Abstract

The development of *in vitro* tissue culture methodologies is one of the main bottlenecks for the advancement of plant genetic transformation. *In planta* methodologies offer a promising alternative to overcome the limitations of tissue culture and facilitate the genetic improvement of crops. In this research, the optimization of an *in planta* transformation methodology in rice was carried out, with the goal to use it in the CRISPR-Cas9 editing system. Mature embryos of rice indica var CR-5272 seeds, without any pretreatment, were pierced with a needle and infected with *Agrobacterium tumefaciens*. It was possible to optimize a transformation protocol of indica rice var CR-5272 with *Agrobacterium tumefaciens* ATHV *in planta* with an average transient transformation efficiency of 96% of the transformed area. The protocol consists of a 40-minute immersion in a solution of *A. tumefaciens* ATHV with an optical density of 1.0 OD (600 nm), supplemented with 76 µM acetosyringone, followed by co-culture on solid medium for 6 days. The protocol is highly efficient with 8.3% stable transformation compared to callus transformation of less than 1%. The number of

explants with GUS expression is 100% in plant and only 56% in callus. *In planta* transformation decreases the cost by approximately 44% and reduces the time required to obtain transformed plants by 80 days, compared to the *in vitro* method.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, *in planta*, Cultivo de tejidos, Transformación.

Introducción

El arroz es uno de los cultivos más importantes, es el principal alimento de más de la mitad de la población (Bandyopadhyay & Thilmony, 2021). La estabilidad en la producción de arroz es crucial para la seguridad alimentaria, sin embargo, como en todo cultivo la producción se ve afectada por factores de estrés bióticos y abióticos. La transformación de plantas, junto con la ingeniería genética y la secuenciación de genomas tendrán un impacto significativo en la seguridad alimentaria del futuro. El rol de la transformación de plantas es esencial para el estudio funcional de genes, permitiendo el descubrimiento de procesos biológicos y características que pueden ser aplicadas por medio de la biotecnología para el mejoramiento genético de cultivos (Anjanappa & Gruissem, 2021).

CRISPR/Cas9 es actualmente la principal herramienta de edición de genomas para la mejora de plantas, parece estar en camino de revolucionar el mejoramiento de cultivos (Wolter et al., 2019). La edición del genoma en las plantas requiere la inserción y expresión del sistema CRISPR/Cas9 dentro de la célula vegetal. El método más utilizado y eficiente para la entrega de los componentes es la integración estable o la expresión transitoria del ADN mediante la transformación genética de *Agrobacterium* y la regeneración de plantas a través de métodos de cultivo de tejidos *in vitro* (D. Zhang et al., 2021).

Las metodologías de transformación genética de plantas más utilizadas son la transformación mediante cepas de *Agrobacterium* y por biobalística, ambos métodos se utilizan tradicionalmente en conjunto con técnicas de cultivo *in vitro*, que se basan en el uso de medios de cultivo, reguladores de crecimiento y condiciones asépticas controladas para la multiplicación de tejidos, órganos o plantas completas (Saran et al., 2013). El establecimiento y optimización de protocolos de cultivo *in vitro* de tejidos es difícil en algunas variedades de arroz, especialmente en indica, además son protocolos que demandan mucho trabajo y tiempo y son susceptibles a variación somaclonal, estas desventajas pueden limitar la aplicación de herramientas de ingeniería genética en variedades de arroz de importancia comercial (Romero & Gatica-Arias, 2019).

Las metodologías de transformación de plantas que sobrepasan las limitantes y desventajas del cultivo *in vitro* de tejidos son conocidas como *in planta*. Estas metodologías agrupan la transformación de tejidos meristemáticos, tejidos reproductivos, o células de líneas germinales sin la necesidad de pasos de cultivo de tejidos (Ji et al., 2020). Las ventajas de la transformación *in planta* amplían las posibilidades y aplicaciones de las tecnologías de ingeniería genética de plantas. El primer método de transformación genética *in planta* fue descrito por (Feldmann & Marks, 1986). Desde entonces se han desarrollado diferentes procedimientos *in planta* como inmersión floral, infiltración, transformación mediada por polen y microinyección. Las metodologías *in planta* son rutinarias en transformación masiva de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, por su rapidez y facilidad (Ahmad Jan et al., 2016).

El primer método de transformación *in planta* en arroz fue descrito por (Supartana et al., 2005). Este método de transformación por *Agrobacterium* utilizó como explante el tejido meristemático de embriones maduros. Los embriones imbibidos en agua se perforaron con una aguja previamente sumergida en una solución de *Agrobacterium* y se colocaron en papel filtro estéril sobre vermiculita

húmeda por 9 días. La eficiencia de transformación estable en las plantas T_1 fue de 40% determinado por selección en higromicina. A partir de este método, otros grupos de investigación han desarrollado protocolos similares con algunas modificaciones como inmersión del tejido en la solución bacteriana (Hanjagi et al., 2011), uso de infiltración con vacío (Lin et al., 2009), uso de acetosiringona para mejorar la eficiencia (Naseri Gita, 2012), el uso de surfactantes como Tween20 para mejorar la penetración de la bacteria (Ahmed et al., 2018a) y realizar la selección por resistencia a herbicidas en la T_1 . Estos métodos reportan diferentes eficiencias entre 8% - 40%. La eficiencia de transformación de arroz es dependiente de múltiples factores como el tipo y estado del tejido, el genotipo de la planta, la concentración del inóculo, las condiciones de cultivo *in vitro*, las cepas de *A. tumefaciens* y vectores, la selección de marcadores y agentes de selección (Hiei et al., 2014).

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizaron semillas de arroz indica (*Oryza sativa* L. Indica) variedad CR-5272, almacenadas a 4°C en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (UCR). Las semillas se activaron a 37°C por 7 días antes de cada ensayo de transformación genética.

Cepas de *Agrobacterium* y Vectores

Para la optimización de la transformación *in planta* de embriones de arroz, se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV:pCambia1303 y GV3101:pCambia1303. El ADN-T del plásmido pCambia1303 contiene el gen codificante de la enzima β -glucuronidasa (*gus*) como gen reportero (Figura 1).

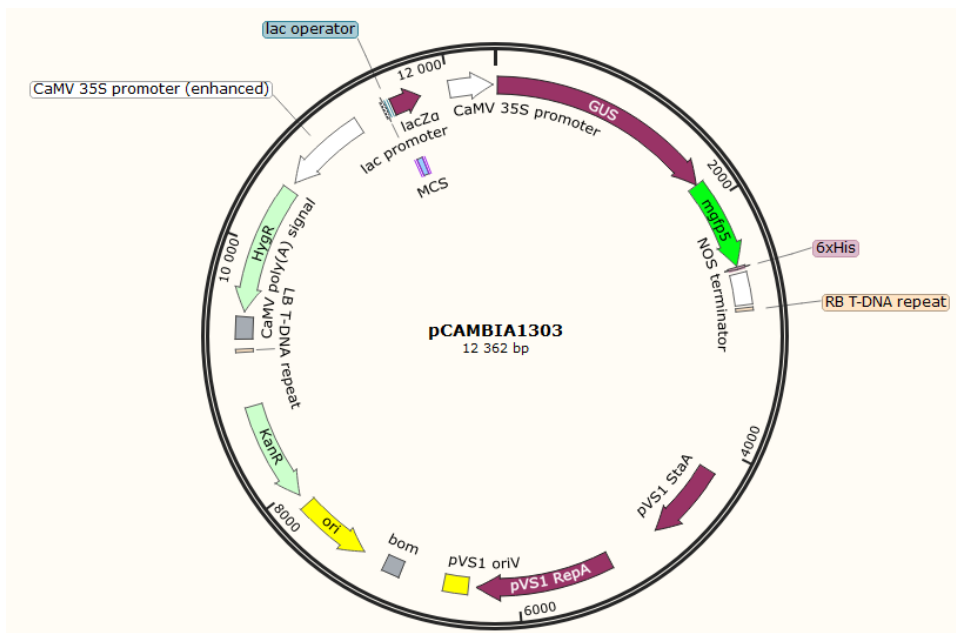


Figura 1. Mapa del plásmido pCambia1303. Fuente: SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com).

Optimización de la transformación *in planta* de embriones de arroz

Se optimizaron los parámetros de transformación genética de embriones maduros de arroz con el objetivo final de realizar edición genética mediante CRISPR-Cas9.

Los parámetros óptimos para la transformación de embriones maduros de arroz se evaluaron de manera secuencial. Los valores óptimos de los primeros factores se utilizaron en la optimización de los siguientes. Primeramente, se evaluaron las condiciones de co-cultivo con un análisis multifactorial del método de co-cultivo (medio sólido y medio líquido), tiempo de co-cultivo (4 y 6 días) y cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (ATHV y GV3101). Seguidamente, se evaluaron los factores: uso de cumarina como agente inhibidor de la germinación (0 mM y 12 mM), concentración de acetosiringona (50 μ M, 100 μ M, 150 μ M) y densidad del cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* (0.5 DO_{600 nm}, 1.0 DO_{600 nm} y 1.5 DO_{600 nm}). Los valores base de las variables sobre los cuales se realizará la optimización se basan en la metodología propuesta por (Ahmed et al., 2018b) y modificaciones a partir de resultados de ensayos preliminares a esta investigación.

Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se inocularon inicialmente en 5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con rifampicina (50 mg/l) y kanamicina (50 mg/l) y se incubaron a 28°C por 24 h en agitación constante. Luego, se subcultivaron en 50 ml de caldo LB suplementado con rifampicina (50 mg/l), kanamicina (50 mg/l) y acetosiringona (76 μ M) y se incubaron a 28°C por 24 h en agitación constante, previo a los ensayos de transformación.

Transformación de embriones maduros

Las semillas de arroz previamente activadas y peladas se desinfectaron en 50 ml de cloro comercial (NaClO 3.5%) y una gota de Tween-20 por 20 min en agitación continua, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Se repitió la desinfección con 50 ml de cloro comercial (NaClO 3.5%) y una gota de Tween-20 por 20 min en agitación continua, luego se lavaron 5 veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre una placa Petri con papel toalla. Se tomaron las semillas, una a una, con pinzas estériles y con una aguja hipodérmica (30G x 1/2") se realizó una perforación en el embrión, procurando realizar la punción lo más cercano a la plúmula, sin desprender el tejido.

Para preparar la solución de infección de *Agrobacterium tumefaciens*, se centrifugó el cultivo bacteriano a 3500 rpm por 20 min, el pellet se resuspendió en 50 ml de medio de co-cultivo líquido MS (4,4g/l Medio Murashige y Skoog + vitaminas de Gamborg, 10g/l sacarosa, Tween20 0,1% v/v, acetosiringona 76 μ M, pH 5.2) y se realizó la dilución necesaria hasta obtener una densidad bacteriana de 0.5-0.6 DO_{600 nm}.

Las semillas con los embriones perforados se colocaron en 50 ml de la solución de infección de *Agrobacterium tumefaciens* y se incubaron por 40 min en agitación leve continua. Después de la infección, los explantes se colocaron en papel toalla estéril para eliminar el exceso de bacteria, se colocaron en medio de co-cultivo sólido (4,4 g/l Medio Murashige & Skoog + vitaminas de Gamborg, 5 g/l sacarosa, 76 μ M acetosiringona, 5 g/l gelificante Gelzan, pH 5.2) y se co-cultivaron a 25 °C bajo un fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h oscuridad por 4 – 6 días.

Después del periodo de co-cultivo, para eliminar la bacteria, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril, seguido de una solución de carbenicilina (600 mg/l) por 5 min, 4 lavados con agua destilada estéril y un lavado final con una solución de carbenicilina (600 mg/l) por 30 min y se subcultivaron en un medio de regeneración basal (4,4 g/l Medio basal Murashige & Skoog +

vitaminas de Gamborg, 10 g/l sacarosa, 500 mg/l carbenicilina, 5 g/l gelificante Gelzan, pH 5.6) a 25°C bajo un fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h.

Transformación de callos de arroz

Las semillas de arroz, previamente peladas y desinfectadas, se colocaron en un medio de cultivo de inducción de callos MSI (4,4 g/l Medio Murashige & Skoog + vitaminas de Gamborg, 2,5 mg/l ácido 2.4-diclorofenoxiacético (2.4-D), 0,3 g/l de caseína hidrolizada, 0,5 g/l de prolina, 20 g/l de sacarosa, 5 g/l de gelificante Gelzan, pH 5.8.) y se mantuvieron en oscuridad por 15 días hasta obtener callos del tamaño adecuado para transformarse.

El cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* se preparó en 10 ml de medio líquido LB suplementado con los antibióticos rifampicina (50 mg/l) y kanamicina (50 mg/l) y se incubó a 28°C por 24 h. Luego, se subcultivó en 50 ml de nuevo medio LB con antibióticos y acetosiringona (76 µM) y se incubó a 28°C por 24 h. Para preparar la solución de infección, el cultivo bacteriano se centrifugó a 14000 rpm por 20 min y se resuspendió en medio de cocultivo líquido MS (4,4g/l Medio basal Murashige y Skoog, 10g/l sacarosa, Tween20 0,01% v/v, acetosiringona 76 µM). Se realizó la dilución necesaria para obtener una concentración de 0.5 - 0.6 DO_{600nm} (densidad óptica medida en espectrofotómetro).

Los callos se colocaron en un matraz con la solución de *Agrobacterium* en agitación por 30 minutos. Luego, los callos se colocaron sobre papel toalla estéril para eliminar el exceso de bacteria y se colocaron en un medio de co-cultivo sólido (4,4 g/l Medio Murashige & Skoog + vitaminas de Gamborg, 2,5 mg/l ácido 2.4-diclorofenoxiacético (2.4-D), 0,3 g/l de caseína hidrolizada, 0,5 g/l de prolina, 5 g/l sacarosa, 76 µM acetosiringona, 5 g/l gelificante Gelzan, pH 5.2) por 3 días en oscuridad a 25°C.

Después del periodo de co-cultivo, se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril y 2 lavados con carbenicilina (500 mg/l) por 30 minutos para eliminar la bacteria. Los callos se subcultivaron a un medio de recuperación (4,4 g/l Medio basal Murashige & Skoog + vitaminas de Gamborg, 2,5 mg/l ácido 2.4-diclorofenoxiacético (2.4-D), 0,3 g/l de caseína hidrolizada, 0,5 g/l de prolina, 10 g/l sacarosa, 500 mg/l carbenicilina, 5 g/l gelificante Gelzan, pH 5.6) por 7 días a 25°C bajo un fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h. Luego, se subcultivaron a un medio de selección (4,4 g/l Medio basal Murashige & Skoog + vitaminas de Gamborg, 2,5 mg/l ácido 2.4-diclorofenoxiacético (2.4-D), 0,3 g/l de caseína hidrolizada, 0,5 g/l de prolina, 10 g/l sacarosa, 500 mg/l carbenicilina, 50 mg/l higromicina 5 g/l gelificante Gelzan, pH 5.6) suplementado con higromicina, en este punto, solo las células transformadas resistentes a higromicina sobreviven y pueden multiplicarse. Los callos se mantuvieron en selección por 15 días a 25°C bajo un fotoperiodo de 12 h luz/ 12 h. Pasado este tiempo, se subcultivaron en nuevo medio de selección por 15 días más, en las mismas condiciones de crecimiento. Una vez seleccionados los callos resistentes, se pasaron a medio de cultivo de regeneración (4,4g/l Medio basal Murashige y Skoog, 10 g/l sacarosa, 5 g/l gelificante Gelzan, pH 5.6, higromicina 500 mg/l) por 30 días, en las mismas condiciones de crecimiento.

Evaluación de la eficiencia de transformación genética

Expresión transitoria del gen gus

Se realizó una prueba histoquímica de expresión transitoria GUS para determinar la eficiencia de la transformación genética. Después de 2 días del proceso de transformación, las plantas se colocaron

en un tubo cónico de 15 ml con buffer de tinción (Buffer fosfato de sodio (NaPO₄) pH 7 5mM, Triton X-100 0.2% v/v, ferrocianuro de potasio 0.5mM, ferricianuro de potasio 0.5mM, EDTA 10mM, metanol 20%) cubriendo por completo el tejido vegetal y se incubaron a -80°C por una hora. Luego se agregó el sustrato X-gluc (20 µl por cada 10 ml de buffer de tinción utilizado) y se incubó a 37°C por toda la noche.

Para visualizar la tinción del tejido, las muestras se decoloraron en una solución de alcohol 95%/ácido acético (3:1) en un baño María a 70°C por 1 hora. El tejido se conservó en alcohol 95 %. Se tomaron fotografías del tejido y se analizaron con la herramienta ImageJ para determinar el porcentaje del área transformada (Schneider et al., 2012). Se determinó el porcentaje de eficiencia (%) como el área total del tejido/área transformada x 100. También se utilizó como criterio de selección de variables el porcentaje de muestras con un área transformada mayor al 90%.

Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de transformación genética se analizaron por medio de análisis de varianza ANOVA o mediante la prueba Kruskal-Wallis, en aquellos resultados que no cumplieran con los supuestos de distribución normal (Shapiro-Wilk, $p < 0.05$). Las pruebas estadísticas y la representación gráfica de los resultados se realizaron utilizando la herramienta RStudio (RStudio Team, 2020).

Comparación entre métodos *in planta* e *in vitro*

Análisis de eficiencia de transformación

Se determinó la eficiencia de transformación transitoria mediante la prueba histoquímica GUS realizada 2 días después de la transformación. Se calculó como el porcentaje de explantes con coloración GUS en su tejido, independientemente del área o intensidad de la tinción. La eficiencia de transformación estable para las plantas transformadas con el método *in planta* se determinó por métodos moleculares mediante PCR. La eficiencia de transformación estable para la metodología *in vitro* se determinó como el porcentaje de callos seleccionados como resistentes a higromicina.

Análisis de costos

Se realizó un estudio comparativo de la eficiencia de transformación, costos y tiempo entre el protocolo optimizado *in planta* y el protocolo *in vitro* de callos derivados a partir de semillas de arroz. Los análisis de costos y tiempo se realizaron siguiendo las metodologías para la transformación de 100 explantes (semillas o callos). El costo de los insumos de laboratorio necesarios (Cuadro 1), fue determinado mediante una cotización formal a la empresa AJ Soluciones S.A, recibida el día 23 de abril del 2023.

Cuadro 1. Lista de insumos considerados en el análisis de costos de las metodologías de transformación genética.

Caldo LB con Miller Modification (PhytoTech Labs)
Murashige & Skoog Modified Medio Basal con Vitaminas de Gamborg (PhytoTech Labs)
Agar, Grado Técnico (PhytoTech Labs)
Gelzan™ (PhytoTech Labs)
Acetosiringona (PhytoTech Labs)
Sorbitán polioxi-etileno (Tween® 20) (PhytoTech Labs)
Rifampicina (PhytoTech Labs)
Kanamicina (PhytoTech Labs)
Higromicina (PhytoTech Labs)
Carbenicilina (PhytoTech Labs)
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (PhytoTech Labs)
L-Prolina (PhytoTech Labs)
Caseína hidrolizada (PhytoTech Labs)
Cloro comercial
Sacarosa (azúcar comercial)
Tubos de centrífuga 50 ml (ONILAB)
Puntas para micropipeta (10 ul, 200 ul, 1000 ul) (ONILAB)
Aguja hipodérmica

Se consideró también el costo de la mano de obra calculada sobre el tiempo efectivo de trabajo necesario en cada una de las etapas de los procedimientos. Se utilizó como valor el monto económico que otorga la Oficina de Becas y Atención Socioeconómicas (OBAS) de la Universidad de Costa Rica por hora asistente para el año lectivo 2023, que corresponde a ₡12,796.00 / hora.

Resultados

Optimización de las condiciones de transformación

Efecto del Método de Cocultivo y Cepa de *Agrobacterium* sobre la eficiencia de transformación

Para determinar las mejores condiciones de co-cultivo de semillas de arroz con *Agrobacterium tumefaciens*, se evaluó el efecto del método de cocultivo, tiempo de cocultivo y cepa de *Agrobacterium* sobre la eficiencia de transformación. Se observó mayor porcentaje de área transformada (63%) en los explantes infectados con la cepa ATHV:pCambia1303 y cocultivados por 6 días en un medio sólido (Figura 2).

Al realizar una prueba estadística multifactorial (ANOVA), no se encontró interacción estadísticamente significativa entre las 3 variables analizadas ($p=0.3$). Sin embargo, si se analiza la diferencia del promedio de área transformada por cada una de las variables, se evidencia mayor eficiencia de transformación utilizando la cepa ATHV (56%) que utilizando GV3101 (50%),

realizando un co-cultivo en medio sólido (55%) en comparación con medio líquido (50%), y tiempo de co-cultivo por 6 días (57%) en lugar de 4 días (45%).

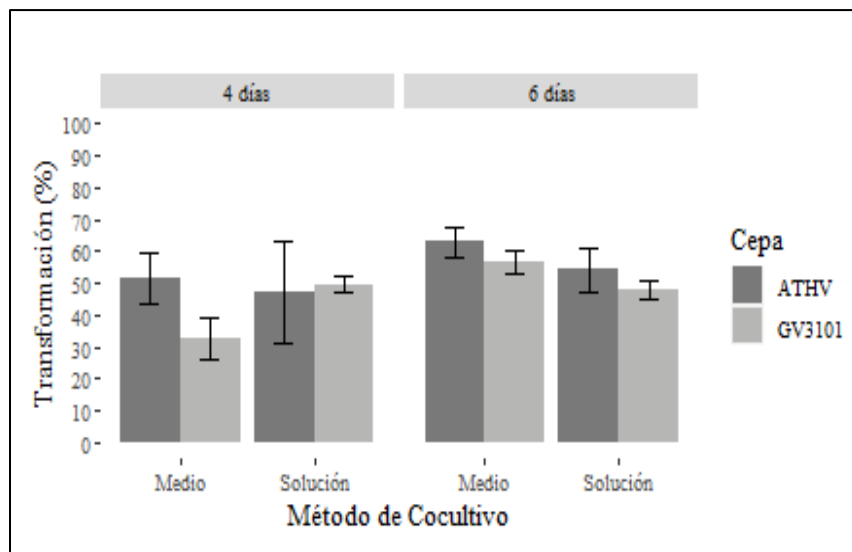


Figura 2. Efecto de las condiciones de co-cultivo y cepa de *Agrobacterium* en la eficiencia de transformación genética. Porcentaje promedio de área con expresión GUS de plantas transformadas mediante la combinación de los factores: método de co-cultivo (medio sólido, medio líquido), tiempo de co-cultivo (4, 6 días) y cepa de *Agrobacterium* (ATHV, GV3101).

Efecto del uso de Cumarina como inhibidor de germinación

En los primeros ensayos de transformación se observó una rápida germinación y elongación de los brotes de arroz durante el periodo de co-cultivo. Razón por la cual se propone evaluar el uso de cumarina como un inhibidor de la germinación y determinar su efecto en la eficiencia de transformación. Las condiciones de aplicación del reactivo cumarina sobre las semillas de arroz fueron previamente evaluadas y se determinó como óptima, la aplicación de una solución de cumarina 12 mM por 40 min durante el periodo de infección con *Agrobacterium*.

Se observó menor área transformada al utilizar cumarina (73,2%), en comparación con las condiciones base de transformación (80,8%) (Figura 3). Al no existir diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (ANOVA $p=0.129$), se utilizó como parámetro de selección, el porcentaje de muestras con un área transformada mayor al 90%. El 35% de las plántulas transformadas con las condiciones base presentaban tinción GUS en al menos 90% del tejido total, mientras que al utilizar cumarina se observó un 23% de plantas con tinción GUS en al menos 90% del tejido (Figura 3).

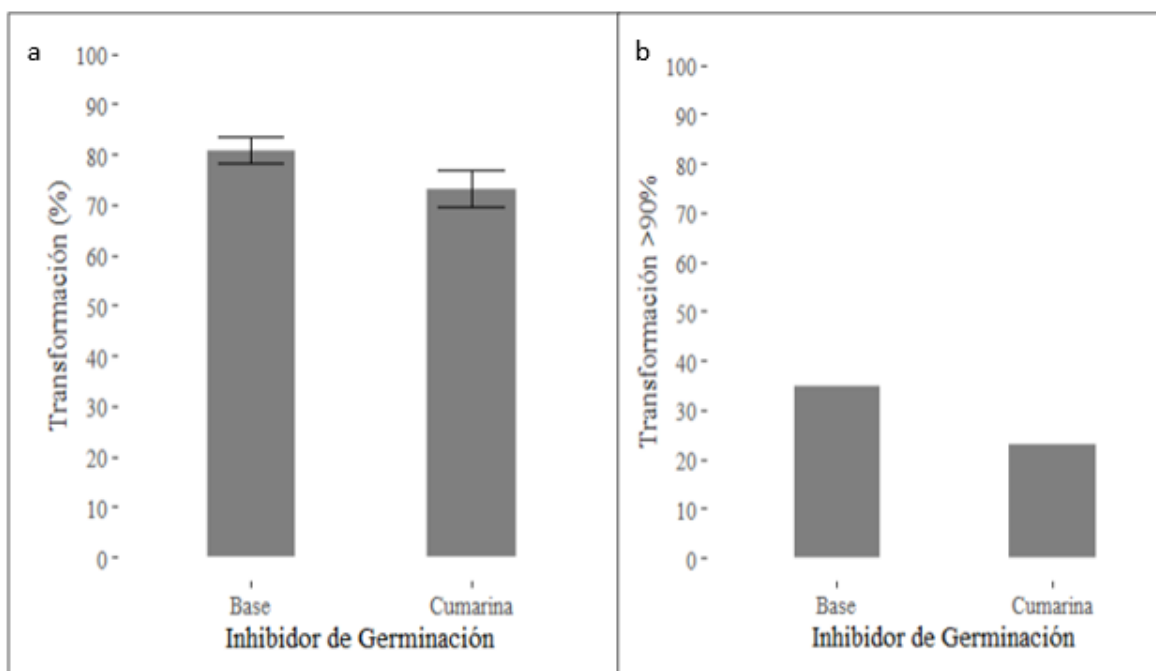


Figura 3. Efecto del uso de cumarina en la eficiencia de transformación genética. **a** Porcentaje promedio de área con expresión GUS de plantas transformadas con diferentes tratamientos de cumarina (0 mM, 12 mM). **b** Porcentaje de plantas con expresión GUS en más del 90% del área para cada tratamiento de cumarina. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar de cada tratamiento.

Efecto de la concentración de Acetosiringona

Se evaluó el efecto de la concentración de acetosiringona en el medio de co-cultivo. La mejor eficiencia de transformación se observó al utilizar una concentración de acetosiringona de 50 μ M (88%) y disminuyó levemente al aumentar la concentración a 100 μ M (85%) y 150 μ M (83%). Al no observarse diferencia estadística significativa (Kruskal-Wallis $p=0.66$), ni una diferencia significativa en el porcentaje de área transformada, se seleccionó la concentración de acetosiringona entre 50 - 100 μ M como óptima para la transformación *in planta* de semillas de arroz (Figura 4).

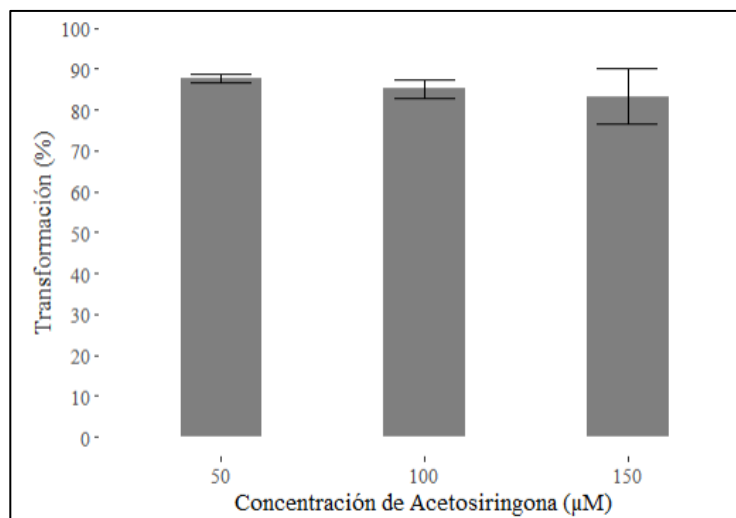


Figura 4. Efecto de la concentración de acetosiringona en la eficiencia de transformación genética. **a** Porcentaje promedio de área con expresión GUS de plantas transformadas con diferentes concentraciones de acetosiringona (50 μM, 100 μM, 150 μM). Los datos representan el valor promedio ± error estándar de cada tratamiento.

Efecto de la concentración de *Agrobacterium tumefaciens*

Se evaluó el efecto de la densidad óptica de *Agrobacterium tumefaciens* sobre la eficiencia de transformación. Se observó un leve incremento en la eficiencia de transformación proporcional al incremento en la densidad óptica de la solución de *Agrobacterium*, alcanzando un promedio de área transformada de 93,6% al infectar con una densidad óptica de 1.5 DO_{600 nm} (Figura 5). Al no existir diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (Kuskal-Wallis p=0.2), se utilizó como criterio de selección el porcentaje de muestras con un área transformada mayor al 90%. El tratamiento que presentó mayor cantidad de plántulas con más del 90% de área transformada fue 1.0 DO_{600 nm} (77%), seguido de 1.5 DO_{600 nm} (73%) y 0.5 DO_{600 nm} (64%) (Figura 5).

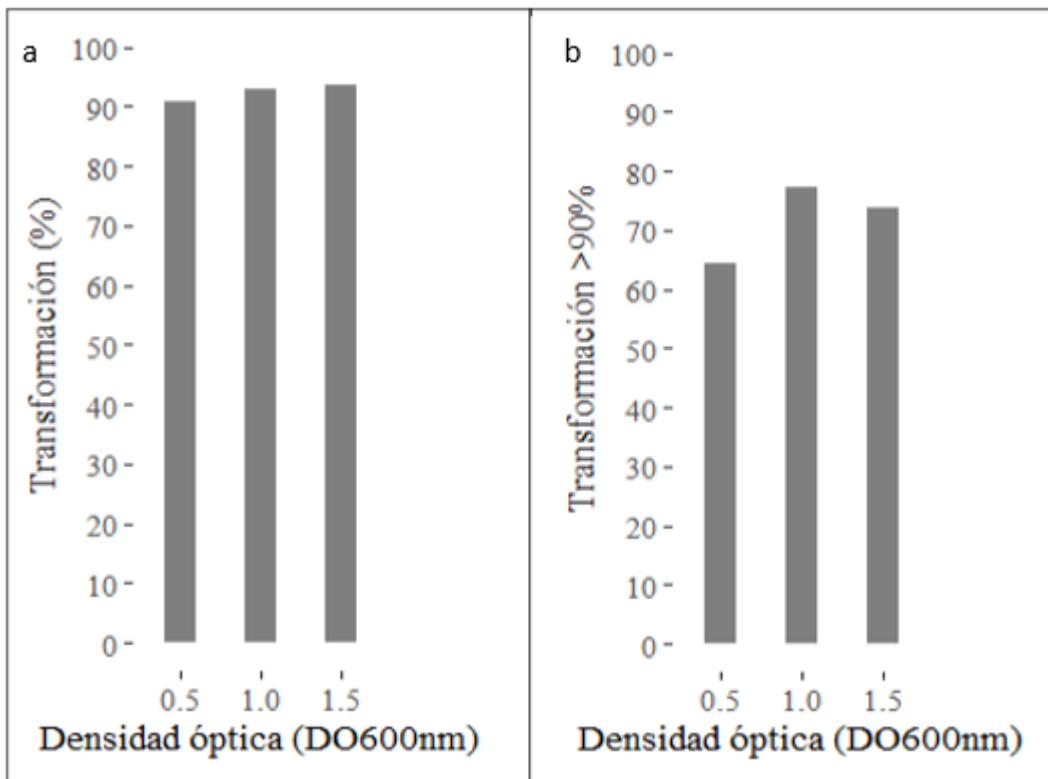


Figura 5. Efecto de la densidad óptica de *Agrobacterium* en la eficiencia de transformación genética. **a** Porcentaje promedio de área con expresión GUS de plantas transformadas con diferentes densidades ópticas de *Agrobacterium* (0.5 DO_{600 nm}, 1.0 DO_{600 nm}, 1.5 DO_{600 nm}). **b** Porcentaje de plantas con expresión GUS en más del 90% del área para cada tratamiento. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar de cada tratamiento.

El protocolo de transformación *in planta*, con los parámetros óptimos, permite obtener plantas regeneradas con expresión transitoria del gen GUS en hasta el 100% del tejido vegetal (Figura 6). A pesar de que no se evaluó el tamaño de la planta regenerada, se observó un crecimiento relativamente uniforme. Sin embargo, algunas plantas más desarrolladas en comparación con el resto de la población tienden a presentar menor porcentaje de área de transformada. Se realizaron cortes histológicos para corroborar la transformación genética en el tejido del interior de las plantas regeneradas (Figura 7).

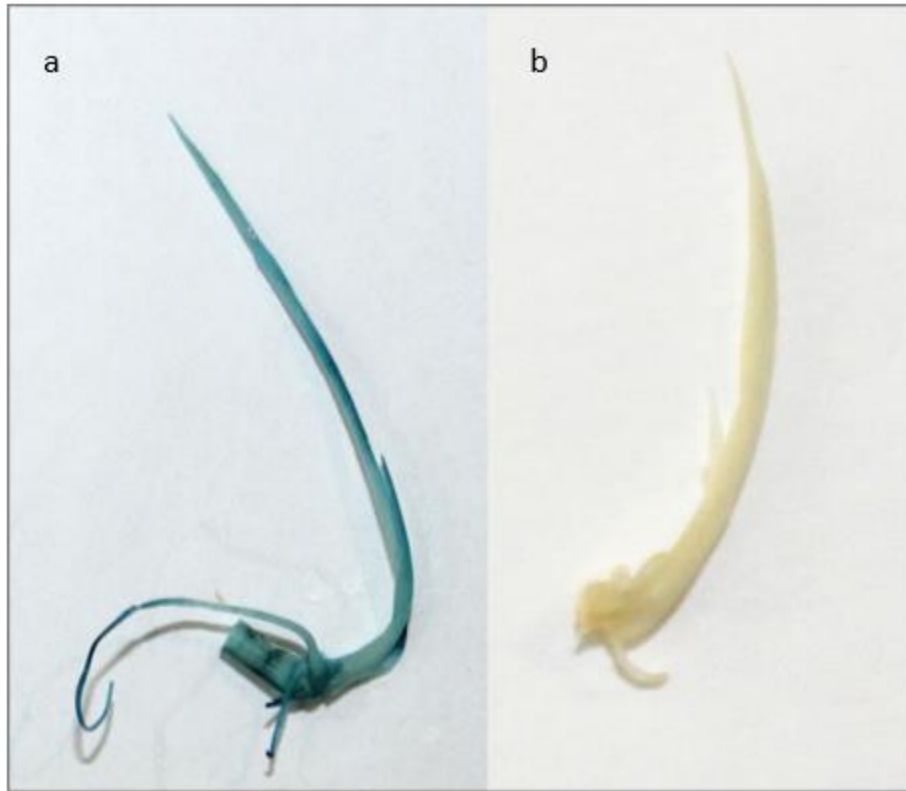


Figura 6. Prueba histoquímica GUS de plantas de arroz transformadas. **a** Plántula de arroz obtenida a partir de transformación de embriones maduros de arroz con el protocolo *in planta* optimizado. **b** Planta sin transformar.

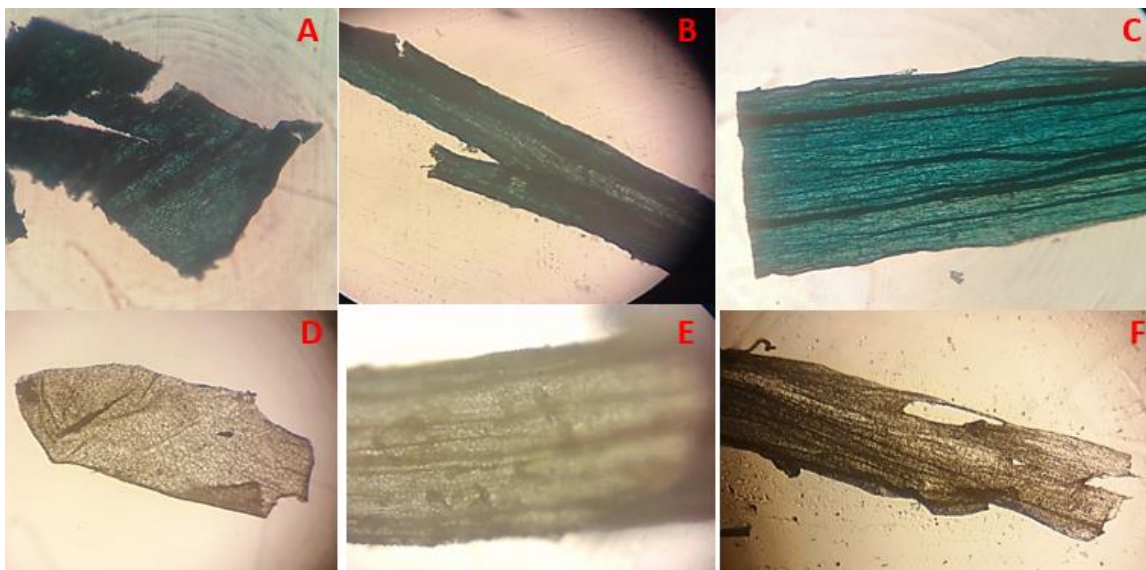


Figura 7. Cortes longitudinales de mesocótilo, coleótilo y primera hoja de plantas de arroz expresando actividad GUS (A, B y C respectivamente) después de 6 días de transformación y controles de plantas sin transformar (D, E y F respectivamente). Aumento 20X

Transformación genética de callos de arroz

La mitad de los callos transformados se utilizó para realizar la prueba histoquímica GUS y la otra mitad se subcultivó en medio de selección con higromicina. Se observó coloración azul (Figura 8), indicando expresión transitoria del gen *gus*, en el 56% de los callos evaluados.



Figura 8. Prueba histoquímica GUS. **a** Callos de arroz transformados con puntos de coloración azul indicando expresión del gen GUS. **b** Callos de arroz sin transformar.

La totalidad de los callos transformados, subcultivados a medio de selección con higromicina, se oscurecieron a los pocos días (Figura 9). Entre 7 – 15 días después se tornaron de color negro, quedando completamente inviables. Se determinó una eficiencia de >1%.

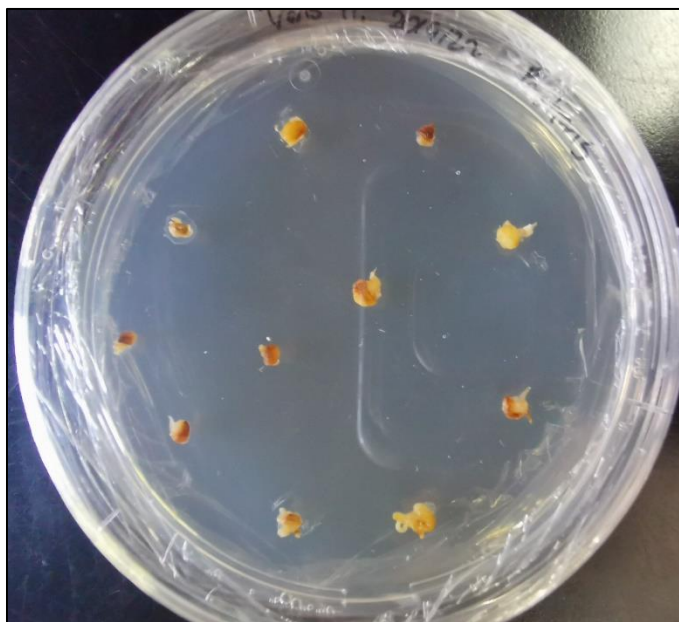


Figura 9. Selección de callos transformados en medio suplementado con higromicina (50mg/l).

Análisis comparativo

El método de transformación genética de arroz *in vitro*, utilizando callos obtenidos a partir de semillas de arroz, es más costoso económicamente y es más lento en comparación con el método de transformación *in planta* de embriones maduros de arroz (Cuadro 2). El mayor costo del método *in vitro* se debe principalmente a la mayor cantidad de tiempo necesario, sobre todo en el subcultivo de los callos en los diferentes medios de cultivo.

Cuadro 2. Comparación entre métodos de transformación *in planta* e *in vitro*.

Método	Costo económico	Tiempo para obtener plantas transformadas	Eficiencia de transformación transitoria (%GUS)	Eficiencia de transformación estable (%)
<i>In vitro</i>	₡ 223,899.00	85 – 90 días	56 %	<1%
<i>In planta</i>	₡125,593.00	8 días	100 %	8,3%

Se observó tinción GUS en el 56% de callos transformados, independientemente de su intensidad. No se logró obtener callos resistentes a higromicina después de 2 subcultivos. Por otro lado, se logró confirmar transformación estable en el 8,3% de las plantas transformadas de manera *in planta*, y se observó tinción GUS en el 100% de las plantas evaluadas.

Discusión

Optimización de las condiciones de transformación *in planta*

La transformación genética de cereales incluyendo el arroz era muy difícil hace 30 años, debido a que los monocotiledones no activan su división celular como respuesta al daño físico (Potrikus, 1990). La optimización de factores clave como las condiciones de cultivo de tejidos, el uso de inductores de los genes *Vir* y la selección de explantes han facilitado la transformación genética de arroz (Tan et al., 2017).

Las cepas de *Agrobacterium* con base cromosomal C58 son de las más utilizadas en biotecnología de plantas, entre ellas las más comunes son GV3101, EHA101, EHA105 y AGL01. Las cepas presentan diferentes propiedades de capacidad de adherencia a las células vegetales, niveles de expresión de los genes *vir* y capacidad de modular la respuesta de defensa de la planta (De Saeger et al., 2021). Es necesario seleccionar la cepa adecuada a cada planta e incluso variedad o explante. En esta investigación se seleccionó la cepa ATHV por encima de la cepa GV3101 para la transformación *in planta* de embriones maduros de arroz indica. La cepa ATHV derivada de EHA101, posee C58RifR como ADN cromosomal y el plásmido ayudante pEHA101 (Goetz Reustle & Khidr, 2007), se ha utilizado anteriormente en transformación de callos de arroz indica y se seleccionó por encima de GV3101 y LBA404 (Aguilar-Bartels et al., 2021). En otras especies como calabaza (*Cucurbita pepo*), también se han observado mejores resultados utilizando ATHV en comparación con GV3101 y LBA4404 (Goetz Reustle & Khidr, 2007). Por otro lado, ATHV presentó menor eficiencia (86%) que GV3101 (100%) y LBA4404 (100%) en infiltración de discos de hoja de café (*Coffea arabica*) (Vargas-Guevara et al., 2018).

Las condiciones de co-cultivo son importantes para asegurar la interacción célula-célula entre *Agrobacterium* y el tejido vegetal, crucial para la eficiente transformación genética de arroz (Mohammed et al., 2019). El mejor tratamiento se determinó al incubar las semillas de arroz infectadas en un medio de co-cultivo semisólido por 6 días. El tiempo de co-cultivo para arroz usualmente es de 2-3 días, sin embargo, el tiempo óptimo es de 5 días para arroz indica var IR64 (Tan et al., 2017). El tiempo de co-cultivo tiene que ser lo suficientemente largo para asegurar el proceso de transferencia del ADN-T.

Normalmente se evalúan la composición de medios de cultivo y su efecto en la eficiencia, sin embargo, al optimizar un protocolo *in planta*, el medio de co-cultivo tiene como función dar soporte al crecimiento de *Agrobacterium* y la adecuada adherencia a los embriones maduros arroz sin la presencia de reguladores de crecimiento ni componentes nutricionales especiales.

Con el mismo objetivo de asegurar la transferencia de ADN, se evaluó el efecto de cumarina como inhibidor de la rápida germinación de las semillas de arroz. Además de su efecto inhibidor, la cumarina se ha estudiado como agente inductor de los genes *vir* (Cha et al., 2011). Anteriormente, se reportó un incremento en la eficiencia de transformación genética de microalgas utilizando cumarina como una alternativa al uso de acetosiringona. Es posible que exista un efecto sinérgico entre acetosiringona y cumarina en la inducción de genes de virulencia. Para motivos de esta investigación no se exploró más esta interacción y se determinó mejor eficiencia sin aplicar el inhibidor de germinación.

El uso de inductores de los genes *vir* ha sido sumamente importante en el avance de la transformación genética de especies recalcitrantes de monocotiledones (Hiei et al., 2014). La acetosiringona imita los compuestos fenólicos liberados por la planta de manera natural y en conjunto con azúcares y pH

ácido induce la virulencia de *Agrobacterium* (Ziemienowicz, 2014) . La concentración de acetosiringona entre 50 μM y 100 μM en el medio de co-cultivo fue la más adecuada y observamos eficiencia de transformación de hasta 88% de área transformada. Recientemente, un protocolo similar de transformación *in planta* de semillas de arroz obtuvo 24% de plantas transformadas de manera estable utilizando acetosiringona (100 μM) (Naseri, 2012).

La concentración de *Agrobacterium* tiene un efecto importante en la transformación. Una baja densidad puede resultar en baja eficiencia, por otro lado, una alta densidad puede causar daño en el tejido, un crecimiento excesivo de la bacteria y disminuir el porcentaje de recuperación de los explantes (Asande et al., 2020). Este efecto, si bien dependen de otras variables como el tipo de tejido, se han observado y confirmado en plantas de interés agrícola como trigo (Amoah et al., 2001), soja (Li et al., 2017), y maíz (Zhao et al., 2001). En esta investigación se evaluaron rangos entre 0.3 y 1.0 DO de densidad óptica, comúnmente utilizados en transformación *in planta* de arroz (Burman et al., 2020). Se encontró un leve incremento en la eficiencia de transformación proporcional al incremento en densidad óptica. El máximo valor evaluado fue de 1.5 DO y no se observó que tuviera un efecto negativo en la germinación o desarrollo de las plantas. Sin embargo, para evitar un crecimiento excesivo en futuros subcultivos, se seleccionó 1.0 DO como tratamiento óptimo, con dicho tratamiento se obtuvieron 77% de las plantas con un porcentaje de área transformada mayor al 90%.

La optimización de variables fue sumamente exitosa, en ensayos preliminares a esta investigación se observaba tinción GUS solamente en el grano de arroz y no así en los brotes (resultados no mostrados). En las primeras etapas de optimización se logró transformar el embrión maduro de arroz y la expresión GUS transitoria se observó hasta en un 63% del área de los brotes. El protocolo optimizado permite obtener una eficiencia promedio de 93,6% del área transformada transitoriamente. Es posible que el alto porcentaje de área transformada esté relacionada a la eficiente transferencia del ADN-T en las células meristemáticas del embrión, ya que las células de la plúmula dan origen al tejido apical y foliar de la planta y los genes de interés son transmitidos por división celular. Este posible evento, es sumamente importante para disminuir la probabilidad de quimeras al utilizar este protocolo para edición genética mediante CRISPR-Cas9.

La alta eficiencia de transformación transitoria *in planta* de arroz, la hacen una alternativa de gran utilidad para investigación básica como localización intracelular de proteínas, el estudio *in vivo* de interacciones proteína-proteína, proteína-ADN y proteína -ARN, y para realizar experimentos de actividad enzimática, co-inmunoprecipitación, e inmunoprecipitación de cromatina (Burman et al., 2020).

Los estudios previos de transformación *in planta* de embriones maduros de arroz reportan eficiencias de transformación entre 6% - 30%. Generalmente, se utiliza como parámetro de eficiencia la cantidad de plantas resistentes a higromicina, utilizando este criterio, las plantas no transformadas o quimeras mueren (Das & Sanan-Mishra, 2015). Debido a que el objetivo siguiente de esta investigación es utilizar el protocolo para edición genética mediante CRISPR-Cas9, las plantas no se sometieron a selección por resistencia a higromicina, bajo la hipótesis de que el sistema es capaz de inducir mutaciones incluso si se expresa de manera transitoria (Kaur et al., 2021; Nandy et al., 2019).

Comparación entre métodos *in planta* e *in vitro*

El mejoramiento genético de arroz, mediante transformación genética y otras herramientas biotecnológicas, es un campo de estudio muy activo debido a su importancia global como cultivo alimenticio y su uso como organismo modelo (Verma & Sinha, 2020). Los programas de

mejoramiento se enfocan en desarrollar variedades con altos rendimientos, excelente calidad de grano, mejoras nutricionales, y resistencia al estrés por factores bióticos y abióticos.

La generación de plantas transgénicas de arroz es un proceso rutinario en muchos laboratorios. Se ha realizado estudios de transformación genética en cerca de 100 genotipos de arroz (Amandeep Kaur, 2014). La metodología estándar y más comúnmente utilizada es la transformación de callos embriogénicos mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Las metodologías *in vitro* son también las más utilizadas en edición de genomas mediante CRISPR-Cas (Romero & Gatica-Arias, 2019). Las ventajas de las metodologías *in vitro* son principalmente la disponibilidad de protocolos bien establecidos altamente eficientes y permite obtener plantas a partir de una sola célula lo que facilita la selección de plantas con integración estable (Amandeep Kaur, 2014). Sin embargo, algunas variedades de arroz *indica* se siguen considerando recalcitrantes y difíciles de transformar debido a su baja respuesta de regeneración *in vitro* (Sundararajan et al., 2020).

Los protocolos de transformación *in vitro* pueden demandar mucho trabajo y tiempo, en plantas como arroz o tomate puede tardar hasta 6 meses (Kim, 2020). Además, las plantas son susceptibles a cambios fenotípicos por variación somaclonal y rearreglos cromosómicos (Ghosh et al., 2021)

Los resultados obtenidos en esta investigación contrastan las desventajas del método *in vitro* en comparación con el método *in planta*. Principalmente la gran diferencia en el tiempo necesario para obtener plantas transformadas. Además, el tiempo de trabajo de laboratorio invertido en cada una de las etapas y como se ve reflejado en el costo económico. La transformación *in planta* es más rápida, menos costosa, y menos susceptible a contaminación por manipulación de los explantes. La eficiencia de transformación no es comparable entre las metodologías, debido a la diferencia en los procesos biológicos involucrados. Sin embargo, una interpretación válida es la necesidad de una mayor cantidad de callos para obtener una planta transformada por métodos *in vitro*, en comparación con una menor cantidad de semillas necesarias para obtener una planta transformada por el método *in planta*. Este criterio es de interés ya que puede simplificar el trabajo y el manejo de un ensayo al disminuir la cantidad de explantes necesarios.

La metodología *in planta*, conocida como inmersión floral, ha desplazado a las metodologías *in vitro* en la transformación rutinaria y masiva de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (Bent, 2000). El potencial de este enfoque es cada vez más estudiado en plantas como el arroz, maíz, y trigo (Abhishek et al., 2016; Basavaraju et al., 2020; Hamada et al., 2017). Los resultados de esta investigación se suman a los esfuerzos para sobrepasar las limitantes de la transformación genética en cultivos de importancia agrícola y potenciar el uso de herramientas modernas como CRISPR-Cas.

Conclusiones

Se desarrollo un protocolo *in planta* rápido y altamente eficiente para la transformación transitoria de embriones maduros de arroz *indica*. El alto porcentaje de área transformada evidencia la transferencia y expresión del ADN-T en el interior de las células vegetales.

Las principales ventajas de las metodologías de transformación *in planta*, en comparación de metodologías dependientes de cultivo *in vitro* de tejidos, son la reducción en el tiempo necesario para regenerar, evaluar y seleccionar plantas transformadas. De la misma manera, facilita y reduce el volumen de trabajo del laboratorio y reduce riesgos asociados a subcultivos y mantenimiento del material vegetal.

El uso de embriones maduros de arroz es adecuado para estudios de transformación genética de arroz ya sea para evaluar expresión transitoria, como se demostró en esta investigación, o para generar transgénicos estables de manera exitosa.

Se propone el uso de este protocolo como una manera rápida y eficiente de realizar edición de genomas mediante CRISPR-Cas9 en variedades de arroz indica de importancia comercial.

Bibliografía

- Abhishek, A., Kumari, R., Karjagi, C. G., Kumar, P., Kumar, B., Dass, S., Sai Kumar, R., & Ramteke, P. W. (2016). Tissue Culture Independent *Agrobacterium tumefaciens* Mediated *In planta* Transformation Method for Tropical Maize (*Zea mays*.L). *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 86(2), 375–384.
<https://doi.org/10.1007/s40011-014-0454-0>
- 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*. *Agronomia Mesoamericana*, 32(3), 764–778.
<https://doi.org/10.15517/AM.V32I3.44978>
- Ahmad Jan, S., Khan Shinwari, Z., Hussain Shah, S., Shahzad, A., Amir Zia, M., & Ahmad, N. (2016). In-planta transformation: recent advances. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1).
<https://www.researchgate.net/publication/301655045>
- Ahmed, T., Biswas, S., Elias, S. M., Sazzadur Rahman, M., Tuteja, N., & Seraj, Z. I. (2018a). *In planta* transformation for conferring salt tolerance to a tissue-culture unresponsive indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(2), 154–165.
<https://doi.org/10.1007/s11627-017-9870-1>
- Ahmed, T., Biswas, S., Elias, S. M., Sazzadur Rahman, M., Tuteja, N., & Seraj, Z. I. (2018b). *In planta* transformation for conferring salt tolerance to a tissue-culture unresponsive indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(2), 154–165.
<https://doi.org/10.1007/s11627-017-9870-1>
- Amandeep Kaur, S. K. S. (2014). Genetic Transformation of Rice: Problems, Progress and Prospects. *Rice Research: Open Access*, 03(01). <https://doi.org/10.4172/2375-4338.1000132>
- Amoah, B. K., Wu, H., Sparks, C., & Jones, H. D. (2001). Factors influencing *Agrobacterium* - mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1135–1142. www.pgreen.ac.uk/plasmid.htm.
- Anjanappa, R. B., & Gruissem, W. (2021). Current progress and challenges in crop genetic transformation. In *Journal of Plant Physiology* (Vol. 261). Elsevier GmbH.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153411>

- Asande, L. K., Omwoyo, R. O., Oduor, R. O., & Nyaboga, E. N. (2020). A simple and fast *Agrobacterium* -mediated transformation system for passion fruit KPF4 (*Passiflora edulis* f. *edulis* × *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Plant Methods*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00684-4>
- Bandyopadhyay, A., & Thilmony, R. (Eds.). (2021). *Rice Genome Engineering and Gene Editing Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, LLC. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1068-8>
- Basavaraju, S. N., Lakshmikanth, R. Y., & Makarla, U. (2020). A modified in-planta transformation technique to generate stable gain-in function transformants in a recalcitrant indica rice genotype. *Plant Physiology Reports*, *25*(2), 231–244. <https://doi.org/10.1007/s40502-020-00517-5>
- Bent, A. F. (2000). *Update on Plant Transformation Arabidopsis in planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species 1*. <https://academic.oup.com/plphys/article/124/4/1540/6109857>
- Burman, N., Chandran, D., & Khurana, J. P. (2020a). A Rapid and Highly Efficient Method for Transient Gene Expression in Rice Plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.584011>
- Cha, T. S., Chen, C. F., Yee, W., Aziz, A., & Loh, S. H. (2011). Cinnamic acid, coumarin and vanillin: Alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium* -mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of Microbiological Methods*, *84*(3), 430–434. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.005>
- Das, S. S., & Sanan-Mishra, N. (2015). A direct method for genetically transforming rice seeds modelled with FHVB2, a suppressor of RNAi. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *120*(1), 277–289. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0604-3>
- De Saeger, J., Park, J., Chung, H. S., Hernalsteens, J. P., Van Lijsebettens, M., Inzé, D., Van Montagu, M., & Depuydt, S. (2021). *Agrobacterium* strains and strain improvement: Present and outlook. In *Biotechnology Advances* (Vol. 53). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107677>
- Feldmann, K. A., & Marks, M. D. (1986). RAPID AND EFFICIENT REGENERATION OF PLANTS FROM EXPLANTS OF *ARABIDOPSIS THALIANA*. In *Plant Science* (Vol. 47).
- Ghosh, A., Igamberdiev, A. U., & Debnath, S. C. (2021). Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: a review. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 48, Issue 1, pp. 823–841). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06062-6>
- Goetz Reustle, P., & Khidr, Y. (2007). *Development of a strategy to induce RNA-silencing in squash against virus diseases by genetic transformation*.
- 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11936-0>

- Hanjagi, P. S., Sashidhar, V., Radhakrishnan, V., Awaji, S. M., & Sreevathsa, R. (2011). Transgenic Plant Journal Improvement of Salt Tolerance in Putatively Transgenic Rice Plants Overexpressing AVP1, a Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase. *Transgenic Plant Journal*, 5, 43–49.
- Hiei, Y., Ishida, Y., & Komari, T. (2014). Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue November, pp. 1–11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
- Ji, X., Yang, B., & Wang, D. (2020). Achieving Plant Genome Editing While Bypassing Tissue Culture. In *Trends in Plant Science* (Vol. 25, Issue 5, pp. 427–429). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.02.011>
- Kaur, M., Manchanda, P., Kalia, A., Ahmed, F. K., Nepovimova, E., Kuca, K., & Abd-Elsalam, K. A. (2021). Agroinfiltration mediated scalable transient gene expression in genome edited crop plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms221910882>
- Kim, S. G. (2020). The way to true plant genome editing. In *Nature Plants* (Vol. 6, Issue 7, pp. 736–737). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0723-2>
- Lanka, R. (2014). DNA Sequencing Analysis Software for Sanger Data-Sets: Comparisons of Basic features Useful for Mutational Studies. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 8, 11–17. <https://www.researchgate.net/publication/272352955>
- Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N., Gai, J., & Li, Y. (2017). Optimization of *Agrobacterium* -mediated transformation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00246>
- Lin, J., Zhou, B., Yang, Y., Mei, J., Zhao, X., Guo, X., Huang, X., Tang, D., & 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. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0706-2>
- Mohammed, S., Samad, A. A., & Rahmat, Z. (2019). *Agrobacterium* -Mediated Transformation of Rice: Constraints and Possible Solutions. In *Rice Science* (Vol. 26, Issue 3, pp. 133–146). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.04.001>
- Nandy, S., Pathak, B., Zhao, S., & Srivastava, V. (2019). Heat-shock-inducible CRISPR/Cas9 system generates heritable mutations in rice. *Plant Direct*, 3(5). <https://doi.org/10.1002/pld3.145>
- Naseri Gita. (2012). *In planta* transformation of rice (*Oryza sativa*) using thaumatin-like protein gene for enhancing resistance to sheath blight. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(31). <https://doi.org/10.5897/ajb11.3331>
- Potrikus, I. (1990). Gene Transfer to Cereals: An Assessment. *Nat Biotechnol*, 8, 535–542. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nbt0690-535>
- Romero, F. M., & Gatica-Arias, A. (2019). CRISPR/Cas9: Development and Application in Rice Breeding. In *Rice Science* (Vol. 26, Issue 5, pp. 265–281). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.08.001>

- RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC.
- Saran, S., Prem, B., & Dantu, K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. SpringerScience+BusinessMedia. <https://doi.org/DOI10.1007/978-81-322-1026-9>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 671–675). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com).* (n.d.).
- Sundararajan, S., Rajendran, V., Nayeem, S., & Ramalingam, S. (2020). Physicochemical factors modulate regeneration and Agrobacterium -mediated genetic transformation of recalcitrant indica rice cultivars - ASD16 and IR64. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101519>
- 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. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.391>
- Tan, L. W., Rahman, Z. A., Goh, H. H., Hwang, D. J., Ismail, I., & Zainal, Z. (2017). Production of transgenic rice (indica cv. MR219) overexpressing ABP57 gene through Agrobacterium - mediated transformation. *Sains Malaysiana*, 46(5), 703–711. <https://doi.org/10.17576/jsm-2017-4605-04>
- Vargas-Guevara, C., Vargas-Segura, C., Villalta-Villalobos, J., Pereira, L. F. P., & Gatica-Arias, A. (2018). A simple and efficient agroinfiltration method in coffee leaves (*Coffea arabica* L.): assessment of factors affecting transgene expression. *3 Biotech*, 8(11). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1495-5>
- Verma, N., & Sinha, A. K. (2020). Modern tools in improving rice production. In *Advancement in Crop Improvement Techniques* (pp. 67–75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818581-0.00004-8>
- Wolter, F., Schindele, P., & Puchta, H. (2019). Plant breeding at the speed of light: The power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. In *BMC Plant Biology* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1775-1>
- Zhang, D., Zhang, Z., Unver, T., & Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 29, pp. 207–221). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.10.003>
- Zhang, Z., Hua, L., Gupta, A., Tricoli, D., Edwards, K. J., Yang, B., & Li, W. (2019). Development of an Agrobacterium -delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, 17(8), 1623–1635. <https://doi.org/10.1111/pbi.13088>
- Zhao, Z.-Y., Gu, W., Cai, T., Tagliani, L., Hondred, D., Bond, D., Schroeder, S., Rudert, M., & Pierce, D. (2001). High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. In *Molecular Breeding* (Vol. 8).

Ziemenowicz, A. (2014). Agrobacterium -mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 95–102). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.004>

ARTÍCULO 3

Edición del gen de la trehalasa OSTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9 de manera *in planta*.

Alejandro Sebiani Calvo 1,2

¹ Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, Laboratorio de Biotecnología de plantas, San José, Costa Rica

² Programa de Posgrado en Biología (PPB), Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Resumen

Los efectos negativos en la producción agrícola por estrés abiótico como sequía y salinidad son de las principales amenazas para la seguridad alimentaria, y por ende, uno de los principales enfoques de programas de mejoramiento genético de cultivos. La disponibilidad de herramientas genéticas precisas y eficientes como CRISPR/Cas9, permite el estudio de genes y generar líneas mutantes con rasgos deseados. Los genes de la ruta biosintética de la trehalosa se han identificado como posibles blancos de edición genética debido a su rol en diferentes procesos biológicos de las plantas incluidos la resistencia a estrés abiótico. Se implementó una estrategia de edición genética mediante CRISPR/Cas9 de manera *in planta* para realizar una disrupción en el gen de la trehalasa en arroz, OsTRE. Se confirmó la edición genética con un porcentaje de eficiencia del 23,5%. La línea mutante C720-34 posee una mutación heterocigota que resulta en la traducción de la enzima trehalasa de menor tamaño y con pérdida de su sitio activo de hidrólisis de trehalosa.

Abstract

The negative effects on agriculture production due to abiotic stress such as drought and salinity are one of the main threats to food security, and therefore one of the main focuses of crop genetic improvement programs. The availability of precise and efficient gene editing tools, such as CRISPR/Cas9, allows the study of genes and the generation of mutant lines with desired traits. The genes of the trehalose biosynthetic pathway have been identified as potential targets for gene editing due to their role in different biological processes in plants, including resistance to abiotic stress. An *in planta* CRISPR/Cas9 gene editing strategy was implemented to disrupt the rice trehalase gene, OsTRE. Genetic editing was confirmed with an efficiency percentage of 23.5%. The C720-34 mutant line has a heterozygous mutation that results in the translation of the trehalase enzyme being smaller and with loss of its active trehalose hydrolysis site.

Palabras clave CRISPR/Cas9, transformación *in planta*, sequía, salinidad, arroz, trehalasa, trehalosa

Introducción

La sequía es la principal amenaza a la producción de cultivos agrícolas y afecta especialmente al cultivo de arroz, altamente susceptible debido a su pequeño sistema radicular, delgada capa de cera cuticular y un sistema de cierre rápido de estomas (Sahebi et al., 2018).

Las tecnologías de edición de genomas tienen la capacidad de superar limitantes de programas de mejoramiento tradicionales en selección de rasgos como resistencia a sequía. Entre ellas se destaca el sistema CRISPR/Cas9 como la más novedosa, el cual se ha utilizado para mejoramiento de cultivos de importancia agronómica por su precisión, adaptabilidad y simplicidad (Oladosu et al., 2019). El sistema CRISPR/Cas9 original crea cortes de doble banda (DSB por sus siglas en inglés) en el ADN genómico de manera precisa y basado en una guía de ARN (sgRNA) complementaria al sitio blanco del ADN genómico. El complejo enzimático sgRNA-Cas9 reconoce una secuencia corta al lado del sitio de corte llamada motivo adyacente al proto-espaciador o sitio PAM (por sus siglas en inglés). Una vez que se reconoce el sitio PAM, la enzima Cas9 es activada y corta el ADN (Jinek et al., 2012). Este sistema se puede codificar dentro de un plásmido e insertarse dentro de las células vegetales por métodos de transformación genética (Z. Zhang et al., 2019).

Las aplicaciones de CRISPR/Cas en arroz incluyen el estudio de genes de respuesta a estrés abióticos por salinidad, sequía, bajas temperatura, resistencia a enfermedades bacterianas, resistencia a herbicidas y mejoramiento de procesos biológicos como la eficiencia del uso de nitrógeno (Romero & Gatica-Arias, 2019). La resistencia a sequía es un rasgo complejo cuyo fenotipo es afectado por una gran variedad de rutas metabólicas y por ende complejidad de genes involucrados. Entre los compuestos estudiados se destaca la trehalosa, un disacárido con capacidad de osmoprotección que se ha determinado tiene un papel importante en el mecanismo de respuesta ante sequía y salinidad en plantas de arroz (Redillas et al., 2012).

Existen varias rutas involucradas en la biosíntesis de trehalosa en bacterias y arqueas, sin embargo, en procariotas se encuentra una sola ruta biosintética de dos pasos, catalizada por las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP). La ruta biosintética resulta en la acumulación de trehalosa-6-fosfato (T6P) y trehalosa en cantidades micromolares, cuando hay disponibilidad de sucrosa (Lunn et al., 2014). Trehalosa-6-fosfato es una molécula de señalización que inhibe la proteína quinasa SnRK1 relacionada con SNF-1, un regulador central en la respuesta de las plantas a disponibilidad de carbono y estado energético. Las plantas regulan su crecimiento y desarrollo de acuerdo con la disponibilidad de sucrosa, mediante la señalización por T6P/SnRK1, y su consecuente reprogramación a larga escala de expresión genética (Paul et al., 2022).

Mutaciones en los genes de la ruta de biosíntesis de trehalosa afecta la distribución y el catabolismo de fuentes de carbono, afectando varios procesos biológicos en plantas. La disrupción del gen TPS1 en *Arabidopsis thaliana* arresta el desarrollo embrionario en el estado de torpedo. La sobreexpresión de los genes biosintéticos de trehalosa de *E. coli* otsA y otsB en arroz resultan en un incremento en los niveles de azúcares solubles, una mayor tolerancia a estrés abiótico y un potencial aumento en el rendimiento.

La mayoría de los estudios se han enfocado en los genes de biosíntesis TPS y TPP, la degradación de la trehalosa en plantas ocurre por la actividad de enzima trehalasa (TRE), codificada en un único gen en algunas plantas como arroz. El gen de la trehalasa en arroz, OsTRE, se encarga en degradar la trehalosa en 2 moléculas de glucosa (Islam et al., 2019). La inhibición del gen OSTRE provoca la acumulación de trehalosa y un aumento de resistencia a sequía y salinidad (Tian et al., 2015).

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Cepa de *Agrobacterium* y Vectores

Para la edición genética del gen codificante para la enzima trehalasa (*OsTRE*) en el genoma de arroz, se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV conteniendo el vector binario nombrado C720 (Figura 1). El vector binario C720 contiene el gen codificante para la enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, la secuencia del ARN guía (5'-GCAACTTCCTTATCAAACAC-3'), y el gen de selección por resistencia a higromicina B (*hptII*). El ARN guía es complementaria a una secuencia del exón 9 del gen *OsTRE* (accesión del NCBI LOC4349141). El vector CRISPR/Cas9 y el ARN guía fueron previamente diseñadas en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Universidad de Costa Rica (Rojas-Vásquez, 2022).

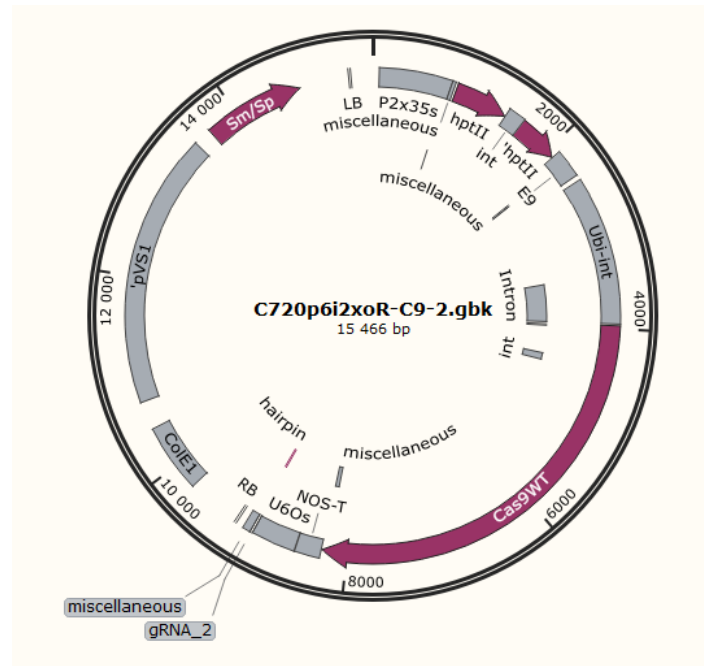


Figura 1. Mapa del plásmido C720. Fuente: (SnapGene® Software (from Dotmatics; Available at Snapgene.Com), n.d.).

Transformación de embriones maduros de arroz

Se realizó la transformación genética de embriones de arroz siguiendo la metodología *in planta* optimizada. Las plantas transformadas se mantuvieron en un medio de cultivo basal (4,4g/l Medio basal Murashige y Skoog, 10 g/l sacarosa, 5 g/l gelificante Gelzan, pH 5.6) a 25°C con un fotoperiodo de 12h luz/12h oscuridad. La selección de plantas transformadas se realiza comúnmente con un agente de selección como higromicina, sin embargo, debido a la posible presencia de plantas quiméricas la evaluación de la transformación estable se realizó por métodos moleculares para cada uno de los individuos sobrevivientes al proceso de transformación en la T_0 .

Análisis molecular y selección de posibles editados

La integración estable del sistema CRISPR/Cas9 en las plantas sobrevivientes se confirmó mediante métodos moleculares. Se realizó la extracción de ADN de hojas de las plantas sobrevivientes y la evaluación de la presencia de los genes de trehalasa, Cas9, y virG mediante PCR. Las muestras seleccionadas como transformadas de manera estable se analizaron por medio de secuenciación para evaluar la posible edición genética.

Se realizó la extracción de ADN genómico total de hojas de las plantas después de al menos 30 días de la transformación. Se utilizó un protocolo CTAB estándar del laboratorio de Biotecnología de Plantas (UCR). La calidad del ADN se determinó mediante mediciones de absorbancia en un equipo NanoDrop, así como visualización en electroforesis en gel de agarosa 1%.

Se utilizaron primers diseñados para la amplificación específica de los genes OsTRE, cas9 y virG (Cuadro 1). El perfil térmico utilizado para la amplificación fue de un ciclo de 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa 1%.

Cuadro 1. Primers específicos para el análisis molecular de plantas transformadas.

Gen Blanco	Primer	Secuencia	Tm	Tamaño de amplicón
OsTRE	Exon9F	TCTTTCACCCTTTTCTTGTCAT	60	829 pb
	Exon11R	ATCTGCGAAGATGGGGTTTA		
cas9	Cas9F1	TTGATTGGCGCCCTTCTCTT	60	693 pb
	Cas9R1	CCAAGGAGAGAGCGATCAGG		
virG	virgF1	GCCGACAGCACCCAGTTCAC	60	383 pb
	virgR1	CCTGCCGTAAGTTTCACCTCACC		

Se seleccionaron como muestras transformadas de manera estable, aquellas que resultaron positivas para la amplificación de los genes OsTRE y cas9 y negativas para la amplificación del gen virG.

Secuenciación y confirmación de mutantes

Para analizar la posible edición genética de estas muestras, los productos de PCR del gen OsTRE fueron secuenciados por el método Sanger, servicio contratado a la empresa Macrogen. La calidad de las secuencias obtenidas, así como la posible edición genética en el sitio blanco fue analizada por medio de herramientas bioinformáticas Genenious(Geneious, 2023). La eficiencia de la edición genética se determinó como el porcentaje de plantas editadas genéticamente del total de muestras secuenciadas.

Resultados

Transformación y selección de posibles editados

Se siguió la metodología de transformación genética optimizada, utilizando la cepa de *Agrobacterium* ATHV:C720. Las plantas transformadas se mantuvieron en recuperación en un medio semisólido. La selección de las plantas transformadas se realizó mediante métodos moleculares, debido a la alta probabilidad de tener plantas quiméricas.

Se transformaron un total de 400 semillas de arroz, de las cuales 96 sobrevivieron al proceso de transformación (23% de supervivencia). Se realizó la extracción de ADN genómico total de cada plántula y se determinó su calidad mediante mediciones de absorbancia en un equipo NanoDrop (Thermo Scientific) (Cuadro 2), así como visualización en electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 2).

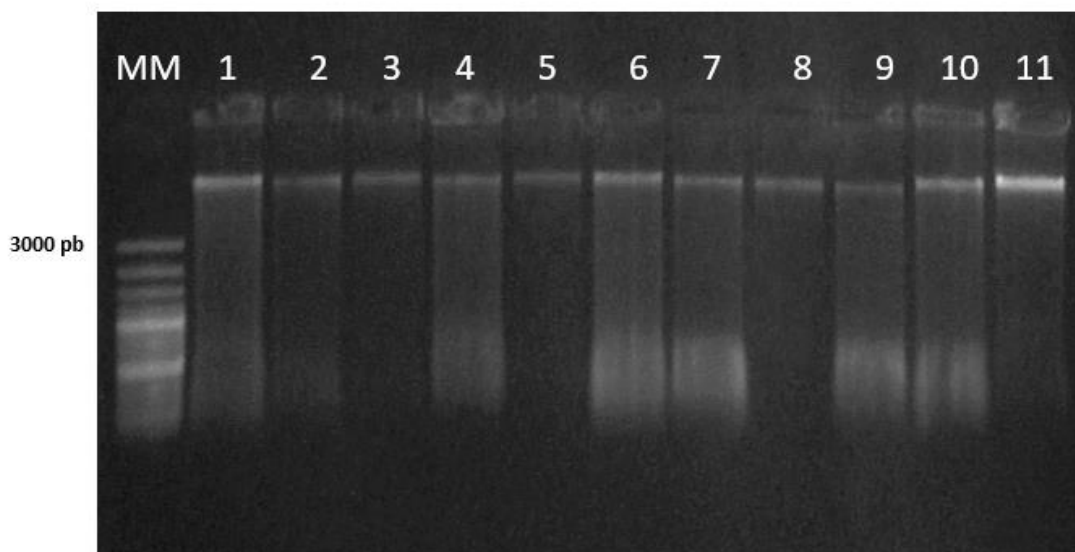


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ADN de plantas transformadas. MM= GeneRuler 100bp plus (Thermo Scientific), 1-11 = ADN extraído de plantas transformadas. Agarosa 1%, 100V x 30 min.

Cuadro 2. Cuantificación y análisis de calidad de ADN de plantas transformadas.

Muestra	ADN (ng/ul)	A260/2680	A260/230
C720-69	85,391	2,835	0,072
C720-93	261,521	1,821	0,298
C720-96	231,504	2,059	0,252
C720-107	108,791	2,757	0,094
C720-108	144,082	2,593	0,163
C720-111	166,954	2,434	0,165
C720-113	203,538	2,244	0,207

El ADN extraído a partir de hojas de plantas transformadas es de una calidad adecuada. En el gel de agarosa se observan bandas intensas bien definidas y sin señales de degradación para todas las muestras Figura 2. Las mediciones de absorbancia indican una buena concentración de ADN (>85 ng/ul) para todas las muestras Cuadro 2. Los valores de la relación de absorbancia 260/280 son aceptables, pero más altos del criterio de pureza de 1.8 indicando posible presencia de ARN. Los valores de la relación de absorbancia 260/230 son más bajos del criterio de pureza de 1.5-2.0, indicando posible contaminación con sales caotrópicas, fenol o carbohidratos.

La amplificación del gen de la trehalasa (OsTRE) se consideró como un control de calidad del ADN, ya que este gen se encuentra presente en las plantas independientemente del proceso transformación.

Se logró amplificar la región de 820 pb del gen OsTRE para todas las muestras (Figura 3). Para lograr amplificar el gen OsTRE en algunas muestras fue necesario realizar diluciones de ADN. Las mismas diluciones fueron utilizadas para la amplificación de los genes cas9 y virG.

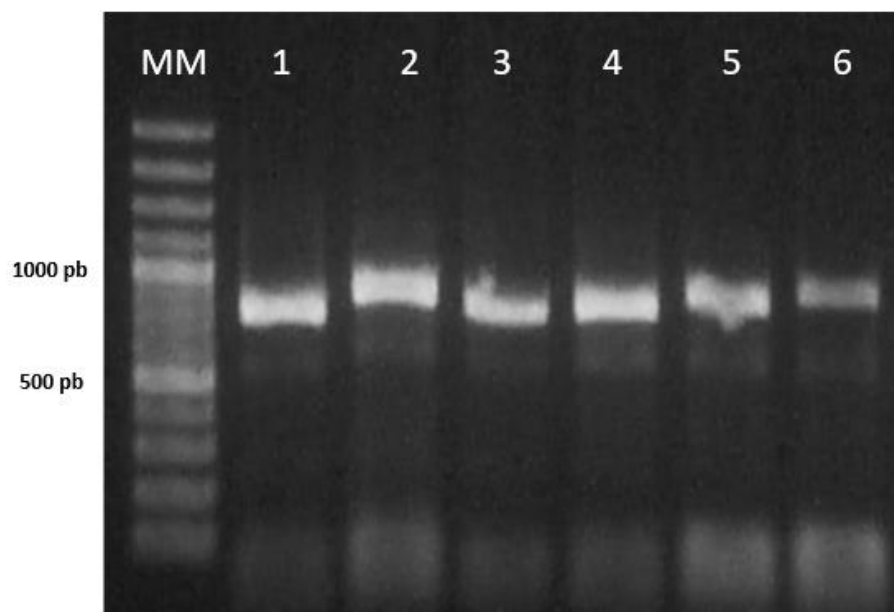


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del gen OsTRE. MM= GeneRuler 100bp plus (Thermo Scientific), 1-6 = Plantas transformadas. Amplificación de un fragmento de 820pb del gen OsTRE a partir de ADN de muestras de plantas transformadas. Agarosa 1%, 100V x 30 min.

La extracción de ADN se realizó 30 días después de la transformación, la expresión transitoria debería ser mínima o nula, por lo que la presencia del gen cas9 indica la correcta integración del ADN-T al genoma de las plantas. Todas las muestras resultaron positivas para la presencia del gen cas9, se observó el fragmento esperado de 693 pb (Figura 4).

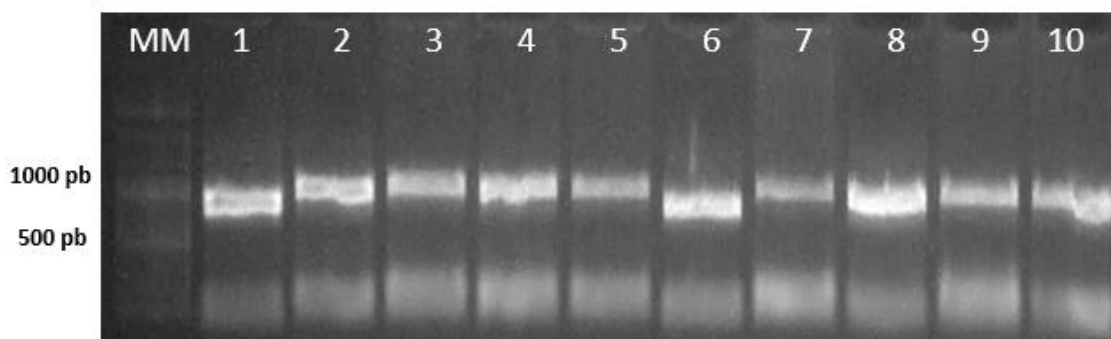


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del gen cas9. MM= GeneRuler 100bp plus (Thermo Scientific), 1-10 = Plantas transformadas. Amplificación de un fragmento de 693pb del gen cas9 a partir de ADN de muestras de plantas transformadas. Agarosa 1%, 100V x 30 min.

La amplificación del gen *virG* indica la presencia de ADN de *Agrobacterium tumefaciens*. Es necesario un resultado negativo en el PCR del gen *virG* para corroborar que la amplificación del gen *cas9* corresponde a una región de ADN integrada en el genoma de la planta y no proveniente del ADN de la bacteria. La región de 383 pb del gen *virG* amplificó en la mayoría de las muestras (Figura 5), indicando contaminación por *Agrobacterium*. Solamente en 8 muestras se descartó la contaminación y se corroboró la integración estable del gen *cas9*. La muestra 11 en el gel de electroforesis de la figura 5, es 1 de las 8 muestras negativas.

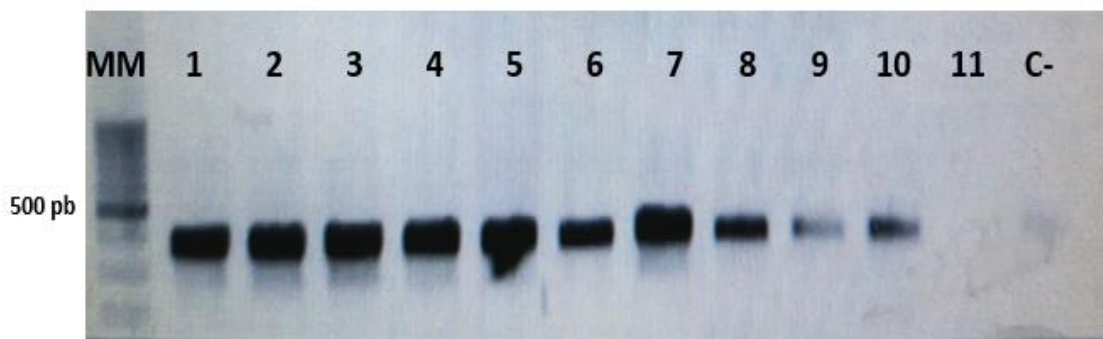


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del gen *virG*. MM= GeneRuler 100bp plus (Thermo Scientific), 1-10 = Plantas transformadas contaminadas, 11 = Planta transformada sana, C- =Control negativo. Amplificación de un fragmento de 383pb del gen *virG* a partir de ADN de muestras de plantas transformadas. Agarosa 1%, 100V x 30 min.

Debido a la contaminación observada por *Agrobacterium tumefaciens* en las plantas transformadas, se puede corroborar una transformación estable e integración del sistema CRISPR/Cas9 en el 8,3% de las plantas transformadas Cuadro 3. Sin embargo, es importante aclarar que, debido al descarte de muestras, existe la probabilidad que este dato este subestimando la eficiencia real del método de transformación.

Cuadro 3. Eficiencia de integración estable del sistema CRISPR/Cas9 mediante transformación *in planta* de embriones maduros de arroz.

Plantas transformadas	Plantas sobrevivientes	Amplificación del gen OsTRE	Plantas positivas para Cas9	Plantas negativas para <i>virG</i>	Plantas transformadas estables
400	96 (23%)	96	96	8	8 (8,3%)

Confirmación de eventos de edición en el gen OsTRE mediante CRISPR/Cas9

Se analizaron las secuencias del gen OsTRE de 8 muestras confirmadas como transformadas de manera estable y 11 muestras más seleccionadas de manera aleatoria a pesar de la contaminación con *Agrobacterium*. En total se analizaron 19 muestras, de las cuales se descartaron 2 por baja calidad de secuenciación. Se confirmó la edición genética del gen OsTRE mediante el sistema CRISPR/Cas9 entregado por *Agrobacterium tumefaciens* de manera *in planta* con una eficiencia del 23,5%. Todas las plantas evaluadas son mutantes heterocigotos para el gen OsTRE. (Cuadro 4)

Cuadro 4. Análisis de la edición en el gen OsTRE mediante CRISPR/Cas9 en plantas transformadas *in planta*.

Plantas analizadas	Plantas editadas / Eficiencia de edición (%)	Mutantes homocigotos	Mutantes heterocigotos
17	4 (23,5%)	0	4

La planta C720-2 contiene la mutación c.1394+5G>T, consiste en una transversión de una base G por una base T entre los exones 9 y 10 del gen OsTRE (Figura 6). Esta mutación, al estar dentro de un intrón, no afecta la traducción de la secuencia de aminoácidos de la enzima trehalasa ni tiene un posible efecto en su actividad.

C720-2

5'-TTATCAA|CACAGGGCAACAATGGTCAGTTCAGTGGGAAGAGC-3' OsTRE1
 5'-TTATCAA|CACAGGGCAACAATGGTCATTTCACTGGGAAGAGC-3' OsTRE1 1394+5G>T

TTATCAA|CACAGGGCAACAATGGTCAGTTCAGTGGGAAGAGC

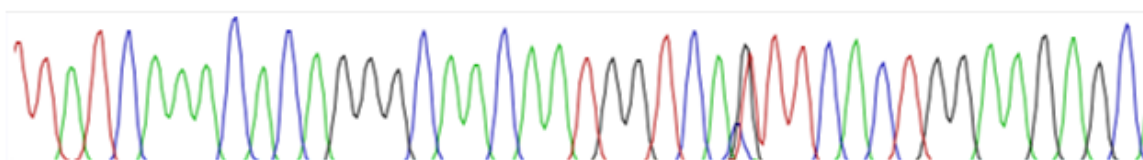


Figura 6. Mutaciones en el gen OsTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9. Secuenciación de la región blanco en el exón 9 del gen OsTRE de la planta C720-2. La secuencia PAM se resalta en color verde, la secuencia complementaria al ARN guía se resalta en color rojo y el sitio de corte se resalta con una flecha roja. La mutación se representa con letra azul.

La planta C720-38 contiene la mutación c.1387A>C, y la mutación c.1387_1388insT, consisten en una transversión de una base A por una base C en la posición 1387 y una inserción de una base, T, entre las posiciones 1387-1388 de la secuencia codificante del gen OsTRE, respectivamente (Figura 7). La inserción de una sola base, T, provoca un cambio en el marco abierto de lectura y resulta en la traducción de una proteína truncada de 494 aa, en lugar de la proteína funcional de 563 aa (Cuadro 5). La proteína truncada pierde el sitio conservado de hidrólisis de glucósidos y por ende su actividad catalítica.

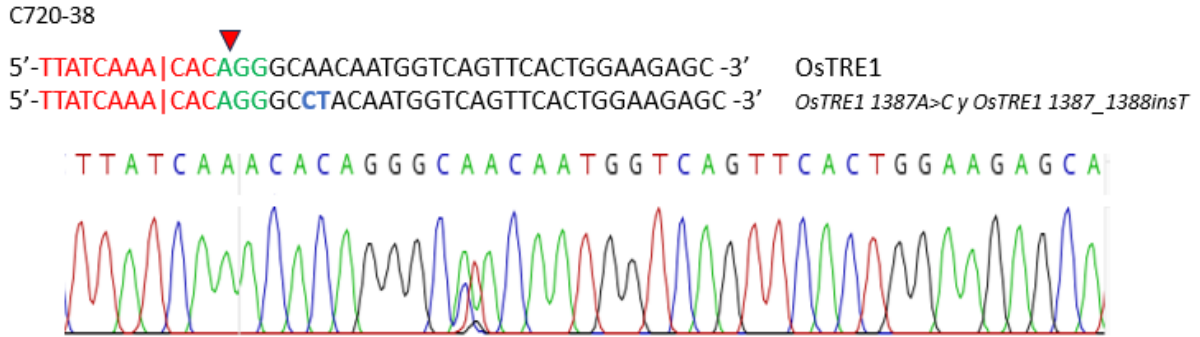


Figura 7. Mutaciones en el gen OsTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9. Secuenciación de la región blanco en el exón 9 del gen OsTRE de la planta C720-38. La secuencia PAM se resalta en color verde, la secuencia complementaria al ARN guía se resalta en color rojo y el sitio de corte se resalta con una flecha roja. La mutación se representa con letra azul.

La planta C720-64 contiene la mutación c.1393T>C, consiste en una transición de una base T por una base C en la posición 1393 de la secuencia codificante del gen OsTRE (Figura 8). Esta mutación provoca un cambio de la identidad del último codón del exón 9, resultando en una mutación de cambio de sentido p.465W>R, donde un aminoácido triptófano es reemplazado por un aminoácido arginina en la posición 465 de la enzima de la trehalasa (Cuadro 5).



Figura 8. Mutaciones en el gen OsTRE en arroz mediante CRISPR/Cas9. Secuenciación de la región blanco en el exón 9 del gen OsTRE de la planta C720-64. La secuencia PAM se resalta en color verde, la secuencia complementaria al ARN guía se resalta en color rojo y el sitio de corte se resalta con una flecha roja. La mutación se representa con letra azul.

La muestra C720-111 contiene la mutación c.1394+6insC, consiste en una inserción de una base, C, entre los exones 9 y 10 del gen OsTRE (Figura 9). Esta mutación, al estar dentro de un intrón, no afecta la traducción de la secuencia de aminoácidos de la enzima trehalasa ni tiene un posible efecto en su actividad.



Figura 9. Mutaciones en el gen *OsTRE* en arroz mediante CRISPR/Cas9. Secuenciación de la región blanco en el exón 9 del gen *OsTRE* de la planta C720-111. La secuencia PAM se resalta en color verde, la secuencia complementaria al ARN guía se resalta en color rojo y el sitio de corte se resalta con una flecha roja. La mutación se representa con letra azul.

Cuadro 4. Predicción de los marcos abiertos de lectura (*ORF*) de los genes editados y su comparación con el gen *OsTRE*.

Gen	Marco Abierto de Lectura (<i>ORF</i>)
<i>OsTRE</i>	MAPTAAVAGGGVEAEALLGLLQRVQSEALRAFPGPNDFDPKLYV DLPLAADASAAAALASLPRAAPSRGEMEAYISRYFALAGSDLVA AADPPDFERDPPGFLPRVERAEARAWALEVHALWKDLTRRVAP AVAARPDRHTLLPLPGRVVVPGSRFREVYYWDSYWVVRGLLVS KMYETAKDIVLNLVYLVEKYGFVLNGARSYYTNRSQPPLLSSMV LDIYMATGDMAFVRRVFPSLLKEHSFWMSEVHNVAVMDNHGR VHNLSTRYQAMWNKRPESATIDEEFASKLSTAAKEKPHYQVAST AETGWDFSSRWMRDSTDMTTLTTSCIIPVDLNTFILKMEQDIAFF AKLIGESTTSEIFSEASKARHNAIDSVLWNADMEQWLDYWLPTD GNCQGVYQWKSISQNRAIFASNFVPLWLNAQHSGLEQFVDEAKS VRVMRSLQKSGLLQPAGIATSLSN TGQWDFPNGWAPLQHLIVE GLLRSGSGEARELAEDIATRWRVTNYDAYKATGAMHEKYDVVT CGKSGGGGEYKPQTGFGWSNGVILSFLDEFGWPQDKKIDC
<i>OsTRE</i> 1387_1388insT, <i>ORF1</i>	MAPTAAVAGGGVEAEALLGLLQRVQSEALRAFPGPNDFDPKLYV DLPLAADASAAAALASLPRAAPSRGEMEAYISRYFALAGSDLVA AADPPDFERDPPGFLPRVERAEARAWALEVHALWKDLTRRVAP AVAARPDRHTLLPLPGRVVVPGSRFREVYYWDSYWVVRGLLVS KMYETAKDIVLNLVYLVEKYGFVLNGARSYYTNRSQPPLLSSMV LDIYMATGDMAFVRRVFPSLLKEHSFWMSEVHNVAVMDNHGR VHNLSTRYQAMWNKRPESATIDEEFASKLSTAAKEKPHYQVAST AETGWDFSSRWMRDSTDMTTLTTSCIIPVDLNTFILKMEQDIAFF AKLIGESTTSEIFSEASKARHNAIDSVLWNADMEQWLDYWLPTD GNCQGVYQWKSISQNRAIFASNFVPLWLNAQHSGLEQFVDEAKS VRVMRSLQKSGLLQPAGIATSLSN TGH TMGFSKRMGPVAASDSR GIVEVWFRRGKGT C
<i>OsTRE</i> 1387_1388insT, <i>ORF2</i>	GHCHEVGENKL

<i>OsTRE</i> <i>1387_1388insT, ORF3</i>	CL
<i>OsTRE</i> <i>1387_1388insT, ORF4</i>	GYRRDA
<i>OsTRE</i> <i>1387_1388insT, ORF5</i>	EVRCGDLWKIWRWG
<i>OsTRE</i> <i>1387_1388insT, ORF6</i>	IQTPDWFVLVQRCDIILG
<i>OsTRE</i> <i>1387_1388insT, ORF7</i>	IWMASGQEDRL
<i>OsTRE 1393T>C,</i> <i>ORF1</i>	MAPTAAVAGGGVEAEALLGLLQRVQSEALRAFPGPNDFDPKLYV DLPLAADASAAAALASLPRAAPSRGEMEAYISRYFALAGSDLVA AADPPDFERDPPGFLPRVERAEARAWALEVHALWKDLTRRVAP AVAARPDRHTLLPLPGRVVVPGSRFREVYYWDSYWVVRGLLVS KMYETAKDIVLNLVYLVEKYGFVLNGARSYYTNRSQPPLLSSMV LDIYMATGDMAFVRRVFPSSLKEHSFWMSEVHNVAVMDNHGR VHNLSRYQAMWNKRPESATIDEEFASKLSTAAKEKFYHQVAST AETGWDFSSRWMRDSTDMTTLTSCIPVDLNTFILKMEQDIAFF AKLIGESTTSEIFSEASKARHNAIDSVLWNADMEQWLDYWLPTD GNCQGVYQWKSISQNRIFAISNFVPLWLNAQHSGLEQFVDEAKS VRVMRSLQKSGLLQPAGIATSLSNTGQQRDFPNGWAPLQHLIVE GLLRSGSGEARELAEDIATRWRVTNYDAYKATGAMHEKYDVVT CGKSGGGGEYKPQTGFGWSNGVILSFLDEFGWPQDKKIDC

* Sitio conservado con actividad glicósido hidrolasa resaltado en azul 464-473 [HTMGFSKRMG](#).

Discusión

CRISPR/Cas es la tecnología más utilizada actualmente para estudio funcional de genes y el desarrollo de líneas mutantes de plantas con mejor tolerancia a estrés biótico y abiótico. La estrategia de entrega del sistema CRISPR/Cas al interior de las células vegetales de arroz mediante metodologías de transformación *in planta* ha sido poco explorada. A nuestro conocimiento solamente un estudio ha implementado esta estrategia para realizar la edición del gen de reparación de errores de emparejamiento de ADN MSH2 (Karthika et al., 2021), la naturaleza de la edición les permitió seleccionar mutantes de acuerdo con cambios en su fenotipo y luego corroborar la edición con resultados positivos.

La posible generación de quimeras es un punto por considerar al utilizar la estrategia de transformación *in planta*. Los mutantes obtenidos en esta investigación se clasificaron como heterocigotos en base a las señales mezcladas en los electroferogramas de la secuenciación (Lanka, 2014), sin embargo, este efecto puede ser también debido a la presencia de tejidos compuestos por células editadas y células no editadas. Es necesario analizar la progenie de las líneas mutantes para elucidar la naturaleza de las mutaciones y seleccionar los mutantes homocigotos de interés. Para efectos de esta investigación, se decidió evaluar las plantas transformadas T_0 a manera de una prueba de concepto y descubrir el potencial de la edición mediante CRISPR de manera *in planta*, sobrepasando las limitantes del cultivo *in vitro* de tejidos.

El uso de CRISPR/Cas9 de manera *in planta*, resultó en la confirmación de eventos de edición en el 23,5% de las plantas evaluadas. El único estudio que ha implementado CRISPR/Cas9 de manera *in planta* en arroz (Karthika et al., 2021), realizó análisis moleculares hasta en la T_2 . Por lo que no se

puede realizar una comparación en términos de eficiencia de edición. Sin embargo, considerando que se descartaron una gran cantidad de muestras debido a la presencia del gen *virG*, la eficiencia de edición genética reportada en este estudio es bastante alta y representa una alternativa prometedora para facilitar la edición de genomas y mejoramiento genético de arroz.

La proteína trehalasa, codificada en el gen *OSTRE*, es una enzima con actividad catalítica responsable de degradar al disacárido α,α -trehalosa en dos subunidades de glucosa (Islam et al., 2019). La trehalosa es un disacárido con capacidad de osmoprotección que se ha determinado tiene un papel importante en el mecanismo de respuesta ante sequía y salinidad en plantas de arroz (Redillas et al., 2012). El estudio funcional del gen *OsTRE* en arroz reveló que su expresión es inducida por estrés de salinidad, sequía, y bajas temperaturas. La sobreexpresión del gen *OsTRE* resultada en un incremento dramático en la actividad de trehalasa y una disminución significativa en la cantidad de trehalosa acumulada, sin afectar los niveles de otros azúcares solubles (Islam et al., 2019). Por otro lado, la inhibición de la actividad de la trehalasa mediante el ARN de interferencia, *miR162b*, resulta en mayor resistencia a estrés abiótico por sequía y salinidad en arroz (Tian et al., 2015).

Recientemente, miembros de este mismo grupo de investigación, lograron la disrupción de los genes *NTH1* y *NTH2* en *Saccharomyces cerevisiae* mediante CRISPR/Cas9 (Hernández-Soto et al., 2022). Los genes *NTH1* y *NTH2*, en comparación con el gen *OSTRE* en arroz, codifican para enzimas trehalasas. Las cepas mutantes *nth2* 1271_1272delTA son más resistentes a condiciones de salinidad en comparación con las cepas silvestres, pueden sobrevivir a concentraciones de 0.85M NaCl en el medio de cultivo.

El objetivo de la edición del gen *OsTRE* en arroz es generar una pérdida de función de la enzima trehalasa y una acumulación de trehalosa que resulte en plantas de arroz con mayor resistencia a estrés por sequía y salinidad. La línea C720-34 posee la mutación c.1387_1388insT, una inserción de una sola base que genera un cambio en el marco abierto de lectura. El nuevo ORF putativo para la secuencia mutada resultó en la traducción de una proteína truncada de menor tamaño y que pierde por completo su sitio activo y actividad bioquímica. El sitio conservado identificado como la familia 37 de las glicosido hidrolasas, posee solamente la actividad de trehalasa.

La edición del gen de la trehalasa en *Arabidopsis thaliana* (*AtTRE*) mediante CRISPR/Cas9, dirigida a un sitio conservado en el dominio de unión al sustrato, resulta en líneas mutantes con características fenotípicas similares a plantas silvestres en condiciones de riego normales. Sin embargo, al suspender el riego, las plantas silvestres adelantaron su floración, y mostraron pérdida de vigor y marchitez, mientras que las líneas editadas no se vieron afectadas por las condiciones de sequía (Nuñez-Muñoz et al., 2021).

Conclusiones

La metodología de transformación *in planta* de embriones maduros de arroz optimizada es una alternativa prometedora para facilitar la edición de genomas de arroz mediante CRISPR/Cas9.

Según las predicciones realizadas, los cambios inducidos por el sistema de edición CRISPR/Cas9 en arroz sobre el gen de la trehalasa *OsTRE*, resultan en la pérdida de función de la actividad de hidrólisis del disacárido trehalosa. Según los resultados de estudios previos, la edición lograda tiene el potencial de incrementar la resistencia a sequía y salinidad de dichas líneas de arroz.

Es necesario analizar la progenie de las plantas editadas para identificar con exactitud la naturaleza de las mutaciones y seleccionar las líneas homocigotas o bialélicas.

Bibliografía

Geneious. (2023). *Geneious*. <https://www.geneious.com>.

Hernández-Soto, A., Delgado-Navarro, J. P., Benavides-Acevedo, M., Paniagua, S. A., & Gatica-Arias, A. (2022). NTH2 1271_1272delTA Gene Disruption Results in Salt Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation*, *8*(4).
<https://doi.org/10.3390/fermentation8040166>

Islam, M. O., Kato, H., Shima, S., Tezuka, D., Matsui, H., & Imai, R. (2019). Functional identification of a rice trehalase gene involved in salt stress tolerance. *Gene*, *685*, 42–49.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.071>

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 One-Sentence Summary. *Science*, *337*(6096), 816–821.

Karthika, V., Chandrashekar, B. K., Kiranmai, K., Shankar, A. G., Makarla, U., & Ramu, V. S. (2021). Disruption in the DNA Mismatch Repair Gene MSH2 by CRISPR- Cas9 in Indica Rice Can Create Genetic Variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(14), 4144–4152.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00328>

Lanka, R. (2014). DNA Sequencing Analysis Software for Sanger Data-Sets: Comparisons of Basic features Useful for Mutational Studies. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, *8*, 11–17. <https://www.researchgate.net/publication/272352955>

Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N., Gai, J., & Li, Y. (2017). Optimization of *Agrobacterium* -mediated transformation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, *8*.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00246>

Lunn, J. E., Delorge, I., Figueroa, C. M., Van Dijck, P., & Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *Plant Journal*, *79*(4), 544–567. <https://doi.org/10.1111/tpj.12509>

Nuñez-Muñoz, L., Vargas-Hernández, B., Hinojosa-Moya, J., Ruiz-Medrano, R., & Xoconostle-Cázares, B. (2021). Plant drought tolerance provided through genome editing of the trehalase gene. *Plant Signaling and Behavior*, *16*(4). <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1877005>

Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Samuel, C., Fatai, A., Magaji, U., Kareem, I., Kamarudin, Z. S., Muhammad, I., & Kolapo, K. (2019). Drought Resistance in Rice from Conventional to Molecular Breeding:

- A Review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 14). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms20143519>
- Paul, M. J., Miret, J. A., & Griffiths, C. A. (2022). Improving rice photosynthesis and yield through trehalose 6-phosphate signaling. In *Molecular Plant* (Vol. 15, Issue 4, pp. 586–588). Cell Press.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.03.004>
- Redillas, M. C. F. R., Park, S. H., Lee, J. W., Kim, Y. S., Jeong, J. S., Jung, H., Bang, S. W., Hahn, T. R., & Kim, J. K. (2012). Accumulation of trehalose increases soluble sugar contents in rice plants conferring tolerance to drought and salt stress. *Plant Biotechnology Reports*, 6(1), 89–96.
<https://doi.org/10.1007/s11816-011-0210-3>
- Rojas-Vásquez, R. (2022). *Edición del gen de la enzima trehalasa mediante CRISPR/Cas9 en arroz subsp. Indica var. Cr-5272* [Tesis de Maestría]. Universidad de Costa Rica.
- Romero, F. M., & Gatica-Arias, A. (2019). CRISPR/Cas9: Development and Application in Rice Breeding. In *Rice Science* (Vol. 26, Issue 5, pp. 265–281). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.08.001>
- Sahebi, M., Hanafi, M. M., Rafii, M. Y., Mahmud, T. M. M., Azizi, P., Osman, M., Abiri, R., Taheri, S., Kalhori, N., Shabanimofrad, M., Miah, G., & Atabaki, N. (2018). Improvement of Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.): Genetics, Genomic Tools, and the WRKY Gene Family. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2018/3158474>
- SnapGene*® software (from Dotmatics; available at snapgene.com). (n.d.).
- Tian, C., Zuo, Z., & Qiu, J. L. (2015). Identification and Characterization of ABA-Responsive MicroRNAs in Rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(7), 393–402.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.04.008>
- Zhang, Z., Hua, L., Gupta, A., Tricoli, D., Edwards, K. J., Yang, B., & Li, W. (2019). Development of an Agrobacterium -delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, 17(8), 1623–1635. <https://doi.org/10.1111/pbi.13088>