

Informe final publicable de proyecto

Optimización de las técnicas de edición genómica libres de ADN utilizando un modelo de resistencia a herbicida

Código de proyecto ANII: FMV_3_2018_1_148011

04/07/2022

FLEITAS BELAMENDIA, Andrea Luciana (Responsable Técnico - Científico)

CORONEL DÍAZ, María Pía (Investigador)

BONNECARRÈRE MARTÍNEZ, María Victoria (Investigador)

GALLINO MALCUORI, Juan Pablo (Investigador)

SEÑORALE POSE, Mario (Investigador)

VIDAL, Sabina (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA LAS BRUJAS \\
AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

Resumen del proyecto

Las metodologías de edición genómica, especialmente aquellas basadas en el sistema CRISPR/Cas9 se han establecido en los últimos años como herramientas poderosas al servicio del mejoramiento vegetal. Recientemente se han reportado metodologías de edición genómica “libres de DNA” en plantas, las cuales garantizan la no incorporación de ADN foráneo al genoma y confieren ventajas a las variedades editadas desde el punto de vista de su regulación. Algunos países, entre ellos Estados Unidos y países de la región (Argentina y Brasil), han optado por una regulación en la que no se considera a los organismos editados dentro de la categoría de OGM. Esto repercutirá en la reducción de costos y tiempos de liberación de las nuevas variedades, así como en la percepción pública sobre los alimentos derivados de ellas. Resulta ventajoso que nuestro país se mantenga actualizado en las tecnologías que apoyan el mejoramiento vegetal. En este sentido, este proyecto buscó generar dos productos de utilidad: primero, una metodología optimizada para la edición genómica libre de DNA y segundo, una metodología de remplazo alélico valiéndose del sistema CRISPR/Cas9.

Ciencias Agrícolas / Biotecnología Agropecuaria / Biotecnología Agrícola y Biotecnología Alimentaria / Biotecnología Vegetal

Palabras clave: CRISPR/Cas9 / Remplazo alélico / Soja /

Introducción

La soja ocupa la mayor superficie de siembra en Uruguay, pero su productividad es sensiblemente menor a la reportada para la región y Estados Unidos. La dificultad para mejorar caracteres complejos y la estrecha base genética con la que cuentan los programas de mejoramiento hacen que la disponibilidad de cultivares con rasgos de tolerancia a diversos tipos de estrés sea escasa. Las principales estrategias utilizadas para mejorar rasgos agronómicos en soja se basan en la sobreexpresión de genes o en metodologías de silenciamiento basadas en RNA de interferencia (RNAi). La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o mediante biolística ha sido ampliamente utilizada para generar plantas de soja transgénica, sin embargo estas metodologías presentan una serie de desventajas. Los fragmentos de DNA se integran al azar en el genoma de la planta lo que puede causar la disrupción de genes endógenos o el silenciamiento del transgen, entre otras posibilidades. Las metodologías basadas en RNAi pueden resultar en el silenciamiento no deseado de familias génicas enteras. El sistema CRISPR/Cas9 permite modificar genes específicos de manera muy precisa, superando las flaquezas de las metodologías antes mencionadas. El sistema CRISPR/Cas9 se ha consolidado como la tecnología de edición genómica más utilizada y robusta. En este sistema la endonucleasa Cas9 es guiada a una secuencia blanco en el DNA genómico por una molécula sintética de RNA, denominada RNA-guía (sgRNA). Los mecanismos de reparación actúan sobre el corte de doble cadena generado a través de la vía de reparación ilegítima (non-homologous end joining, NHEJ) o mediante la vía de reparación por homología (homologous-directed repair, HDR). La vía NHEJ es propensa a errores y puede generar inserciones o deleciones pudiendo interrumpir un gen o alterar su expresión. La HDR puede ocurrir cuando un fragmento de DNA homólogo está presente, permitiendo remplazar un fragmento del genoma (Kim, 2014). En plantas, esta metodología se implementa utilizando la transgénesis para introducir una construcción que permita la expresión de Cas9 y de los sgRNAs esperando que éstos actúen generando la alteración. Una vez obtenida la modificación deseada, la construcción puede ser eliminada del genoma por cruza con una variedad no transgénica y segregación. Si bien la transgénesis es una herramienta sumamente útil para la biotecnología vegetal, los altísimos costos que insume el desarrollo y la evaluación de un producto transgénico previo a su liberación (aproximadamente US\$10 millones) hace que la mayor parte del desarrollo biotecnológico con fines productivos esté liderado por compañías multinacionales. En años recientes, ha habido varios ejemplos de productos generados mediante edición genómica que han sido liberados en el mercado Estadounidense sin la revisión del Departamento de Agricultura (Kuzma, 2016; Kanchiswamy, 2016). En América Latina la regulación se encamina por un rumbo similar. Quiere decir que la incorporación de estas nuevas tecnologías de mejoramiento permitiría reducir muchísimo los costos y los tiempos para liberar un evento, lo que es un elemento democratizador para la academia y los programas de mejoramiento. Algunos estudios han reportado metodologías de edición “libres de DNA”. Estos desarrollos se basan, por un lado, en la introducción en las células vegetales de los sgRNAs y del transcripto de Cas9 (mRNA-Cas9) generados mediante transcripción *in vitro* (IVT), o por otro lado, en la introducción de complejos ribonucleoprotéicos Cas9-sgRNA pre-ensamblados (RNPs) (Woo, 2015; Liang, 2017). Las metodologías de edición genómica libres de DNA aventajan a las basadas en la transgénesis en que los RNPs (o la

proteína Cas9 derivada de la traducción del mRNA-Cas9) actúan transitoriamente sobre el genoma, reduciendo la probabilidad de que presenten efectos off-target, esto es, que actúen fuera del sitio blanco deseado. Asimismo, no es necesario segregar las construcciones del genoma, lo que reduce los tiempos necesarios para generar una planta editada, libre de secuencias exógenas. La edición genómica libre de DNA es un área en crecimiento y existen aún muchas consideraciones prácticas que requieren optimización. Un cuello de botella fundamental es la regeneración de las plantas a partir de un tejido o células editadas. Si bien existen muchos artículos donde se describe la edición genómica utilizando RNPs en protoplastos de diversas especies, son muy pocos en los que logran efectivamente regenerar una planta. Existe varios ejemplos en los que se ha logrado regenerar plantas editadas exitosamente utilizando la edición genómica libre de DNA, pero la implementación de estas metodologías es especialmente útil para especies de propagación vegetativa, donde no es posible segregar la construcción introducida.

Este proyecto pretende generar los siguientes productos de utilidad: 1-una metodología optimizada para la edición genómica libre de DNA y 2-una metodología de remplazo alélico. Se utilizará un modelo de resistencia a glifosato para seleccionar los tejidos editados debido al amplio conocimiento disponible acerca de la resistencia a este herbicida y a la practicidad del modelo para seleccionar las modificaciones generadas. Brevemente, lo que se propone es reemplazar uno de los genes codificantes para la enzima EPSPS por una versión mutada que no sea inhibida por glifosato. En proyectos anteriores y actuales nuestro grupo ha logrado transformar y regenerar plantas soja a partir de embriones somáticos y ha obtenido mutantes mediante edición genómica utilizando el sistema CRISPR/Cas transgénesis mediante. Este es el punto de partida del proyecto.

Metodología/diseño del estudio

El estado del arte sobre los mecanismos de reparación del DNA sustentan este trabajo. Es sabido que cuando un corte es generado en la doble cadena del DNA la reparación del mismo puede ocurrir mediante mecanismos de recombinación homóloga o ilegítima. La presencia de un fragmento de DNA lineal homólogo al sitio afectado en el genoma aumenta el porcentaje de reparación por la vía de reparación por homología. Este trabajo parte de la hipótesis de que generando un corte en el DNA genómico utilizando la endonucleasa Cas9 y brindando un fragmento de DNA lineal, entregado como un plásmido ectópico que es también procesado por la proteína Cas9, podremos promover el remplazo alélico en soja. Se propone utilizar una estrategia de modificación y remplazo alélico de uno de los genes de EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) de soja. La enzima EPSPS participa en la síntesis de aminoácidos aromáticos y es el blanco de acción del herbicida glifosato. La idea de modificar esta enzima combina la conveniencia de generar plantas resistentes a herbicidas que no sean transgénicas con la obtención de un fenotipo fácil de detectar durante el proceso de optimización de las técnicas de edición genómica libre de DNA.

El primero de los objetivos de este trabajo consiste en optimizar una metodología para la edición genómica libre de DNA de soja. Este objetivo comprende dos preguntas: por un lado, cuál es la mejor estrategia de entrega del complejo Cas9/sgRNA dentro de las células vegetales (complejos RNP o mRNA-Cas9) y por otro lado, qué tejido blanco resulta más eficiente y limpio para realizar esa entrega.

Para abordar la primera de las preguntas se procederá a: 1- obtener todos los componentes para realizar el ensamblado de los complejos RNP, 2- obtener todos los componentes para realizar para la síntesis del Cas9-mRNA. Para abordar la segunda pregunta se procederá a: 3- realizar la entrega de los RNPs o mRNA-Cas9 sobre embriones somáticos de soja, 4-poner a punto un protocolo de regeneración de protoplastos de manera de poder realizar la entrega de los RNPs o mRNA-Cas9 sobre protoplastos, y 5- poner a punto un protocolo de transformación del ovario de la flor de manera de poder realizar la entrega de RNPs o mRNA-Cas9 sobre flores.

Para llevar adelante estas actividades se propone la metodología descrita a continuación.

1- Ensamblado de los complejos RNP

Para ensamblar los complejos RNP se requieren dos componentes: proteína Cas9 con alto grado de pureza y SgRNAs dirigidos al el gen de la EPSPS.

La proteína Cas9 será expresada de manera recombinante en E.coli. Al momento se cuenta con un vector de expresión de Cas9 cedido por el Julius Kühn Institut y con un protocolo optimizado para la producción y purificación de esta proteína. El vector dirige la expresión de Cas9 fusionada a la proteína de unión a maltosa, separadas por un sitio de corte para la proteasa TEV y una cola de histidinas. Esto permite la purificación por cromatografía de interacción con metales seguida de corte por la proteasa TEV, intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. Hemos realizado ensayos de inducción y la proteína se expresa en gran cantidad, de manera soluble. Para producir los SgRNAs se diseñarán secuencias específicas de 20 nucleótidos (Target Adaptors, TA) según Labuhn (2017) eligiendo de entre aquellos TA que

presenten menor cantidad de secuencias off-target. Los TA serán clonados en el vector pEN-ChimeraT7 el cual permite el clonado del pequeño adaptador dentro de la secuencia conservada del SgRNA. Este vector contiene un promotor para la T7 polimerasa lo que permite la producción del SgRNA mediante transcripción in vitro (IVT). Antes de proceder al realizar intentos de edición sobre explantes, la actividad de los SgRNAs será probada in vitro. Para ello, se ensamblarán los RNPs incubando los SgRNA con la proteína Cas9 y se probará su actividad de corte sobre el producto de PCR de la EPSPS. Aquellos sgRNAs que resulten activos y específicos para uno de los genes serán evaluados in vivo en protoplastos de soja. Los protoplastos serán generados según el protocolo optimizado por nuestro grupo y la transformación mediada por polietilenglicol (PEG) será realizada de acuerdo a Yoo (2007). La aparición de mutaciones será comprobada mediante el ensayo de la endonucleasa T7 y secuenciación del locus de la EPSPS.

2- Síntesis del Cas9-mRNA Para poder realizar la síntesis del RNA mensajero antes que nada se le incorporará a la secuencia codificante para la proteína Cas9 regiones 5' y 3' UTR. Se clonará la secuencia de la proteína Cas9 optimizada para su expresión en soja (Michno, 2015) en el vector pEAQ-HT (Sainsbury, 2009) En este vector, la región codificante de Cas9 quedará flanqueada por las regiones 5'-UTR y 3'-UTR hipertraducibles provenientes del RNA2 del virus del mosaico del poroto las cuales propician una alta tasa de traducción del transcripto. El mRNA-Cas9 será generado mediante IVT y será modificado mediante de adición de 5' CAP y poliadenilado. Los sgRNA activos, derivados del objetivo anterior, serán utilizados junto con el mRNA-Cas9 para transformar protoplastos. Las mutaciones serán evaluadas como se mencionó anteriormente.

3- Entrega de complejos RNP o mRNA-Cas9/SgRNAs en embriones somáticos de soja Se generarán embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros de acuerdo al protocolo descrito por Santarém. Para abordar la primera de las preguntas se procederá a: 1- obtener todos los componentes para realizar el ensamblado de los complejos RNP, 2- obtener todos los componentes para realizar para la síntesis del Cas9-mRNA. Para abordar la segunda pregunta se procederá a: 3- realizar la entrega de los RNPs o mRNA-Cas9 sobre embriones somáticos de soja, 4-poner a punto un protocolo de regeneración de protoplastos de manera de poder realizar la entrega de los RNPs o mRNA-Cas9 sobre protoplastos, y 5- poner a punto un protocolo de transformación del ovario de la flor de manera de poder realizar la entrega de RNPs o mRNA-Cas9 sobre flores.

Para llevar adelante estas actividades se propone la metodología descrita a continuación.

1- Ensamblado de los complejos RNP Para ensamblar los complejos RNP se requieren dos componentes: proteína Cas9 con alto grado de pureza y SgRNAs dirigidos al el gen de la EPSPS. La proteína Cas9 será expresada de manera recombinante en E.coli. Al momento se cuenta con un vector de expresión de Cas9 cedido por el Julius Kühn Institut y con un protocolo optimizado para la producción y purificación de esta proteína. El vector dirige la expresión de Cas9 fusionada a la proteína de unión a maltosa, separadas por un sitio de corte para la proteasa TEV y una cola de histidinas. Esto permite la purificación por cromatografía de interacción con metales seguida de corte por la proteasa TEV, intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. Hemos realizado ensayos de inducción y la proteína se expresa en gran cantidad, de manera soluble. Para producir los SgRNAs se diseñarán secuencias específicas de 20 nucleótidos (Target Adaptors, TA) según Labuhn (2017) eligiendo de entre aquellos TA que presenten menor cantidad de secuencias off-target. Los TA serán clonados en el vector pEN-ChimeraT7 el cual permite el clonado del pequeño adaptador dentro de la secuencia conservada del SgRNA. Este vector contiene un promotor para la T7 polimerasa lo que permite la producción del SgRNA mediante transcripción in vitro (IVT). Antes de proceder al realizar intentos de edición sobre explantes, la actividad de los SgRNAs será probada in vitro. Para ello, se ensamblarán los RNPs incubando los SgRNA con la proteína Cas9 y se probará su actividad de corte sobre el producto de PCR de la EPSPS. Aquellos sgRNAs que resulten activos y específicos para uno de los genes serán evaluados in vivo en protoplastos de soja. Los protoplastos serán generados según el protocolo optimizado por nuestro grupo y la transformación mediada por polietilenglicol (PEG) será realizada de acuerdo a Yoo (2007). La aparición de mutaciones será comprobada mediante el ensayo de la endonucleasa T7 y secuenciación del locus de la EPSPS.

2- Síntesis del Cas9-mRNA

Para poder realizar la síntesis del RNA mensajero antes que nada se le incorporará a la secuencia codificante para la proteína Cas9 regiones 5' y 3' UTR. Se clonará la secuencia de la proteína Cas9 optimizada para su expresión en soja (Michno, 2015) en el vector pEAQ-HT (Sainsbury, 2009) En este vector, la región codificante de Cas9 quedará flanqueada por las regiones 5'-UTR y 3'-UTR hipertraducibles provenientes del RNA2 del virus del mosaico del poroto las cuales propician una alta tasa de traducción del transcripto. El mRNA-Cas9 será generado mediante IVT y será modificado mediante de

adición de 5' CAP y poliadenilado. Los sgRNA activos, derivados del objetivo anterior, serán utilizados junto con el mRNA-Cas9 para transformar protoplastos. Las mutaciones serán evaluadas como se mencionó anteriormente.

3- Entrega de complejos RNP o mRNA-Cas9/SgRNAs en embriones somáticos de soja

Se generarán embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros de acuerdo al protocolo descrito por Santarém mediante el uso de primers solapantes que contengan las mutaciones deseadas. Estas variantes de la EPSPS serán clonadas bajo el control de un promotor constitutivo en un vector binario que será utilizado para transformar *Arabidopsis*. De esta manera evaluaremos la funcionalidad para conferir resistencia al herbicida de estas variantes mutantes in vivo.

7- Evaluación de las variantes Pro106-Ser y Thr102-Ile+Pro106-Ser in vivo

Las construcciones generadas en la actividad previa serán utilizadas para transformar *Arabidopsis* mediante transformación floral (Clough, 1998) Ya que la resistencia a glifosato es una característica dominante, las plantas serán evaluadas en la primera generación (T0).

8- Incorporación de la variante seleccionada en un plásmido de remplazo

Para la generación del vector de remplazo, la variante conteniendo la mutación seleccionada será flanqueada por 1000 bp de secuencia homóloga al locus genómico de la EPSPS. Este cassette de remplazo estará a su vez flanqueado por la secuencia de reconocimiento del SgRNA tal que al incorporar el plásmido junto con la proteína Cas9 (como RNP o mRNA), también será cortado, liberando un fragmento de DNA lineal que servirá de molde para la reparación mediante HDR.

9- Cotransformación del plásmido de remplazo junto con los RNPs o el mRNA-Cas9/SgRNA.

La construcción generada será utilizada junto con los RNP o el mRNA-Cas9 para ser introducida en embriones de soja mediante biolística, y, de ser posible, en protoplastos y en el ovario de la flor. Los eventos editados serán regenerados en ausencia de selección y serán fenotipados según su resistencia al glifosato. Se ha observado que un factor que incrementa considerablemente la tasa de recombinación homóloga es el silenciamiento o la inhibición de la ligasa IV, una de las enzimas fundamentales en la vía de reparación ilegítima, NHEJ (Endo, 2016; Vartak, 2015). En este sentido, para favorecer la HDR se incorporará en los medios de transformación y regeneración el inhibidor de la ligasa IV, SCR7 (Vartak, 2015).

Resultados, análisis y discusión

Recordando, los objetivos de este proyecto eran los siguientes:

- 1- Optimizar una metodología para la edición genómica libre de DNA de soja; y
- 2- Desarrollar una metodología de remplazo alélico para soja.

En este sentido se esperaba obtener los siguientes resultados:

- 1- Lograr determinar la mejor forma de entrega del complejo Cas9-SgRNA (complejo ribonucleoproteico o mRNA-Cas9).
- 2- Lograr determinar el tejido más eficiente y limpio para realizar la entrega del complejo Cas9-SgRNA (embriones somáticos, protoplastos o flores).
- 3- Obtener un plásmido de remplazo alélico.
- 4- Obtener un protocolo optimizado para modificación genética de soja.

Para determinar si la estrategia de remplazo de un gen EPSPS insensible al glifosato es verdaderamente posible, se generaron plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan las variantes TIPS y TIPA de la EPSPS de soja. La secuencia codificante del gen EPSPS1 (Glyma.01G139600.1) fue amplificada a partir de ADNc de la variedad Jack de soja. Los mutantes puntuales fueron generados mediante mutagénesis QuickChange utilizando como molde la construcción pENTR2B:EPSPS1CDS. Las variantes mutantes TIPS y TIPA así como la versión wild type (WT) de la EPSPS1 fueron subclonados en un vector binario para transformación vegetal, pUB-Dest mediante recombinación con la clonasa LR, utilizando el sistema Gateway. El vector pUB-Dest permite la expresión constitutiva de los genes de interés bajo el control de un promotor de poliubiquitina de *Arabidopsis*. Las construcciones pUB-Dest WT, TIPS y TIPA fueron transformadas en *Arabidopsis thaliana* utilizando la transformación floral mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Se obtuvieron varias líneas transgénicas resistentes a glufosinato de amonio.

Con el fin de llevar adelante algunas de las actividades desarrolladas en este trabajo, se puso a punto un protocolo de expresión y purificación de la proteína Cas9 novedoso. La proteína fue expresada a partir del plásmido pMJ922 obtenido a partir del repositorio AddGene (<http://www.addgene.org/>). Dicho vector permite la expresión de la proteína SpCas9

conteniendo secuencias de localización nuclear como fusión N-terminal a la proteína de unión a maltosa (MBP) junto a una cola de histidinas (HisTag) y una fusión C-terminal a GFP. El protocolo obtenido ha sido publicado en la revista *methods and protocols* bajo el doi:10.3390/mps5030044.

En cuanto a los resultados 1 y 2, se ha descartado la posibilidad de realizar la edición o el remplazo alélico sobre protoplastos debido a que las etapas de regeneración no han sido fructíferas al momento. Luego de una evaluación prolongada, hemos también descartado la entrega de ácidos nucleicos en el ovario de la flor. La transformación de este tejido utilizando ADN codificante para el gen reportero GUS, pareció eficiente en la primera progenie de las plantas mostrando actividad GUS en la generación T1, pero esta señal no fue estable en las siguientes generaciones. Es una hipótesis a comprobar que la señal observada haya sido producida por bacterias endófitas que se hubieran transformado con la construcción entregada. Tampoco fue eficiente la entrega de los complejos RNP o los RNAs codificantes para el SgRNA y Cas9, por lo que hemos descartado la posibilidad de transformar o modificar este explante por metodologías con ADN o libres de ADN.

A pesar de que no se pudo realizar la entrega DNA free en flores, otra herramienta que se desprende de este trabajo es la obtención de un vector conteniendo la secuencia codificante para la proteína Cas9 optimizada para su expresión en soja y conteniendo una señal de localización nuclear en un vector conteniendo pEAQ-HT. En el mismo, la secuencia codificante para la proteína Cas9 queda flanqueada por las secuencias 5' y 3' UTR hipertraducibles provenientes del virus del mosaico del poroto. Esta construcción puede ser utilizada como molde para la síntesis del mRNA-Cas9 utilizando el kit de transcripción in vitro HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit (with tailing) el cual permite la transcripción in vitro, el capping y la adición de la cola poliA al mRNA y también esta variante hipertraducible ha sido incorporada en nuestros vectores de biolística para mejorar la eficiencia de edición por metodologías mediadas por transgénesis.

Asimismo, se ha intentado entregar proteína ARN mensajero (en este caso, codificante para la proteína GUS) y el único sistema que permite la entrega eficiente de ambas moléculas ha sido el bombardeo de embriones somáticos. Este sistema permite una gran regeneración de plantas en ausencia de selección, lo que complejiza mucho el genotipado de las plantas regeneradas. Esto podría ser facilitado mediante la implementación de metodologías de secuenciación masiva, pero esta solución es cara aún para nuestra escala. Sería posible favorecer la regeneración de las zonas impactadas por los proyectiles utilizando factores de desarrollo. Hemos obtenido vectores que permiten la expresión de algunos de estos factores para determinar si es posible su utilización sobre embriones somáticos de soja. También hemos utilizado estas construcciones para la transformación de soja mediada por *A. tumefaciens* y estas plantas están actualmente en etapa de enraizamiento. Es importante destacar también, que en este camino hemos puesto a punto un protocolo de transformación de soja mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Esta actividad no estaba planteada inicialmente en el trabajo y representa una capacidad nueva y valiosa que hemos incorporado a nuestro laboratorio. La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* mejora la eficiencia de generación de plantas editadas por metodologías mediadas por transgénesis respecto a la biolística gracias a un menor fraccionamiento de las construcciones incorporadas.

El tercero de los resultados ha sido cumplido, sin embargo, se decidió incorporar una actividad adicional y se ha generado un vector multipropósito que pueda ser utilizado para transformación con *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens* o biolística de embriones. Se ha generado un vector binario que contiene la secuencia codificante para la proteína Cas9 optimizada para soja, un marcador fluorescente DsRED, un sitio de clonado para SgARNs y sitio de clonado para el molde de remplazo. Esta herramienta permitirá la validación de los SgRNAs y del proceso de remplazo alélico de manera rápida utilizando expresión transitoria en raíces de soja. Asimismo, estas mismas construcciones podrían utilizarse para la transformación estable de soja mediada por *agrobacterium* o biolística. La estudiante de maestría María Pía Coronel en la Universidad de Georgia nos ha permitido determinar que nuestro vector funciona adecuadamente para realizar mutaciones y a la brevedad analizaremos el remplazo alélico en el sistemas transitorios de hairy root. La transformación transitoria de hairy root no solamente nos permite evaluar rápidamente los SgRNAs in vivo, sino que es una metodología nueva para nosotros que también podría ser útil para evaluar rasgos relacionados a la raíz de soja. Esta actividad tampoco estaba planificada inicialmente, pero una vez más representa una herramienta valiosa para nosotros.

Conclusiones y recomendaciones

En este trabajo no fue posible completar los objetivos inicialmente planteados. Sin embargo, se generaron muchas herramientas que potenciarán nuestro trabajo en el futuro, no solamente en el área de la edición génica de soja. Entre ellos:

- 1- Se generó una variante de la EPSPS de soja resistente a la inhibición por glifosato.
- 2- Se generó un protocolo de expresión y purificación robusto y detallado para la proteína Cas9 (Fleitas et al., 2022, doi:10.3390/mps5030044).
- 3- Se puso a punto nuevas metodologías de transformación de soja que no habían sido utilizadas en nuestro laboratorio hasta el momento: la transformación de nodo cotiledonar mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y la transformación transitoria mediada por *Agrobacterium rhizogenes*.
- 4- Se generaron varias herramientas de ADN que también serán de utilidad en un futuro: Se generó una variante de Cas9 optimizada para soja conteniendo regiones hipertraducibles para mejorar nuestros vectores de biolística y para utilizar durante la síntesis de mRNA codificante para la proteína Cas9, se generaron vectores multipropósito que funcionan muy bien para la evaluación de SgRNAs en hairy roots y que serán de utilidad para el desarrollo de una metodología de replazo alélico.
- 5- Además, se ganó experiencia en metodologías de genotipado que nos permitirán mejorar esta etapa del proceso de edición.

Como conclusión final:

La edición génica libre de ADN no es fácil de realizar. Son pocas las especies vegetales que logran efectivamente incorporar mutaciones y ser regeneradas eficientemente de esta manera. Si bien es importante optimizar estas metodologías puesto que reduce los tiempos para obtener plantas que sean productos biotecnológicos, esto es especialmente relevante en plantas que sean de propagación vegetativa, en las que no es posible segregar las construcciones posteriormente a la edición. Este no es el caso para la soja. En vistas del avance en los marcos regulatorios, que en general (salvo para la unión europea) consideran a las plantas editadas carentes de construcción como no GMO, el desarrollo de una metodología libre de ADN pierde cierta relevancia. En nuestro caso, además de complejizar el genotipado de los eventos editados (porque no hay cassettes de selección) es importante notar que los elementos para realizar la edición deben llegar a las células genéticamente efectivas, es decir, las que darán gametos y permitirán que la edición generada se propague a próximas generaciones. Esto es aún más difícil de realizar si no se utiliza la transgénesis.

Por otra parte, seguimos muy motivadas para lograr desarrollar un protocolo de replazo alélico. Resultados de nuestro grupo y de otras publicaciones muy recientes nos permiten estimar que vamos en buen camino para conseguir este objetivo. Esto lo realizaremos utilizando metodologías mediadas por transgénesis.

Referencias bibliográficas

- Andersson M, Turesson H, Olsson N, Fält AS, Ohlsson P, Gonzalez MN, Samuelsson M, Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Plant Physiol.* (2018) doi: 10.1111/ppl.12731.
- Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell.* (2014) 26(1):151-63.
- Cai Y, Chen L, Liu X, Guo C, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean. *Plant Biotechnol J.* (2018) 16(1):176-185.
- Callaway E. CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union. *Nature* (2018). <https://www.nature.com/articles/d41586-018-05814-6>
- Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (1998) 16(6):735-43.
- Dhir SK, Dhir S, Widholm JM. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.): genotypic differences in culture response. *Plant Cell Rep* (1992) 11:285-289.
- Endo M, Mikami M, Toki S. Biallelic Gene Targeting in Rice. *Plant Physiol.* (2016) 170(2):667-77.
- Fan Y, Liu J, Lyu S, Wang Q, Yang S, Zhu H. The Soybean Rfg1 Gene Restricts Nodulation by *Sinorhizobium fredii* USDA193. *Front Plant Sci.* (2017) 8:1548. doi: 10.3389/fpls.2017.01548.
- Fausera F, Rotha N, Pachera M, Ilga G, Sánchez-Fernández R, Biesgenb C, Puchta H. In planta gene targeting. *PNAS* (2012) 109(19): 7535–7540.
- Finer JJ. Generation of transgenic soybean (*Glycine max*) via particle bombardment of embryogenic cultures. In: *Current protocols in Plant Biology* (2016), p. 592-603. Wiley Online Library doi: 10.1002/cppb.20039.
- Gil-Humanes J, Wang Y, Liang Z, Shan Q, Ozuna CV, Sánchez-León S, Baltes NJ, Starker C, Barro F, Gao C, Voytas DF. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J.* (2017) 89(6):1251-1262.
- Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J.* (2014) 12(7):934-40.
- Kanchiswamy CN. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. *Plant Cell Rep.* (2016) 35(7):1469-74.
- Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet.* (2014) 15(5):321-34.
- Kuzma J. Policy: Reboot the debate on genetic engineering. *Nature* (2016) 516, 165-7.
- Labuhn M, Adams FF, Ng M, Knoess S, Schambach A, Charpentier EM, Schwarzer A, Mateo JL, Klusmann JH, Heckl D. Refined sgRNA efficacy prediction improves large and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Res.* (2018) 46(3):1375-1385.
- Li HQ, Chen C, Chen RR, Song XW, Li JN, Zhu YM. Preliminary analysis of the role of GmSnRK1.1 and GmSnRK1.2 in the ABA and alkaline stress response of the soybean using the CRISPR/Cas9-based gene double-knockout system. (2018) 40(6):496-507. doi: 10.16288/j.ycz.17-424.
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* (2017) 8(14261).
- Liu J, Su Q, An L, Yang A. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free smGFP cassette into soybean via ovary-drip transformation *Biotechnol Lett.* (2009) 31:295–303
- Liu M, Yang J, Cheng YQ, An LJ. Optimization of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) in planta ovary transformation using a linear minimal gus gene cassette. *J Zhejiang Univ Sci B.* (2009) 10(12):870-876.
- Martin-Ortigosa S, Wang K. Proteolistics: a biolistic method for intracellular delivery of proteins. *Transgenic Res.* (2014) 23:743–756
- Michno JM, Wang X, Liu J, Curtin SJ, Kono TJ, Stupar RM. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops Food.* (2015) 6(4):243-52.
- Niler E. Why Gene Editing Is the Next Food Revolution. *Nat Geo Magazine* (2018). <https://www.nationalgeographic.com/environment/future-of-food/food-technology-gene-editing/>
- Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonosoff GP. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J* (2009) 7: 682–93.
- Sammons RD, Gaines TA. Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag Sci* (2014) 70: 1367–77.
- Santarém ER, Finer JJ. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) merrill] using proliferative embryogenic tissue

maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell Dev Biol* (1999) 35:451-5.

Sun X, Hu Z, Chen R, Jiang Q, Song G, Zhang H, Xi Y. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep.* (2015) 5:10342. doi: 10.1038/srep10342

Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci.* (2005) 61(3):246-57.

Vartak SV, Raghavan SC. Inhibition of nonhomologous end joining to increase the specificity of CRISPR/Cas9 genome editing. *FEBS Journal* (2015), 282: 4289–94.

Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* (2015) 33(11): 1162-4.

Wang S, Blumwald E. Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell.* (2014) (12):4875-88.

Yoo SD, Cho YH, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc.* (2007) 2(7):1565-72.

Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang Y, Liu J, Chen K, Qiu JL, Gao C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun.* (2016) 7:12617. doi: 10.1038/ncomms12617.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)