



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**EDICIÓN GENÉTICA DE LA  
VARIEDAD DE CAÑA UFCP 82-1655  
PARA INACTIVAR EL GEN BU1 Y  
MODIFICAR LA FUNCIÓN DEL GEN  
ALS MEDIANTE CRISPR/CAS9**

**Claudia Marcela Franco Arango**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Palmira, Colombia

2019



# **EDICIÓN GENÉTICA DE LA VARIEDAD DE CAÑA UFCP 82-1655 PARA INACTIVAR EL GEN BU1 Y MODIFICAR LA FUNCIÓN DEL GEN ALS MEDIANTE CRISPR/CAS9**

**Claudia Marcela Franco Arango**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias biológicas**

Director:

Doctor, Jershon López Gerena

Codirectora:

Doctora, Karina López López

Línea de Investigación:

Biotecnología Vegetal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Palmira, Colombia

2019



## *Dedicatoria*

*A Dios, los ángeles, arcángeles y seres de luz que guían mi camino siempre. A mis padres por su apoyo incondicional. A mi hermana por siempre creer en mí. A mi compañero de vida por tantas enseñanzas, amor y consejos. A mis amigos por tantas risas, complicidades y compañía.*

*“Los desafíos son los que hacen la vida interesante, y superarlos es lo que hace la vida significativa”*

## Agradecimientos

Muchas gracias a mi mamá, mi papá y mi hermana, por ser mi apoyo, mi sostén, mi mayor fortaleza. Ellos saben cuánto los amo y cuán agradecida y feliz me siento de tenerlos en mi vida. Gracias a ellos soy la mujer valiente y amorosa que todos conocen.

A mi compañero de vida Hernán David Flórez por su amor, apoyo, dedicación, confianza, por enseñarme tantas maravillas, por sus consejos y guía, por iluminar mi vida y por aventurarse a construir y compartir conmigo nuestro camino. Así mismo, agradezco por la revisión del presente documento.

Muchas gracias a mis compañeros y amigos de Cenicaña quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional y siempre tienen la mejor disposición para colaborarme en lo que necesite. Además de brindarme su amistad verdadera, más que mis amigos, son mis hermanos, mis cómplices, mis consejeros, los que siempre me sacan una sonrisa y me tienden su mano amiga. Gracias por tantas risas, historias, aventuras, locuras, celebraciones, alegría, consejos; en resumen, gracias por su amor. De ellos he aprendido el valor de la amistad. Ellos son: Hugo Jaimes, Rocío Barrios, Isabel Ocampo, Jhon Trujillo, Alejandra Espinoza, Alejandra Londoño, Giann Karlo Aguirre, Carolina Saavedra, Kimberly Gutiérrez, Viviana Aya, Melissa Montoya, Manuel Quintero y Miguel David Zea. Adicionalmente hay también muchos agradecimientos para aquellos amigos que ya no están en Cenicaña pero conocerlos ha sido muy valioso para mí y aún siguen siendo mis amigos: Carolina Acosta, José David Cortés, Christian Loaiza, Héctor Espitia, Yisel Carrillo, Eliana Torres y Camila Martínez. Millones de gracias a cada uno de ellos.

A Jershon López mi director de tesis, mi jefe, consejero, pero sobre todo mi amigo. Gracias porque desde el primer momento que llegué a Cenicaña me acogió como su asistente de investigación y aprendiz y a lo largo de este tiempo me ha enseñado innumerables lecciones de vida y me ha depositado su confianza para llevar a cabo diferentes proyectos de investigación que me han hecho crecer profesionalmente y también personalmente. Mil gracias.

Muchas gracias a mis compañeros de la Universidad de Florida quienes me enseñaron los procedimientos necesarios para llevar a cabo mi tesis de maestría, pero además me brindaron su amistad y un valioso aprendizaje para mi vida, me mostraron sus culturas, sus costumbres, sus familias, diferentes puntos de vista y diversas maneras de ver la vida y la ciencia. Gracias a Baskaran

Kannan, Tufan Oz, Lucia Matiello, Dev Paudel, Matthew Schneider, Thaibinhduong Nguyen, David May, Guangbin Luo, Sofia Cano, Pritika Pandey, Rana Fiaz-ul-Haq, Duoduo Wang, Bryant Brown, Musa Kavas, Katrina Kelly, Tu Huynh y Angelika Altpeter.

A Fredy Altpeter, por su asesoramiento, por todas sus ideas, guía, consejos, enseñanzas, asesoría y sobre todo gracias por abrirme las puertas de su laboratorio para mi aprendizaje y el desarrollo de este trabajo.

Gracias a John Jaime Riascos, por asesorarme, aconsejarme y enseñarme lecciones valiosas para mi vida y también para mi camino profesional.

A la profesora Karina López, co-directora de mi tesis, gracias por sus palabras cálidas, por su guía, por tantas enseñanzas, por su paciencia, por su amabilidad y por aceptar el reto de dirigir este trabajo y darme la oportunidad aún sin conocerme.

A la Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira, por la educación brindada, a cada uno de los profesores que me formaron en diferentes áreas que han sido muy útiles para mi desarrollo profesional y por acogermelo como su estudiante por todos estos años.

A mis compañeros de la Universidad Nacional por hacer mis días en la U muy agradables y simpáticos, de mucho compartir y de muchas alegrías. Gracias Paola Martínez, Adriana Giraldo, Luisa Rayo, Carlos Arboleda, Yeison López, Andrés Oviyus, Elmer, Octavio Trujillo y demás compañeros de clase que compartieron conmigo durante mi estancia en la U.

A Cenicaña por la financiación de este proyecto y por ser mi casa durante 10 años y contando. Gracias por todo el apoyo y por creer en mí.





## Resumen

La edición del genoma es una técnica utilizada para modificar con precisión y eficiencia el ADN dentro de una célula. Desde 2012, el sistema CRISPR/Cas se ha utilizado para la edición de genes (agregando, interrumpiendo o cambiando las secuencias de genes específicos) y para la regulación génica en varias especies. Para esta investigación se utilizó esta metodología para provocar la eliminación funcional del gen BU1 responsable del ángulo de la hoja en caña de azúcar y para introducir una modificación del gen ALS para conferir resistencia a herbicidas. Para probar el sistema de edición de genes en caña de azúcar se diseñaron dos vectores, uno para el gen BU1 y otro para el gen ALS + gen BU1, los cuales fueron disparados por medio de una pistola genética en callos embriogénicos de la variedad de caña UFCP 82-1655. Después del bombardeo, el tejido se puso en selección con geneticina (20mg/L), a las plantas que sobrevivieron se les hicieron pruebas moleculares con PCR, ensayo TaqMan y enzimas de restricción. Después de la selección con geneticina sobrevivieron 89 plantas para el plásmido con BU1 y 98 plantas para el plásmido ALS + BU1, después de la evaluación molecular de estas plantas, se encontró la modificación o inserción del gen ALS en dos plantas (eventos ALS107 y ALS111), las cuales presentaron el nucleótido T en la posición 653, mientras que ninguna de las plantas resultó ser editada para el gen BU1.

**Palabras clave:** CRISPR/Cas9, edición genética, mutación, ángulo de la hoja, resistencia a herbicidas, BU1, ALS.

## Abstract

Genome editing is a technique used to accurately and efficiently modify the DNA within a cell. Since 2012, the CRISPR/Cas system has been used for gene editing (adding, interrupting or changing specific gene sequences) and for gene regulation in several species. For this investigation, this methodology was used to cause the functional elimination of the BU1 gene responsible for the leaf angle in sugarcane and to introduce a modification of the ALS gene to confer resistance to herbicides. To test the sugarcane gene editing system, two vectors were designed one for the BU1 gene and one for the ALS + BU1 genes, which were bombardment with a genetic gun in embryogenic calli of the UFCP 82-1655 sugarcane variety. After the bombardment, the tissue was selected with geneticin (20mg/L), the plants that survived were subjected to molecular tests using PCR, TaqMan assay and restriction enzymes. After selection with geneticin, 89 plants containing the plasmid with BU1 and 98 plants for the plasmid ALS + BU1 survived, after the molecular evaluation of these plants, the modification or insertion of the ALS gene in two plants (events ALS107 and ALS111) was found, these plants presented nucleotide T at position 653, while none of the plants turned out to be edited for the BU1 gene.

**Keywords:** CRISPR / Cas9, genetic edition, mutation, leaf angle, herbicide resistance, BU1, ALS.

# Contenido

Contenido	Pág.
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>21</b>
1.1 Ángulo de la hoja.....	21
1.2 Ángulo de la hoja en caña .....	22
1.3 Gen BU1 .....	23
1.4 Gen ALS .....	25
1.5 Edición de genoma mediante CRISPR/Cas9.....	26
1.5.1 ¿Cómo funciona CRISPR-Cas?.....	27
1.5.2 Diversidad de CRISPR-Cas .....	29
1.5.3 CRISPR-Cas en plantas.....	31
1.6 Regulación de cultivos editados genéticamente.....	32
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
2.1 Condiciones experimentales .....	36
2.2 Material vegetal.....	36
2.3 Producción de callo embriogénico .....	37
2.4 Búsqueda gen BU1 en caña de azúcar.....	37
2.5 Diseño de ARN guías (ARNg) .....	38
2.5.1 Ensayo in-vitro con Cas9 para probar los ARNg .....	38
2.6 Diseño de vectores para el sistema CRISPR/Cas9 .....	39
2.7 Bombardeo del callo embriogénico con micropartículas de oro utilizando pistola genética	40
2.7.1 Preparación del callo embriogénico .....	40
2.7.2 Preparación del ADN para el bombardeo con micropartículas.....	41
2.7.3 Condiciones del disparo .....	42
2.8 Selección con genética, regeneración, elongación, enraizamiento y paso a suelo de las plantas editadas.....	42
2.9 Pruebas moleculares.....	43
2.9.1 Extracción de ADN .....	43
2.9.2 Amplificación del gen NPTII.....	44
2.9.3 Amplificación del gen Cas9.....	44
2.9.4 Ensayo TaqMan para detectar mutaciones del gen ALS .....	45
2.9.5 Ensayo con las enzimas de restricción <i>BsaI</i> y <i>SmlI</i> para detectar la mutación del gen BU1	46
2.9.6 Ensayo para detectar la mutación del gen ALS con las enzimas de restricción <i>MmeI</i> y <i>BfaI</i>	46
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
3.1 Diseño y evaluación de ARNs guía sobre gen BU1 de caña de azúcar .....	48

3.1.1	Búsqueda gen BU1 en caña de azúcar.....	48
3.1.2	Diseño de ARN guías (ARNg).....	50
3.1.3	Ensayo <i>in-vitro</i> con Cas9 para probar los ARNg.....	53
3.2	Diseño de vectores para el sistema CRISPR/Cas9.....	56
3.3	Material vegetal y producción de callo embriogénico.....	66
3.4	Bombardero y selección con genética.....	66
3.5	Verificación de las plantas de caña transformadas que portan el sistema CRISPR para mutar el gen BU1 y el gen ALS.....	68
3.5.1	Amplificación del gen NPTII en las plantas del tratamiento 1.....	68
3.5.2	Amplificación del gen Cas9 en las plantas BU.....	69
3.5.3	Digestión con las enzimas de restricción <i>BsaI</i> y <i>SmlI</i> para detectar la mutación del gen BU1.....	69
3.6	Verificación de mutación del gen ALS en las plantas de caña transformadas que portan el sistema CRISPR.....	70
3.6.1	Amplificación del gen NPTII en las plantas ALS.....	70
3.6.2	Amplificación del gen Cas9 en las plantas ALS.....	71
3.6.3	Ensayo TaqMan para detectar mutaciones del gen ALS.....	72
3.6.4	Digestión con las enzimas de restricción <i>MmeI</i> y <i>Bfal</i> para detectar la mutación del gen ALS.....	73
3.6.5	Digestión con las enzimas de restricción <i>BsaI</i> y <i>SmlI</i> para detectar la mutación del gen BU1 en las plantas ALS.....	75
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
4.1	Aspectos metodológicos.....	77
4.2	Genes que regulan la expresión del ángulo de las hojas en plantas.....	79
4.3	Ganancia de función: Resistencia a herbicidas con la modificación del gen ALS.....	83
4.4	Consideraciones finales.....	85
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>86</b>
5.1	Conclusiones.....	86
5.2	Recomendaciones.....	87
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>89</b>

## Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Morfología de la hoja de caña de azúcar. Fuente: (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia-Cenicaña 1995) .....	23
Figura 2. Mutaciones en el gen ALS de <i>Arabidopsis</i> y de otros cultivos que confieren tolerancia a herbicidas inhibidores de ALS. Las sustituciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con un sistema de numeración de <i>Arabidopsis</i> . Fuente: (Endo and Toki 2013).....	25
Figura 3. Funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9. Fuente: (Rath et al. 2015) .....	28
Figura 4. EnergyCane sembrada en la estación de Belle Glade Florida .....	36
Figura 5. Inducción de callo embriogénico con 9 explantes por caja Petri .....	37
Figura 6. Disposición del callo embriogénico en la caja Petri para su uso en biobalística .....	41
Figura 7. Visualización del gen BU1 en el genoma de Sorgo. En color morado se visualizan las regiones 5' y 3' UTR, en color rosado se ven los dos exones y en color verde el intrón .....	48
Figura 8. Amplificación del gen BU1 en cuatro variedades de caña de azúcar (CC 85-92, CP 88-1762, CP 96-1252, UFCIP 82-1655).....	49
Figura 9. Secuencia del gen BU1 en caña de azúcar. En color azul se resaltan los dos exones del gen.....	49
Figura 10. Primer exón del gen BU1 resaltado con letras de color azul y los SNP encontrados se muestran con letras de color rojo.....	50
Figura 11. Segundo exón del gen BU1 resaltado con letras de color azul y los SNP encontrados se muestran con letras de color rojo.....	51
Figura 12. Amplificación de los 9 ARNg escogidos para la prueba in-vitro .....	53
Figura 13. Gel de agarosa al 1% mostrando el ensayo de Cas9 para 5 ARNg ubicados en el exón 1. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (1kb Plus de Invitrogen®), en el carril 2 está el gen BU1 (amplicón de 784 pb: Gen BU1 + 5' UTR), en los carriles 3-7 están los ARNg que se probaron. ....	55
Figura 14. Ensayo <i>in-vitro</i> de Cas9 para 4 ARNg ubicados en el exón 2. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (1kb Plus de Invitrogen®), en el carril 2 está el gen BU1 (amplicón con un tamaño de 784 pb: Gen BU1 + 5' UTR), en los carriles 3-6 están los ARNg que se probaron. ....	56
Figura 15. Mapa del plásmido 1 mostrando los sitios de corte de la enzima <i>BbsI</i> , en ese lugar se ligó el ARNg 13. Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia.....	57
Figura 16. Mapa del plásmido 2 mostrando los sitios de corte de la enzima <i>BbsI</i> , en ese lugar se ligó el ARNg 13, este plásmido contiene el ARNg para el gen ALS. Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia .....	58
Figura 17. Confirmación de la secuencia del ARNg 13 en el plásmido 1 .....	58
Figura 18. Confirmación de la secuencia del ARNg 13 en el plásmido 2. En verde se resalta el ARNg para el gen ALS.....	59

Figura 19. Mapa del plásmido 1 mostrando el sitio de corte de la enzima <i>BsaI</i> , en ese lugar se ligó el ARNg 3. <i>Diagrama realizado con Benchling®. Fuente:Elaboración propia</i> .....	59
Figura 20. Mapa del plásmido 2 mostrando los sitios de corte de la enzima <i>BsaI</i> , en ese lugar se ligó el ARNg 3, este plásmido contiene el ARNg para el gen ALS. <i>Diagrama realizado con Benchling®. Fuente:Elaboración propia</i> .....	60
Figura 21. Confirmación de las secuencias (resaltadas en amarillo) del ARNg 13 y del ARNg 3 en el plásmido 1 .....	60
Figura 22. Confirmación de las secuencias (resaltadas en amarillo) del ARNg 13 y el ARNg 3 en el plásmido 2. En verde se resalta el ARNg para el gen ALS .....	61
Figura 23. Gel de agarosa al 1% mostrando los productos de la digestión con las enzimas de restricción <i>SrfI</i> y <i>NotI</i> para cada plásmido .....	62
Figura 24. Plásmido 1 mostrando en azul los 877pb que se obtienen después de la digestión con las enzimas de restricción. <i>Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia</i> .....	63
Figura 25. Plásmido 2 mostrando en azul los 1050pb que se obtienen después de la digestión con las enzimas de restricción. <i>Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia</i> ...	63
Figura 26. Plásmido 3 mostrando en azul los 13957pb que se obtienen después de la digestión con las enzimas de restricción. <i>Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia</i> ...	64
Figura 27. Resultados de la secuenciación mostrando una parte del Plásmido 3.1 con los ARNg 13 y 3 en amarillo. ....	64
Figura 28. Resultados de la secuenciación mostrando una parte del Plásmido 3.2 con los ARNg 13 y 3 en amarillo. En verde se muestra el ARNg para el gen ALS.....	65
Figura 29. Plásmido 3.1 con Cas9, Sistema Cre-Lox, NPTII y los ARNg para el gen BU1 (ARNg 13 y ARNg 3). Tratamiento 1. <i>Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia</i> .....	65
Figura 30. Plásmido 3.2 con Cas9, Cre, NPTII, los ARNg para el gen BU1 (ARNg 13 y ARNg 3) y el ARNg 653 para el gen ALS. Tratamiento 2. <i>Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia</i> .....	66
Figura 31. Amplificación por PCR del gen NPTII (345 pb) en las 103 plantas BU. WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, NTC: control sin muestra .....	68
Figura 32. Amplificación por PCR del gen Cas9 (261 pb) en las 103 plantas BU. WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, NTC: control sin muestra .....	69
Figura 33. Amplificación por PCR del gen NPTII (345 pb) en las 112 plantas ALS. WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, NTC: control sin muestra .....	71
Figura 34. Amplificación por PCR del gen Cas9 en las 112 plantas ALS. WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, NTC: control sin muestra .....	72
Figura 35. Ensayo con sondas TaqMan para discriminación alélica de las muestras mutadas y las muestras silvestres. Se observan dos eventos ASL111 y ALS107 donde ocurrió la edición genética WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, C-: control sin muestra .....	73

---

Figura 36. Corte con las enzimas de restricción <i>BsaI</i> y <i>SmlI</i> . WT: control negativo= testigo silvestre, TCWT: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo.....	74
Figura 37. Gel de agarosa al 1% mostrando la digestión enzimática con las enzimas de restricción <i>BsaI</i> y <i>SmlI</i> en algunas muestras de las plantas ALS. Se observa cada muestra sin digerir y cada muestra digerida con ambas enzimas .....	75

## Lista de tablas

## Pág.

Tabla 1. Iniciadores para secuenciación de los plásmidos a bombardear .....	40
Tabla 2. Cantidad de ADN utilizado para cada plásmido en los tratamientos.....	41
Tabla 3. Iniciadores para el gen NPTII .....	44
Tabla 4. Iniciadores para el gen Cas9 .....	44
Tabla 5. Iniciadores para amplificar un fragmento grande del gen ALS .....	45
Tabla 6. Iniciadores para el gen ALS con un tamaño de amplicón pequeño.....	47
Tabla 7. Iniciadores degenerados diseñados a partir de la secuencia de <i>Sorghum bicolor</i> para el gen BU1 .....	49
Tabla 8. Lista de los 24 ARNg diseñados para el gen BU1.....	52
Tabla 9. Secuencia de los iniciadores forward y reverse para el gen BU1 con un tamaño de amplicón grande.....	53
Tabla 10. Iniciadores Forward para la prueba <i>in-vitro</i> de los ARN guía diseñados .....	54
Tabla 11. Secuencia de los iniciadores forward y reverse para el gen BU1 y un tamaño de amplicón grande (gen + 5'UTR).....	54
Tabla 12. ARN guía escogidos para la clonación en los plásmidos respectivos y posterior uso para la edición del gen BU1. Al final de cada secuencia y en negrilla se muestra el sitio PAM.....	54
Tabla 13. Iniciadores para clonar cada ARNg según la estrategia Golden Gate.....	56
Tabla 14. Tamaños de banda en pares de bases (pb) esperados para cada plásmido .....	61
Tabla 15. Eventos obtenidos para cada tratamiento .....	67



## Lista de símbolos y abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALS</b>	Acetolactato Sintasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNsg</b>	ARN guía único
<b>ARNg</b>	ARN guía
<b>BEL</b>	Bentazon Sensitive Lethal
<b>BR</b>	Brasinosteroides
<b>BRI1</b>	Brasinosteroide Insensitive1
<b>BU1</b>	Brasinosteroide Upregulated 1
<b>CIPDS</b>	Fitoeno desaturasa
<b>CRISPR</b>	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas
<b>DEP1</b>	Dense and erect panicle1
<b>EE. UU.</b>	Estados Unidos
<b>HDR</b>	Recombinación homóloga
<b>Hg</b>	Pulgadas de mercurio
<b>ICA</b>	Instituto Colombiano Agropecuario
<b>IM</b>	Imidazolinonas
<b>MGE</b>	Elementos genéticos móviles
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
<b>NEB</b>	New Englands Biolabs
<b>NHEJ</b>	Recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos
<b>OGM</b>	Organismos Genéticamente Modificados
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa o PCR en tiempo real
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido simple
<b>SP5G</b>	Self-pruning5G
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UF</b>	Universidad de Florida
<b>µl</b>	Microlitro
<b>USDA</b>	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
<b>W</b>	Watt

## Introducción

El mejoramiento convencional de caña de azúcar, es un proceso que toma aproximadamente 13 años; este tiempo podría reducirse mediante la implementación y uso de herramientas de biología molecular que permitan acelerar procesos de selección de variedades y fortalecer los programas de mejoramiento genético convencionales (Pinto et al. 2010).

Editar un genoma es producir cambios/mutaciones en sitios específicos, dirigidos, permanentes y heredables, en el genoma de una especie. Esta edición es mediada por sistemas de reparación del ADN en la célula con la menor probabilidad de cometer errores (*off-targets*) y sin dejar secuencias de ADN foráneo (New England Biolabs 2007). Al modificar la información genética de un organismo se introducen o eliminan genes específicos alterando su función, por ejemplo, inactivando alguna ruta metabólica del organismo que permita estudiar su función, o para conferirle alguna nueva capacidad, como la de producir cierta proteína útil (Doench et al. 2016).

La tecnología CRISPR/Cas9 (en inglés: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) es la herramienta molecular más utilizada actualmente ya que actúa en cualquier célula de manera muy precisa y controlada. Este mecanismo surgió en 2012, en el ámbito científico como una técnica de biología molecular para utilizarla en la edición de genes (agregando, interrumpiendo o cambiando las secuencias de genes específicos) de importancia en plantas, animales e incluso como terapia génica en humanos (Nekrasov et al. 2013; Shan et al. 2013).

Hay dos componentes principales en el sistema CRISPR-Cas9: una enzima Cas9 que corta el ADN, como un par de tijeras moleculares; y una pequeña molécula de ARN que dirige a la enzima a una secuencia específica dentro del ADN para hacer el corte. Al suministrar la proteína Cas9 y los ARN guía (ARNg) apropiados a una célula, el genoma de esta puede cortarse en los lugares deseados,

cuyas secuencias serán complementarias a las de los ARN guía utilizados. Esto permite la eliminación funcional de genes (pérdida de función) mediante el mecanismo de reparación conocido como NHEJ (*Non-homologous end joining*), en español: unión de extremos no-homólogos, o la introducción de mutaciones (ganancia de función) mediante el mecanismo de reparación conocido como HDR (*Homology-Directed Repair*), en español: reparación dirigida por homología, para estudiar sus efectos. Modificaciones recientes del sistema CRISPR/Cas9 permiten también actuar sobre la transcripción de los genes, modificando así solo su nivel de funcionamiento, pero no la información genética (Eid and Mahfouz 2016).

El uso de esta tecnología de edición genómica en plantas permitirá mejorar el rendimiento, conferir resistencia a enfermedades producidas por patógenos y plagas, permitir tolerancia a la sequía y mejorar las propiedades nutricionales de los cultivos, entre otros. También existe la posibilidad de reducir el uso de productos químicos como los fertilizantes y fitosanitarios usados en agricultura, lo que a su vez traería ventajas para el ambiente y para la salud humana (Schiml and Puchta 2016). Varias investigaciones recientes han descrito mutagénesis exitosas dirigidas por CRISPR/Cas9 en plantas (Mikami, Toki, and Endo 2015; Shan et al. 2013; Baltes and Voytas 2015).

CRISPR y su aplicación en edición genómica abre posibilidades para editar un genoma tan complejo como el genoma de caña de azúcar para determinar la función de genes, introducir fuentes de resistencia a patógenos, convertir alelos silvestres en alelos “mejorados” o viceversa, aumentar la producción de micronutrientes, producir nuevas variedades con diferentes composiciones en lignina, conferir tolerancia a herbicidas, o facilitar cruzamientos con especies silvestres, entre muchas otras posibilidades (Belhaj et al. 2013).

Por medio de esta técnica, el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia, Cenicaña, ha iniciado proyectos de investigación en esta línea para mantener altos niveles de productividad y competitividad bajo factores adversos así como diversificar el cultivo por su alto potencial como biofábrica. En esta investigación se hizo la prueba de concepto para ambos mecanismos de reparación (NHEJ y HDR). Para el mecanismo de unión de extremos no-homólogos se indujo una mutación del gen de caña asociado con el ángulo de inserción de la hoja, gen BU1, para obtener pérdida de su función. Adicionalmente, para el mecanismo de reparación homóloga se hizo la inserción de una copia modificada del gen ALS, para conferir resistencia a herbicidas, es decir para obtener ganancia de función. Ambas ediciones se hicieron en la variedad de caña UFCP82-1655 producida por la Universidad de la Florida, como prueba de concepto de la metodología

CRISPR/Cas9 para luego aplicarla en variedades de caña producidas por Cenicaña. En esta prueba de concepto se pudo editar el gen ALS y se obtuvieron dos plantas para el mecanismo de reparación HDR, el cual ha sido reportado como complejo, encontrándose la inserción del gen ALS en ambas plantas. Sin embargo, no se obtuvo edición del gen BU1 y por ende no se logró ninguna planta editada por el mecanismo de NHEJ.

# ***1. MARCO TEÓRICO***

## **1.1 Ángulo de la hoja**

Mejorar la eficiencia con la cual las plantas interceptan la radiación solar es uno de las alternativas para mejorar la sostenibilidad de la productividad de los cultivos y es una de las características que más interés suscita entre los mejoradores. Para lograr una mayor eficiencia fotosintética, los investigadores han estudiado un rasgo muy importante asociado con esta característica que es el ángulo de inserción de la hoja.

La inclinación de la hoja, es decir, el ángulo entre la lámina de la hoja y el culmo, es un rasgo agronómico importante en las plantas monocotiledóneas y contribuye a la arquitectura de la planta y los rendimientos de grano (Sinclair and Sheehy 1999; Hoshikawa 1989). La base fisiológica para el impacto de los ángulos de inclinación de la hoja en la producción puede ser explicada por la distribución vertical alterada de la radiación solar en el dosel (Truong et al. 2015). Este parámetro, ha generado atención considerable debido a la mejora en la eficiencia fotosintética y la reducción del estrés en plantas, esto debido a la redistribución de la radiación solar desde los niveles superiores a los inferiores de los doseles (Drewry, Kumar, and Long 2014; Mansfield and Mumm 2013; Tollenaar and Wu 1999).

Se ha encontrado una correlación positiva entre un menor ángulo de las hojas y el rendimiento de los cultivos de cereales; por ejemplo, en cultivares de arroz que tenían ángulos de inclinación de hoja más pequeños se obtuvieron rendimientos relativamente más altos (más grano) (Yoshida 1972; Sinclair and Sheehy 1999; Sakamoto et al. 2006).

El maíz moderno también se caracteriza porque sus hojas presentan ángulos de inclinación pequeños como una consecuencia de la selección para incrementar producción de grano en los programas de mejoramiento (Duvick 2005; Lee and Tollenaar 2007; Hammer et al. 2009; Tian et al. 2011; Mansfield and Mumm 2013). De igual manera, se ha demostrado que un rasgo erecto de la hoja en el arroz mejora la eficiencia de la captura de la luz solar y aumenta los depósitos de nitrógeno para el relleno de grano, y hace que las plantas sean más adecuadas para plantaciones densas (Sinclair and Sheehy 1999; Sakamoto et al. 2006).

La unión de la lámina contribuye significativamente a que la hoja se doble horizontalmente desde el eje principal, y el desarrollo anormal del collar dará como resultado un cambio en los ángulos de la hoja. La falta de elongación longitudinal en el collar dio lugar a la hoja erecta (Hong, Ueguchi-Tanaka, and Matsuoka 2004); a la inversa, el aumento de la expansión celular de las células adaxiales del collar dio lugar a una mayor inclinación de la hoja (Cao and Chen 1995; Duan et al. 2006), lo que indica la importancia del desarrollo del collar en la formación del ángulo de la hoja. Se ha demostrado que el cuello de la hoja contribuye significativamente a la formación del ángulo de la hoja y los ángulos de la hoja más grandes pueden reflejar alteraciones en el desarrollo del cuello (Yamamuro et al. 2000; Cao and Chen 1995).

El cuello de la hoja conecta la lámina de la hoja y la vaina, lo que contribuye significativamente al rasgo del ángulo de la hoja y los brasinosteroides (BR) son los principales reguladores del rasgo, mientras que otros reguladores de crecimiento, como el etileno, la giberelina y la auxina, también influyen en el ángulo de la hoja (Gan et al. 2015). Una hoja más erecta facilita la captación de la luz solar, mejorando la eficiencia fotosintética (Sakamoto et al. 2006).

## 1.2 Ángulo de la hoja en caña

Las hojas de la caña se componen de vaina, cuello y lámina. La lámina foliar es de forma lanceolada y estrecha y se encuentra unida a la yagua. Se diferencia principalmente por su longitud, anchura y disposición. Según la disposición la lámina foliar puede ser erecta: que permanece rígida, con la punta curvada, arqueada: cuando forma un arco más o menos amplio, curvada en la base: cuando el arco que forma es más o menos cerrado (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia-Cenicaña 1995).

El cuello es la parte que une la lámina foliar y la vaina. La vaina o yagua es la parte inferior de la hoja, que se abraza al tallo para sostener la lámina foliar y proteger los tejidos jóvenes del tallo. Las hojas inferiores se reducen a vainas triangulares y semienvolventes (Figura 1). En las hojas bien desarrolladas la vaina es cilíndrica y abierta hasta la base. La lígula es transparente y de consistencia membranosa. Las aurículas son cortas y redondeadas. La relación larga/ancho de la lámina es constante y diferente según el clon (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia-Cenicaña 1995).

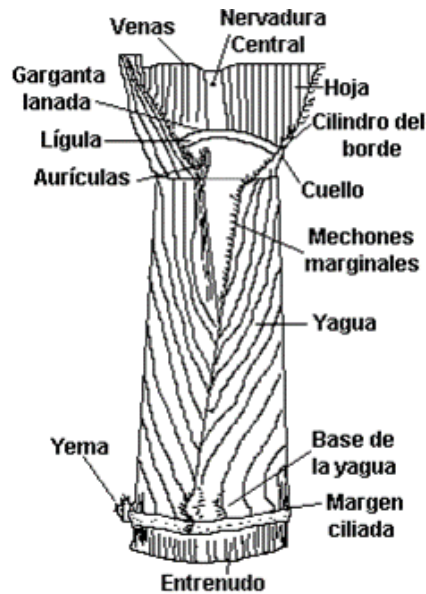


Figura 1. Morfología de la hoja de caña de azúcar. Fuente: (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia-Cenicaña 1995)

En *Saccharum spontaneum* y sus híbridos naturales con *S. officinarum* las hojas tienen vainas envolventes que permanecen adheridas a los tallos, al contrario de las cañas nobles en las cuales se separan y caen (Brumley et al. 2008).

La hoja es la parte de la planta en donde ocurre la transformación del agua, el  $\text{CO}_2$  y los nutrientes en carbohidratos, en presencia de la luz solar. Las funciones principales de la hoja son: 1) la fotosíntesis y la translocación de nutrientes, 2) la respiración, 3) la transpiración. Cada uno de estos procesos implica un intercambio de gases entre el interior y el exterior de la planta, que es controlado por los estomas. Las partes más importantes de la hoja son la epidermis, los haces vasculares, el tejido fotosintético y el parénquima (Moore and Botha 2013).

### 1.3 Gen BU1

El gen BU1: *Brassinosteroid Upregulated 1* (BU1) es un factor de transcripción hélice-bucle-hélice involucrado en la señalización de brasinosteroides (BR) (Tanaka et al. 2009). Los brasinosteroides (BR) son reguladores esenciales del crecimiento, involucrados en muchos procesos fisiológicos; por ejemplo, expansión y división celular, diferenciación de haces vasculares, esquizomorfogénesis, floración, senescencia, estrés biótico y estereotípico (Nakashita et al., 2003; Szekeres et al., 1996;

Yu et al., 2008). Los principales componentes de la señalización de BR se han identificado principalmente en *Arabidopsis thaliana* (Belkhadir and Chory 2006). Las BR se perciben mediante una quinasa receptora rica en leucinas (Leu) conocida como *Brassinosteroid Insensitive1* (BRI1) (Kinoshita et al. 2005; J. Li and Chory 1997).

El cuello de la hoja, que es la región que une la lámina foliar y la vaina, es un órgano especialmente sensible a los brasinoesteroides (Wada et al. 1981). Tanaka et. al., (2009) reportaron la identificación y caracterización del gen de arroz *Brassinosteroid Up Regulated1* (BU1), que codifica la proteína abHLH pero presumiblemente carecía de una región básica. Ellos encontraron que los mutantes que perdieron la función de la biosíntesis de BR, d2 y d11, tenían hojas erectas debido a la deficiencia de BR (Hong et al. 2003b; Tanabe et al. 2005b). Además, los mutantes de arroz deficientes en BR tuvieron granos mucho más cortos que el tipo silvestre (Mori et al. 2002; Hong et al. 2003a; Tanabe et al. 2005a).

La expresión del gen BU1 en el cuello de la hoja, se comprobó por dos experimentos independientes, los cuales sugirieron fuertemente que BU1 está involucrado en la flexión del cuello de la hoja en plantas silvestres. Estos resultados indicaron que BU1 estaba involucrado en la señalización de BR, pero no en su biosíntesis. Además, para los investigadores, fue claro que BU1 controla la flexión de la articulación de la lámina (Tanaka et al. 2009). Adicionalmente, el patrón de expresión de BU1 revelado por el ensayo histoquímico de GUS que hicieron estos investigadores, sugirió que BU1 puede estar involucrado no solo en la flexión de la articulación de la lámina, sino también en la diferenciación vascular en la lámina de la hoja, la vaina de la hoja y los órganos florales y que BU1 puede estar localizado en los haces vasculares (floema) en la lámina de la hoja y la panícula (Tanaka et al. 2009).

La caracterización del mutante de pérdida de función de BRI1 y sus homólogos, BRL1 y BRL3, en *Arabidopsis* y OsBRI1 en arroz mostró que la BR juega un papel importante en la diferenciación vascular, mejora la diferenciación del xilema e inhibe la diferenciación de floema (Nakamura et al. 2006; Cano-Delgado 2004). Finalmente, Tanaka y colaboradores (2009), concluyeron que con la sobreexpresión de gen *Brassinosteroid Upregulated 1* (BU1), se da como resultado una mayor flexión de la articulación de la lámina, mientras que las plantas en las que el BU1 fue suprimido mostraron el fenotipo de la hoja erecta.



## 1.4 Gen ALS

La acetolactato sintasa (ALS; EC 4.1.3.18) cataliza el paso inicial en la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina. ALS se ha conservado entre especies, y se pueden observar similitudes de secuencia sustanciales entre las enzimas de las bacterias, levaduras y plantas superiores (Smith, Schloss, and Mazur 1989). Esta enzima es el objetivo principal de dos clases de herbicidas: las sulfonilureas (LaRossa and Schloss 1984) y las imidazolinonas (IM) (Shaner, Anderson, and Stidham 1984). ALS representa el objetivo principal de al menos cinco clases de herbicidas estructuralmente distintos, incluidos los IM, pirimidinilcarboxilatos, sulfonilureas, triazolopirimidina sulfonamidas y sulfonil-aminocarbonil-triazolinonas. (Endo and Toki 2013).

ALS es una familia de genes bien caracterizada que consta de dos genes, ALS1 y ALS2, que pueden editarse para conferir resistencia a los herbicidas de la clase de sulfonilureas (Svitashev et al. 2015). Las sulfonilureas son un grupo de compuestos que inhiben la enzima biosintética de aminoácidos ramificados acetolactato sintasa (ALS) (LaRossa and Schloss 1984). Varios herbicidas comerciales inhiben ALS como su sitio primario de acción.

Las mutaciones en el gen ALS reportadas por conferir tolerancia a los herbicidas que inhiben la acción enzimática de la ALS se ilustran en la Figura 2 (Endo and Toki 2013).

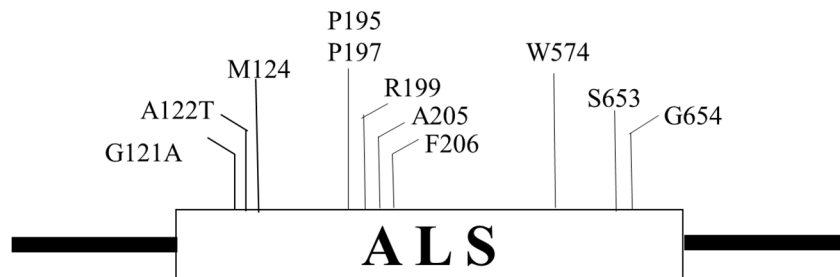


Figura 2. Mutaciones en el gen ALS de *Arabidopsis* y de otros cultivos que confieren tolerancia a herbicidas inhibidores de ALS. Las sustituciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con un sistema de numeración de *Arabidopsis*. Fuente: (Endo and Toki 2013)

## 1.5 Edición de genoma mediante CRISPR/Cas9

Las bacterias y las arqueas, en respuesta a la infección viral han desarrollado una gama de mecanismos de defensa, y muchos de estos sistemas protectores, como los sistemas de modificación de restricciones, la infección abortiva y la modificación de los receptores del virus, proporcionan inmunidad innata (Samson et al. 2013).

En 1987 se publicó un artículo en el que se describía cómo algunas bacterias incluyendo *Streptococcus pyogenes*, se defendían de las infecciones virales. Estas bacterias tenían unas enzimas que eran capaces de distinguir entre el material genético de la bacteria y el del virus y, una vez hecha la distinción, destruían al material genético del virus (Suttle 2007). Pero fue Francisco Mojica el primero en vislumbrar el sistema inmune microbiano en 1992. Mojica revisó datos de secuencia de genoma de *Haloflex mediterranei* y observó 14 secuencias inusuales de ADN, cada una con 30 bases de longitud, éstas leían más o menos lo mismo hacia atrás y hacia adelante, y se repetían cada 35 bases aproximadamente. Estas repeticiones estaban separadas entre sí mediante unas secuencias denominadas “espaciadores” que se parecían a otras de virus y plásmidos. Posteriormente, en 2005, tres grupos reconocieron que las secuencias de algunos espaciadores CRISPR fueron idénticas a las secuencias de los elementos genéticos móviles (MGE), incluyendo virus y plásmidos conjugativos (van der Oost et al. 2014; Mojica et al. 2005). Estas secuencias son responsables de la inmunidad adaptativa y se conocen como CRISPR-Cas loci (en inglés: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, en español: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas) (Makarova, Wolf, and Koonin 2013).

Más adelante se encontró una correlación positiva entre la posesión de espaciadores derivados de virus y la resistencia al virus correspondiente (Mojica et al. 2005), lo cual sugirió que el loci CRISPR podría participar en un sistema inmune basado en ácidos nucleicos. Esta hipótesis fue probada por experimentos con fagos, los cuales revelaron que los loci de CRISPR adquieren fragmentos del invasor y que estos nuevos espaciadores dan como resultado una resistencia secuencia-específica al fago correspondiente. Además, se encontró que los genes Cas son requeridos para este proceso (van der Oost et al. 2014; Barrangou et al. 2007).

Durante los años subsiguientes se continuó la investigación sobre este sistema, pero no fue sino hasta el año 2012 en el que se dio el paso clave para convertir este descubrimiento, en una herramienta

molecular útil que cambiaría el rumbo de las investigaciones en edición de genomas. En agosto de ese año un equipo de investigadores dirigido por las investigadoras Emmanuelle Charpentier de la Universidad de Umea en Suecia y Jennifer Doudna, de la Universidad de Berkeley en California-EE. UU., publicaron un artículo en la revista Science el que se demostraba cómo convertir esa maquinaria natural en una herramienta de edición “programable”, que servía para cortar cualquier cadena de ADN *in vitro*. Es decir, lograban programar el sistema para que se dirigiera a una posición específica de un ADN cualquiera (no solo vírico) y lo cortaran (Jinek et al. 2012).

Para que el sistema CRISPR/Cas9 funcionara en laboratorio, se propuso entonces la fusión de los dos ARN presentes en el sistema natural: crARN (ARN CRISPR) y tracrARN (transactivador crARN) en una solo molécula denominada ARNsg (del inglés: *single-guide RNA*, en español: ARN guía único). Los crARN contienen las secuencias homólogas a genes de interés presentes en el genoma a editar, mientras que los tracrRNA sirven de anclaje a la proteína Cas9 (Gómez-Mena 2020). Con el ARNsg se demostró que el sistema CRISPR/Cas9 es funcional y dirige a la proteína Cas9 a la zona del genoma donde se encuentra el sitio a editar (Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012). Adicionalmente para el trabajo con esta técnica de edición es muy importante definir la secuencia blanco y tener claro cuál es la modificación que se quiere realizar, por eso es necesario tener secuenciado y caracterizado el genoma del organismo a modificar (Aglawe et al. 2018).

### 1.5.1 ¿Cómo funciona CRISPR-Cas?

Cuando un virus entra dentro de la bacteria toma el control de la maquinaria celular y para ello interacciona con distintos componentes celulares. Pero las bacterias que poseen este sistema de defensa tienen un complejo formado por una proteína Cas unida al ARN producido a partir de las secuencias CRISPR. Entonces, el material génico del virus puede interactuar con este complejo. Si ocurre eso, el material genético viral es inactivado y posteriormente degradado. Pero el sistema va más allá; las proteínas Cas son capaces de coger una pequeña parte del ADN viral, modificarlo e integrarlo dentro del conjunto de secuencias CRISPR. De esa forma, si esa bacteria (o su descendencia) se encuentra posteriormente con esa misma clase de virus, ahora inactivará de forma mucho más eficiente al material genético viral (Figura 3). Es, por lo tanto, un verdadero sistema inmune que poseen las bacterias (Rath et al. 2015).

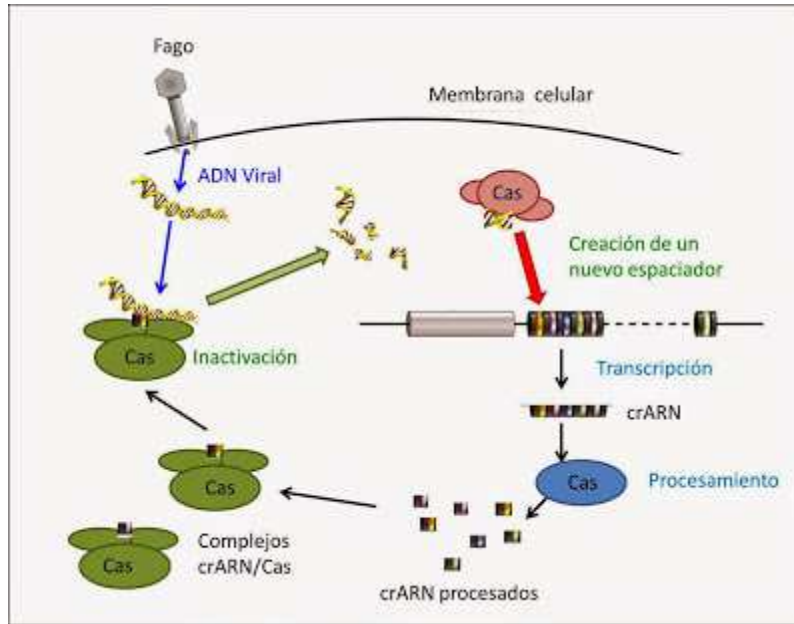


Figura 3. Funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9. Fuente: (Rath et al. 2015)

El sistema CRISPR-Cas más utilizado como herramienta en edición genética es el de tipo II y procede de *Streptococcus pyogenes*. En este sistema participan la endonucleasa Cas9 y una pequeña molécula de ARN guía o ARNsg, que dirige a Cas9 (Melero Royo, Martínez-García, and Centeno Martín 2020).

Esta herramienta de edición genómica ha sido revolucionaria gracias a la capacidad de modificar regiones genómicas de interés con alta precisión en varios genomas de plantas, animales e incluso en ADN humano. Para la edición de genes el sistema CRISPR utiliza una enzima (Cas9) que corta el ADN como un par de tijeras moleculares y una pequeña molécula de ARN guía (ARNg) que dirige las tijeras a una secuencia específica de ADN para hacer el corte, este ARN guía es sintético (diseñado con diferentes plataformas) y es dirigido a una localización específica dentro del genoma (Kumar and Jain 2015; Eid and Mahfouz 2016).

El Sistema CRISPR-Cas9 permite realizar lo siguiente:

- Eliminación de genes o “*knock-out*”:

El silenciamiento génico usando CRISPR involucra el uso de un ARN guía único (ARNsg) en los genes de interés y el fraccionamiento de la doble hélice usando la endonucleasa Cas9. Estas rupturas son luego reparadas por un mecanismo innato de reparación de ADN: unión de extremos no-

homólogos (NHEJ). Sin embargo, NHEJ es propenso a errores y da como resultado deleciones o inserciones genómicas, lo que luego ocasiona un silenciamiento permanente del gen de interés (Cong et al. 2013; Addgene 2019).

- Edición de genes libre de ADN

CRISPR se puede usar para la edición de genes libre de ADN sin el uso de vectores de ADN, requiriendo solo componentes de ARN o proteínas. Un sistema de edición de genes sin ADN puede ser una buena opción para evitar la posibilidad de alteraciones genéticas indeseables debido a la integración del ADN plasmídico en el sitio de corte o integraciones aleatorias de vectores (Cong et al. 2013; Horizon 2018; Addgene 2019)

- Inserciones de genes o "*Knock-in*"

La ruptura de doble cadena inducida por CRISPR también se puede usar para crear un "knock-in" o ganancia de función de un gen, aprovechando la reparación homóloga directa de las células. La inserción precisa de una molécula molde donante puede alterar la región de codificación de un gen, se usa para "arreglar" un gen defectuoso, introducir una etiqueta de proteína o crear un nuevo sitio de restricción. Estudios anteriores han demostrado que el ADN monocatenario puede usarse para crear inserciones precisas utilizando el sistema CRISPR-Cas9 y cuando se usa con un ADN de doble cadena, se lleva a cabo la reparación por homología directa (HDR) (Cong et al. 2013; Horizon 2018).

- Silenciamiento transitorio de genes

Al modificar la proteína Cas9 para que no pueda cortar el ADN, también se puede hacer el silenciamiento transitorio del gen o la represión transcripcional. El Cas9 modificado, dirigido por un ARN guía, se dirige a la región promotora de un gen y reduce la actividad transcripcional y la expresión génica. La activación transitoria o la regulación positiva de genes específicos se puede hacer de manera efectiva (Cong et al. 2013; Horizon 2018)

## 1.5.2 Diversidad de CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas son altamente diversos, lo cual probablemente sea debido a la rápida evolución de los sistemas inmunes bacterianos como un resultado de la dinámica de las presiones de selección que son impuestas por la invasión de los elementos genéticos móviles (MGEs). Los sistemas CRISPR-Cas han sido clasificados en tres tipos principales y varios subtipos (Makarova et al. 2011). Cada uno tiene una proteína Cas específica: los sistemas tipo I contienen la helicasa-

nucleasa Cas 3, los sistemas tipo II son definidos por la nucleasa Cas9 y los sistemas tipo III tienen Cas 10, la cual es una gran proteína de función desconocida (Makarova et al. 2011). Los sistemas tipo I y tipo III parecen estar distantemente relacionados, mientras que los sistemas tipo II son estructural y filogenéticamente diferentes (Heidrich and Vogel 2013). A pesar de su diversidad, todas las proteínas Cas pueden ser agrupadas en 4 categorías funcionales: nucleasas y/o recombinasas, las cuales están involucradas en adquisición de espaciadores; ribonucleasas que catalizan el procesamiento de crARN (CRISPR-ARN) guías; proteínas que se ensamblan con los ARN guía para formar los complejos crRNP (CRISPR-ribonucleoproteína) para la verificación del objetivo; y nucleasas que son responsables de la degradación de los ADN o ARN blancos (Van der Oost, Westra, Jackson, & Wiedenheft, 2014).

La inmunidad CRISPR/Cas involucra tres mecanismos diferentes: adaptación, expresión e interferencia (Makarova et al. 2015). La etapa de adaptación implica la incorporación de fragmentos de ADN extraño (conocidos como espaciadores) de virus invasivos y plásmidos en la matriz CRISPR, como nuevos espaciadores (Makarova et al. 2015). Estos espaciadores proporcionan la memoria de secuencia para una defensa dirigida contra invasiones subsiguientes por el virus o plásmido correspondiente. Durante la etapa de expresión, la matriz CRISPR se transcribe como una transcripción precursora (pre-crARN), que se procesa y madura para producir ARNs CRISPR más pequeños (crARN). Durante la etapa de interferencia, se cortan los ácidos nucleicos de virus o plásmidos afines, proceso dirigido por los crARNs, ayudados por las proteínas Cas, que funcionan como guías (Barrangou 2013; van der Oost et al. 2009; Chylinski et al. 2014).

De todos los sistemas CRISPR conocidos a la fecha, el sistema más usado es CRISPR-Cas9 por su simplicidad y versatilidad en la edición de genoma; sin embargo, los microorganismos tienden a mezclar y unir diferentes sistemas CRISPR y así mismo van descartando los previos (Barrangou et al. 2007). Con la tecnología CRISPR/Cas9 se inicia una nueva era de ingeniería genética en la que se puede editar, corregir o alterar el genoma de cualquier célula de una manera fácil, rápida, barata y, sobre todo, altamente precisa. En plantas, por ejemplo, CRISPR ofrece un método fácil y exacto para alterar genes que permitan crear rasgos tales como resistencia a factores bióticos y abióticos con mayor probabilidad de hacer los cultivos más productivos (Belhaj, Chaparro-García, Kamoun, & Nekrasov, 2013).

### 1.5.3 CRISPR-Cas en plantas

Los primeros estudios que utilizaron CRISPR-Cas9 para la edición de genes en plantas se han centrado en características agronómicas importantes para la agricultura. Los investigadores se dieron cuenta que el sistema podía usarse en cultivos para mejorar características, como el rendimiento, la arquitectura de la planta, la estética de la planta, la tolerancia a las enfermedades, entre otros rasgos que siempre han sido blanco para el mejoramiento tradicional de los cultivos.

Con el uso de CRISPR es posible añadir o eliminar un rasgo de forma más rápida, más precisa, más fácil y, en la mayoría de los casos, más barato que las técnicas de mejoramiento tradicional o métodos previos de ingeniería genética. Aunque los científicos pueden usar CRISPR para agregar genes de otras especies a una planta, muchos investigadores se han enfocado en mayor medida en aprovechar la gran diversidad de genes que existen dentro de una misma especie vegetal. De hecho, la mejora de muchos de los rasgos más valorados en la agricultura no requiere la adición de ADN de otras especies. Diversas investigaciones se han llevado a cabo con CRISPR-Cas9 en plantas. Por ejemplo, en arroz (*Oryza sativa*) se ha modificado el gen BEL (*Bentazon Sensitive Lethal*) que confiere resistencia a herbicidas, dichas plantas editadas mostraron susceptibilidad al bentazon (R. Xu et al. 2014). También en arroz, el equipo de Ying Wang de *Syngenta Biotechnology*© en China lograron editar el genoma de arroz, modificando el gen DEP1 (*dense and erect panicle1*) en la línea de arroz Indica IR58025B. En las plantas mutantes producidas mediante CRISPR se observaron mejoras en el rendimiento, medido como panículas densas y erectas y reducción en la altura de la planta (Wang et al. 2017).

Por medio de CRISPR-Cas9, investigadores de la Academia China de Ciencias Agrícolas, el Centro Nacional para el Mejoramiento de Variedades de Cítricos y la Universidad Southwest han desarrollado plantas de cítricos resistentes al chancro, una enfermedad causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). El equipo editó el promotor del gen CsLOB1, que promueve el desarrollo de chancro en los cítricos. Las líneas desarrolladas mostraron una mayor resistencia a la enfermedad en comparación con los cítricos silvestres (Peng et al. 2017). En soya (*Glycine max*), científicos también de la Academia China de Ciencias Agrícolas liderados por Yupeng Cai, usaron el sistema CRISPR-Cas9 para inducir mutaciones en el gen *GmFT2a*, un integrador en la ruta de la floración en el fotoperíodo de la soya. Las plantas editadas mostraron floración tardía, lo que resultó en un mayor tamaño vegetativo (Cai et al. 2018).

La floración también fue manipulada por investigadores de varias instituciones, incluida *Cold Spring Harbor*, EE. UU., en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Mediante CRISPR-Cas9, los investigadores generaron mutaciones en el supresor de floración SELF-PRUNING5G (SP5G) para manipular la respuesta al fotoperiodo del tomate. Las mutaciones provocadas por CRISPR-Cas9 causaron una floración rápida y mejoraron el hábito de crecimiento compacto de los tomates, lo que resultó en una rápida producción de flores (Soyk et al. 2017).

Investigadores del laboratorio de Mejoramiento de Germoplasma Vegetal de Beijing, dirigido por Shouwei Tian, utilizaron CRISPR-Cas9 para editar el gen *CIPDS*, la fitoeno desaturasa de la sandía (*Citrullus lanatus*), para lograr el fenotipo albino. Todas las sandías editadas mostraron un fenotipo albino completo o mosaico. Este estudio sirvió como prueba de concepto del uso del sistema CRISPR-Cas9 en el mejoramiento de sandías (Tian et al. 2017).

Recientemente, un grupo del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid reportó la edición del gen *SIJAZ2* de tomate, el cual está relacionado con el jasmonato. Esta edición confiere protección a la planta frente a hongos patógenos mediante un mecanismo asociado al cierre estomático (Ortigosa et al. 2019).

Un ejemplo de edición genética con importante repercusión en la salud humana es el desarrollo de plantas de trigo con bajo contenido en proteínas del gluten, responsables de diferentes trastornos del sistema digestivo. Esta investigación fue exitosa en la introducción de mutaciones de manera específica y simultánea y se obtuvieron plantas con bajo contenido en gluten y una disminución en la inmunoreactividad del 85% (Sánchez-León et al. 2018). Todas estas investigaciones demuestran el enorme potencial de usar edición mediante CRISPR/Cas9 en el mejoramiento de los cultivos.

## 1.6 Regulación de cultivos editados genéticamente

Los cultivos editados genéticamente tienen el potencial de hacer que las plantas sean más productivas, resistentes a la sequía, resistentes a enfermedades, más nutritivas o con mejor sabor.

Los novedosos sistemas de edición del genoma ayudan a introducir modificaciones puntuales heredadas de manera estable en el genoma de la planta, y la región transgénica se puede eliminar después de editar un gen objetivo. Esto permite la creación de plantas consideradas no transgénicas y variedades mejoradas (Y. Gao and Zhao 2014; R. F. Xu et al. 2015; Nagamangala Kanchiswamy



et al. 2015). Estas tecnologías son más rápidas en comparación con los métodos de mejoramiento tradicionales y ayudan a obtener las líneas segregantes mutadas que han perdido la inserción del transgen (Woo et al. 2015; Araki and Ishii 2015). Las plantas con mutaciones dirigidas desarrolladas por la tecnología de edición del genoma son casi idénticas a las plantas obtenidas por el mejoramiento clásico, y su seguridad debe evaluarse teniendo en cuenta el producto resultante en lugar del proceso utilizado para crearlos (Hartung and Schiemann 2014; Y. Gao and Zhao 2014; Jones 2015). En este contexto, los productos genéticamente editados son en muchos casos indistinguibles de los productos mejorados convencionalmente; por lo tanto, dichos productos no deberían regularse de la misma manera que los productos generados por métodos de ingeniería genética (Sauer et al. 2016; Shah et al. 2018).

La edición genética también puede dar lugar plantas no transgénicas, con modificaciones similares a las mutaciones espontáneas o a las producidas por agentes mutagénicos y que, por lo tanto, no pueden ser distinguidas de las plantas obtenidas por métodos de mejoramiento tradicionales. Por lo tanto la mayoría de países, exceptuando la Unión Europea (UE), consideran que las plantas editadas genéticamente no transgénicas fueran sometidas a una regulación distinta y menos restrictiva que los cultivos transgénicos (Melero Royo, Martínez-García, and Centeno Martín 2020). Europa tomó la decisión de regulación de cultivos editados genéticamente en 2018 por el Tribunal de Justicia de la UE donde se concluyó que los estados miembros los regularían de la misma forma que los cultivos biotecnológicos ya existentes (Holman 2019).

En Estados Unidos el USDA estableció que no se tratarán como organismos transgénicos aquellos que hubieran podido obtenerse igualmente por métodos de mejora tradicionales. Esto incluye: deleciones, sustituciones de unos pocos pares de bases, inserciones de secuencias provenientes de plantas compatibles para la reproducción, o descendencia que no contenga el transgén gracias a la segregación (Holman 2019).

En Canadá el sistema de regulación se basa en evaluar el producto final y no la tecnología a través de la cual se ha generado el cultivo, lo cual favorece a las plantas editadas genéticamente. Por otra parte, Japón ha estipulado que los cultivos editados genéticamente que no contengan secuencias exógenas no deberían ser tratados como transgénicos. Otros países que están de acuerdo con esta posición son: Australia, Brasil, Guatemala, Colombia, República Dominicana, Honduras, Jordania,

Paraguay, Uruguay, Chile, Argentina, Vietnam y la Comunidad Económica de Estados de África Occidental (Holman 2019; Melero Royo, Martínez-García, and Centeno Martín 2020).

En Colombia durante los años 2017 y 2018, el ICA trabajó en el marco normativo para aquellos cultivares mejorados obtenidos con las nuevas técnicas de innovación en fitomejoramiento y que al final se puede obtener un cultivar equivalente a un cultivar obtenido por mejoramiento convencional. Producto de ello, se expidió la Resolución ICA N° 29299 del 01 de agosto de 2018 *“Por la cual se establece el procedimiento para el trámite ante el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) de solicitudes de un cultivar mejorado con técnicas de innovación en fitomejoramiento a través de Biotecnología moderna, con el fin de determinar si el cultivar corresponde a un Organismo Vivo Modificado o a un convencional”* (ICA 2018).

Usando el sistema CRISPR-Cas9, es posible obtener cultivos genéticamente modificados, sin genes marcadores de resistencia a antibióticos (Kumar and Jain 2015; Jones 2015), sin embargo, para esta investigación se usó el gen NPTII como marcador de resistencia a geneticina, esto por ser la primera vez que se desarrollaba la metodología, pero en el futuro el objetivo será desarrollar plantas de caña de azúcar editadas sin el uso de estos marcadores de resistencia. Esto con el fin de que en el futuro las variedades desarrolladas con mutaciones dirigidas, utilizando sistemas de edición del genoma, no sean sometidas a un proceso de regulación, el cual conlleva a considerarlo como un material transgénico, además se incurren en elevados costos a veces no viables para liberar un producto comercial ya que como sugieren (Nagamangala Kanchiswamy et al. 2015; Araki and Ishii 2015) las reglas operativas existentes para la regulación de plantas genéticamente modificadas no deberían aplicarse a plantas editadas, así como lo determinó el gobierno Colombiano en la resolución 29299 de agosto 1 de 2018. Actualmente, las tecnologías de edición del genoma están siendo discutidas por varias autoridades asesoras y reguladoras en el contexto de la legislación sobre OGM y se ha determinado que los cultivos y plantas obtenidos mediante técnicas de edición del genoma se deberían de considerar no modificados genéticamente.

Hoy en día, las empresas que desean comercializar una planta editada genéticamente pueden preguntar al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) si su producto requerirá revisión regulatoria. Hasta ahora, para las plantas que no contienen genes externos, el USDA ha respondido que no tiene la autoridad para regular. Para edición de plantas, la patente de CRISPR/Cas9 ha sido concedida a DuPont Pioneer® por lo tanto, es esta entidad quien se encarga de regular el uso o licenciamiento de la tecnología CRISPR para plantas. En Colombia, DuPont tiene

una empresa aliada, por lo tanto, la entidad encargada del licenciamiento de la tecnología es Dentos Company®, la cual tiene sede en Bogotá y es quien se encarga de otorgar permisos y regulaciones para la tecnología CRISPR en plantas editadas (com. pers. Dr. Roger Pennell, septiembre 2019).

## ***2. MATERIALES Y MÉTODOS***

### **2.1 Condiciones experimentales**

Este trabajo se desarrolló en la Universidad de Florida (UF) en Gainesville, EE. UU. desde noviembre 2017 hasta noviembre de 2018. Todas las experimentaciones se llevaron a cabo en el laboratorio y en los invernaderos del departamento de agronomía de la Universidad de Florida (UF) dirigidos por el Dr. Fredy Altpeter. Esto se logró gracias a un convenio institucional entre UF y Cenicaña. Por lo tanto, todos los productos obtenidos son propiedad intelectual de ambas instituciones.

El Doctor Fredy Altpeter es profesor de Genética Molecular y Biotecnología, adscrito al departamento de Agronomía del Instituto de Ciencias Agroalimentarias, en la Universidad de Florida- Estados Unidos (UF/IFAS).

### **2.2 Material vegetal**

La variedad UFCP 82-1655 fue desarrollada en Estados Unidos, para su uso como fuente de biomasa para producción de etanol y se caracteriza por tener bajo contenido de azúcar y alta concentración de fibra (Baskaran Kannan, 2017 com. pers.). La manera en que se desarrolló fue haciendo un cruzamiento entre *S. spontaneum* y un híbrido comercial (Figura 4).



Figura 4. EnergyCane sembrada en la estación de Belle Glade Florida

### 2.3 Producción de callo embriogénico

Para la inducción de callo embriogénico se utilizaron los cogollos de la variedad UFCP 82-1655, y se siguió el protocolo desarrollado por el laboratorio del Dr. Fredy Altpeter en la Universidad de Florida (Estados Unidos). Los cogollos fueron limpiados con etanol al 70% y posteriormente fueron sembrados en el medio de cultivo, disponiendo 9 rodajas por caja Petri (Figura 5).

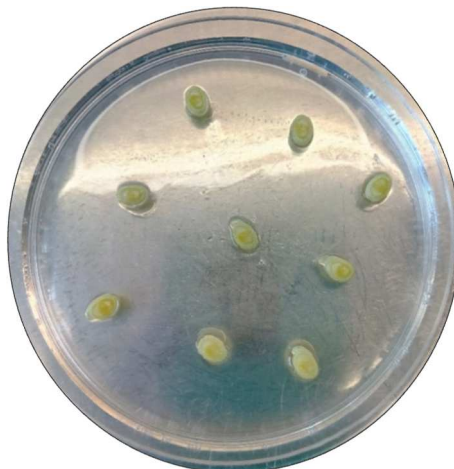


Figura 5. Inducción de callo embriogénico con 9 explantes por caja Petri

El medio en el que se dispusieron las rodajas para la inducción de callo embriogénico fue desarrollado en el laboratorio del Dr. Fredy Altpeter y se siguieron las mismas condiciones de cultivo publicadas por (Taparia, Gallo, and Altpeter 2012).

A los 8 días siguientes se hizo el primer subcultivo del tejido poniendo rodajas aún más pequeñas en cada caja Petri. Para este subcultivo se ponen tantas rodajas de tejido como sea posible. Posteriormente, se continuó con el subcultivo cada 8 días para refrescar el medio e ir seleccionando solamente el tejido embriogénico y de buena calidad; así mismo durante cada subcultivo se multiplicaba el tejido y se iba disminuyendo la fenolización y la contaminación. El subcultivo se realizó por dos meses, tiempo en el cual el callo estuvo listo para su edición por biobalística.

### 2.4 Búsqueda gen BU1 en caña de azúcar

Se diseñaron un par de iniciadores degenerados para amplificar el gen en la variedad de interés. Estos iniciadores se diseñaron con base en el gen BU1 de sorgo (*Sorghum bicolor* <http://www.plantgdb.org/SbGDB/>). El gen BU1 tiene dos exones y los iniciadores se diseñaron de

tal modo que se pudiera amplificar todo el gen en caña de azúcar, el cual tiene 572 pares de bases (pb).

Se hizo la amplificación en diferentes genotipos de caña de azúcar: CC 85-92, CP 88-1762, CP 96-1252 y UFCP 82-1655. Posteriormente se hizo la clonación del producto de PCR en el plásmido pGEMT-easy de Promega® siguiendo el protocolo de la casa comercial y finalmente se mandó a secuenciación para determinar la secuencia del gen BU1 en caña de azúcar.

## 2.5 Diseño de ARN guías (ARNg)

Los ARN guía se diseñaron en una región altamente conservada en los dos exones del gen BU1. Para el diseño de los ARN guía se utilizaron diferentes softwares: *Benchling*, *CRISPOR*, *CRISPR-Direct* y *CRISPR-P*. Se compararon las secuencias obtenidas con cada software y se escogieron aquellos que fueron consistentes en estos cuatro programas. El ARNg para el gen ALS fue diseñado por el Dr. Tufan Oz en el laboratorio del Dr. Fredy Altpeter.

### 2.5.1 Ensayo in-vitro con Cas9 para probar los ARNg

Después del análisis de los ARN guía obtenidos, se escogieron 9 ARN guías (5 en el primero exón y 4 en el segundo exón), estas 9 secuencias fueron probadas con Cas9 para ver cuál podía cortar el gen BU1.

Para este ensayo se diseñaron dos iniciadores que cubrieran todo el gen. De igual manera se diseñaron los iniciadores para cada uno de los ARN guía, para el diseño del iniciador Forward se reemplazó el primer nucleótido por una G, adicionalmente, antes de la secuencia del ARN guía se puso la secuencia del promotor T7 y finalmente, después del ARN guía, se puso una parte de la secuencia scaffold.

El iniciador Reverse fue el mismo para todos los ARN guía: AAAAAGCACCGACTCGG

Para la amplificación de estos iniciadores se utilizó como molde un plásmido (PUC57), el cual tiene el scaffold (76 pb), por lo tanto, se espera un amplicón de 119 pb.

Con cada muestra se hizo la síntesis de ARN. Seguidamente se hizo el tratamiento con DNAsI para remover el ADN molde.

Para el ensayo in vitro de Cas9 tanto el ADN purificado del gen BU1 como los ARN guía se utilizaron a una concentración de 100ng/μl y la Cas9 se utilizó a una concentración de 150 ng/μl. Esta reacción se llevó a cabo siguiendo el protocolo de la casa comercial New England Biolabs®.

## 2.6 Diseño de vectores para el sistema CRISPR/Cas9

Para el diseño de los vectores se siguió la estrategia de Golden Gate ®(Engler, Kandzia, and Marillonnet 2008).

Ambos ARNg fueron clonados en dos vectores diferentes, pero siguiendo la misma estrategia.

- 1) Tratamiento 1: plásmido con Cas9 y dos ARNg para el gen BU1. Objetivo: pérdida de función del gen BU1
- 2) Tratamiento 2: plásmido con Cas9, dos ARNg para el gen BU1 y un ARNg para el gen ALS. Objetivo: pérdida de función del gen BU1 y ganancia de función del gen ALS

Para la clonación, se hizo la primera reacción de Golden Gate utilizando el plásmido pUC57 haciéndole un corte con la enzima de restricción *BsbI*. Posteriormente se hizo la transformación en células competentes de *E. coli*, se hizo aislamiento del plásmido, siguiendo el protocolo del kit de extracción de la casa comercial Qiagen ® y se hizo secuenciación. Después se escogió la colonia en la cual se ensambló el primer ARNg y se utilizó esta colonia para la segunda reacción de Golden Gate. Para dicha reacción se utilizó la enzima de restricción *BsaI*, se hizo aislamiento del plásmido, siguiendo el protocolo del kit de extracción de la casa comercial Qiagen ® y se hizo verificación por secuenciación. Por último, se analizaron las secuencias y se escogió la colonia con el plásmido en el cual se ensamblaron los dos ARNg.

Para el caso del tratamiento 2 se hizo el mismo procedimiento descrito anteriormente y se escogió la colonia con el plásmido en el cual se ensamblaron tanto los dos ARNg para el gen BU1 como el ARNg para el gen ALS, con una mutación en la posición 653 (proporcionado por el laboratorio del Dr. Fredy Altpeter de la Universidad de la Florida- Estados Unidos). Los plásmidos seleccionados se almacenaron a -80°C en glicerol para su posterior uso.

Después de la confirmación de ambos ARNg, se hizo la clonación en los vectores para Cas9. Para ello se hizo la digestión de los plásmidos 1 y 2 con las enzimas *SrfI* y *NotI*, de igual manera se hizo la digestión del vector completo (plásmido 3) con las mismas enzimas de restricción *SrfI* y *NotI*. Para el ensamblaje en el vector final (plásmido con Cas9, NPTII, sistema *Cre-LoxP* y demás elementos necesarios para la edición genómica) se hizo una digestión de ambos plásmidos con dos enzimas de restricción *SrfI* y *NotI*. Después de hacer las respectivas ligaciones se hizo la transformación en *E. coli* y se enviaron a secuenciar 3 colonias por cada ligación. Para la secuenciación se utilizaron dos cebadores (proporcionados por el laboratorio del Dr. Fredy Altpeter de la Universidad de la Florida-EE. UU.) (Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores para secuenciación de los plásmidos a bombardear

Nombre	Iniciadores	Secuencia
NtHSPt	Forward	AGTTGTCCTTGGAGTAAAGAGTC
Scaf-35S	Reverse	CTTGTTAACGCGGCCGCA

Con la secuenciación se pudo confirmar que la ligación fue exitosa para los dos plásmidos.

El plásmido 3 fue diseñado por los Drs. Lucia Matiello y Tufan Oz en el laboratorio del Dr. Fredy Altpeter de la Universidad de la Florida- EE. UU.

## 2.7 Bombardeo del callo embriogénico con micropartículas de oro utilizando pistola genética

### 2.7.1 Preparación del callo embriogénico

El callo se pasó a medio osmótico (con sorbitol 0.4M), se procuró disponer el tejido de tal manera que no quedaran espacios entre el tejido para maximizar la superficie de contacto con el disparo (Figura 6). El tejido se puso en este medio por cuatro horas antes de los disparos.





Figura 6. Disposición del callo embriogénico en la caja Petri para su uso en biobalística

El callo se distribuyó en dos tratamientos cada uno con 15 disparos, adicionalmente se puso callo en tres cajas Petri para los controles, para un total de 33 cajas Petri. Después de cada disparo el tejido se pasó nuevamente a medio de inducción de callo embriogénico (Figura 6) para su recuperación.

### 2.7.2 Preparación del ADN para el bombardeo con micropartículas

Para el bombardeo, los plásmidos de ambos tratamientos fueron linearizados haciendo una digestión de cada plásmido con la enzima *CeuI*.

Posteriormente se hizo la extracción de la banda a partir del gel con el kit para extracción a partir de gel, de la casa comercial NEB ® y se midió la concentración de cada ADN plasmídico. A partir de estas concentraciones se hicieron los respectivos cálculos para cada disparo. Para el tratamiento 1 (pérdida de función del gen BU1) se disparó el plásmido a una concentración de 1.5ng/kb/disparo y para el tratamiento 2 (pérdida de función del gen BU1 y ganancia de función del gen ALS) se disparó el plásmido más el molde de ALS que va a ser insertado en el sitio específico de corte, este disparo se hizo en una relación 1:3 (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidad de ADN utilizado para cada plásmido en los tratamientos

Tratamiento	Muestra	Relación	Cantidad de ADN (ng/kb/disparo)	Tamaño (kb)	ng por disparo
1	BU1-Cas9-NPTII	1	1.5	12.182	548.19

2	BU1-Cas9-ALS-NPTII	1	1.5	12.355	555.98
	ALS-template	3	6	4.550	819.00

### 2.7.3 Condiciones del disparo

Para la preparación de las partículas de oro se pesaron 30mg de oro (<1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, Crescent Chemicals, Germany®) y se prepararon de acuerdo al protocolo del laboratorio del Dr. Fredy Altpeter.

Para recubrir con ADN las micropartículas de oro se dio vórtex a las partículas por 1 minuto, en un tubo a parte se pusieron 30  $\mu\text{l}$  del stock de oro con 30  $\mu\text{l}$  de ADN y se mezcló por 1 minuto. Mientras se estaba mezclando en vórtex, se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de espermidina a 0.1M y 50  $\mu\text{l}$  de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a 2.5M, y se siguió agitando con el vórtex por un minuto más. El oro se re-suspendió en 100  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y se mezcló. De esta mezcla se utilizaron 5  $\mu\text{l}$  por disparo.

Cada disparo se hizo a una presión de 1100 psi con la pistola PDS-1000/He de la casa comercial Biorad®. Se usaron 5  $\mu\text{l}$  de las partículas de oro que se esparcieron en los macrocarries y se dejaron secar brevemente. El plato Petri fue dispuesto en la bandeja, 2 niveles por debajo o 6 cm debajo del soporte del macrocarrier. El vacío se puso a 26.0 Hg (pulgadas de mercurio), se presionó el botón de encendido y se sostuvo hasta que el disco de ruptura se rompió aproximadamente a 1100 psi de presión y 27.5 Hg de vacío. Antes de cada disparo la pistola y sus componentes fueron esterilizados con etanol al 70%.

## 2.8 Selección con geneticina, regeneración, elongación, enraizamiento y paso a suelo de las plantas editadas

Ocho días después del disparo, el callo embriogénico se puso en medio de selección con geneticina, en los dos tratamientos los plásmidos utilizados tienen el gen NPTII, por lo tanto, en todos los tratamientos se utilizó el antibiótico geneticina a una concentración de 20mg/L para selección del tejido editado. El tejido permaneció en el medio de inducción de callo embriogénico con geneticina durante 5 semanas. La composición de este medio se describe en (Taparia, Gallo, and Altpeter 2012). El tejido se separó en pedacitos de callo, según su fragmentación natural y cada grupo de tejido embriogénico fue separado uno del otro, además cada grupo fue codificado con un número diferente para su seguimiento.

Cada ocho días se refrescó el medio y se seleccionó el tejido sobreviviente, descartando aquellos callos que estuvieran muertos (necróticos) debido a la acción de la geneticina. De igual manera, en cada cambio de medio se conservaron los números y se hicieron los respectivos conteos de tejido muerto y tejido sobreviviente.

Después de 5 semanas en inducción, el callo se pasó a medio de regeneración también suplementado con geneticina (20 mg/L). En este medio, el tejido estuvo durante 6 semanas y durante cada paso se escogió solamente aquel tejido que mostrara puntos verdes. Posteriormente, el tejido que regeneró en plántulas fue puesto en medio de elongación con geneticina (20 mg/L). Las plántulas estuvieron en este medio entre 2-3 semanas.

Cuando las plantas alcanzaron la altura deseada: entre 4-5 cm de longitud, fueron puestas en medio de enraizamiento (Taparia, Gallo, and Altpeter 2012) y se detuvo la selección con geneticina para favorecer el crecimiento de las raíces. En este punto, el antibiótico fue removido para facilitar el desarrollo de raíces.

Las plantas estuvieron en el medio de enraizamiento durante 3 semanas adicionales. Pasado este tiempo, se tomó tejido de cada una para la extracción de ADN y luego se pusieron a choque térmico a 40°C durante 5 horas, esto con el fin de que se activara el sistema *Cre-LoxP*, para eliminar la mayoría del plásmido y así evitar que las plantas editadas fueran consideradas organismos modificados genéticamente. Finalmente, las plantas fueron llevadas al invernadero de bioseguridad de la Universidad de la Florida (UF-Estados Unidos.).

## 2.9 Pruebas moleculares

A cada una de las 103 plantas obtenidas para el tratamiento 1 y 112 para el tratamiento 2 se les hizo las diferentes pruebas moleculares con el objetivo de validar la integración de los genes o su delección.

### 2.9.1 Extracción de ADN

Las muestras fueron extraídas, siguiendo el protocolo CTAB (Porebski, Bailey, and Baum 1997). Se partió de 1g de tejido por muestra, el cual fue macerado usando nitrógeno líquido. Para la extracción

se usó buffer CTAB y se hizo una limpieza con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), todas las muestras se resuspendieron con 50µl de agua bidestilada estéril, cada muestra se cuantificó y fue diluída a 100 ng/µl para las respectivas amplificaciones.

## 2.9.2 Amplificación del gen NPTII

Para la amplificación del gen de selección NPTII se utilizaron los iniciadores de la (Tabla 3).

Tabla 3. Iniciadores para el gen NPTII

Iniciadores	Secuencia	Tamaño del amplicón
<b>Forward</b>	TACCTGCCCATTCGACCACC	345 pb
<b>Reverse</b>	TAAAGCACGAGGAAGCGGTC	

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl y se utilizó la Taq Hot Start polimerasa de NEB®. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95 ° C durante 30 s, seguido de 35 ciclos de 95 ° C durante 30 s, 55 ° C durante 45 s y 68 ° C durante 45 s. Las amplificaciones se verificaron en geles de agarosa al 1%.

## 2.9.3 Amplificación del gen Cas9

Para la amplificación del gen Cas9 se utilizaron los iniciadores de la (Tabla 4).

Tabla 4. Iniciadores para el gen Cas9

Iniciadores	Secuencia	Tamaño del amplicón
<b>Forward</b>	AGGTGGAGAAGGGAAAGTCG	261 pb
<b>Reverse</b>	AGTTCACGTACTTGGACGGC	

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl y se utilizó la Taq Hot Start polimerasa de NEB®. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95 ° C durante 30 s, seguido de 35 ciclos de 95 ° C durante 30 s, 54 ° C durante 45 s y 68 ° C durante 45 s. Las amplificaciones se verificaron en geles de agarosa al 1%.

### 2.9.4 Ensayo TaqMan para detectar mutaciones del gen ALS

Para las plantas o líneas editadas obtenidas para el tratamiento 2 se hizo un ensayo de sonda TaqMan para detectar aquellas plantas que fueron editadas y que además tuvieran el inserto del gen ALS modificado. Este ensayo se realizó en aquellas líneas que presentaron la banda para el gen NPTII y/o para el gen Cas9.

El ADN del gen ALS que se insertó en estas plantas tenía una modificación en un nucleótido en la posición 653, el gen silvestre tiene una G en esta posición, el molde insertado tiene en lugar de una G una T, éste sería el alelo mutado. Por ende, las plantas que tengan una T en la posición 653 serán consideradas editadas y/o mutadas.

Para este procedimiento, se siguieron varios pasos que se describen a continuación. Lo primero que se hizo fue la amplificación por PCR de un fragmento grande del gen ALS: 1913 pb, para lo cual se utilizaron los iniciadores UP6 y DO1 (Tabla 5).

Tabla 5. Iniciadores para amplificar un fragmento grande del gen ALS

Primer	Secuencia	Tamaño del amplicón
UP6	CATCGCCAACCCACCTCTTCC	1913 pb
DO1	GAAGCCAATTCAGAACCACTGC	

De igual manera, se utilizó una sonda TaqMan para el gen ALS que fue diseñada por el Dr. Tufan Oz en el laboratorio del Dr. Fredy Altpeter de la Universidad de la Florida.

La reacción de qPCR (PCR cuantitativa o PCR en tiempo real) se llevó a cabo utilizando una dilución 20 veces del producto de PCR como molde en un volumen final de reacción de 10  $\mu$ l. Como control negativo se utilizaron dos plantas silvestres de la variedad UFCP 82-1655 una proveniente de campo y otra proveniente de cultivo de tejidos y como control positivo se utilizó un plásmido y dos muestras con la mutación identificadas por el Dr. Tufan Oz (com. Pers. 2018).

La reacción de qPCR se llevó a cabo en un termociclador en tiempo real CFX 96 de BioRad® y se utilizaron como fluoróforos VIC y FAM. Las condiciones de qPCR fueron las siguientes: 95 ° C durante 10 m, seguido de 40 ciclos de 95 ° C durante 15 s y 62 ° C durante 1 m.

Posteriormente se hizo el análisis de los datos leyendo la discriminación alélica brindada por el software CFX manager de Biorad®.

### **2.9.5 Ensayo con las enzimas de restricción *BsaI* y *SmlI* para detectar la mutación del gen BU1**

Para este ensayo se hizo la PCR para el gen BU1 (amplicón de 784 pb: Gen BU1 + 5'UTR). La amplificación se llevó a cabo con aquellas plantas que fueron positivas para los genes Cas9 y/o NPTII en plantas de ambos tratamientos.

A partir de esta reacción de PCR se realizaron dos digestiones, una con la enzima *BsaI* y la otra con la enzima *SmlI*. La enzima *BsaI*, es una enzima que está presente en el ARNg 13, por lo tanto, si hubo edición en la secuencia que contiene el ARNg 13, se espera que NO ocurra la digestión (corte) en las muestras editadas ya que esto indicaría que se perdió el sitio de reconocimiento de la enzima *BsaI*. La reacción de digestión con *BsaI* fue llevada a cabo con el Buffer CutSmart de NEB® en un volumen final de 20 µl. Esta reacción se incubó a 37°C durante 3 horas. La enzima *SmlI*, es una enzima que está presente en el ARNg 3, por lo tanto, si hubo edición en la secuencia que contiene el ARNg 3, se espera que NO ocurra la digestión (corte) en las muestras editadas ya que esto indicaría que se perdió el sitio de reconocimiento de la enzima *SmlI*. La reacción de digestión con *SmlI* fue llevada a cabo con el Buffer CutSmart de NEB® en un volumen final de 20 µl. Esta reacción se incubó a 55°C durante 3 horas.

### **2.9.6 Ensayo para detectar la mutación del gen ALS con las enzimas de restricción *MmeI* y *BfaI***

Para este ensayo se hizo una PCR del gen ALS en las plantas del tratamiento 2 que dieron positivo para NPTII y/o para Cas9. La amplificación por PCR del gen ALS se hizo en una PCR anidada a partir del primer amplicón (1913 pb) (Tabla 5). Para esta segunda PCR se utilizaron otro par de iniciadores (DMF1 y DMR1) que amplifican un fragmento de 455 pb (Tabla 6).

Tabla 6. Iniciadores para el gen ALS con un tamaño de amplicón pequeño

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño del amplicón</b>
<b>DMF1</b>	CTCATGAACATTCAGGAGCTAGC	455 pb
<b>DMR1</b>	ACCCTTGACTAGCTCATGCGC	

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl con la Hot Start Taq polimerasa de NEB®. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95 ° C durante 30 s, seguido de 35 ciclos de 95 ° C durante 30 s, 54 °C durante 45 s y 68 °C durante 45 s.

A partir de esta reacción de PCR se realizaron dos digestiones, una con la enzima *Bfal* y la otra con la enzima *MmeI*.

La enzima *Bfal*, es una enzima que está presente en el genotipo silvestre. Por lo tanto, se espera que ocurra la digestión (corte) en las muestras silvestres, es decir, las no-editadas. La reacción de digestión se realizó con el Buffer CutSmart de NEB® en un volumen final de 20 µl. Esta reacción se incubó a 37°C durante 3 horas.

La enzima *MmeI*, es una enzima que está presente en el ADN molde, por lo tanto, se espera que la digestión ocurra en las plantas positivas, es decir, las que han sido editadas. La reacción de digestión se realizó con el Buffer CutSmart de NEB® en un volumen final de 20 µl. Esta reacción se incubó a 37°C durante 3 horas.

# 3. RESULTADOS

## 3.1 Diseño y evaluación de ARNs guía sobre gen BU1 de caña de azúcar

### 3.1.1 Búsqueda gen BU1 en caña de azúcar

Al realizar la búsqueda en el NCBI (del inglés: *National Center for Biotechnology Information* y en español: Centro Nacional para la Información Biotecnológica) del gen BU1 en el genoma de sorgo (*Sorghum bicolor*), se encontró que este gen en sorgo tiene 572 pb y codifica para una proteína de 87 aminoácidos y posee dos exones correspondientes al gen BU1 (Figura 7).



Figura 7. Visualización del gen BU1 en el genoma de Sorgo. En color morado se visualizan las regiones 5' y 3'UTR, en color rosado se ven los dos exones y en color verde el intrón

A partir de esta secuencia se diseñaron los iniciadores degenerados (Tabla 7) con la herramienta *primer-BLAST* del NCBI y se amplificaron por PCR en cuatro genotipos de caña de azúcar (Figura 8). Después de la amplificación y posterior verificación de su secuenciación se encontró la secuencia homóloga de dicho gen (Figura 9) en el genoma de caña de azúcar para lo cual se hizo un análisis usando la herramienta CTBE BLAST la cual contiene información de la base de datos del genoma de la variedad SP 80-3280 (Riaño-Pachón and Mattiello 2017).



Tabla 7. Iniciadores degenerados diseñados a partir de la secuencia de *Sorghum bicolor* para el gen BU1

Iniciadores	Secuencia	Longitud	Tamaño del amplicón
<b>Forward</b>	CGASGATGTCGAGCCGRAGGT	21 pb	580 pb
<b>Reverse</b>	SKAGCGGAGGAKGCTGCGGAT	21 pb	

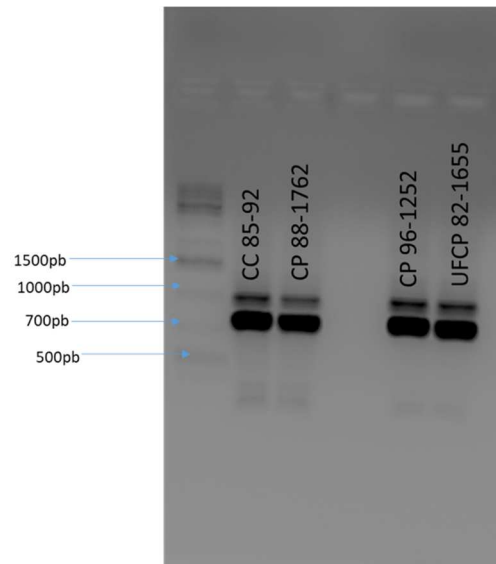


Figura 8. Amplificación del gen BU1 en cuatro variedades de caña de azúcar (CC 85-92, CP 88-1762, CP 96-1252, UFCIP 82-1655)

```

AGGGCGATTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTGATTGACGATGT
CGAGCCGGAGGTCCCGCGCGTCTGGGAGGAGATCAACGAGCTTATCTCCAGGCTGCAGACGCT
GCTCCCCAGCGCGCCGCCGTGGCGGCAGCCAGGTACGTACGCGTGACATTGAGAGCAACCGATGCAT
GATCAGGCGCACAGACAGCAGGCATGAATGTTTCATGTGCAGACACAAGCTAGGTAGCTAGCTCTCACGG
CACTGAGTAGCTAGTACTGACACTGCTGACACCGACACATCCATAAAGCTAGAGACATAAACTGTAGTG
CCACCGCTTGCAAGTACGTACAGTACGACGTGCGTGCGTACTCCTATATGCGTGCTGGTCTACTCTAGC
TCCAAGCCAAGGTCGTCTGATGTAAGGATGATGCGTGCTGCAGGCGTGCAGACGACGACGAAGCTGCTCAA
GGAGACGTGCAGCTACATCAAGAGCCTGCACCGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCCTGTCGGACCTC
ATGGCCACCATGGACCACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCTCCGCTAGAATCACTAGTG
AATTCGCGGCCCTGCAGGTGACCATATGGGAGAGCTCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTC
TATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC
AATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGC

```

Figura 9. Secuencia del gen BU1 en caña de azúcar. En color azul se resaltan los dos exones del gen

El gen BU1 en caña de azúcar tiene una secuencia de 558 pb (Figura 9) y la proteína que codifica tiene 87 aminoácidos.

### 3.1.2 Diseño de ARN guías (ARNg)

Con las secuencias del gen BU1 se hizo el análisis para encontrar similitudes y/o diferencias entre genotipos y, diseñar los ARNg en las zonas altamente conservadas. En el análisis se encontraron los dos exones esperados. Para el primer exón se encontraron 4 SNPs con respecto a Sorgo (Figura 10) y para el segundo exón se encontraron 3 SNPs, dos de ellos en el genoma de Sorgo y uno en las secuencias de caña (Figura 11).

```

BU1_sorghum -----
CP88_8 -----
CC85_3 AGGGCGATTGGGCCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGAT
CC85_4 -GGGCGATTGGGCCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGAT
CC85_5 -GGGCGATTGGGCCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGAT
CP88_2 -----
CC85_8 -----
CP88_1 -----

BU1_sorghum -CGAGGATGTCGAGCCGAGGTCCCGCGCTCGGTGTCGGAGGAGGAGATCAACGAGCTC
CP88_8 -CGAGGATGTCGAGCCGAGGTCCCGCGCTCGGTGTCGGAGGAGGAGATCAACGAGCTT
CC85_3 TCGAGGATGTCGAGCCGAGGTCCCGCGCTCGGTGTCGGAGGAGGAGATCAACGAGCTT
CC85_4 TCGAGGATGTCGAGCCGAGGTCCCGCGCTCGGTGTCGGAGGAGGAGATCAACGAGCTT
CC85_5 TCGAGGATGTCGAGCCGAGGTCCCGCGCTCGGTGTCGGAGGAGGAGATCAACGAGCTT
CP88_2 -CGAGGATGTCGAGCCGAGGTCCCGCGCTCGGTGTCGGAGGAGGAGATCAACGAGCTT
CC85_8 TCGAGGATGTCGAGCCGAGGTCCCGCGCTCGGTGTCGGAGGAGGAGATCAACGAGCTT
CP88_1 -CGAGGATGTCGAGCCGAGGTCCCGCGCTCGGTGTCGGAGGAGGAGATCAACGAGCTT
*** *****

BU1_sorghum ATCTCCAGGCTCCAGACGCTGCTCCCGAGCGCGCGCCCGCTGGCGGCAGCGAGGTACGT
CP88_8 ATCTCCAGGCTCCAGACGCTGCTCCCGAGCGCGCGCCCGCTGGCGGCAGCGAGGTACGT
CC85_3 ATCTCCAGGCTCCAGACGCTGCTCCCGAGCGCGCGCCCGCTGGCGGCAGCGAGGTACGT
CC85_4 ATCTCCAGGCTCCAGACGCTGCTCCCGAGCGCGCGCCCGCTGGCGGCAGCGAGGTACGT
CC85_5 ATCTCCAGGCTCCAGACGCTGCTCCCGAGCGCGCGCCCGCTGGCGGCAGCGAGGTACGT
CP88_2 ATCTCCAGGCTCCAGACGCTGCTCCCGAGCGCGCGCCCGCTGGCGGCAGCGAGGTACGT
CC85_8 ATCTCCAGGCTCCAGACGCTGCTCCCGAGCGCGCGCCCGCTGGCGGCAGCGAGGTACGT
CP88_1 ATCTCCAGGCTCCAGACGCTGCTCCCGAGCGCGCGCCCGCTGGCGGCAGCGAGGTACGT
*****

BU1_sorghum ACGCGTGACATTAGAGCAAGATGCATGATCAGGCTGGCGCG-CAGACAGGCACTAATG
CP88_8 ACGCGTGACATTAGAGCAAGCGATGCATGATCAGGCGTACAGACAGCAGGCATGAATG
CC85_3 ACGCGTGACATTAGAGCAACCGATGCATGATCAGGCGCACAGACAGCAGGCATGAATG
CC85_4 ACGCGTGACATTAGAGCAACCGATGCATGATCAGGCGCACAGACAGCAGGCATGAATG
CC85_5 ACGCGTGACATTAGAGCAACCGATGCATGATCAGGCGCACAGACAGCAGGCATGAATG
CP88_2 ACGCGTGACATTAGAGCAACCGATGCATGATCAGGCGCACAGACAGCAGGCATGAATG

```

Figura 10. Primer exón del gen BU1 resultado con letras de color azul y los SNP encontrados se muestran con letras de color rojo

```

BU1_sorghum      TCGTGCTGCAGGCGTGCAGCAGGAGCTGCTCAAGGAGACCTGCAGTACATCAAGAGCC
CP88_8           GCGTGCTGCAGGCGTGCAGCAGGAGCTGCTCAAGGAGACGTGCAGTACATCAAGAGCC
CC85_3           GCGTGCTGCAGGCGTGCAGCAGGAGCTGCTCAAGGAGACGTGCAGTACATCAAGAGCC
CC85_4           GCGTGCTGCAGGCGTGCAGCAGGAGCTGCTCAAGGAGACGTGCAGTACATCAAGAGCC
CC85_5           GCGTGCTGCAGGCGTGCAGCAGGAGCTGCTCAAGGAGACGTGCAGTACATCAAGAGCC
CP88_2           GCGTGCTGCAGGCGTGCAGCAGGAGCTGCTCAAGGAGACGTGCAGTACATCAAGAGCC
CC85_8           GCGTGCTGCAGGCGTGCAGCAGGAGCTGCTCAAGGAGACGTGCAGTACATCAAGAGCC
CP88_1           GCGTGCTGCAGGCGTGCAGCAGGAGCTGCTCAAGGAGACGTGCAGTACATCAAGAGCC
*****

BU1_sorghum      TGCACGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCTGTCCGACCTCATGGCCACCATGGACC
CP88_8           TGCACGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCTGTCCGACCTCATGGCCACCATGGACC
CC85_3           TGCACGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCTGTCCGACCTCATGGCCACCATGGACC
CC85_4           TGCACGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCTGTCCGACCTCATGGCCACCATGGACC
CC85_5           TGCACGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCTGTCCGACCTCATGGCCACCATGGACC
CP88_2           TGCACGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCTGTCCGACCTCATGGCCACCATGGACC
CC85_8           TGCACGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCTGTCCGACCTCATGGCCACCATGGACC
CP88_1           TGCACGGGAGGTGGACGACCTGAGCGACCGCTGTCCGACCTCATGGCCACCATGGAGC
*****

BU1_sorghum      ACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCTCCGCTAG-----
CP88_8           ACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCTCCGG-----
CC85_3           ACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCTCCGCTAGAACTACTAGTGAATTC
CC85_4           ACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCTCCGCTAGAACTACTAGTGAATTC
CC85_5           ACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCTCCGCTAGAACTACTAGTGAATTC
CP88_2           ACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCT-----
CC85_8           ACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCTCCGCTCAACTACTAGTGAATTC
CP88_1           ACAACAGCCCCGGCGCGAGATCATCCGACGCTCCT-----
*****

```

Figura 11. Segundo exón del gen BU1 resaltado con letras de color azul y los SNP encontrados se muestran con letras de color rojo

Para el diseño de los ARNg se usaron diferentes softwares: *Benchling*, *CRISPOR*, *CRISPR-DIRECT*, *CRISPR-P* y se escogieron aquellos que fueron consistentes en los 4 programas con lo que se hizo un listado con 24 ARNg, de los cuales 12 se encontraban ubicados en el primer exón y 12 en el segundo exón (Tabla 8).

Tabla 8. Lista de los 24 ARNg diseñados para el gen BU1

#	RNAg	strand	Exon	GC	ER	Score
1	GAGCCGGAGGTCGCCGCGT <b>CGG</b>	+	1	80		49.19
2	CTCCTCCGACACCGACGCG <b>GGG</b>	-	1			52.00
3	GAGGTCCCGCGCGT <b>CGGTCTCGG</b>	+	1	75		50.81
4	GTCCCGCGCGT <b>CGGTCTCGGAGG</b>	+	1	80		61.53
5	CGCCACGGCGCGCG <b>CGCTGGGG</b>	-	1			46.54
6	CTCCCCAGCGCGCGCC <b>CGCTGG</b>	+	1	90	BssHII,BtgI	46.53
7	CCCAGCGCGCGCC <b>CGCTGGCGG</b>	+	1	90	BssHII,BtgI	44.00
8	GCGCGTGGGGAGCAG <b>CGTCTGG</b>	-	1			34.33
9	CCGCCACGGCGCGCG <b>CGCTGGG</b>	-	1			23.00
10	GCCGCCACGGCGCG <b>CGCGCTGG</b>	-	1			18.82
11	CTCCCCAGCGCGCGCC <b>CGCTGG</b>	+	1	90	BssHII,BtgI	46.53
12	GCGCCCGCTGGCGGC <b>AGCCAGG</b>	+	1	90	BtgI	51.83
13	GTCGACGACGAAG <b>CTGCTCAAGG</b>	+	2	60	AccI,HincII,Sall,SmlI	48.23
14	GCTACATCAAGAG <b>CCTGCACCGG</b>	+	2	55		57.98
15	CAGGCTCTT <b>GATGTAGCTGCAGG</b>	-	2			49.99
16	CTACATCAAGAG <b>CCTGCACCGGG</b>	+	2	55		48.92
17	CATCAAGAG <b>CCTGCACCGGGAGG</b>	+	2	65	---	65.28
18	CAAGAG <b>CCTGCACCGGGAGGTGG</b>	+	2	70		45.94
19	GTCCGAC <b>CTATGGCCACCATGG</b>	+	2	65	BtgI,EaeI,MscI,NcoI	56.99
20	GGTCG <b>GACAGGCGTTCGCTCAGG</b>	-	2			46.19
21	TGGCCAT <b>GAGGTCGGACAGGCGG</b>	-	2			61.79
22	GGTCG <b>TCCACCTCCCGTGCAGG</b>	-	2			41.77
23	CGACCG <b>CCTGTCGGACCTCATGG</b>	+	2	70	BsiEI	50.08
24	CGCTCAG <b>TCGTCCACCTCCCGG</b>	-	2			51.81

De esta lista se escogieron 9 ARNg, 5 en el primer exón (ARNg 1, ARNg 2, ARNg 3, ARNg 4 y ARNg 12) y 4 en el segundo exón (ARNg 13, ARNg 14, ARNg 19 y ARNg 21). Con estos 9 ARNg se hizo el ensayo de transcripción *in vitro*, para determinar cuál potencialmente podría guiar adecuadamente a la proteína Cas9 para cortar o editar la secuencia del gen BU1.

Se probaron los iniciadores para cada ARNg y se comprobó que fueran amplificables por PCR en la variedad a editar: UFCP 82-1655 (Figura 12).

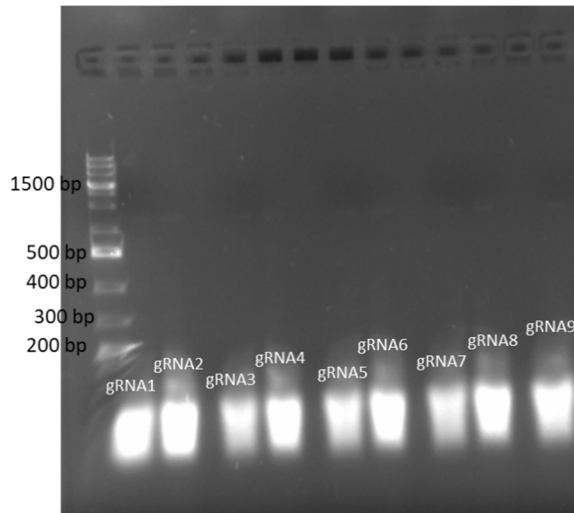


Figura 12. Amplificación de los 9 ARNg escogidos para la prueba *in-vitro*

De cada ARNg se obtuvo una banda de 119 pb. Después de la corrida del gel, se hizo la extracción de cada banda a partir del gel y se procedió con el ensayo *in-vitro* para Cas9.

### 3.1.3 Ensayo *in-vitro* con Cas9 para probar los ARNg

Después del análisis de los ARN guía obtenidos, se escogieron 9 ARN guías (5 en el primero exón y 4 en el segundo exón), estas 9 secuencias fueron probadas con la proteína Cas9 para validar cuál podía cortar la secuencia del gen BU1.

Para este ensayo se diseñaron dos iniciadores que dieran un tamaño de amplicón grande por lo tanto, se diseñaron teniendo en cuenta la región 5'UTR, más, la secuencia de todo el gen y de esta manera, logra el amplicón deseado (Tabla 9), estos iniciadores se diseñaron con la herramienta *primer-BLAST* del NCBI.

Tabla 9. Secuencia de los iniciadores forward y reverse para el gen BU1 con un tamaño de amplicón grande

Iniciadores	Secuencia	T °C	Longitud	Tamaño del amplicón
Forward	CTTTCTGCTTCCCATCGCCA	60.68	20 pb	784 pb
Reverse	CTAGCGGAGGAGGCTGCG	62.3	18 pb	

De igual manera se diseñaron los iniciadores para cada uno de los ARN guía con la herramienta *primer-BLAST* del NCBI; para el diseño del iniciador Forward se reemplazó el primer nucleótido por una G. Adicionalmente, antes de la secuencia del ARN guía se puso la secuencia del promotor T7 y finalmente, después del ARN guía, se puso una parte de la secuencia scaffold (Tabla 10).

Tabla 10. Iniciadores Forward para la prueba *in-vitro* de los ARN guía diseñados

T7	ARNg	SCAFFOLD
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GGCCACGGCGGCGCGCTG	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GCCAGCGCGCCCGCCGTGG	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GTCGACGACGAAGCTGCTCA	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GCTACATCAAGAGCCTGCAC	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GAGCCGGAGGTCCC GCGCGT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GTCTCCGACACCGACGCGC	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GAGGTCCC GCGCGT CCGTCT	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GTCCC GCGCGT CCGTCTCGG	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GAATTTAATACGACTCACTATAG	GCGCCCGCGTGGCGGCAGCC	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC

La secuencia del iniciador Reverse fue la misma para todos los ARN guía: AAAAAGCACCGACTCGG

Tabla 11. Secuencia de los iniciadores forward y reverse para el gen BU1 y un tamaño de amplicón grande (gen + 5'UTR)

Iniciadores	Secuencia	T °C	Longitud	Tamaño del amplicón
<b>Forward</b>	CTTTCTGCTTCCCATCGCCA	60.68	20 pb	784 pb
<b>Reverse</b>	CTAGCGGAGGAGGCTGCG	62.3	18 pb	

Después del ensayo *in vitro*, se escogieron dos ARNg: uno en el primero exón y otro en el segundo exón (Tabla 12).

Tabla 12. ARN guía escogidos para la clonación en los plásmidos respectivos y posterior uso para la edición del gen BU1. Al final de cada secuencia y en negrilla se muestra el sitio PAM

ARNg	Secuencia	Exón
<b>1</b>	GAGGTCCC GCGCGT CCGTCT <b>CGG</b>	1
<b>2</b>	GTCGACGACGAAGCTGCTCA <b>AGG</b>	2

Para el gen ALS el ARNg fue diseñado por el Dr. Tufan Oz en la Universidad de La Florida y fue él quien también hizo el ensayo in-vitro con la proteína Cas9 para el ARNg del gen ALS. Por razones de propiedad intelectual la secuencia de dicho ARNg no se puede documentar en este manuscrito.

Con el gen BU1 sí se procedió con el ensayo in-vitro con la proteína Cas9 para lo cual, se hizo la síntesis de ARN de cada ARNg con la enzima T7 ARN polimerasa. Seguidamente, se realizó el ensayo con la proteína Cas9 y los resultados se visualizaron en gel de agarosa al 1%. Para el exón 1 se probaron 5 ARNg y se encontraron tres que cortaron con la Cas9 (Figura 13). De estos tres exones se escogió el ARNg 3, el cual se usó para realizar la edición genética mediante biobalística.

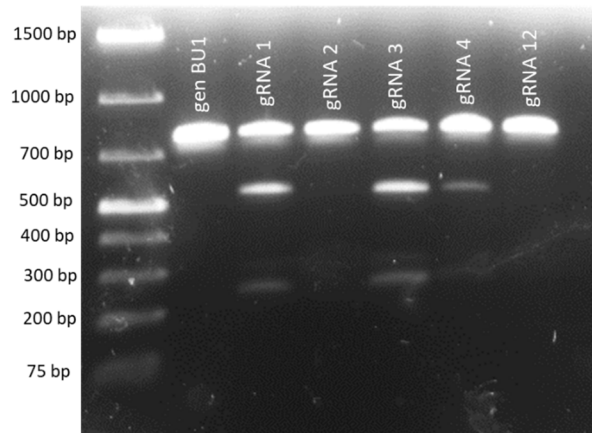


Figura 13. Gel de agarosa al 1% mostrando el ensayo de Cas9 para 5 ARNg ubicados en el exón 1.

En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (1kb Plus de Invitrogen®), en el carril 2 está el gen BU1 (amplicón de 784 pb: Gen BU1 + 5'UTR), en los carriles 3-7 están los ARNg que se probaron.

Para el exón 2 se probaron 4 ARNg y se encontraron dos que fueron cortados con la Cas9 (Figura 14). Para este exón se escogió el ARNg 13, el cual se usó para realizar la edición genética mediante biobalística.

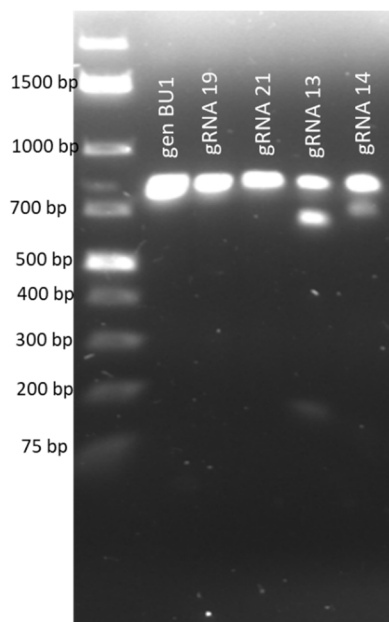


Figura 14. Ensayo *in-vitro* de Cas9 para 4 ARNg ubicados en el exón 2. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (1kb Plus de Invitrogen®), en el carril 2 está el gen BU1 (amplicón con un tamaño de 784 pb: Gen BU1 + 5'UTR), en los carriles 3-6 están los ARNg que se probaron.

### 3.2 Diseño de vectores para el sistema CRISPR/Cas9

Para la construcción de los vectores se siguió la estrategia de clonación según Golden Gate® (Engler, Kandzia, and Marillonnet 2008). Para los dos tratamientos se siguió el mismo procedimiento de clonación. Para estas clonaciones se diseñaron los iniciadores para los ARNg añadiendo cuatro nucleótidos al inicio de cada uno. Para los cebadores *forward* se añadieron estos cuatro nucleótidos al principio: 5'TGCA 3' y para los iniciadores *reverse* se adicionaron estos cuatro nucleótidos al principio: 5' AAAC 3' (Tabla 13).

Tabla 13. Iniciadores para clonar cada ARNg según la estrategia Golden Gate

ARNg	Iniciadores	Secuencia	Exón
1	Forward	TGCAGAGGTCCCGCGCGTTCGGTCT	1
	Reverse	AAACAGACCGACGCGCGGGACCTC	1
2	Forward	TGCATGAGCAGCTTCGTCGTCGAC	2
	Reverse	AAACGTCGACGACGAAGCTGCTCA	2

Para el diseño de los iniciadores se evitaron los sitios PAM.











```

TTTTNTGNAAGTTGAATTACGGCATAGCCGAAGGAATAACAGAATCGTTTCACACN TTCGTAACAAAGA
TCTTCTNNNCATGTTTCAGACGATGGAGGCAAGGCTGATCAAAGTGATCAAGCACATAAACGCATTTT
TTTACCATGTTTCACTCCATAAGCGTCTGAGATTATCACAAGTCACGTCTAGTAGTTTGATGGTACACTA
GTGACAATCAGTTCGTGCAGACAGAGCTCATACTTGACTACTTGAGCGATTACAGGCGAAAAGTGTGAA
ACGCATGTGATGTGGGCTGGGAGGAGGAGAATATATACTAATGGGCCGTATCTGATTTGGGCTGCGT
CGGAAGGTGCAGCCACGCGCGCCGTACCGCGCGGGTGGCGCTGTACCCACTTTAGTCCGTTGGATG
GGGATCCGATGGTTTGC GCGGTTGGCGTTGGCGGGGATGTTTAGTACCACATCGGAAACCGAAAGACG
ATGGAACCAGCTTATAAACCCGCGCTGTAGTCAGCTTAAACAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAA
TAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTGATTCCCGGCTGGTGCA GTCGACGACGAAGCTGCTCA
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA
GTCGGTGCAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTT
GATTCCCGGCTGGTGCA GAGGTCCCGCGCTCGGTCT GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATA
AGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTG
GTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTGATTCCCGGCTGGTGCA GTCAAAGAAAGGC
AGGGAGG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGT
GCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTTTGCGGCCGATTACCCTGTTATCCCTAGGGCCC

```

Figura 22. Confirmación de las secuencias (resaltadas en amarillo) del ARNg 13 y el ARNg 3 en el plásmido 2. En verde se resalta el ARNg para el gen ALS

Después de la confirmación de ambos ARNg, se hizo la clonación en los vectores para Cas9. Para ello se hizo la digestión de los plásmidos 1 y 2 con las enzimas *SrfI* y *NotI*, de igual manera se hizo la digestión del vector completo (plásmido 3) con las mismas enzimas de restricción *SrfI* y *NotI*. De cada digestión se esperan dos bandas como se puede ver en la Tabla 14.

Tabla 14. Tamaños de banda en pares de bases (pb) esperados para cada plásmido

Plásmido	Banda 1	Banda 2
Plásmido 1	877 pb	2727 pb
Plásmido 2	1050 pb	2688 pb
Plásmido 3	1248 pb	13957 pb

Después de cada digestión se hizo el gel de agarosa al 1% y se corrió a 100 Watt (W) durante 90 minutos, luego se cortó la banda esperada y se purificó el ADN de cada banda extraída. Para el plásmido 1 la banda que se cortó fue la de 877 pb, para el plásmido 2 fue la de 1050 pb y para el plásmido 3 se cortó la banda de 13957 pb (Figura 23).

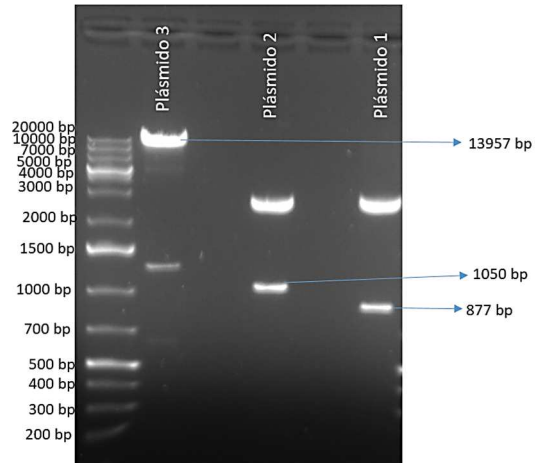


Figura 23. Gel de agarosa al 1% mostrando los productos de la digestión con las enzimas de restricción *SrfI* y *NotI* para cada plásmido

Cada uno de las bandas obtenidas se purificó y se cuantificó para hacer las respectivas ligaciones.

Se hicieron dos ligaciones:

- 1) Se ligó el plásmido 1 (la banda de 877 pb) (Figura 24) con el plásmido 3 (la banda de 13957 pb) (Figura 26)
- 2) Se ligó el plásmido 2 (la banda de 1050pb) (Figura 25) con el plásmido 3 (la banda de 13957 pb) (Figura 26).



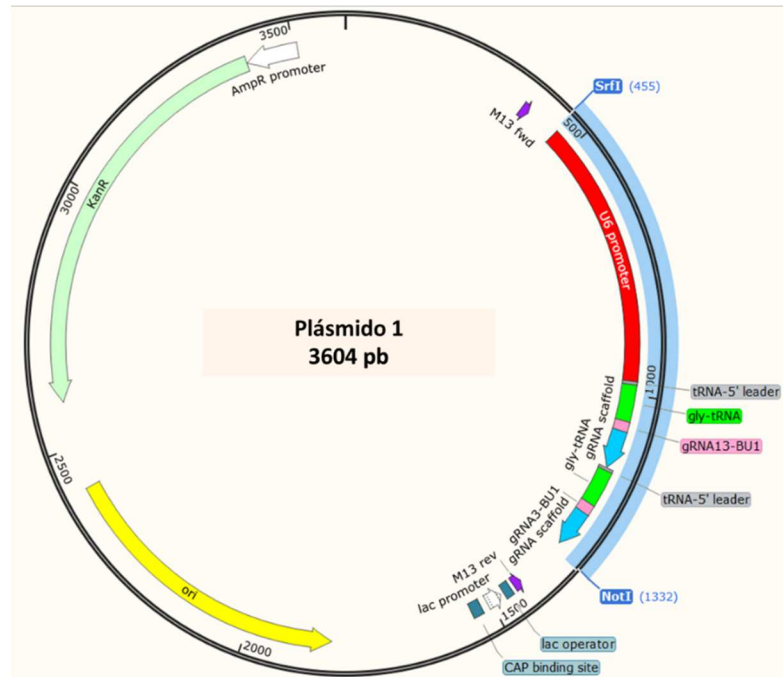


Figura 24. Plásmido 1 mostrando en azul los 877pb que se obtienen después de la digestión con las enzimas de restricción. *Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia*

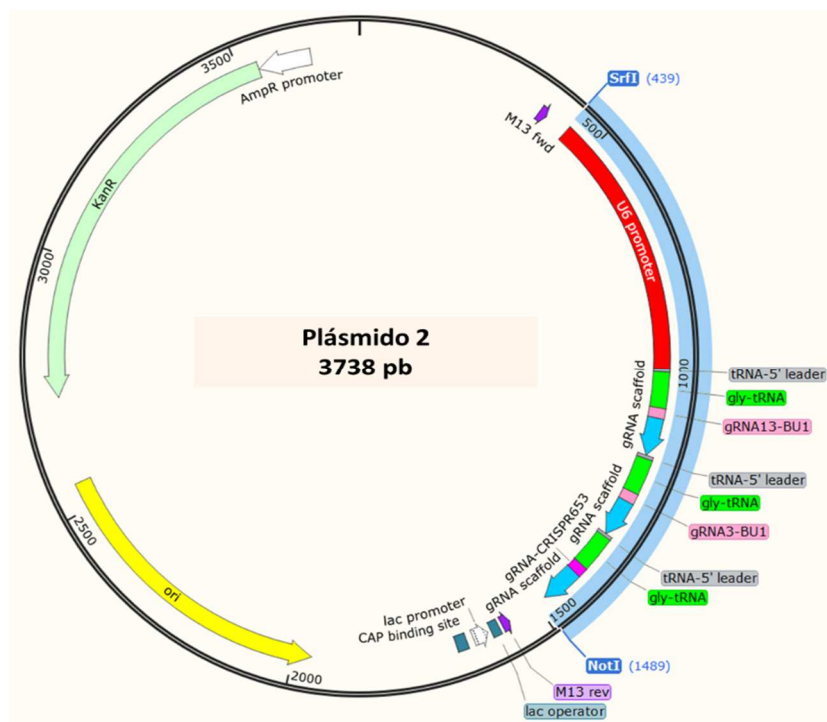


Figura 25. Plásmido 2 mostrando en azul los 1050pb que se obtienen después de la digestión con las enzimas de restricción. *Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia*

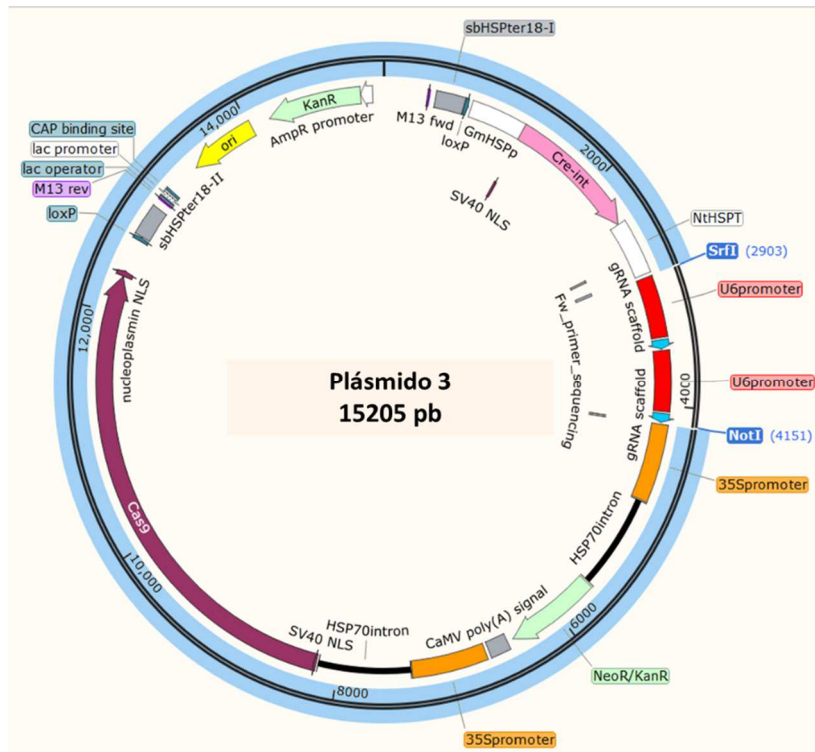


Figura 26. Plásmido 3 mostrando en azul los 13957pb que se obtienen después de la digestión con las enzimas de restricción. *Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia*

Con la secuenciación se pudo confirmar que la ligación fue exitosa para los dos plásmidos (Figura 27 y Figura 28).

```
TGTTTGTGGCCCGGGCTTTGTGAAAGTTGAATTACGGCATAGCCGAAGGAATAACAGAATCGTTTCACA
CTTTCGTAACAAAGATCTTCTATCATGTTTCAGACGATGGAGGCAAGGCTGATCAAAGTGATCAAGCA
CATAAACGCATTTTTTACCATGTTTCACTCCATAAAGCGTCTGAGATTATCACAAGTCACGCTAGTAGTT
TGATGGTACACTAGTGACAATCAGTTCGTGCAGACAGAGCTCATACTTGACTACTTGAGCGATTACAGG
CGAAAGTGTGAAACGCATGTGATGTGGGCTGGGAGGAGGAGAATATACTAATGGGCCGTATCCTG
ATTTGGGCTGCGTCGGAAGTGCAGCCACGCGCGCGTACC GCGGGTGGCGCTGCTACCCACTTT
AGTCCGTTGGATGGGGATCCGATGTTTGCGCGGTGGCGTTGCGGGGGATGTTTAGTACCACATCGGA
AACCGAAAGACGATGGAACAGCTTATAAACC GCGCGCTGTAGTCAGCTTAAACAAAGCACCAGTGGT
CTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGTTCGATTCCCGGCTGGTGCA GTTCGACGA
CGAAGCTGCTCAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA
AGTGGCACCGAGTCGGTCAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACA
GACCCGGGTTGATTCCCGGCTGGTGCA GAGGTCCCGCGCTCGGTCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
AAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTCTTTTTTTTTCGGG
CCGCCTTAAACAGCTTCTGAGGTCGATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAATATCCGGAACCTCCTC
GGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGTGGTCTCTACAAA
TGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCNNTGCCANNNGGTCCCAAGATGG
ACCCANCNCGAGGNNNNCNTGAAAANGNANTTCCACCANCNNNTCAA
```

Figura 27. Resultados de la secuenciación mostrando una parte del Plásmido 3.1 con los ARNg 13 y 3 en amarillo.



```

AAACGNNNNGNCCCCCTTNNNCACTTCCANNNTTNCNCCGNNNCCTGGANGNNTTTTGAGGCCA
NCCNCGCCTNNTCTNNGNCCAAAGGACGANNCCGGCCNNGANACCTGGCCTGGTCCGGCCANN
CCGCCCCGNTGGGNCNCCNNGACATGGCCCGGGCTTTNNGAAAGTTGAATTACGGCATAGCCGA
AGGAATAACAGAATCGTTTCACACTTTCGTAACAAAGATCTTATCATGTTTCAGACGATGGAGGCA
AGGCTGATCAAAGTGATCAAGCACATAAACGCATTTTTTACCATGTTTCACTCCATAAGCGTCTGAGAT
TATCACAAGTCACGTCTAGTAGTTTGATGGTACTACTAGTGACAATCAGTTCGTGCAGACAGAGCTCATA
CTTGACTACTTGAGCGATTACAGGCGAAAGTGTGAAACGCATGTGATGTGGGCTGGGAGGAGGAGAA
TATATACTAATGGGCCGTATCCTGATTTGGGCTGCGTCGGAAGGTGCAGCCACGCGCGCCGTACCGC
GCGGGTGGCGCTGCTACCCACTTTAGTCCGTTGGATGGGGATCCGATGGTTTGC GCGGTGGCGTTGCG
GGGGATGTTTAGTACCACATCGGAAACCGAAAGACGATGGAACCAAGCTTATAAACCCGCGCGTGTAG
TCAGCTTAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTGCG
ATTCGCGCTGGTGCAGTCGACGACGAAGCTGCTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAA
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGG
TAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTGATTCCCGGCTGGTGCAGAGGTCCCGCGCGTC
GGTCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA
CCGAGTCGGTGAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGG
GTTGATTCCCGGCTGGTGCAGTCAAAGAAAGGCAGGGAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAG
    
```

Figura 28. Resultados de la secuenciación mostrando una parte del Plásmido 3.2 con los ARNg 13 y 3 en amarillo. En verde se muestra el ARNg para el gen ALS

Finalmente, después de los resultados de secuenciación se pudo confirmar que los plásmidos para Cas9 estaban completos (Figura 29 y Figura 30) es decir, con todos los elementos necesarios para ser usados en bioalística y editar caña de azúcar mediante CRISPR/Cas9.

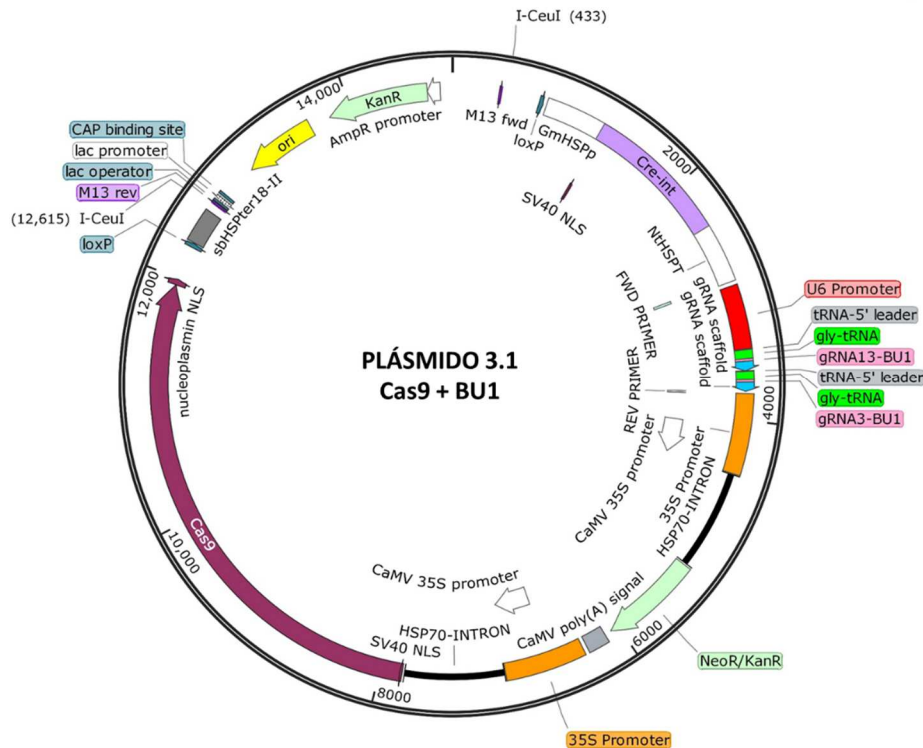


Figura 29. Plásmido 3.1 con Cas9, Sistema Cre-Lox, NPTII y los ARNg para el gen BU1 (ARNg 13 y ARNg 3). Tratamiento 1. Diagrama realizado con Benchling®. Fuente: Elaboración propia



Tabla 15. Eventos obtenidos para cada tratamiento

Plásmido	Tratamiento	Eventos obtenidos	Eventos que sobrevivieron a la selección con geneticina (20mg/L)	Porcentaje (%) de eventos después de selección con geneticina (20mg/L)
<b>Plásmido 3.1: con Cas9, Cre, NPTII y los ARNg para el gen BU1 (ARNg 13 y ARNg 3).</b>	1	456	103	23
<b>Plásmido 3.2 con Cas9, Cre, NPTII, los ARNg para el gen BU1 (ARNg 13 y ARNg 3) y el ARNg 653 para el gen ALS.</b>	2	510	112	22

Para el tratamiento control se hicieron 3 disparos (sin plásmido). Para este tratamiento se obtuvieron 97 eventos independientes, de los cuales 33 fueron puestos sin selección (sin antibiótico) y el resto fueron puestos con geneticina 20mg/L. El tejido sin geneticina tuvo un 100% de formación de brotes y en el tejido con geneticina se observó un 8% de formación de brotes.

### 3.5 Verificación de las plantas de caña transformadas que portan el sistema CRISPR para mutar el gen BU1 y el gen ALS

#### 3.5.1 Amplificación del gen NPTII en las plantas del tratamiento 1

Se amplificó el gen NPTII en todas las plantas obtenidas en el tratamiento 1 (103 eventos) que llevan los ARNg para el gen BU1 (ARNg 13 y ARNg 3). Estas plantas se nombraron plantas BU con un número consecutivo (de ahora en adelante, en este documento se denominarán plantas BU).

Después de la amplificación se encontraron 83 eventos positivos para NPTII (80.6%) y 20 eventos negativos para NPTII (Figura 31).

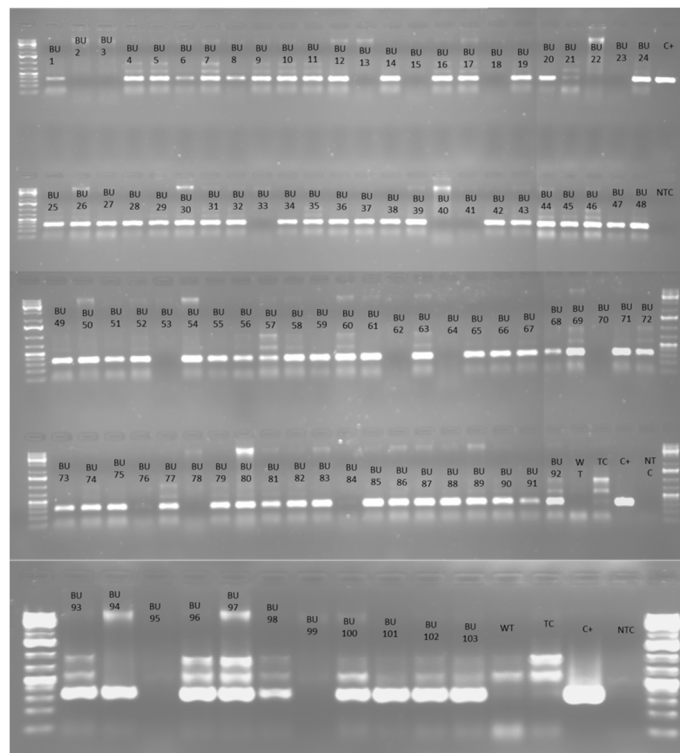


Figura 31. Amplificación por PCR del gen NPTII (345 pb) en las 103 plantas BU. WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, NTC: control sin muestra

### 3.5.2 Amplificación del gen Cas9 en las plantas BU

Se amplificó el gen Cas9 en las 103 plantas BU, encontrándose 83 eventos positivos para Cas9 (80.6%) y 20 eventos negativos para Cas9 (Figura 32).

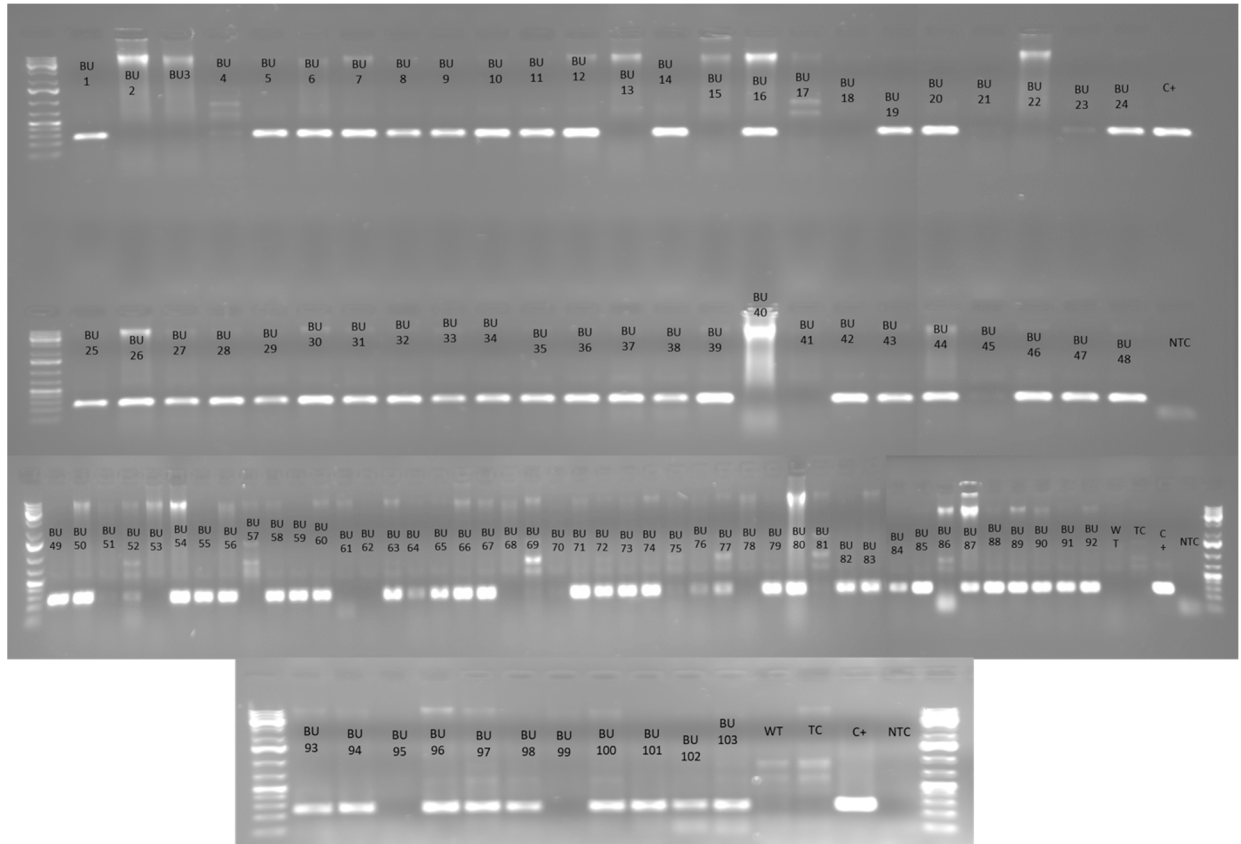


Figura 32. Amplificación por PCR del gen Cas9 (261 pb) en las 103 plantas BU. WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, NTC: control sin muestra

### 3.5.3 Digestión con las enzimas de restricción *BsaI* y *SmlI* para detectar la mutación del gen BU1

Este ensayo se realizó únicamente para aquellos eventos que presentaron amplificación de la banda del gen NPTII y/o para el gen Cas9, es decir, se evaluaron 89 muestras de las plantas BU con las enzimas de restricción *BsaI* y *SmlI* a partir del amplicón grande de 784 pb que abarca el gen BU1.

El corte con la enzima de restricción *BsaI* se utilizó para corroborar edición del ARNg 13 y la enzima *SmlI* se utilizó para corroborar edición del ARNg 3. Las plantas silvestres (no editadas) normalmente presentan un sitio de reconocimiento para ambas enzimas; mientras que las plantas que tuvieran edición en el sitio del ARNg 13 o del ARNg 3 debieron perder el sitio de reconocimiento para la respectiva enzima y por ende no se debió presentar digestión enzimática.

Después del análisis de digestión enzimática se encontró que todas las plantas BU evaluadas presentaron digestión con ambas enzimas. Por lo tanto, se determinó que ninguna planta presentó edición por pérdida de función para el gen BU1. Es decir, la edición por *knock-out* (pérdida de función) no fue exitosa para caña de azúcar de la manera como se realizó en este proyecto.

Para efectos de corroboración de la edición genética, adicionalmente se realizó la secuenciación para el gen BU1 a todas las plantas BU y nuevamente el resultado fue negativo, es decir, que en ninguna planta BU se logró edición mediante CRISPR/Cas9.

### **3.6 Verificación de mutación del gen ALS en las plantas de caña transformadas que portan el sistema CRISPR**

#### **3.6.1 Amplificación del gen NPTII en las plantas ALS**

Se amplificó el gen NPTII en todas las plantas obtenidas en el tratamiento 2 (112 eventos), es decir, aquellas que llevan los ARNg para el gen BU1 (ARNg 13 y ARNg 3) y el ARNg 653 para el gen ALS. Las plantas del tratamiento 2 se nombraron plantas ALS con un número consecutivo (de ahora en adelante, en este documento se denominarán plantas ALS).

Para las plantas ALS se encontraron 94 eventos positivos para NPTII (83.9%) y 18 eventos negativos para NPTII (Figura 33).

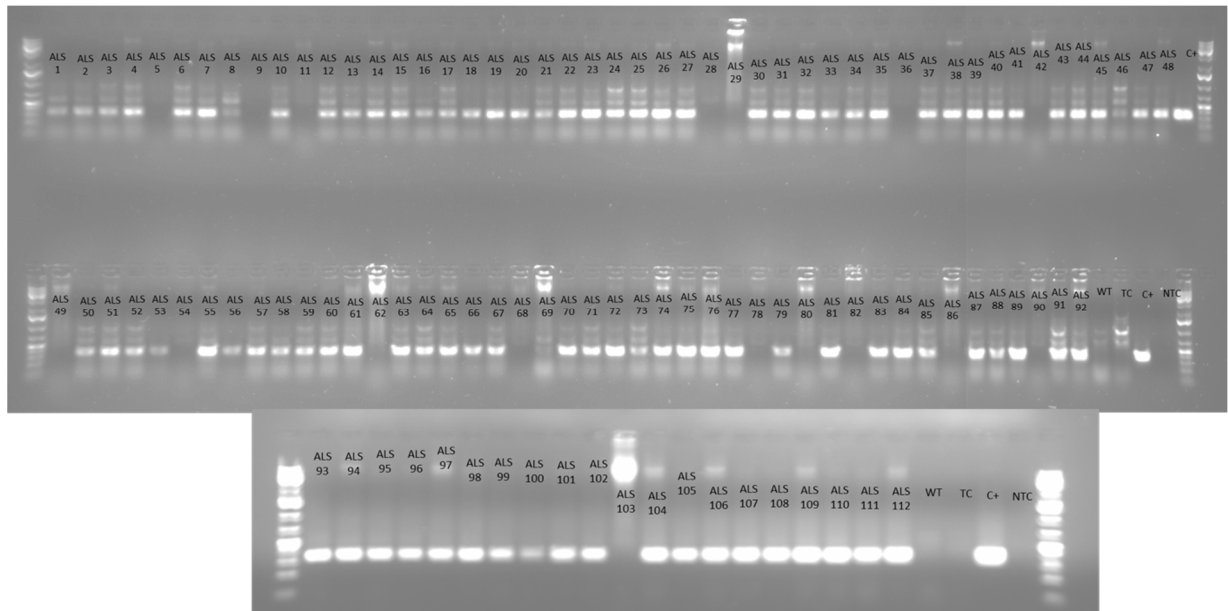


Figura 33. Amplificación por PCR del gen NPTII (345 pb) en las 112 plantas ALS. WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, NTC: control sin muestra

### 3.6.2 Amplificación del gen Cas9 en las plantas ALS

Se amplificó el gen Cas9 en las 112 plantas ALS. Para las plantas ALS se encontraron 87 eventos positivos para Cas9 (77.7%) y 25 eventos negativos para Cas9 (Figura 34).

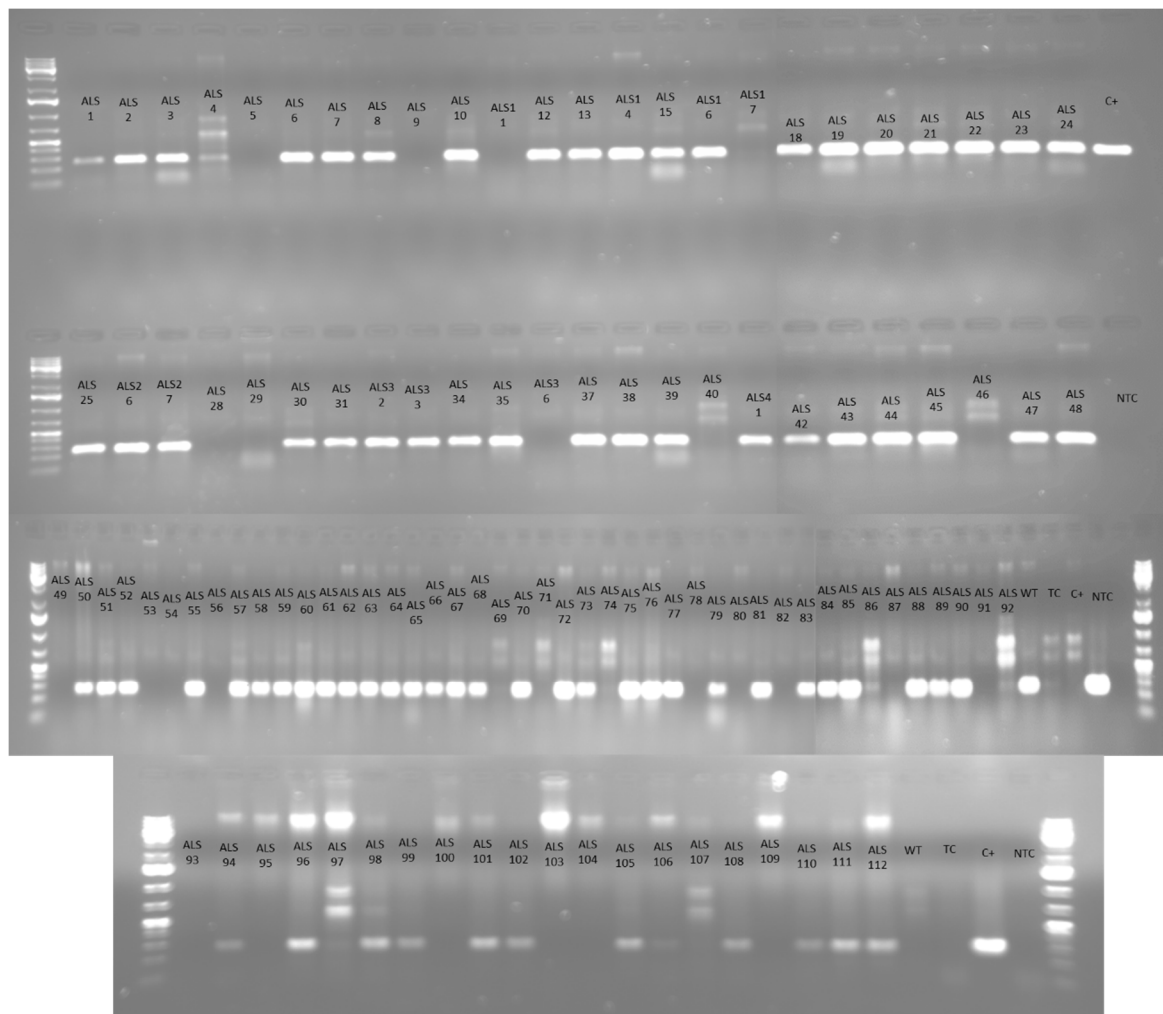


Figura 34. Amplificación por PCR del gen Cas9 en las 112 plantas ALS. WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, NTC: control sin muestra

### 3.6.3 Ensayo TaqMan para detectar mutaciones del gen ALS

Este ensayo se realizó solamente para las plantas ALS y únicamente en aquellos eventos que presentaron la banda para el gen NPTII y/o para el gen Cas9, es decir, en 98 plantas. Para este ensayo se utilizó una sonda marcada con el fluoróforo VIC para las muestras silvestres (sonda con el nucleótido G en la posición 653) y otra sonda marcada con el fluoróforo FAM para las muestras mutantes (sonda con el nucleótido T en la posición 653). Con esta metodología se pudieron detectar las plantas que fueron editadas para el gen ALS. De los 112 eventos evaluados, **DOS** plantas marcaron positivo para el fluoróforo FAM, es decir que estas dos muestras presentan la mutación para el gen ALS, teniendo una T en la posición 653. Las dos muestras positivas para la edición



genética se identificaron como ALS 107 y ALS 111 y se observan en el lado derecho superior de la gráfica (Figura 35). Las muestras que en la posición 653 tuvieron el nucleótido G se observan al lado izquierdo de la gráfica y se consideraron como no editadas (Figura 35).

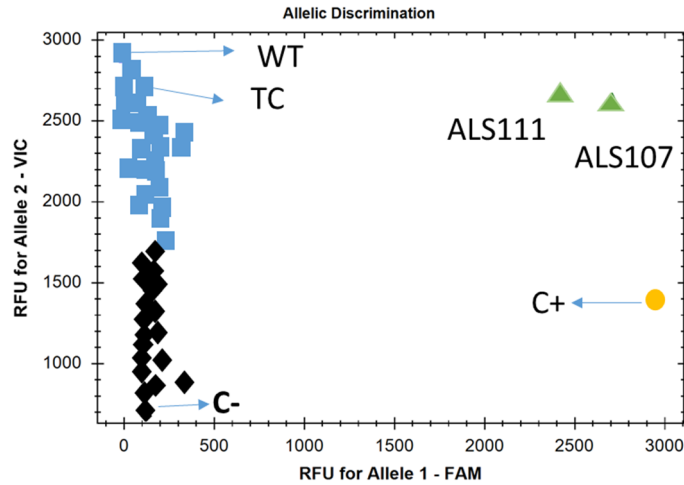


Figura 35. Ensayo con sondas TaqMan para discriminación alélica de las muestras mutadas y las muestras silvestres. Se observan dos eventos ALS111 y ALS107 donde ocurrió la edición genética WT: control negativo= testigo silvestre, TC: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo, C-: control sin muestra

Con estos resultados se corroboró que las muestras ALS 111 y ALS 107 presentan la edición genética por recombinación homóloga del gen ALS. Estas plantas de caña de azúcar fueron editadas exitosamente por la metodología CRISPR/Cas9 para ganancia de función, es decir, que estas dos plantas son potencialmente resistentes a herbicidas.

### 3.6.4 Digestión con las enzimas de restricción *MmeI* y *BfaI* para detectar la mutación del gen ALS

Para corroborar la edición por *knock-in* (ganancia de función) del gen ALS también se hizo un ensayo de digestión enzimática con las enzimas de restricción *MmeI* y *BfaI*, por lo tanto, esta prueba se hizo solamente para 98 muestras de las plantas ALS a partir del producto de PCR de 455 pb para el gen ALS.

La edición introduce el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *MmeI* (un fragmento de ~380 bp). Por lo tanto, las muestras editadas deberían mostrar dos fragmentos; mientras que en muestras silvestres no se debería presentar la digestión o corte enzimático. La digestión con la enzima *BfaI* en muestras editadas elimina el sitio de reconocimiento de la enzima por lo tanto en muestras editadas se debería presentar un fragmento de ~425 bp sin digestión enzimática.

La secuencia de nucleótidos del gen ALS sin digestión enzimática tiene un tamaño de 455 pb. Al realizar la digestión con ambas enzimas, se encontró que solamente las muestras ALS 107 y ALS 111 presentaron los fragmentos esperados, flecha roja para el fragmento de ~380 bp y flecha azul para el fragmento de ~425 bp (Figura 36).

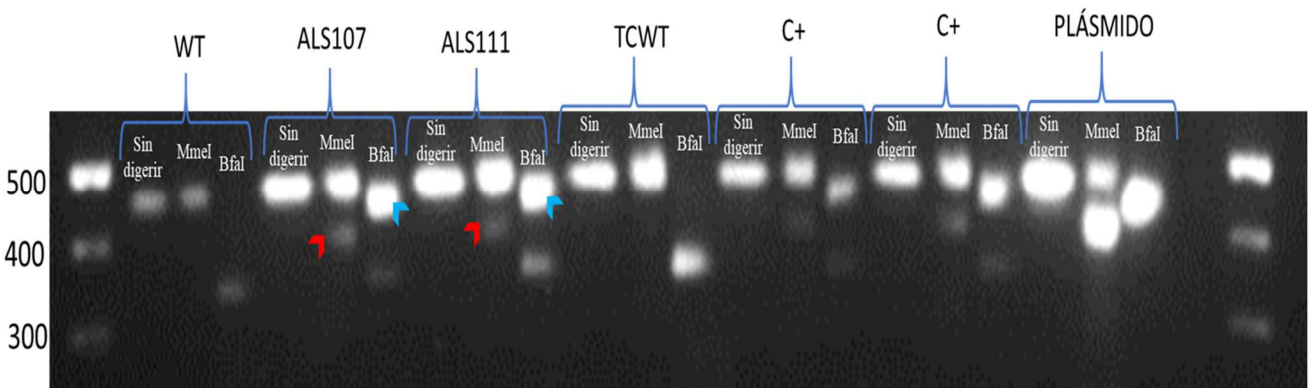


Figura 36. Corte con las enzimas de restricción *BsaI* y *SmlI*. WT: control negativo= testigo silvestre, TCWT: control negativo = testigo de cultivo de tejidos, C+: control positivo

Con este resultado se corroboró nuevamente que se obtuvo edición genética en dos plantas de caña de azúcar editadas por recombinación homóloga, es decir, la edición por *knock-in* fue exitosa en este estudio, logrando entonces la ganancia de cambio de función del gen ALS y por ende se obtuvieron dos plantas potencialmente resistentes a herbicidas.

### 3.6.5 Digestión con las enzimas de restricción *BsaI* y *SmlI* para detectar la mutación del gen BU1 en las plantas ALS

En este ensayo se evaluaron 98 muestras de las plantas ALS. Las plantas ALS también tienen los ARNg 3 y ARNg 13 para el gen BU1, por lo tanto, se quiso corroborar si hubo cambios en la secuencia o mutación del gen BU1 con una digestión enzimática con las enzimas *BsaI* y *SmlI* a partir del producto de 784 pb que abarca el gen BU1.

Al igual que en la sección 3.5.3 (Página: 69), se esperaba que las plantas editadas no presentaran digestión enzimática con ninguna de las dos enzimas. Sin embargo, todas las plantas ALS evaluadas presentaron digestión con esta enzima (Figura 37). Por lo tanto, se determinó que ninguna planta ALS presentó edición genética por pérdida de función para el gen BU1. Es decir, la edición por *knock-out* (pérdida de función) no fue exitosa en este proyecto.

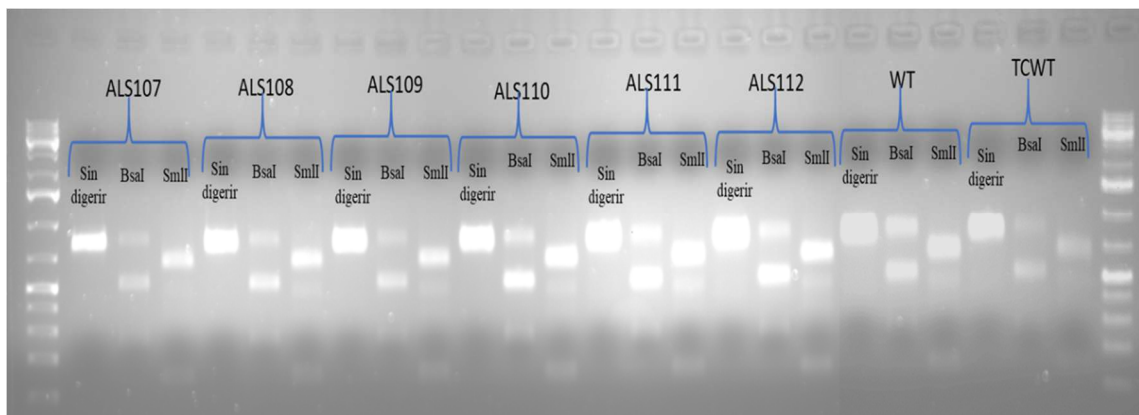


Figura 37. Gel de agarosa al 1% mostrando la digestión enzimática con las enzimas de restricción *BsaI* y *SmlI* en algunas muestras de las plantas ALS. Se observa cada muestra sin digerir y cada muestra digerida con ambas enzimas

Para efectos de validación de la edición genética, se realizó la secuenciación del gen BU1 de las muestras en estudio y nuevamente el resultado fue negativo, es decir, que en ninguna planta ALS se logró edición genética con el gen BU1.

## ***4. DISCUSIÓN***

Para el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia, Cenicaña, es de gran interés contar con los conocimientos para establecer una línea base de investigación en edición genómica para implementarla en las diferentes investigaciones llevadas dentro del área de Biotecnología como apoyo al mejoramiento convencional que se desarrolla en el Programa de Variedades. Puesto que la edición de genomas puede ser aplicada para corregir factores negativos como ausencia de floración, susceptibilidad a enfermedades como la roya café o roya naranja, también podría aplicarse para mejorar otras características de importancia económica positivamente como el incremento en los niveles de sacarosa, en variedades comerciales de caña de azúcar en Colombia mediante la mutación o sobreexpresión de un gen específico en el genoma de la caña.

Siendo la edición de genomas una técnica altamente poderosa dentro de las nuevas técnicas modernas del mejoramiento genético de cultivos, se llevó a cabo esta investigación ya que las plantas editadas genéticamente servirán como prueba de concepto para la metodología de edición genómica en caña de azúcar. Por lo anterior, se decidió editar una característica fácil de evaluar visualmente como es el ángulo de la hoja. Además la modificación del ángulo de la hoja es una característica importante en la arquitectura de la planta, lo que a su vez influye en cómo el dosel de la planta intercepta la radiación solar y tiene efecto directo en la productividad (Truong et al. 2015).

La eficiencia con la que una planta intercepta la radiación solar está determinada principalmente por su arquitectura. Por lo tanto, es algo fundamental entender la regulación genética de la arquitectura de la planta y cómo los cambios en la misma afectan el rendimiento para mejorar la productividad de los cultivos (Pendleton et al. 1968).

La edición del gen BU1 responsable del ángulo de inclinación de la hoja permitiría tener plantas de caña de azúcar que podrían ser mejores en su capacidad de captación de la energía solar y, por ende, mejorar la productividad de la caña de azúcar por la vía de toneladas de caña por hectárea (TCH) y por ende incrementar sus contenidos de sacarosa, dos características fundamentales para el sector azucarero colombiano.

## 4.1 Aspectos metodológicos

Para la edición genética mediante CRISPR/Cas9 se decidió utilizar el método de transferencia de genes por biobalística ya que a la fecha es el método más eficiente y frecuentemente usado para transformación en caña de azúcar (Altpeter y Oraby 2010), en contraste con la transformación mediada por *Agrobacterium*, esto debido a que la biobalística facilita la co-transferencia de múltiples genes desligados y no es genotipo dependiente (Altpeter et al. 2005).

De igual manera, otros investigadores han reportado que la transformación mediante biobalística también puede entregar ARNsg sintetizados *in vitro* directamente en células vegetales transformadas con Cas9 e inducir mutaciones dirigidas (Svitashev et al., 2015). Este método de transformación permitió integrar los dos casetes de expresión de Cas9 y de los ARNsg utilizados en el genoma de la caña de azúcar.

Adicionalmente, para los disparos se usaron casetes de mínima expresión para ambos tratamientos (digestión con la enzima *I-CeuI*: página 66), el uso de estos casetes es importante porque permiten que las plantas transgénicas tengan un patrón de integración génico mucho más simple (Fu et al. 2000; Breitler et al. 2002). Los investigadores explican que esto puede ser debido a la ausencia de secuencias *backbone* (de soporte) en procariontes las cuales pueden contribuir a aumentar la recombinación del ADN (Kohli et al. 1999). Estas secuencias *backbone* precisamente son las que se evitan con el uso de casetes de expresión mínima. Estudios previos sugieren que las secuencias bacterianas pueden inducir la metilación de loci transgénicos, causando el silenciamiento transcripcional del gen (Clark, Harold, and Yull 1996). Razones por las cuales es recomendable realizar los disparos de biobalística con casetes de mínima expresión como se hizo para este proyecto.

Los plásmidos utilizados para esta investigación fueron diseñados cuidadosamente, teniendo en cuenta varios elementos importantes para la edición genética de plantas. La secuencia original codificante de Cas9 tiene 4107 pb de longitud. Para mejorar la expresión de Cas 9 en plantas, la mayoría de genes Cas9 para edición de genomas en plantas han sido además optimizados con el uso de codones para plantas (F. Gao, Shen, Jiang, Wu, & Han, 2016; Ma et al., 2015; Svitashev et al., 2015). Para este proyecto se usó una secuencia del gen Cas9

optimizada para caña de azúcar con una longitud de 4101 pb. Adicionalmente, en eucariotas, la localización nuclear de Cas9 requiere la fusión de una señal única o dual de localización nuclear (NLS) a la codificación de la secuencia de Cas9, por lo tanto, también se utilizó esta secuencia NLS.

Para una alta eficiencia de edición genética en arroz y otras gramíneas, la optimización de codones del gen Cas9 (Cas9p) se ha modificado aún más al aumentar los contenidos de GC en la región 5' terminal (Ma et al. 2015), lo cual imita los genes de la familia *Gramineae* (Wong et al. 2002). Sin embargo, varias aplicaciones en plantas también han utilizado Cas9 con optimización de codones para especies no vegetales, pero su eficiencia de edición puede ser relativamente más baja que la de los métodos optimizados para plantas (Lawrenson et al., 2015; Ma, Zhu, Chen, & Liu, 2016a).

La edición realizada en esta investigación se hizo con base en sistemas de transformación genética, lo cual se ha hecho con diferentes cultivos como por ejemplo arroz, *Arabidopsis*, tabaco y sorgo (Jiang et al. 2013). Como mencionan algunos autores la edición de genes en plantas a menudo requiere una etapa inicial de transformación genética para introducir los elementos del sistema (ARNsg y proteína Cas9) y se plantea su posterior eliminación en la siguiente generación. En esta investigación la introducción de los ARNsg y de la Cas9 se hizo con la pistola genética, sin embargo, al ser caña de azúcar un cultivo que se propaga vegetativamente la eliminación del transgen en la siguiente generación no es posible, por lo tanto, en este trabajo se utilizó el sistema *Cre-LoxP* (Yang et al. 2017) que permitiría eliminar los transgenes en las plantas editadas. Sin embargo, este sistema aparentemente no se activó, por ende, las plantas editadas siguen siendo además plantas transformadas, esto se pudo corroborar al hacer nuevamente la PCR con NPTII y con Cas9 ya que volvió a dar positivo para ambos genes. Es probable que la temperatura usada no fue la adecuada por lo que el sistema *Cre-Lox-P* no se activó, o quizás a la hora de diseñar el plásmido no se pusieron todos los elementos necesarios para que funcionara correctamente, esto puede ser debido a que se utilizó el promotor de *Glycine max* para dirigir este gen y tal vez no funciona en caña, por eso no se activó como se esperaba, o el sistema se integró adecuadamente en la planta, pero no hubo expresión de la proteína Cre. Otra razón para que el sistema Cre-Lox no funcionara pudo haber sido que se activó muy tarde (en etapa de plantas), en el futuro sería mejor activarlo cuando el material esté en etapa de callo para garantizar la activación de este sistema. En caso

de querer comercializar alguna de las plantas obtenidas en esta investigación se deberán tratar como un cultivo modificado genéticamente para efectos de su regulación

Debido precisamente a estos desafíos que tienen los cultivos vegetativos que se propagan clonalmente como la caña de azúcar, es que varios investigadores han venido desarrollando métodos alternativos y confiables para que las plantas editadas no sean además plantas con modificaciones genéticas. Uno de ellos fue el utilizado en esta investigación el sistema *Cre-LoxP* (Yang et al. 2017) que ha sido exitoso en otros cultivos.

Otros investigadores han desarrollado métodos alternativos que no requieren transformación estable utilizando protoplastos o embriones inmaduros (Liang et al. 2017; Osakabe et al. 2018). El uso de estas células sin pared celular puede ser una solución. Sin embargo, la regeneración de plantas completas a partir de protoplastos es muy compleja en especial para especies monocotiledóneas como el maíz, el trigo, la cebada y la caña de azúcar (Liang et al. 2017).

También se han desarrollado sistemas de edición compuestos únicamente por proteínas o complejos RNA-proteína que permiten editar el genoma sin el uso de ADN recombinante (Metje-Sprink et al. 2019). Esta estrategia consiste en bombardear embriones inmaduros con partículas de oro recubiertas del complejo ARNsg-Cas9 (Svitashev et al. 2016), seguido de la regeneración de embriones somáticos portadores de la edición.

Los componentes de CRISPR/Cas también pueden ser entregados mediante complejos de ribonucleoproteínas (Cas9 RNPs), que consisten en la proteína Cas9 purificada en conjunto con el sgRNA. Estas dos moléculas son ensambladas in vitro y pueden ser entregadas directamente a la célula (Addgene 2017)

## **4.2 Genes que regulan la expresión del ángulo de las hojas en plantas**

En diferentes cultivos se han identificado varios genes responsables del ángulo de la hoja. En maíz, se ha identificado los genes *ligueless1* y *ligueless2* como los principales reguladores del ángulo de la hoja para mejorar la productividad vegetal (Lambert & Johnson, 1978; Walsh, Waters, & Freeling, 1998). En arroz, *osdwarf4-1* y *leaf inclination2* han sido identificados

y juegan un papel importante en las respuestas de las hormonas vegetales que resultan en cambios en el ángulo de la hoja (Sakamoto et al. 2006; Zhao et al. 2010). En Sorgo, se ha encontrado que el ángulo de la hoja es un rasgo hereditario regulado por múltiples loci del gen *dwarf-3*. La variación genética en el ángulo de las hojas puede ser utilizada para modificar la arquitectura de la planta y por ende mejorar el rendimiento del cultivo (Truong et al. 2015).

Con respecto al gen BU1 se ha encontrado que tiene una gran similitud con el gen PRE1 de *Arabidopsis*, que codifica una proteína involucrada en la señalización de giberelinas (GA) (Lee et al., 2006). Las plantas a las que se suprimió el gen BU1 por knock-out mostraron una disminución del ángulo de inserción en las hojas y por lo tanto produjeron plantas con el fenotipo de hojas erectas (Tanaka et al. 2009). Por tal razón, este fue el gen escogido para este proyecto para poner a prueba la metodología de edición genética usando CRISPR/Cas9 en caña de azúcar por la vía de unión de extremos no-homólogos o como se conoce en inglés: *knock-out*.

Para este proyecto se tuvo como objetivo modificar el ángulo de la hoja por edición genómica, anulando la función del gen BU1 de plantas de caña, con el fin de mejorar la eficiencia con la cual las plantas de caña interceptan la radiación solar y, por ende, incrementar la productividad de la variedad editada. Adicionalmente, esto se iba a ver reflejado por la distribución vertical de las hojas de la planta editada y, por ende, se esperaba que hubiese mayor captación radiación solar en el dosel de las cañas editadas exitosamente. Sin embargo, a pesar de que se obtuvieron un número considerable de plantas transformadas corroboradas con las amplificaciones de NPTII (83 eventos para el tratamiento 1 y 94 eventos para el tratamiento 2) y Cas9 (83 eventos para el tratamiento 1 y 87 eventos para el tratamiento 2), no se pudo lograr edición del gen BU1 responsable del ángulo de la hoja.

El no haber logrado la edición genética por *knock-out* para el gen BU1 se pudo deber a varios factores, tales como el diseño de los ARNg. Es posible que estos ARN guías no quedaran bien diseñados debido a que, para la fecha de su diseño, se contaba con muy poca información del genoma de caña de azúcar, para esa entonces se contaba con una herramienta conocida como *CTBE BLAST* la cual permite hacer alineamientos de una secuencia de interés contra la base de datos que correspondía a unos ensamblajes realizados en Brasil de la variedad SP 80-3280 (Riaño-Pachón and Mattiello 2017) sin embargo no todas las secuencias arrojaban un alineamiento confiable que correspondiera al gen BU1; por lo tanto, para el diseño también se



utilizó el genoma disponible de Sorgo (<http://www.plantgdb.org/SbGDB/>), ya que de las gramíneas secuenciadas esta es la más cercana filogenéticamente a caña de azúcar y la secuencia completa de este genoma es de libre acceso. Así mismo, a la fecha, no se han desarrollado de herramientas ni softwares específicos para diseño de ARN guías de caña y por ende en este trabajo la probabilidad de encontrar los verdaderos sitios *off-targets* fue menor y, por consiguiente, la eficiencia de los ARNg diseñados no fue tan alta.

De hecho, varios investigadores han encontrado que la aparición de mutaciones fuera del sitio objetivo (*off-target*) podría ser uno de los problemas de la edición genómica sobre todo para el uso agrícola, aunque no hay evidencia de los efectos deletéreos de los *off-target*. En organismos modificados genéticamente, varios autores afirman que algunas mutaciones fuera del objetivo dan como resultado mutaciones silenciosas o de pérdida de función, otras podrían provocar inmunogenicidad o toxicidad en los productos alimenticios al cambiar los aminoácidos dentro de una proteína, aunque no se ha documentado ningún efecto adverso resultante a partir de alimentos producidos a partir de plantas modificadas genéticamente (Goodman and Tetteh 2011) y por ende, tampoco se ha podido ver ningún efecto adverso de plantas editadas genéticamente. Los investigadores deben demostrar que no hay mutaciones significativas asociadas con riesgos potenciales para la salud o el medio ambiente. De lo contrario, el uso imprudente de la edición del genoma puede conducir a su rechazo en aplicaciones agrícolas y ambientales (Araki and Ishii 2015).

Otro factor que pudo influenciar el no haber logrado la edición del gen BU1 pudo haber sido el plásmido utilizado, ya que este vector no había sido usado en investigaciones previas. Este proyecto fue el primero en el que se disparó este plásmido en caña y como se puede observar en las Figura 29 y Figura 30 este vector fue diseñado con muchos elementos, por lo tanto, es posible que al tener demasiados artefactos en el vector puede haber ocasionado una expresión menor de Cas 9 para la edición genética o el promotor utilizado para dirigir la expresión de Cas9 no fue el adecuado.

El promotor para dirigir Cas9 utilizado en este proyecto es un promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor: CaMV 35S. En general, se ha encontrado que los promotores constitutivos, tales como la ubiquitina de maíz, ubiquitina de arroz o ubiquitina de *Arabidopsis*, y el virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) pueden cumplir los requerimientos para dirigir la Cas9 en monocotiledóneas y en dicotiledóneas para mediar una edición eficiente del

genoma en métodos de transformación basados en callo embriogénico. Según algunos autores, en muchos casos los promotores fuertes de ubiquitina producen eficiencias más altas de edición que el promotor CaMV 35S lo cual se ha reportado en transformación de caña de azúcar (Brumley et al. 2008). Esto tal vez es otro factor que pudo haber influenciado el no haber tenido edición genética para el gen BU1.

Así mismo, es probable que los eventos que resultaron no editados no recibieran el ARNg o Cas9 necesarios para generar las mutaciones. Otra alternativa es que los alelos pueden haber sido mutados pero aún conservan la función de tipo silvestre (Svitashev et al. 2015). Adicionalmente, se pudo haber producido un silenciamiento en una o todas las copias del gen BU1.

Diversos estudios han demostrado que utilizando una sola nucleasa y varios ARNg se pueden editar varios sitios del genoma simultáneamente, lo cual es especialmente interesante cuando se pretende editar genes de gran tamaño o familias de genes (Wolter, Schindele, and Puchta 2019). Por ejemplo, en 2014 varios investigadores desarrollaron una herramienta para integrar múltiples ARNg en un solo vector binario para la edición del genoma múltiple, construyeron seis vectores de módulos de ARNg, incluidos tres diseñados para dicotiledóneas y tres diseñados para monocotiledóneas (Xing et al. 2014). Estos métodos permitieron a los investigadores personalizar sus propios módulos de ARNg y ensamblar múltiples casetes de expresión de ARNg para la edición multiplex del genoma (Xing et al. 2014). Lo cual es muy útil para editar múltiples genes simultáneamente.

Por consiguiente, con esta idea en mente y con el ánimo de hacer la edición más efectiva se utilizó un vector policistrónico para esta investigación, queriendo entonces editar varias copias del gen BU1 y así lograr mayor eficiencia en la edición. Sin embargo, este factor también pudo haber afectado los resultados encontrados, ya que el arreglo policistrónico hace que haya repeticiones (ya de por sí el genoma de caña es altamente repetitivo), las cuales pueden llevar a re-arreglos durante la integración de ese sector o también pueden generar problemas asociados a la expresión de los ARNg. Adicionalmente, se pueden producir altos porcentajes de silenciamiento de los genes insertados precisamente por estructuras repetitivas, lo que puede llevar a que se esté expresando muy bien el casete de selección, pero no se esté expresando el casete de interés, lo que ya se ha reportado en transformación en caña de azúcar

en los que se da la expresión transitoria con el gen GUS pero poca o ninguna con los genes de interés (Joyce et al. 2010).

### **4.3 Ganancia de función: Resistencia a herbicidas con la modificación del gen ALS**

Los herbicidas que muestran baja toxicidad para especies cultivables juegan un papel importante en el control de las malezas en la agricultura moderna. Sin embargo, tales herbicidas selectivos a menudo están disponibles solo para las principales especies de cultivos (sorgo, arroz, maíz y trigo) debido a los altos costos de desarrollo. Una alternativa a la identificación de nuevos herbicidas selectivos es la modificación genética de especies de cultivos susceptibles para que sean resistentes a herbicidas no selectivos. Un método para lograr esto es a través de la transformación genética de plantas con resistentes a herbicidas. Los requisitos previos para tal enfoque son la capacidad de transformar las especies de interés y la disponibilidad de un gen que confiera resistencia a los herbicidas (Haughn et al. 1988).

Los genes y genomas en muchas especies de cultivos importantes a menudo están presentes en múltiples copias, debido a reordenamientos, duplicaciones y / o poliploidización. En algunos casos, todas las copias de un gen necesitarían ser blanco de mutación para dar como resultado una inactivación completa. Sin embargo, en algunos casos, solo una copia de una familia de genes requeriría edición para producir un fenotipo deseado (Svitashev et al., 2015).

En este estudio, se eligió el gen ALS para evaluar la capacidad del sistema Cas9- ARNg para facilitar la edición endógena de genes por recombinación homóloga (HDR) en callo embriogénico de caña de azúcar transformadas por biobalística. Se escogió este gen debido a que ha sido muy estudiado; en *Arabidopsis* por ejemplo investigadores encontraron un alto grado de resistencia a los herbicidas de las plantas transgénicas que portaban el gen ALS, por lo cual lo sugirieron como un marcador de selección útil para estudios de genética molecular de plantas (Haughn et al. 1988). Así mismo, la edición genética del gen ALS ha sido reportada previamente en maíz, en la cual, los investigadores probaron varios ARNg dirigidos a dos genes simultáneamente ALS1 y ALS2. Ellos reportaron que el tener un ARNg dirigido a ALS1 y ALS2 condujo a una baja recuperación de eventos estables, probablemente debido a la alta frecuencia de mutaciones *knock-out* bialélicas y también debido a la naturaleza del gen (Svitashev et al. 2015).

Otras investigaciones han reportado que el reemplazo mediado por recombinación homóloga del gen ALS con diferentes genes de resistencia a herbicidas condujo a plantas transgénicas tolerantes a herbicidas (Soda, Verma, and Giri 2018). También se desarrolló una caña de azúcar resistente a herbicidas a través del enfoque intragénico mediante la introducción de un gen ALS de sorgo mutado bajo el control del promotor de ubiquitina de *Sorghum* y la proteína de choque térmico de *Sorghum* (SbHSP18) 3'UTR (Dermawan et al. 2016). En esta investigación se diseñó un ARNg para el gen ALS y adicionalmente se introdujo una cadena molde con una mutación en la posición 653 (se puso el nucleótido T en lugar del G). Se obtuvieron dos plantas de caña de azúcar que mostraron ser positivas por ensayo de qPCR con sondas TaqMan, para modificación del gen ALS, estas plantas fueron los eventos ALS107 y ALS111.

El haber obtenido estas dos plantas editadas por HDR, es considerado un gran logro, teniendo en cuenta que el único reporte que existe de plantas de caña de azúcar editadas genéticamente mediante CRISPR/Cas9 es precisamente un macro-proyecto del Dr. Fredy Altpeter en el cual se incluyen plantas de otra variedad desarrolladas por el Dr. Tufan Oz y por otros investigadores e incluso se incluyeron los avances obtenidos en esta investigación (Oz et al. 2019). Todo esto abre un panorama importante de investigación en biotecnología y biología molecular para el cultivo de caña de azúcar, demostrando que es posible editar el genoma de caña mediante CRISPR/Cas9, metodología que podrá usarse en el futuro cercano con diferentes genes asociados con las principales variables de productividad del cultivo.

También es importante resaltar en este estudio, el haber logrado, mediante edición genómica una mutación puntual en el locus específico, ya que este gen está específicamente dirigido por los herbicidas imidazolinona (IMI) y sulfonilurea (SU) (Townsend et al., 2009). La edición del genoma mediante la inducción de mutaciones puntuales se puede utilizar en el mediano plazo, ya que es una forma precisa y eficiente para reemplazar la transformación genética la cual requiere de regulación ante entidades gubernamentales, comparada con la edición genética que bajo la Resolución N°29299 del 01 de agosto de 2018 por parte del ICA, permite el desarrollo de variedades editadas genéticamente que al final se pueden considerar como convencionales.

## 4.4 Consideraciones finales

La edición de genomas mediante una de las nuevas herramientas de mejoramiento como CRISPR/Cas9 no solo facilitará la investigación básica, sino también aplicada, lo cual acelerará el fitomejoramiento genético de variedades y el desarrollo de nuevo germoplasma con miras a una mejor productividad del cultivo. La utilización de la metodología CRISPR para mejorar el germoplasma es particularmente importante en el contexto del cambio climático global, así como también frente a los desafíos agrícolas, ambientales y ecológicos actuales. Se espera que esta metodología permita el desarrollo de una agricultura más sostenible, reducir la huella ambiental de la agricultura y adaptar las variedades a un clima cambiante. Por ejemplo, los cultivos que sean más tolerantes a los entornos que cambian rápidamente y sean más resistentes a plagas y enfermedades o a fenómenos como el niño y la niña serán cruciales para el éxito de los enfoques de la producción de alimentos del futuro.

Este proyecto para el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar, Cenicaña, permitirá a mediano y largo plazo la generación de plantas editadas con características que sean de importancia para la industria azucarera tales como: supresión de floración, uso eficiente del agua, uso eficiente del nitrógeno, alta producción de biomasa y sacarosa, así como resistencia a las principales enfermedades que afectan el cultivo de la caña. Adicionalmente, la edición genómica podría utilizarse en el mediano plazo en la validación de genes identificados a partir de estudios de expresión génica, así como a partir de estudios de mapeo genético y secuenciación ya que al ser editados o mutados pueden estudiarse a nivel fenotípico y determinar el efecto del impacto agronómico sobre una determinada característica de interés comercial.

En esta investigación mediante biobalística se logró transformar eficientemente caña de azúcar (en el caso del gen NPTII: 80.6% para el tratamiento 1 y 83.9% tratamiento 2 y en el caso del gen Cas9: 80.6% para el tratamiento 1 y 77.7% para el tratamiento 2), sin embargo, la edición genética se logró parcialmente. En el caso de la edición del gen BU1 para obtener la pérdida de función (NHEJ) no se obtuvo ninguna planta editada. Sin embargo, para la edición del gen ALS para lograr ganancia de función (HDR) se obtuvieron dos plantas de caña o eventos editados denominados ALS107 y ALS111, plantas potencialmente resistentes a herbicidas. Por lo tanto, se puede afirmar que editar el genoma de caña de azúcar mediante CRISPR/Cas9

resultó bastante complejo y se requiere realizar ajustes a la metodología para lograr aumentar la eficiencia de edición ya sea por pérdida o ganancia de función de un gen determinado. Pese a que la edición genética obtenida en esta investigación fue baja, es un resultado muy importante, que vale la pena destacar por ser unas de las primeras plantas de caña editadas mediante CRISPR/Cas9 para ganancia de función (HDR) en caña de azúcar reportadas hasta la fecha, teniendo en cuenta que solo se han mostrado avances de las investigaciones llevadas a cabo en UF en el Congreso de la Sociedad de Biología In-Vitro, realizado en Tampa-EE.UU. en el 2019, valdría la pena escribir un artículo donde se evidencien los resultados obtenidos en esta investigación, junto con los datos de obtenidos por (Oz et al. 2019).

## ***5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES***

### **5.1 Conclusiones**

- Editar un genoma tan complejo como es el de caña de azúcar supone un reto mayor al de otros cultivos.
- La edición genética de caña de azúcar usando CRISPRr/Cas9 para ganancia de función (HDR) por recombinación homóloga fue posible para el gen ALS donde se obtuvieron dos plantas de caña editadas ALS107 y ALS111, lo que significa que esto resultados complementan los resultados obtenidos por otros investigadores también en UF y podría ser el primer reporte de edición genética en caña usando HDR.
- En esta investigación se logró transformar eficientemente la caña de azúcar usando la metodología de biobalística utilizada en el laboratorio del Dr. Altpeter. Con el gen NPTII se logró una eficiencia de transformación del 18.2% en el tratamiento 1 y 18.4% en el tratamiento 2. Con el gen Cas 9 se logró una eficiencia de transformación del 18.2% para el tratamiento 1 y 17.1% para el tratamiento 2.

- La edición genética para el caso de pérdida de función (NHEJ) del gen BU1, responsable del ángulo de la hoja, no se logró eficientemente en este estudio, ya que en las pruebas moleculares realizada no fue posible detectar ninguna planta editada.
- La edición genética de caña de azúcar es un proceso complejo que requiere averiguar muy bien sobre el gen de interés y el número de copias de cada gen a editar dentro del genoma, así como conocer su secuencia para evitar *off-targets* en el diseño de los ARNg que puedan influir en la aplicación de CRISPR.
- El no tener disponibilidad de la secuencia completa del genoma de caña al momento de realizar esta investigación dificultó la búsqueda de la correcta secuencia del gen BU1 al igual que el diseño de los ARNg y la validación de los mismos, ya que los softwares disponibles para el diseño de los ARNg se basan en la información disponible de organismos secuenciados. En esta investigación se utilizó el genoma de Sorgo, por lo tanto, esto pudo haber afectado el no haber logrado editar eficientemente el gen BU1 en las plantas de caña de azúcar.

## 5.2 Recomendaciones

Se recomienda confirmar la edición de las plantas ALS107 y ALS111 mediante secuenciación del gen BU1 y del gen ALS. Así mismo, se recomienda hacer evaluaciones de resistencia a herbicidas en invernadero de las posibles plantas editadas y corroborar si esta edición les confirió resistencia a los herbicidas de la familia sulfonilurea. Adicionalmente, en ensayos de resistencias a herbicidas sería recomendable hacer selección con el herbicida en etapa de callo, como una manera eficiente de evitar escapes y a también para corroborar la edición del material justo después de los disparos.

Para hacer edición de caña de azúcar en el futuro, se recomienda desarrollar un protocolo libre de ADN para la mutagénesis dirigida con el uso del complejo de la ribonucleoproteína (RNP) el cual está compuesto de la enzima Cas9 purificada y los ARNsg transcritos *in-vitro* o sintetizados. De esta manera, se evitará el uso de plásmidos y la introducción de ADN foráneo, por lo tanto, se facilitará la regulación de las plantas que resulten editadas genéticamente para ser consideradas como plantas obtenidas por métodos de mejoramiento convencionales.

Por último y teniendo en cuenta que actualmente se cuenta con diferentes genomas de caña secuenciados (Riaño-Pachón and Mattiello 2017; Zhang et al. 2018; Garsmeur et al. 2018) incluido el genoma de una variedad colombiana (Trujillo 2020), trabajo llevado a cabo en Cenicaña, se recomienda utilizar estas bases de datos para la búsqueda de las secuencias correctas de los genes de interés, así como el desarrollo de una aplicación que permita diseñar los ARNg e identificar las regiones *off-target* con base en el genoma de caña, y así aumentar la probabilidad de editar caña de azúcar eficientemente.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Addgene. 2017. “CRISPR 101: A Desktop Resource.” [https://doi.org/10.1016/S1058-2746\(99\)90151-9](https://doi.org/10.1016/S1058-2746(99)90151-9).
- . 2019. “CRISPR History and Development for Genome Engineering.” 2019. <https://www.addgene.org/crispr/history/>.
- Aglawe, Supriya B., Kalyani M. Barbadikar, Satendra K. Mangrauthia, and M. Sheshu Madhav. 2018. “New Breeding Technique ‘Genome Editing’ for Crop Improvement: Applications, Potentials and Challenges.” *3 Biotech* 8 (8): 1–20. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1355-3>.
- Araki, Motoko, and Tetsuya Ishii. 2015. “Towards Social Acceptance of Plant Breeding by Genome Editing.” *Trends in Plant Science* 20 (3): 145–49. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.010>.
- Baltes, Nicholas J., and Daniel F. Voytas. 2015. “Enabling Plant Synthetic Biology through Genome Engineering.” *Trends in Biotechnology* 33 (2): 120–31. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.11.008>.
- Barrangou, Rodolphe. 2013. “CRISPR-Cas Systems and RNA-Guided Interference.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4 (3): 267–78. <https://doi.org/10.1002/wrna.1159>.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A Romero, and Philippe Horvath. 2007. “CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes.” *Science* 315 (5819): 1709 LP – 1712.
- Belhaj, Khaoula, Angela Chaparro-Garcia, Sophien Kamoun, Vladimir Nekrasov, R Sorek, CM Lawrence, B Wiedenheft, et al. 2013. “Plant Genome Editing Made Easy: Targeted Mutagenesis in Model and Crop Plants Using the CRISPR/Cas System.” *Plant Methods* 9 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-39>.
- Belkhadir, Youssef, and Joanne Chory. 2006. “Brassinosteroid Signaling: A Paradigm for Steroid Hormone Signaling from the Cell Surface.” *Science* 314 (5804): 1410 LP – 1411. <https://doi.org/10.1126/science.1134040>.
- Breitler, J.C, A Labeyrie, D Meynard, T Legavre, and E Guiderdoni. 2002. “Efficient Microprojectile Bombardment-Mediated Transformation of Rice Using Gene Cassettes.” *Theor Appl Genet* 104: 709–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00122-001-0786-z>.
- Brumbley, Stevens M, Sandy J Snyman, Annathurai Gnanasambandam, Priya Joyce, Scott R Hermann, Jorge A G da Silva, Richard B McQualter, et al. 2008. “Sugarcane.” *Compendium of Transgenic Crop Plants*. Major Reference Works. <https://doi.org/doi:10.1002/9781405181099.k0701>.
- Cai, Yupeng, Li Chen, Xiujie Liu, Chen Guo, Shi Sun, Cunxiang Wu, Bingjun Jiang, Tianfu Han, and Wensheng Hou. 2018. “CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of GmFT2a Delays Flowering Time in Soya Bean.” *Plant Biotechnology Journal* 16 (1): 176–85. <https://doi.org/10.1111/pbi.12758>.

- Cano-Delgado, A. 2004. "BRL1 and BRL3 Are Novel Brassinosteroid Receptors That Function in Vascular Differentiation in Arabidopsis." *Development* 131 (21): 5341–51. <https://doi.org/10.1242/dev.01403>.
- Cao, Heping, and Shankun Chen. 1995. *Brassinosteroid-Induced Rice Lamina Joint Inclination and Its Relation to Indole-3-Acetic Acid and Ethylene*. *Plant Growth Regulation*. Vol. 16. <https://doi.org/10.1007/BF00029540>.
- Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia-Cenicaña. 1995. *El Cultivo de La Caña En La Zona Azucarera de Colombia*. Edited by C. Cassalett, J. Torres, and C. Isaacs.
- Chylinski, Krzysztof, Kira S. Makarova, Emmanuelle Charpentier, and Eugene V. Koonin. 2014. "Classification and Evolution of Type II CRISPR-Cas Systems." *Nucleic Acids Research* 42 (10): 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>.
- Clark, A. J., G. Harold, and F. E. Yull. 1996. "Mammalian CDNA and Prokaryotic Reporter Sequences Silence Adjacent Transgenes in Transgenic Mice." *Nucleic Acids Research* 25 (5): 1009–14. <https://doi.org/10.1093/nar/25.5.1009>.
- Clouse, Steven D, and Jenneth M Sasse. 1998. "BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49 (1): 427–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.427>.
- Cong, Le, F Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D Hsu, et al. 2013. "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 819–23. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
- Doench, John G, Nicolo Fusi, Meagan Sullender, Mudra Hegde, Emma W Vaimberg, Katherine F Donovan, Ian Smith, et al. 2016. "Optimized SgRNA Design to Maximize Activity and Minimize Off-Target Effects of CRISPR-Cas9." *Nature Biotechnology* 34 (2): 184–91. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>.
- Drewry, Darren T, Praveen Kumar, and Stephen P Long. 2014. "Simultaneous Improvement in Productivity, Water Use, and Albedo through Crop Structural Modification." *Global Change Biology* 20 (6): 1955–67. <https://doi.org/10.1111/gcb.12567>.
- Duan, Ke, Li Li, Peng Hu, Shu-Ping Xu, Zhi-Hong Xu, and Hong-Wei Xue. 2006. "A Brassinolide-Suppressed Rice MADS-Box Transcription Factor, OsMDP1, Has a Negative Regulatory Role in BR Signaling." *The Plant Journal* 47 (4): 519–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02804.x>.
- Duvick, D N. 2005. *Genetic Progress in Yield of United States Maize (Zea Mays L.)*. *Maydica*. Vol. 50.
- Eid, A, and M M Mahfouz. 2016. "Genome Editing: The Road of CRISPR/Cas9 from Bench to Clinic." *Exp Mol Med* 48 (10): e265. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.111>.
- Endo, Masaki, and Seiichi Toki. 2013. "Creation of Herbicide-Tolerant Crops by Gene Targeting." *Journal of Pesticide Science* 38 (2): 49–59. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D12-073>.
- Engler, Carola, Romy Kandzia, and Sylvestre Marillonnet. 2008. "A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability." *PLoS ONE* 3 (11).

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>.
- Fu, X, LT Duc, S Fontana, BB Bong, P Tinjuangjun, D Sudhakar, RM Twyman, P Christou, and A Kohli. 2000. "Linear Transgene Constructs Lacking Vector Backbone Sequences Generate Low-Copy-Number Transgenic Plants with Simple Integration Patterns." *Transgenic Res* 9: 11–19.
- Gan, Lijun, Hong Wu, Dapeng Wu, Zhanfang Zhang, Zhengfei Guo, Na Yang, Kai Xia, et al. 2015. "Methyl Jasmonate Inhibits Lamina Joint Inclination by Repressing Brassinosteroid Biosynthesis and Signaling in Rice." *Plant Science* 241: 238–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.012>.
- Gao, Feng, Xiao Z Shen, Feng Jiang, Yongqiang Wu, and Chunyu Han. 2016. "DNA-Guided Genome Editing Using the Natronobacterium Gregoryi Argonaute." *Nature Biotechnology*, no. May: 1–7. <https://doi.org/10.1038/nbt.3547>.
- Gao, Yangbin, and Yunde Zhao. 2014. "Specific and Heritable Gene Editing in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (12): 4357 LP – 4358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402295111>.
- Garsmeur, Olivier, Gaetan Droc, Rudie Antonise, Jane Grimwood, Bernard Potier, Karen Aitken, Jerry Jenkins, et al. 2018. "A Mosaic Monoploid Reference Sequence for the Highly Complex Genome of Sugarcane." *Nature Communications* 9 (1): 2638. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05051-5>.
- Gasiunas, Giedrius, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, and Virginijus Siksnys. 2012. "Cas9-CrRNA Ribonucleoprotein Complex Mediates Specific DNA Cleavage for Adaptive Immunity in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (39): 2579–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
- Gómez-Mena, Concha. 2020. "La Edición De Genomas: Plantas a La Carta." *Mètode Revista de Difusió de La Investigació*, no. 11: 45–49. <https://doi.org/10.7203/metode.11.15507>.
- Goodman, Richard E, and Afua O Tetteh. 2011. "Suggested Improvements for the Allergenicity Assessment of Genetically Modified Plants Used in Foods." *Current Allergy and Asthma Reports* 11 (4): 317–24. <https://doi.org/10.1007/s11882-011-0195-6>.
- Hammer, G, Zhanshan Dong, Greg Mclean, Al Doherty, Carlos Messina, J Schussler, Chris Zinselmeier, Steve Paszkiewicz, and Mark Cooper. 2009. *Can Changes in Canopy and/or Root System Architecture Explain Historical Maize Yield Trends in the US Corn Belt? Crop Science*. Vol. 49. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.03.0152>.
- Hao Liu, Yuduan Ding, Yanqing Zhou, Wenqi Jin, Kabin Xie, Chen, Ling-Ling. 2016. "CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants," 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.003>.
- Hartung, Frank, and Joachim Schiemann. 2014. "Precise Plant Breeding Using New Genome Editing Techniques: Opportunities, Safety and Regulation in the EU." *The Plant Journal* 78 (5): 742–52. <https://doi.org/10.1111/tbj.12413>.
- Haughn, George W, Julie Smith, Barbara Mazur, and Chris Somerville. 1988. "Transformation

- with a Mutant Arabidopsis Acetolactate Synthase Gene Renders Tobacco Resistant to Sulfonylurea Herbicides,” 266–71.
- Heidrich, Nadja, and Jörg Vogel. 2013. “Same Same but Different: New Structural Insight into CRISPR-Cas Complexes.” *Molecular Cell* 52 (1): 4–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.023>.
- Holman, Christopher M. 2019. “A Fractured International Response to CRISPR-Enabled Gene Editing of Agricultural Products.” *Biotechnology Law Report* 38 (1): 3–23.  
<https://doi.org/10.1089/blr.2019.29100.cmh>.
- Hong, Zhi, Miyako Ueguchi-Tanaka, and Makoto Matsuoka. 2004. “Brassinosteroids and Rice Architecture.” *Journal of Pesticide Science* 29 (3): 184–88.  
<https://doi.org/10.1584/jpestics.29.184>.
- Hong, Zhi, Miyako Ueguchi-Tanaka, Kazuto Umemura, Sakurako Uozu, Shozo Fujioka, Suguru Takatsuto, Shigeo Yoshida, Motoyuki Ashikari, Hidemi Kitano, and Makoto Matsuoka. 2003a. “A Rice Brassinosteroid-Deficient Mutant, <Em>Ebisu Dwarf</Em> (<Em>D2</Em>), Is Caused by a Loss of Function of a New Member of Cytochrome P450.” *The Plant Cell* 15 (12): 2900 LP – 2910.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.014712>.
- . 2003b. “A Rice Brassinosteroid-Deficient Mutant, <Em>Ebisu Dwarf</Em> (<Em>D2</Em>), Is Caused by a Loss of Function of a New Member of Cytochrome P450.” *The Plant Cell* 15 (12): 2900 LP – 2910.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.014712>.
- Horizon. 2018. “CRISPR-Cas9 Gene Editing Applications.” 2018.  
<https://horizondiscovery.com/en/applications/crispr-cas9/crispr-cas9-gene-editing-applications>.
- Hoshikawa, Kiyochika. 1989. *The Growing Rice Plant: An Anatomical Monograph*. Edited by Tokyo : Nobunkyo. 1st ed. Tokyo.
- ICA, Instituto Colombiano Agropecuario. 2018. “Resolución-29299-Del-01-de-Agosto-de-2018.Pdf.”
- Jiang, Wenzhi, Huanbin Zhou, Honghao Bi, Michael Fromm, Bing Yang, and Donald P. Weeks. 2013. “Demonstration of CRISPR/Cas9/SgRNA-Mediated Targeted Gene Modification in Arabidopsis, Tobacco, Sorghum and Rice.” *Nucleic Acids Research* 41 (20): 1–12.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science* 337 (6096): 816 LP – 821.  
<http://science.sciencemag.org/content/337/6096/816.abstract>.
- Jones, Huw D. 2015. “Regulatory Uncertainty over Genome Editing.” *Nature Plants* 1 (1): 14011.  
<https://doi.org/10.1038/nplants.2014.11>.
- Joyce, Priya, Melissa Kuwahata, Nicole Turner, and Prakash Lakshmanan. 2010. “Selection System and Co-Cultivation Medium Are Important Determinants of Agrobacterium-Mediated

- Transformation of Sugarcane.” *Plant Cell Reports* 29 (2): 173–83.  
<https://doi.org/10.1007/s00299-009-0810-3>.
- Kinoshita, Toshinori, Ana Caño-Delgado, Hideharu Seto, Sayoko Hiranuma, Shozo Fujioka, Shigeo Yoshida, and Joanne Chory. 2005. “Binding of Brassinosteroids to the Extracellular Domain of Plant Receptor Kinase BRI1.” *Nature* 433 (January): 167.  
<https://doi.org/10.1038/nature03227>.
- Kohli, Ajay, Simon Griffiths, Natalia Palacios, Richard M. Twyman, Philippe Vain, David A. Laurie, and Paul Christou. 1999. “Molecular Characterization of Transforming Plasmid Rearrangements in Transgenic Rice Reveals a Recombination Hotspot in the CaMV 35S Promoter and Confirms the Predominance of Microhomology Mediated Recombination.” *Plant Journal* 17 (6): 591–601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00399.x>.
- Kumar, Vinay, and Mukesh Jain. 2015. “The CRISPR-Cas System for Plant Genome Editing: Advances and Opportunities.” *Journal of Experimental Botany* 66 (1): 47–57.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru429>.
- Lambert, R J, and R R Johnson. 1978. “Leaf Angle, Tassel Morphology, and the Performance of Maize Hybrids1.” *Crop Science* 18: 499–502.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800030037x>.
- LaRossa, R. A., and J. V. Schloss. 1984. “The Sulfonylurea Herbicide Sulfometuron Methyl Is an Extremely Potent and Selective Inhibitor of Acetolactate Synthase in *Salmonella Typhimurium*.” *Journal of Biological Chemistry* 259 (14): 8753–57.
- Lawrenson, Tom, Oluwaseyi Shorinola, Nicola Stacey, Chengdao Li, Lars Østergaard, Nicola Patron, Cristobal Uauy, and Wendy Harwood. 2015. “Induction of Targeted, Heritable Mutations in Barley and Brassica Oleracea Using RNA-Guided Cas9 Nuclease.” *Genome Biology* 16 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0826-7>.
- Lee, Sumin, Seunghye Lee, Ki-Young Yang, Young-Mi Kim, So-Yeon Park, Soo Young Kim, and Moon-Soo Soh. 2006. “Overexpression of PRE1 and Its Homologous Genes Activates Gibberellin-Dependent Responses in *Arabidopsis thaliana*.” *Plant and Cell Physiology* 47 (5): 591–600. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj026>.
- Lee, and Tollenaar. 2007. *Physiological Basis of Successful Breeding Strategies for Maize Grain Yield*. *Crop Science*. Vol. 47. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.04.0010IPBS>.
- Li, Jian Feng, Julie E. Norville, John Aach, Matthew McCormack, Dandan Zhang, Jenifer Bush, George M. Church, and Jen Sheen. 2013. “Multiplex and Homologous Recombination-Mediated Genome Editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* Using Guide RNA and Cas9.” *Nature Biotechnology* 31 (8): 688–91. <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>.
- Li, Jianming, and Joanne Chory. 1997. “A Putative Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase Involved in Brassinosteroid Signal Transduction.” *Cell* 90 (5): 929–38.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80357-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80357-8).
- Liang, Zhen, Kunling Chen, Tingdong Li, Yi Zhang, Yanpeng Wang, Qian Zhao, Jinxing Liu, et al. 2017. “ARTICLE Efficient DNA-Free Genome Editing of Bread Wheat Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes.” *Nature Publishing Group* 8: 1–5.

- <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>.
- Ma, Xingliang, Qunyu Zhang, Qinlong Zhu, Wei Liu, Yan Chen, Rong Qiu, Bin Wang, et al. 2015. "A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants." *Molecular Plant* 8 (8): 1274–84. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>.
- Ma, Xingliang, Qinlong Zhu, Yuanling Chen, and Yao Guang Liu. 2016. "CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications." *Molecular Plant*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.009>.
- Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J. J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, et al. 2011. "Evolution and Classification of the CRISPR–Cas Systems." *Nature Reviews Microbiology* 9 (6): 467–77. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- Makarova, Kira S., Yuri I. Wolf, Omer S. Alkhnbashi, Fabrizio Costa, Shiraz A. Shah, Sita J. Saunders, Rodolphe Barrangou, et al. 2015. "An Updated Evolutionary Classification of CRISPR-Cas Systems." *Nature Reviews. Microbiology* 13 (11): 722–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- Makarova, Kira S., Yuri I. Wolf, and Eugene V. Koonin. 2013. "Comparative Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria." *Nucleic Acids Research* 41 (8): 4360–77. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt157>.
- Mansfield, Brian, and Rita Mumm. 2013. *Survey of Plant Density Tolerance in US Maize Germplasm*. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.04.0252>.
- Melero Royo, Sergio, Nicole Martínez-García, and María Luz Centeno Martín. 2020. "Edición Genética Por CRISPR-Cas y Sus Aplicaciones En La Mejora de Cultivos." *Ambiociencias* 3021 (17): 14. <https://doi.org/10.18002/ambioc.v0i17.6206>.
- Metje-Sprink, Janina, Jochen Menz, Dominik Modrzejewski, and Thorben Sprink. 2019. "DNA-Free Genome Editing: Past, Present and Future." *Frontiers in Plant Science* 9 (January): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01957>.
- Mikami, Masafumi, Seiichi Toki, and Masaki Endo. 2015. "Comparison of CRISPR/Cas9 Expression Constructs for Efficient Targeted Mutagenesis in Rice." *Plant Molecular Biology* 88 (6): 561–72. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0342-x>.
- Mojica, F. J M, César Díez-Villaseñor, Jesús García-Martínez, and Elena Soria. 2005. "Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements." *Journal of Molecular Evolution* 60 (2): 174–82. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.
- Moore, P H, and F C Botha. 2013. *Sugarcane: Physiology, Biochemistry and Functional Biology*. World Agriculture Series. Wiley. <https://books.google.com.co/books?id=-334nQEACAAJ>.
- Moreno, M A, L C Harper, R W Krueger, and M Dellaporta, S L Freeling. 1997. "Liguleless1 Encodes a Nuclear-Localized Protein Required for Induction of Ligules and Auricles During Maize Leaf Organogenesis." *Genes & Development* 11 (5): 616–28. <https://doi.org/10.1101/gad.11.5.616>.

- Mori, Masaki, Takahito Nomura, Hisako Ooka, Masumi Ishizaka, Takao Yokota, Kazuhiko Sugimoto, Ken Okabe, et al. 2002. "Isolation and Characterization of a Rice Dwarf Mutant with a Defect in Brassinosteroid Biosynthesis." *Plant Physiology* 130 (3): 1152 LP – 1161. <https://doi.org/10.1104/pp.007179>.
- Nagamangala Kanchiswamy, Chidananda, Daniel James Sargent, Riccardo Velasco, Massimo E Maffei, and Mickael Malnoy. 2015. "Looking Forward to Genetically Edited Fruit Crops." *Trends in Biotechnology* 33 (2): 62–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.07.003>.
- Nakamura, Ayako, Shozo Fujioka, Hidehiko Sunohara, Noriko Kamiya, Zhi Hong, Yoshiaki Inukai, Kotaro Miura, et al. 2006. "The Role of <Em>OsBRI1</Em> and Its Homologous Genes, <Em>OsBRL1</Em> and <Em>OsBRL3</Em>, in Rice." *Plant Physiology* 140 (2): 580 LP – 590. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072330>.
- Nakashita, Hideo, Michiko Yasuda, Takako Nitta, Tadao Asami, Shozo Fujioka, Yuko Arai, Katsuhiko Sekimata, Suguru Takatsuto, Isamu Yamaguchi, and Shigeo Yoshida. 2003. "Brassinosteroid Functions in a Broad Range of Disease Resistance in Tobacco and Rice." *The Plant Journal* 33 (5): 887–98. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01675.x>.
- Nekrasov, Vladimir, Brian Staskawicz, Detlef Weigel, Jonathan D G Jones, and Sophien Kamoun. 2013. "Targeted Mutagenesis in the Model Plant *Nicotiana Benthamiana* Using Cas9 RNA-Guided Endonuclease." *Nature Biotechnology* 31 (August): 691. <https://doi.org/10.1038/nbt.2655>.
- New England Biolabs. 2007. "CRISPR / Cas9 and Targeted Genome Editing : A New Era in Molecular Biology." *New England BioLabs*, no. Figure 1: 1–4. <papers2://publication/uuid/580A8CEB-0A7F-4743-8E49-9EADD2A9D1B8>.
- Oost, John van der, Matthijs M. Jore, Edze R. Westra, Magnus Lundgren, and Stan J.J. Brouns. 2009. "CRISPR-Based Adaptive and Heritable Immunity in Prokaryotes." *Trends in Biochemical Sciences* 34 (8): 401–7. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.05.002>.
- Oost, John van der, Edze R Westra, Ryan N Jackson, and Blake Wiedenheft. 2014. "Unravelling the Structural and Mechanistic Basis of CRISPR-Cas Systems." *Nature Reviews. Microbiology* 12 (7): 479–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3279>.
- Ortigosa, Andrés, Selena Gimenez-Ibanez, Nathalie Leonhardt, and Roberto Solano. 2019. "Design of a Bacterial Speck Resistant Tomato by CRISPR/Cas9-Mediated Editing of *SlJAZ2*." *Plant Biotechnology Journal* 17 (3): 665–73. <https://doi.org/10.1111/pbi.13006>.
- Osakabe, Yuriko, Zhenchang Liang, Chong Ren, Chikako Nishitani, Keishi Osakabe, Masato Wada, Sadao Komori, et al. 2018. "CRISPR–Cas9-Mediated Genome Editing in Apple and Grapevine." *Nature Protocols* 13 (12): 2844–63. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0067-9>.
- Oz, Tufan Mehmet, Ratna Karan, Fredy Altpeter, and Aldo Merotto. 2019. "Targeted Precision Nucleotide Substitutions in Sugarcane Following CRISPR/Cas9 and Template Mediated Genome Editing Confer 'Gain of Function.'" In *Meeting of the Society for In Vitro Biology*. Tampa, Florida.
- Pendleton, J W, G E Smith, S R Winter, and T J Johnston. 1968. "Field Investigations of the

- Relationships of Leaf Angle in Corn (*Zea Mays* L.) to Grain Yield and Apparent Photosynthesis1.” *Agronomy Journal* 60: 422–24.  
<https://doi.org/10.2134/agronj1968.00021962006000040027x>.
- Peng, Aihong, Shanchun Chen, Tiangang Lei, Lanzhen Xu, Yongrui He, Liu Wu, Lixiao Yao, and Xiuping Zou. 2017. “Engineering Canker-Resistant Plants through CRISPR/Cas9-Targeted Editing of the Susceptibility Gene *CsLOB1* Promoter in Citrus.” *Plant Biotechnology Journal* 15 (12): 1509–19. <https://doi.org/10.1111/pbi.12733>.
- Pinto, L R, A A F Garcia, M M Pastina, L H M Teixeira, J A Bressiani, E C Ulian, M A P Bidoia, and A P Souza. 2010. “Analysis of Genomic and Functional RFLP Derived Markers Associated with Sucrose Content, Fiber and Yield QTLs in a Sugarcane (*Saccharum* Spp.) Commercial Cross.” *Euphytica* 172 (3): 313–27. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9988-2>.
- Porebski, Sue, L Grant Bailey, and Bernard R Baum. 1997. “Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components.” *Plant Molecular Biology Reporter* 15 (1): 8–15.  
<https://doi.org/10.1007/BF02772108>.
- Rath, Devashish, Lina Amlinger, Archana Rath, and Magnus Lundgren. 2015. “The CRISPR-Cas Immune System: Biology, Mechanisms and Applications.” *Biochimie* 117: 119–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>.
- Riaño-Pachón, Diego Mauricio, and Lucia Mattiello. 2017. “Draft Genome Sequencing of the Sugarcane Hybrid SP80-3280.” *F1000Research* 6 (0): 861.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.11859.1>.
- Sakamoto, Tomoaki, Yoichi Morinaka, Toshiyuki Ohnishi, Hidehiko Sunohara, Shozo Fujioka, Miyako Ueguchi-Tanaka, Masaharu Mizutani, et al. 2006. “Erect Leaves Caused by Brassinosteroid Deficiency Increase Biomass Production and Grain Yield in Rice.” *Nature Biotechnology* 24 (December): 105. <https://doi.org/10.1038/nbt1173>.
- Samson, Julie E, Alfonso H Magadán, Mourad Sabri, and Sylvain Moineau. 2013. “Revenge of the Phages : Defeating Bacterial Defences” 11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3096>.
- Sánchez-León, Susana, Javier Gil-Humanes, Carmen V. Ozuna, María J. Giménez, Carolina Sousa, Daniel F. Voytas, and Francisco Barro. 2018. “Low-Gluten, Nontransgenic Wheat Engineered with CRISPR/Cas9.” *Plant Biotechnology Journal* 16 (4): 902–10.  
<https://doi.org/10.1111/pbi.12837>.
- Sauer, Noel J, Jerry Mozoruk, Ryan B Miller, Zachary J Warburg, Keith A Walker, Peter R Beetham, Christian R Schöpke, and Greg F W Gocal. 2016. “Oligonucleotide-Directed Mutagenesis for Precision Gene Editing.” *Plant Biotechnology Journal* 14 (2): 496–502.  
<https://doi.org/10.1111/pbi.12496>.
- Schimpl, Simon, and Holger Puchta. 2016. “Revolutionizing Plant Biology: Multiple Ways of Genome Engineering by CRISPR/Cas.” *Plant Methods*. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0103-0>.
- Shah, Tariq, Tayyaba Andleeb, Sadia Lateef, and Ali Noor. 2018. “Genome Editing in Plants: Advancing Crop Transformation and Overview of Tools ☆.”



- <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.009>.
- Shan, Qiwei, Yanpeng Wang, Jun Li, Yi Zhang, Kunling Chen, Zhen Liang, Kang Zhang, et al. 2013. "Targeted Genome Modification of Crop Plants Using a CRISPR-Cas System." *Nature Biotechnology* 31 (August): 686. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>.
- Shaner, Dale L., Paul C. Anderson, and Mark A. Stidham. 1984. "Imidazolinones: POTENT INHIBITORS OF ACETOHYDROXYACID SYNTHASE." *Plant Physiol.* 76: 545–46. <https://doi.org/10.1017/S0022029900033598>.
- Sinclair, Thomas R, and John E Sheehy. 1999. "Erect Leaves and Photosynthesis in Rice." *Science* 283 (5407): 1455 LP – 1455. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1455c>.
- Smith, J. K., J. V. Schloss, and B. J. Mazur. 1989. "Functional Expression of Plant Acetolactate Synthase Genes in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (11): 4179–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.11.4179>.
- Soda, Neelam, Lokesh Verma, and Jitender Giri. 2018. "CRISPR-Cas9 Based Plant Genome Editing: Significance, Opportunities and Recent Advances." *Plant Physiology and Biochemistry* 131 (October 2017): 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.024>.
- Soyk, Sebastian, Niels A Müller, Soon Ju Park, Inga Schmalenbach, Ke Jiang, Ryosuke Hayama, Lei Zhang, Joyce Van Eck, José M Jiménez-Gómez, and Zachary B Lippman. 2017. "Variation in the Flowering Gene SELF PRUNING 5G Promotes Day-Neutrality and Early Yield in Tomato." *Nature Genetics* 49 (1): 162–68. <https://doi.org/10.1038/ng.3733>.
- Suttle, Curtis a. 2007. "Marine Viruses--Major Players in the Global Ecosystem." *Nature Reviews. Microbiology* 5 (10): 801–12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>.
- Svitashev, Sergei, Christine Schwartz, Brian Lenderts, Joshua K. Young, and A. Mark Cigan. 2016. "Genome Editing in Maize Directed by CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes." *Nature Communications* 7: 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13274>.
- Svitashev, Sergei, Joshua K. Young, Christine Schwartz, Huirong Gao, S. Carl Falco, and A. Mark Cigan. 2015. "Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA." *Plant Physiology* 169 (2): 931–45. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00793>.
- Szekeres, Miklós, Kinga Németh, Zsuzsanna Koncz-Kálmán, Jaideep Mathur, Annette Kauschmann, Thomas Altmann, George P Rédei, Ferenc Nagy, Jeff Schell, and Csaba Koncz. 1996. "Brassinosteroids Rescue the Deficiency of CYP90, a Cytochrome P450, Controlling Cell Elongation and De-Etiolation in Arabidopsis." *Cell* 85 (2): 171–82. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81094-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81094-6).
- Tanabe, Sumiyo, Motoyuki Ashikari, Shozo Fujioka, Suguru Takatsuto, Shigeo Yoshida, Masahiro Yano, Atsushi Yoshimura, et al. 2005a. "A Novel Cytochrome P450 Is Implicated in Brassinosteroid Biosynthesis via the Characterization of a Rice Dwarf Mutant, <Em>Dwarf11</Em>, with Reduced Seed Length." *The Plant Cell* 17 (3): 776 LP – 790. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024950>.
- . 2005b. "A Novel Cytochrome P450 Is Implicated in Brassinosteroid Biosynthesis via the

- Characterization of a Rice Dwarf Mutant, <Em>Dwarf11</Em>, with Reduced Seed Length.” *The Plant Cell* 17 (3): 776 LP – 790. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024950>.
- Tanaka, A., H. Nakagawa, C. Tomita, Z. Shimatani, M. Ohtake, T. Nomura, C.-J. Jiang, et al. 2009. “BRASSINOSTEROID UPREGULATED1, Encoding a Helix-Loop-Helix Protein, Is a Novel Gene Involved in Brassinosteroid Signaling and Controls Bending of the Lamina Joint in Rice.” *Plant Physiology* 151 (2): 669–80. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140806>.
- Taparia, Yogesh, Maria Gallo, and Fredy Altpeter. 2012. “Comparison of Direct and Indirect Embryogenesis Protocols, Biolistic Gene Transfer and Selection Parameters for Efficient Genetic Transformation of Sugarcane.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111 (2): 131–41. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0177-y>.
- Tian, Peter J Bradbury, Patrick J Brown, Hsiaoyi Hung, Qi Sun, Sherry Flint-Garcia, Torbert R Rocheford, Michael D McMullen, James B Holland, and Edward S Buckler. 2011. “Genome-Wide Association Study of Leaf Architecture in the Maize Nested Association Mapping Population.” *Nature Genetics* 43 (January): 159. <https://doi.org/10.1038/ng.746>.
- Tian, Shouwei, Linjian Jiang, Qiang Gao, Jie Zhang, Mei Zong, Haiying Zhang, Yi Ren, et al. 2017. “Efficient CRISPR/Cas9-Based Gene Knockout in Watermelon.” *Plant Cell Reports* 36 (3): 399–406. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2089-5>.
- Tollenaar, M, and J Wu. 1999. “Yield Improvement in Temperate Maize Is Attributable to Greater Stress Tolerance.” *Crop Science* 39: 1597–1604. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.3961597x>.
- Trujillo, John Henry. 2020. “Ensamblaje de Un Genoma y Una Huella Molecular de Caña de Azúcar Utilizando Secuenciación de Alto Rendimiento.” Centro de Investigación de la caña de azúcar de Colombia, Cenicaña.
- Truong, Sandra K, Ryan F McCormick, William L Rooney, and John E Mullet. 2015. “Harnessing Genetic Variation in Leaf Angle to Increase Productivity of Sorghum Bicolor” 201 (November): 1229–38. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.178608>.
- Wada, Kojiro, Shingo Marumo, Nobuo Ikekawa, Masuo Morisaki, and Kenji Mori. 1981. “Brassinolide and Homobrassinolide Promotion of Lamina Inclination of Rice Seedlings.” *Plant and Cell Physiology* 22 (2): 323–25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076173>.
- Walsh, J, C A Waters, and M Freeling. 1998. “The Maize Gene Liguleless2 Encodes a Basic Leucine Zipper Protein Involved in the Establishment of the Leaf Blade-Sheath Boundary.” *Genes & Development* 12 (2): 208–18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9490265>.
- Wang, Ying, Lizhao Geng, Menglong Yuan, Juan Wei, Chen Jin, Min Li, Yu Kun, et al. 2017. “Deletion of a Target Gene in Indica Rice via CRISPR/Cas9.” *Plant Cell Reports* 36 (8): 1333–43.
- Wolter, Felix, Patrick Schindele, and Holger Puchta. 2019. “Plant Breeding at the Speed of Light: The Power of CRISPR/Cas to Generate Directed Genetic Diversity at Multiple Sites.” *BMC Plant Biology* 19 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1775-1>.
- Wong, Gane Ka Shu, Jun Wang, Lin Tao, Jun Tan, Jianguo Zhang, Douglas A. Passey, and Jun

- Yu. 2002. "Compositional Gradients in Gramineae Genes." *Genome Research* 12 (6): 851–56. <https://doi.org/10.1101/gr.189102>.
- Woo, Je Wook, Jungeun Kim, Soon Il Kwon, Claudia Corvalán, Seung Woo Cho, Hyeran Kim, Sang-Gyu Kim, Sang-Tae Kim, Sunghwa Choe, and Jin-Soo Kim. 2015. "DNA-Free Genome Editing in Plants with Preassembled CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins." *Nature Biotechnology* 33 (11): 1162–64. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>.
- Xing, Hui-Li, Li Dong, Zhi-Ping Wang, Hai-Yan Zhang, Chun-Yan Han, Bing Liu, Xue-Chen Wang, and Qi-Jun Chen. 2014. "A CRISPR/Cas9 Toolkit for Multiplex Genome Editing in Plants." *BMC Plant Biology* 14 (1): 327. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>.
- Xu, Rong Fang, Hao Li, Rui Ying Qin, Juan Li, Chun Hong Qiu, Ya Chun Yang, Hui Ma, Li Li, Peng Cheng Wei, and Jian Bo Yang. 2015. "Generation of Inheritable and 'Transgene Clean' Targeted Genome-Modified Rice in Later Generations Using the CRISPR/Cas9 System." *Scientific Reports* 5 (May): 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep11491>.
- Xu, Rongfang, Hao Li, Ruiying Qin, Lu Wang, Li Li, Pengcheng Wei, and Jianbo Yang. 2014. "Gene Targeting Using the Agrobacterium Tumefaciens-Mediated CRISPR-Cas System in Rice." *Rice* 7 (1): 7–10. <https://doi.org/10.1186/s12284-014-0005-6>.
- Yamamuro, Chizuko, Yoshihisa Ihara, Xiong Wu, Takahiro Noguchi, Shozo Fujioka, Suguru Takatsuto, Motoyuki Ashikari, Hidemi Kitano, and Makoto Matsuoka. 2000. "Loss of Function of a Rice *Brassinosteroid Insensitive 1*; Homolog Prevents Internode Elongation and Bending of the Lamina Joint." *The Plant Cell* 12 (9): 1591 LP – 1605. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.9.1591>.
- Yang, Fayu, Changbao Liu, Ding Chen, Mengjun Tu, Haihua Xie, Huihui Sun, Xianglian Ge, et al. 2017. "CRISPR/Cas9-LoxP-Mediated Gene Editing as a Novel Site-Specific Genetic Manipulation Tool." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 7 (June): 378–86. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.018>.
- Yoshida, Shouichi. 1972. "Physiological Aspects of Grain Yield." *Annual Review of Plant Physiology* 23 (1): 437–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.23.060172.002253>.
- Yu, Xiaofei, Li Li, Lei Li, Michelle Guo, Joanne Chory, and Yanhai Yin. 2008. "Modulation of Brassinosteroid-Regulated Gene Expression by Jumonji Domain-Containing Proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (21): 7618 LP – 7623. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802254105>.
- Zhang, Jisen, Xingtang Zhang, Haibao Tang, Qing Zhang, Xiuting Hua, Xiaokai Ma, Fan Zhu, et al. 2018. "Allele-Defined Genome of the Autopolyploid Sugarcane *Saccharum Spontaneum* L." *Nature Genetics* 50 (11): 1565–73. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0237-2>.
- Zhao, Shu-qing, Jiang Hu, Long-biao Guo, Qian Qian, and Hong-wei Xue. 2010. "Rice Leaf Inclination2, a VIN3-like Protein, Regulates Leaf Angle through Modulating Cell Division of the Collar." *Nature Publishing Group* 20 (8): 935–47. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.109>.