

MÉTODOS PARA MEJORAR LA ADMINISTRACIÓN DE PROTEÍNAS A LAS CÉLULAS VEGETALES MEDIANTE BIOLÍSTICA

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense número 63/295.348, presentada el 30 de diciembre de 2021. El contenido completo de la solicitud mencionada anteriormente se incorpora a la presente mediante referencia.

ANTECEDENTES

10 La administración directa de proteínas a las células vegetales es una herramienta útil para la investigación tanto fundamental como aplicada en las ciencias vegetales. Aunque la proteína puede expresarse mediante el uso de un enfoque transgénico (por ejemplo, mediante la administración de un ácido nucleico que codifica la proteína), la proteína de interés a veces se modifica para obtener propiedades que no pueden lograrse mediante su expresión en el organismo de la planta hospedadora, y
15 algunas especies de plantas o tipos de tejido son recalcitrantes a ser transformados mediante métodos estándar conocidos en la técnica. Además, la expresión de proteínas requiere un cierto período de tiempo para detectarse, y el nivel de expresión puede estar limitado por varios factores tales como promotores, tipos de tejido, condiciones de incubación, etc. Por lo tanto, siguen siendo necesarios métodos alternativos para introducir materiales en los tejidos vegetales.

20

COMPENDIO

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para administrar biolísticamente una sustancia al tejido vegetal que comprende:

- 25 (a) aplicar una presión de ruptura o bombardeo de alrededor de 100 psi a alrededor de 3000 psi a un disco macroportador que transporta al menos una gota de micropartículas recubiertas para bombardear las micropartículas recubiertas en el tejido vegetal para formar tejido vegetal bombardeado, en donde las micropartículas tienen un tamaño de alrededor de 0,1 μm a alrededor de 2,0 μm y en donde las micropartículas se encuentran en un volumen de suspensión de micropartículas de alrededor de 0,1 μl a
30 alrededor de 50 μl ; y
- (b) cultivar el tejido vegetal bombardeado en medios de crecimiento en condiciones óptimas de incubación para cada sustancia.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para administrar una sustancia al tejido vegetal que comprende:

(a) administrar biolísticamente micropartículas recubiertas con la sustancia al tejido vegetal para generar tejido vegetal bombardeado,

5 en donde las micropartículas se administran biolísticamente con una pistola genética, en donde se extienden 2 o más gotas de suspensión de micropartículas sobre el círculo interior del disco macroportador antes del secado o la liofilización,

en donde las gotas de suspensiones de micropartículas se encuentran en un volumen de alrededor de 0,1 µl a alrededor de 50 µl,

10 en donde las micropartículas tienen un tamaño de alrededor de 0,1 µm a alrededor de 2,0 µm, y en donde la administración biolística se realiza a una presión de ruptura o bombardeo de alrededor de 100 psi a alrededor de 3000 psi, y

(b) cultivar el tejido vegetal bombardeado en medios de crecimiento.

15 En un segundo aspecto, en la presente se proporciona un método para administrar RNP al tejido vegetal que comprende:

(a) administrar biolísticamente micropartículas recubiertas con la sustancia al tejido vegetal para generar tejido vegetal bombardeado,

en donde las micropartículas se administran biolísticamente con una pistola genética,

20 (b) la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza de alrededor de 26 °C a alrededor de 40 °C, y

(c) cultivar el tejido vegetal bombardeado en medios de crecimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figuras 1A-1C.** Esquemas de construcción. Diagramas esquemáticos de tres vectores de transformación utilizados para *Triticum aestivum* L. cv. Transformación de campo. (Figura 1A) pAct1IHPT-4 es un plásmido de 5870 pb que contiene higromicina fosfotransferasa (HPT) impulsado por el promotor de OsAct1 y su intrón. (Figura 1B) pAct1IDsRED es un plásmido de 5139 pb que contiene DsRED impulsado por el promotor de OsAct1 y su intrón. (Figura 1C) pRGE-PDS-PS2 es un
30 plásmido de 10.122 pb que contiene 2 casetes de genes donde el ARNg es impulsado por el promotor de Tau6 y Cas9 impulsada por el promotor de OsUbi10.

Figuras 2A-2F. Transformación estable del trigo mediante biolística. Transformación estable del trigo mediante un esquema de pistola genética. Figura 2A) Se cosechan las espigas de trigo inmaduras

de 10-14 días después de la antesis. Figura 2B) Se aíslan embriones inmaduros con un tamaño de 1,7-2,2 mm y se colocan en medio osmótico durante 4 horas. Figura 2C) Se disparan partículas de oro con una pistola genética con el tamaño de partícula de oro y la presión del disco de ruptura deseados. Figura 2D) El tejido vegetal se somete a tres rondas de medios de inducción de callos que contienen selección, con subcultivo cada 3 semanas. Figura 2E) Los trozos de callo más grandes derivados de un único embrión inmaduro se rompen y se colocan en un medio de regeneración para la formación de brotes. Figura 2F) Las plántulas que tienen al menos 1 cm de altura se transfieren a un medio de enraizamiento en Phytatrays™ y se cultivan hasta que puedan transferirse al suelo.

Figura 3. Conjuntos de cebadores utilizados para la selección de plantas transgénicas y para la mutación en plantas con edición del genoma. Las secuencias de cebadores (de arriba a abajo en la Figura 3) son las SEQ ID NO: 19-30.

Figuras 4A-4D. Expresión de DsRED en diferentes tipos de tejidos en trigo transgénico. Figura 4A) Expresión transitoria y campo claro de un embrión de trigo inmaduro 3 días después del bombardeo. Figura 4B) La formación de un sector dsRED que crece de 6- 8 semanas después del bombardeo en comparación con una imagen de campo claro del mismo sector. Figura 4C) Una transformación estable que muestra la expresión de DsRED en tejido foliar en comparación con un control de tipo salvaje. Figura 4D) Una plántula de dsRED transformada de forma estable 10-12 semanas después del bombardeo bajo fluorescencia y campo claro.

Figura 5. Frecuencia de transformación estable a nivel de planta T₀ mediante el uso de diferentes parámetros de bombardeo. Frecuencias de transformación estables para las tres combinaciones de tamaño de partícula de oro y presión de ruptura por bombardeo. El conjunto 1 (0,4 µm) muestra las frecuencias de transformación para partículas de oro de 0,4 µm a presiones de ruptura de 650 psi, 900 psi y 1100 psi, así como la frecuencia de transformación total de 0,4 µm en su conjunto. El conjunto 2 (0,6 µm) muestra las frecuencias de transformación para partículas de oro de 0,6 µm a presiones de ruptura de 650 psi, 900 psi y 1100 psi, así como la frecuencia de transformación total de 0,6 µm en su conjunto. El conjunto 3 (1,0 µm) muestra las frecuencias de transformación para partículas de oro de 1,0 µm a presiones de ruptura de 650 psi, 900 psi y 1100 psi, así como la frecuencia de transformación total de 1,0 µm en su conjunto.

Figuras 6A-6B. Volumen (peso) y área de superficie de diferentes tamaños de partículas de oro. Las diferentes partículas de oro son capaces de contener diferentes cantidades de ADN. Figura 6A) El diámetro de una esfera afecta directamente la cantidad de partículas de oro en peso. A medida que aumenta el diámetro, disminuye la cantidad de partículas de oro en un peso fijo. Cuanto más pequeña sea la partícula de oro, más partículas estarán disponibles para recubrirse con ADN en cada preparación

de bombardeo. Figura 6B) Un diámetro mayor afecta directamente el área de superficie de cada partícula. Cuanto mayor sea el diámetro, mayor será el área de superficie. La diferencia de diámetro entre 0,4 μm y 1,0 μm da como resultado un aumento de 6,25 veces en el área de superficie. Esto significa que las partículas más grandes son capaces de contener una mayor cantidad de ADN.

5 **Figuras 7A-7B.** Efecto del tamaño del microportador sobre la expresión transitoria de DsRED y la eficiencia de la edición del genoma. (A) Se tomaron fotografías para la expresión transitoria de DsRED 3 días después del bombardeo. (B) Se realizó la secuenciación de Sanger para detectar mutaciones en los 3 genomas de cada evento transgénico.

10 **Figura 8.** Efecto del tratamiento con temperatura sobre la calidad del tejido del callo y el crecimiento en trigo. Datos del tratamiento térmico del cultivo de tejidos. Tabla que expresa los resultados de un tratamiento osmótico de 1 día seguido de un tratamiento de temperatura de 1 día de 10 embriones cada uno y el peso final del tejido después de 35 días de inducción de callo expresado en gramos.

15 **Figura 9.** Eficiencia de mutación con cuatro tratamientos diferentes de temperatura y tres bombardeos en trigo.

20 **Figura 10.** Análisis molecular de plántulas de trigo M_0 con inactivación de PDS que muestran fenotipo albino. Análisis molecular de 2 eventos de mutación de PDS de fenotipo albino que indican mutaciones bialélicas en todos los genomas y secuencias. Las eliminaciones de nucleótidos se indican mediante letras rayadas en la columna «secuencia», mientras que los nucleótidos insertados o de reemplazo están subrayados. El sitio PAM adyacente (AGG) está en negrita y se indica con fuente gris. Las mutaciones de eliminación, inserción o reemplazo son con respecto a la secuencia de ATGACCACCTTCTTTTCAGCAGGTATGTC (SEQ ID NO:31). Las secuencias de arriba a abajo en la Figura 10 son las SEQ ID NO: 32-41. La secuencia de ARNg ATGACCACCTTCTTTTCAGCAGG es la SEQ ID NO:42.

25 **Figura 11.** Mutante homocigoto con inactivación triple que muestra fenotipo albino. Fotografías que muestran mutantes homocigotos triples de PDS albinos en placas y en Phytatrays™. Evento albino n.º 1 producido como resultado del tratamiento térmico de 1 día a 34 °C, que se muestra en placas y en Phytatray™. Evento albino n.º 2 producido como resultado del tratamiento térmico de 1 día a 34 °C, que se muestra en placas y en Phytatray™.

30 **Figura 12.** Fenotipo de plantas de progenie M_1 derivadas de PC14A con mutaciones monoalélicas y bialélicas en los tres genomas diferentes. Segregación de progenie M_1 del evento heterocigoto PC14A que contenía dos mutaciones monoalélicas y 1 mutación bialélica. Fotografía de 2 progenies M_1 albinas del total de 28 plántulas.

Figura 13. Análisis fenotípico y molecular de plantas de progenie M_1 derivadas de PC14A. PC14A es un evento M_0 con mutaciones monoalélicas y bialélicas en los 3 genomas diferentes.

Figura 14. Mutaciones en los genes *OsPi21* en las plantas de arroz M_0 editadas mediante bombardeo con RNP. Los nucleótidos insertados están subrayados. Los nucleótidos en negrita son una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM) (GGG) de 3 nt inmediatamente en 3' del sitio diana. Las secuencias de arriba a abajo en la Figura 14 son la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 44.

Figura 15. Resultados de la secuenciación de amplicones de 2 grupos diferentes de plantas de trigo M_0 . Se indican las indeles (eliminaciones, sustituciones e inserciones). Las secuencias de arriba a abajo en la columna izquierda de la Figura 15 (grupo n.º 2) son las SEQ ID NO: 46-115. Las secuencias de arriba a abajo en la columna derecha de la Figura 15 (grupo n.º 16) son las SEQ ID NO: 116-201.

Figura 16. Genotipificación de dieciocho plantas de trigo M_0 mediante secuenciación Sanger. «+» indica la presencia de una mutación.

Figura 17. Curva de viabilidad de protoplastos de trigo, que demuestra una disminución de la viabilidad a temperaturas más altas. $N=3$. Las barras de error indican SEM.

Figura 18. Eficiencia de edición dirigida de ribonucleoproteínas (RNP) de ARNg-Cas9 con diferentes tratamientos de temperatura en protoplastos de trigo, lo que demuestra una mayor edición a 30 °C. Se evaluaron cinco ARNg, *Pi21gD*, *Tsn1g2*, *Tsn1g3*, *Snn5g1* y *Snn5g2*, y se transfectaron de forma independiente en protoplastos. $N=3$. Las barras de error indican SEM.

Figuras 19A-19B. Bombardeo de partículas de Cas9-RNP y tratamiento térmico de embriones inmaduros (IE) de trigo. (Figura 19A) Un esquema del proceso de ensayo de eficiencia de edición y bombardeo de partículas. (Figura 19B) Eficiencia de edición dirigida de ribonucleoproteínas (RNP) de ARNg-Cas9 con diferentes tratamientos de temperatura en IE en distintos puntos temporales. Se bombardearon de forma independiente cinco ARNg, *Pi21gD*, *Tsn1g2*, *Tsn1g3*, *Snn5g1* y *Snn5g2*, en IE. Los grupos de tejidos a 14 dpb y 48 dpb consistieron en 10 IE inicialmente bombardeados elegidos al azar. La eficiencia de edición para plantas M_0 se basa en datos agregados de todas las plantas M_0 genotipificadas independientemente que surgieron de 10 IE inicialmente bombardeados elegidos al azar. El porcentaje de tejido editado se define como el porcentaje de tejido con inserciones o eliminaciones dentro de 2 pb del sitio de escisión diana del conjunto total de tejido.

Figura 20. Resumen de los resultados de la edición en *Pi21*, *Tsn1* y *Snn5* dirigidos a plantas de trigo M_0 . Los datos de *Pi21* están desglosados por subgenoma. Un subgenoma es un subconjunto de un genoma, especialmente, uno que tiene una función específica. *Tsn1* y *Snn5* solo están presentes en el subgenoma B. «% de tejido editado» indica el porcentaje de alelos editados entre el total de alelos

analizados de los grupos M_0 . «% de plantas editadas» indica el porcentaje de plantas con cualquier nivel de edición entre el total de plantas analizadas de los grupos M_0 .

Figuras 21A-21B. La edición mediada por Cas9-RNP en embriones inmaduros IE bombardeados con partículas de oro se mantiene en el tiempo. (Figura 21A) Cuantificación de la cantidad de alelos mutantes únicos detectados mediante secuenciación profunda. (Figura 21B) Detección por transferencia Western de Cas9 en muestras bombardeadas con 10-IE tomadas a 0, 2, 7 y 14 dpb con anticuerpo anti-Cas9. Las transferencias superior e inferior representan 2 conjuntos independientes de 10 IE. + = 9 ng (superior) y 3 ng (inferior) Cas9; - = IE que no fueron bombardeados con Cas9-RNP; volumen de carga de 25 μ l (superior) y 40 μ l (inferior) de extracto de proteína soluble total por muestra de IE.

Figura 22. Ejemplo de la diferencia en la cantidad de alelos mutantes únicos entre 14 dpb y 48 dpb. Se proporcionan los alelos detectados en embriones inmaduros de trigo bombardeados con RNP Tsn1g2-Cas9 y tratados a 37 °C. La línea discontinua vertical en negrita representa el sitio de escisión de Cas9. Los alelos mutantes están marcados con *. Los alelos de tipo salvaje están marcados como WT. Las líneas discontinuas indican eliminaciones de pares de bases, los cuadros indican inserciones de pares de bases y las letras en negrita indican sustituciones de pares de bases. Las secuencias de arriba a abajo en la Figura 22 son las SEQ ID NO:202-226.

Figuras 23A-23B. Gráfico de correlación entre la eficiencia de edición dirigida de RNP de ARNg-Cas9 en protoplastos y embriones inmaduros (IE) de trigo en (**Figura 23A**) 48 dpb y en (**Figura 23B**) plantas M_0 tratadas a 30 °C.

Figuras 24A-24M. El ensayo SnToxA en *Tsn1* se dirigió a regenerantes de trigo M_0 . (Figura 24A) Control de campo cultivado a partir de semillas. (Figuras 24B-M) regenerantes de M_0 independientes con genotipos (Figuras 24B, C) de tipo salvaje homocigotos; (Figuras 23D-H) heterocigotos (Figura 24D) -2; (Figura 24E) -5; (Figura 24F) -31; (Figura 24G) -1; (Figura 24H) +1; y (Figuras 24I-M) mutante bialélico u homocigoto (Figura 24I) -2, -5; (Figura 24J) -2, -2, (Figura 24K) -1, -1; (Figura 24L) -2, -2; (Figura 24M) -1, -1. La notación de mutación es la siguiente: un número positivo, +, indica el número de bases insertadas, un número negativo, -, indica el número de bases eliminadas.

Figuras 25A-25M. El ensayo SnTox5 en *Snn5* se dirigió a regenerantes de trigo M_0 . (Figura 25A) Control de campo cultivado a partir de semillas. (Figuras 25B-M) regenerantes de M_0 independientes con genotipos (Figura 25B) de tipo salvaje homocigotos; (Figuras 25C-D) mutante heterocigoto en el marco: (Figura 25C) -3; (Figura 25D) -6; (Figuras 25E-H) mutante heterocigoto: (Figura 25E) -5; (Figura 25F) +20; (Figura 25G) +2-1; (Figura 25H) -4; (Figuras 25I-M) mutante

bialélico u homocigoto: (Figura 25I) -11, -4; (Figura 25J) -8, -2; (Figura 25K) -10, -10; (Figura 25L) +1, -2; (Figura 25M) -5, -1. La notación de mutación es la siguiente: un número positivo, +, indica el número de bases insertadas, un número negativo, -, indica el número de bases eliminadas.

Figura 26. Secuencias diana de ARNg. Las secuencias de arriba a abajo en la Figura 26 son las SEQ ID NO:227-231.

Figura 27. Cebadores utilizados para amplificar la región diana para la secuenciación de amplicones de última generación. Los nucleótidos que se muestran en letras mayúsculas son el extremo 5' compatible con la preparación de la biblioteca Illumina™ NGS. Las secuencias de arriba a abajo en la columna izquierda de la Figura 15 (cebador F) son las SEQ ID NO: 232-235. Las secuencias de arriba a abajo en la columna derecha de la Figura 15 (cebador R) son las SEQ ID NO: 236-239.

Figuras 28A-28B. Manchado de pequeñas gotas de suspensión de micropartículas sobre el disco microportador. Se esparcen múltiples gotas pequeñas de suspensión de micropartículas recubiertas con una proteína o RNP sobre el círculo interno de un disco microportador (Figura 28A). Las micropartículas se bombardean mediante el uso de una pistola de partículas a presión de helio (Figura 28B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción se refiere a la administración de proteínas a células vegetales mediante biolística. Los métodos anteriores recubrían micropartículas con proteína(s) y, luego, se extiende una suspensión que contiene las micropartículas sobre el círculo interno de un disco macroportador. El disco macroportador cargado se congela en nitrógeno líquido y se liofiliza mediante el uso de un liofilizador o se seca al aire. Sin embargo, las suspensiones de micropartículas son difíciles de distribuir uniformemente e incluso la liofilización o el secado al aire pueden ser difíciles de lograr debido a la tensión superficial de la suspensión.

La presente descripción describe un método de dispersión eficiente y secado al aire rápido para suspensión de micropartículas con tensión superficial mínima que da como resultado una administración eficiente de proteínas a las células vegetales diana. Además, la presente descripción describe un método eficiente de edición de genes en plantas con tratamientos a alta temperatura.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para administrar biolísticamente una sustancia al tejido vegetal que comprende:

(a) aplicar una presión de ruptura o bombardeo de alrededor de 100 psi a alrededor de 3000 psi a un disco macroportador que transporta al menos una gota de micropartículas recubiertas para bombardear las micropartículas recubiertas en el tejido vegetal para formar tejido vegetal bombardeado, en donde las micropartículas tienen un tamaño de alrededor de 0,1 μm a alrededor de 2,0 μm y en

donde las micropartículas se encuentran en un volumen de suspensión de micropartículas de alrededor de 0,1 µl a alrededor de 50 µl; y

(b) cultivar el tejido vegetal bombardeado en medios de crecimiento en condiciones óptimas de incubación para cada sustancia.

5 Un aspecto de la invención incluye un método para administrar una sustancia al tejido vegetal, que comprende:

(a) administrar biolísticamente micropartículas recubiertas con la sustancia al tejido vegetal para generar tejido vegetal bombardeado,

en donde las micropartículas se administran biolísticamente con una pistola genética,

10 en donde se extienden 2 o más gotas de suspensión de micropartículas sobre el círculo interior del disco macroportador antes del secado o la liofilización,

en donde una gota de suspensión de micropartículas se encuentra en un volumen de alrededor de 0,1 µl a alrededor de 10 µl,

15 en donde las gotas de suspensión de micropartículas se encuentran en un volumen de alrededor de 0,1 µl a alrededor de 50 µl,

en donde las micropartículas tienen un tamaño de alrededor de 0,1 µm a alrededor de 2,0 µm, y

en donde la administración biolística se realiza a una presión de ruptura de alrededor de 100 psi a alrededor de 3000 psi, y

20 (b) cultivar el tejido vegetal bombardeado en medios de crecimiento en condiciones óptimas de incubación para cada sustancia.

En determinados aspectos, se utilizan diferentes métodos para acelerar las partículas: estos incluyen dispositivos neumáticos; instrumentos que utilizan un impulso mecánico o macroproyectil; fuerzas centrípetas, magnéticas o electrostáticas; pistolas pulverizadoras o de vacunación; y aparatos basados en aceleración por onda de choque, tal como descarga eléctrica. En determinados aspectos, se
25 utiliza una pistola genética, tal como, por ejemplo, una pistola Bio-Rad PDS 1000. En otros aspectos, se utiliza una pistola de entrada de partículas (PIG) genérica. Ambas pistolas genéticas utilizan presión de helio.

Los aspectos de la invención también incluyen un método para administrar RNP al tejido vegetal, que comprende:

30 (a) administrar biolísticamente micropartículas recubiertas con la sustancia al tejido vegetal para generar tejido vegetal bombardeado,

en donde las micropartículas se administran biolísticamente con una pistola genética,

(b) la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza de alrededor de 26 °C a

alrededor de 40 °C, y

(c) cultivar el tejido vegetal bombardeado en medios de crecimiento.

En determinados aspectos, el tejido vegetal se encuentra en un embrión inmaduro (IE), tejido de callo, embrión somático, embrión cigótico, tejido de meristemo, polen, cotiledón, tejido de hoja, tallo o raíz.

En determinados aspectos, la planta es una planta de cultivo.

En determinados aspectos, la planta de cultivo es trigo, arroz, maíz, soja, pimiento, alfalfa, girasol, yuca, cacao, plátano, patata, boniato, fresa, uva, álamo, café, nuez, almendra, melocotón, nectarina, ciruela, albaricoque, manzana, pera, caqui, arándano, mora, frambuesa o un árbol frutal.

En determinados aspectos, las micropartículas tienen un tamaño de alrededor de 0,1 μm a alrededor de 2,0 μm .

En determinados aspectos, las micropartículas tienen un tamaño de alrededor de 0,4 a alrededor de 1,6 μm .

En determinados aspectos, las micropartículas tienen un tamaño de alrededor de 0,5 μm a alrededor de 0,7 μm .

En determinados aspectos, la micropartícula tiene un tamaño de alrededor de 0,6 μm .

En determinados aspectos, la presión de ruptura es de alrededor de 100 psi a alrededor de 3000 psi.

En determinados aspectos, la presión de ruptura es de alrededor de 500 psi a alrededor de 2300 psi.

En determinados aspectos, la presión de ruptura es de alrededor de 600 psi a alrededor de 2200 psi.

En determinados aspectos, la presión de ruptura es de alrededor de 650 psi a alrededor de 1350 psi.

En determinados aspectos, la presión de ruptura es de alrededor de 1100 psi.

En determinados aspectos, la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza de alrededor de 26 °C a alrededor de 40 °C.

En determinados aspectos, la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza de alrededor de 30 °C a alrededor de 37 °C.

En determinados aspectos, la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza a alrededor de 34 °C.

En determinados aspectos, la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza durante alrededor de 1 hora a alrededor de 180 días después del bombardeo.

En determinados aspectos, la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza durante alrededor de 24 horas a alrededor de 30 días después del bombardeo.

En determinados aspectos, la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza durante alrededor de 2 días a alrededor de 14 días después del bombardeo.

5 En determinados aspectos, la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza durante alrededor de 7 días después del bombardeo.

En determinados aspectos, la incubación del tejido vegetal bombardeado se realiza durante alrededor de 3 días después del bombardeo.

En determinados aspectos, la sustancia en la micropartícula comprende una proteína de interés.

10 En determinados aspectos, la sustancia en la micropartícula comprende una proteína Cas9.

En determinados aspectos, la sustancia de la micropartícula comprende ácido nucleico.

En determinados aspectos, la sustancia de la micropartícula comprende ribonucleoproteínas (RNP) de ARNg-Cas9.

En determinados aspectos, la suspensión de micropartículas se encuentra en un volumen de
15 alrededor de 1 μ l a alrededor de 50 μ l por bombardeo. En determinados aspectos, la micropartícula se encuentra en un volumen de alrededor de 10 μ l a alrededor de 30 μ l por bombardeo. En determinadas modalidades, la suspensión de micropartículas se encuentra en un volumen de 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l, 6 μ l, 7 μ l, 8 μ l, 9 μ l, 10 μ l, 11 μ l, 12 μ l, 13 μ l, 14 μ l, 15 μ l, 16 μ l, 17 μ l, 18 μ l, 19 μ l, 20 μ l, 21 μ l, 22 μ l, 23 μ l, 24 μ l, 25 μ l, 26 μ l, 27 μ l, 28 μ l, 29 μ l, 30 μ l, 31 μ l, 32 μ l, 33 μ l, 34 μ l, 35 μ l, 36 μ l, 37 μ l, 38 μ l, 39 μ l, 40 μ l, 41 μ l, 42 μ l, 43 μ l, 44 μ l, 45 μ l, 46 μ l, 47 μ l, 48 μ l, 49 μ l o 50 μ l. En determinados
20 aspectos, la suspensión se aplica como una o más gotas y, luego, se extiende sobre el disco interno del microportador mediante el uso de una espátula, una punta de pipeta u otros medios mecánicos.

Bombardeo de tejido vegetal

25 La tecnología de edición del genoma sin ADN que utiliza complejos de ribonucleoproteína (RNP) de CRISPR/Cas9 se ha convertido recientemente en una herramienta valiosa, especialmente en especies de cultivos que se propagan vegetativamente porque los transgenes no se segregan como ocurre en los procesos estándar de fitomejoramiento. Se ha demostrado mutagénesis dirigida después de la administración directa de Cas9-RNP preensambladas en varios sistemas de protoplastos de plantas.
30 Algunos han producido plantas editadas tras la transfección de protoplastos individuales; sin embargo, la regeneración de varios protoplastos de plantas de cultivo no es factible y depende del genotipo con los métodos actuales. También se ha informado sobre la administración biolística de Cas9-RNP en embriones de maíz, trigo y arroz, pero las tasas de edición han sido generalmente bajas o, en ocasiones,

no reproducibles.

En el método descrito en la presente, se depositan gotas de suspensiones de micropartículas y se secan en un disco macroportador. Las micropartículas utilizadas en el método se han recubierto con RNP que comprenden la proteína Cas9 formando un complejo con ARN guía y tracr. Los parámetros de bombardeo utilizados se seleccionan para un intervalo específico de tamaño de micropartículas, presión del disco de ruptura y cantidad disparos para una transformación más eficiente. Los tejidos vegetales diana de la transformación pueden seleccionarse de una amplia gama de fuentes que incluyen callos, embriones somáticos, embriones cigóticos, tejido de meristemo, polen, cotiledón, tejido de hojas, tallos y raíces.

Un microportador (también denominado «micropartícula» o «microproyector») es una pequeña micropartícula de oro, tungsteno u otra micropartícula que se utiliza para bombardear con una pistola genética. Los microportadores se recubren con cualquier reactivo tal como ADN, ARN, proteínas o RNP antes del bombardeo a las células diana. En determinadas modalidades, el microportador (partícula de oro) tiene un tamaño de 0,4 μm , 0,6 μm , 1,0 μm o 1,6 μm .

Un «macroportador» es un sustrato sólido (tal como un disco) sobre el cual se pueden depositar los microportadores (por ejemplo, micropartículas de oro). Las **Figuras 28A-28B** proporcionan una ilustración de una modalidad del presente método.

Ácidos nucleicos

La expresión «ácido nucleico» hace referencia a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) y polímeros de estos en forma de cadena simple o doble, compuestos por monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es una purina o pirimidina. A menos que se limite de manera específica, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que poseen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia ácidos nucleicos en particular también abarca las variantes modificadas de forma conservadora de esta (por ejemplo, sustituciones de codones redundantes) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de manera explícita. Específicamente, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las que se sustituye la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados con residuos de desoxiinosina y/o base mezclados. Un «fragmento de ácido nucleico» es una parte de una molécula de ácido nucleico determinada.

Las expresiones «polinucleótido», «ácido nucleico» y «fragmento de ácido nucleico» se utilizan

de forma indistinta en la presente. Estos términos abarcan nucleótidos conectados por enlaces fosfodiéster. Un «polinucleótido» puede ser un polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena simple o doble, que opcionalmente contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Un polinucleótido en forma de polímero de ADN puede comprender uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico, ADN sintético o mezclas de estos. Las bases de nucleótidos se indican en la presente mediante un código de una sola letra: adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C), inosina (I) y uracilo (U). A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique de otro modo, una secuencia ácidos nucleicos en particular también abarca implícitamente las variantes modificadas de forma conservadora de esta (por ejemplo, sustituciones de codones redundantes) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de manera explícita. Específicamente, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las que se sustituye la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados con residuos de desoxiinosina y/o base mezclados.

Una «secuencia de nucleótidos» es un polímero de ADN o ARN que puede ser de cadena simple o de cadena doble, que contiene opcionalmente bases de nucleótidos de carácter sintético, no natural o alterado con capacidad de incorporación a polímeros de ADN o ARN. Las expresiones «ácido nucleico», «molécula de ácido nucleico», «fragmento de ácido nucleico», «secuencia o segmento de ácido nucleico» o «polinucleótido» se usan de forma indistinta y también pueden usarse de forma indistinta con un gen, ADNc, ADN y ARN codificados por un gen.

La invención abarca composiciones de ácido nucleico considerablemente purificado. En el contexto de la presente invención, una molécula de ADN o molécula de ARN «aislada» o «purificada» es una molécula de ADN o molécula de ARN que existe aparte de su entorno natural y, por lo tanto, no es un producto de la naturaleza. Una molécula de ADN o molécula de ARN aislada puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora transgénica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico «aislada» o «purificada», o una parte con actividad biológica de esta, está considerablemente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o considerablemente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. En una modalidad, un ácido nucleico «aislado» está libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido nucleico. La presente invención también abarca fragmentos y variantes de las secuencias de

nucleótidos descritas. Por «fragmento» o «parte» se entiende una longitud completa o menos que la longitud completa de la secuencia de nucleótidos.

«De origen natural», «natural» o «de tipo salvaje» se usan para describir un objeto que se puede encontrar en la naturaleza en contraposición a ser producido artificialmente. Por ejemplo, una proteína o una secuencia de nucleótidos presente en un organismo (incluido un virus), que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por una persona en el laboratorio, es de origen natural.

«Genoma» hace referencia al material genético completo de un organismo.

La «identidad», tal como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, tal como se determina al comparar las secuencias. En la técnica, «identidad» también hace referencia al grado de relación de secuencias entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, tal como se determina según la coincidencia entre cadenas de esas secuencias. La «identidad» y «similitud» pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, que incluyen, de modo no taxativo, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, de modo no taxativo, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al. 1984), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F., et al, 1990. El programa BLASTX está disponible al público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., 1990). El conocido algoritmo de Smith Waterman también puede utilizarse para determinar la identidad.

Promotores

«Promotor» hace referencia a una secuencia de nucleótidos, habitualmente anterior (5') con respecto a su secuencia codificante, que controla la expresión de la secuencia codificante al proporcionar el reconocimiento de la ARN polimerasa y otros factores necesarios para una transcripción adecuada. «Promotor» incluye un promotor mínimo que es una secuencia de ADN corta compuesta por una caja

TATA y otras secuencias que sirven para especificar el sitio de inicio de la transcripción, que recibe la adición de elementos reguladores para el control de la expresión. «Promotor» también hace referencia a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores que son capaces de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo de secuencia

5 promotora consiste en elementos anteriores proximales y más distales, estos últimos elementos a menudo se denominan «potenciadores». Por consiguiente, un «potenciador» es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o la especificidad tisular de un promotor. Es capaz de funcionar en ambas orientaciones (normal o invertida) y es capaz de funcionar incluso cuando se mueve en dirección anterior

10 o posterior con respecto al promotor. Tanto los potenciadores como otros elementos promotores anteriores se unen a proteínas de unión al ADN específicas de secuencia que median sus efectos. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen natural, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores que se encuentran en la naturaleza, o incluso estar compuestos por segmentos de ADN sintético. Un promotor también puede contener secuencias de ADN que participan

15 de la unión de factores proteicos que controlan la eficacia del inicio de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o de desarrollo. En la patente estadounidense n.º 7.501.129, que se incorpora a la presente mediante referencia, se proporciona una descripción general sobre los promotores.

La invención abarca composiciones de ácido nucleico considerablemente purificado. En el contexto de la presente invención, una molécula de ADN o molécula de ARN «aislada» o «purificada»

20 es una molécula de ADN o molécula de ARN que existe aparte de su entorno natural y, por lo tanto, no es un producto de la naturaleza. Una molécula de ADN o molécula de ARN aislada puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora transgénica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico «aislada» o «purificada», o una parte con actividad biológica de esta, está considerablemente libre de otro material celular, o medio de cultivo

25 cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o considerablemente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. En una modalidad, un ácido nucleico «aislado» está libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas modalidades, la molécula de ácido nucleico aislada puede

30 contener menos de alrededor de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que deriva el ácido nucleico. La presente invención también abarca fragmentos y variantes de las secuencias de nucleótidos descritas. Por «fragmento» o «parte» se entiende una longitud completa o menos que la

longitud completa de la secuencia de nucleótidos.

En determinadas modalidades, en la presente invención se proporcionan vectores y casetes de expresión que contienen los promotores descritos anteriormente. Se define que un «vector» incluye, entre otras cosas, cualquier vector viral, así como cualquier vector plásmido, cósmido, fágico o binario en forma circular o lineal de cadena simple o doble, que puede o no ser autotransmisible o movilizable, y que puede transformar al hospedador procariota o eucariota, ya sea mediante integración en el genoma celular o existir extracromosómicamente (por ejemplo, un plásmido replicante autónomo con un origen de replicación).

Los ácidos nucleicos que codifican composiciones terapéuticas pueden diseñarse en un vector mediante el uso de técnicas de ligadura convencionales, tales como las descritas en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY (2001). Por ejemplo, las ligaduras pueden lograrse en Tris-Cl a 20 mM, pH 7,5, MgCl₂ a 10 mM, DTT a 10 mM, BSA a 33 µg/mL, NaCl a 10 mM-50 mM y ATP a 40 µM, ADN ligasa T4 a 0,01-0,02 unidades (Weiss) a 0 °C (para la ligadura de «extremos pegajosos») o ATP a 1 mM, ADN ligasa T4 a 0,3-0,6 unidades a 14 °C (para la ligadura de «extremos romos»). Las ligaduras intermoleculares de «extremos pegajosos» habitualmente se realizan en concentraciones totales de ADN de 30-100 µg/mL (concentración total de extremo de 5-100 nM).

En determinadas modalidades, en la presente invención se proporciona un vector que contiene un casete de expresión que comprende un promotor enlazado operativamente a una secuencia diana (por ejemplo, una proteína PEDV S1) para la producción de una vacuna. «Casete de expresión», tal como se usa en la presente, significa una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula hospedadora adecuada, que incluye un promotor enlazado operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que puede estar enlazada operativamente a las señales de terminación. La región codificante habitualmente codifica un ARN funcional de interés, por ejemplo, una molécula de ARNi. El casete de expresión que incluye la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico.

«Enlazado/a operativamente» hace referencia a la asociación de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos en un solo fragmento molecular de forma tal que la función de una de las secuencias se ve afectada por otra. Por ejemplo, se dice que una secuencia de ADN reguladora está «enlazada operativamente a» o «asociada a» una secuencia de ADN que codifica un ARN o un polipéptido, si las dos secuencias están situadas de forma tal que la secuencia de ADN reguladora afecta la expresión de la secuencia de ADN codificante (es decir, que la secuencia codificante o el ARN funcional está bajo el control de transcripción del promotor). Las secuencias codificantes pueden enlazarse operativamente a

secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido. El ácido nucleico está «enlazado operativamente» cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, «enlazado operativamente» significa que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se logra mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si esos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Además, se pueden enlazar entre sí múltiples copias de ácidos nucleicos que codifican enzimas en el vector de expresión. Esos múltiples ácidos nucleicos pueden estar separados por enlazadores.

«Expresión» hace referencia a la transcripción y/o traducción de un gen endógeno o un transgén en las células. Por ejemplo, en el caso de las construcciones no codificantes, la expresión puede hacer referencia únicamente a la transcripción del ADN no codificante. Además, la expresión hace referencia a la transcripción y acumulación estable de ARN codificante (ARNm) o funcional. La expresión también puede hacer referencia a la producción de proteínas.

«Casete de expresión», tal como se usa en la presente, significa una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula hospedadora adecuada, que comprende un promotor enlazado operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que está enlazada operativamente a las señales de terminación. También comprende normalmente secuencias necesarias para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótidos. La región codificante habitualmente codifica una proteína de interés, pero también puede codificar un ARN funcional de interés, por ejemplo, un ARN no codificante o un ARN no traducido, en la dirección sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno de origen natural, pero que se haya obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Esos casetes de expresión comprenderán la región de inicio de la transcripción enlazada a una secuencia de nucleótidos de interés. Ese casete de expresión puede estar provisto de múltiples sitios de restricción para que la inserción del gen de interés esté bajo la regulación de transcripción de las regiones reguladoras. El casete de expresión puede contener, además, genes marcadores seleccionables.

Proteínas

Los términos «proteína», «péptido» y «polipéptido» se usan de forma indistinta en la presente.

El término «aminoácido» incluye los residuos de los aminoácidos naturales (por ejemplo, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Hyl, Hyp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val)

en formas estereoisoméricas dextrógiras o levógiras, así como aminoácidos no naturales (por ejemplo, fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, hidroxiprolina y gamma-carboxiglutamato; ácido hipúrico, ácido octahidroindol-2-carboxílico, estatina, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, penicilamina, ornitina, citrulina, alfa-metil-alanina, para-benzoilfenilalanina, fenilglicina, propargilglicina, sarcosina y terc-butilglicina). El término también comprende aminoácidos naturales y no naturales (estereoisómeros dextrógiros y levógiros) que presentan un grupo protector amino convencional (por ejemplo, acetilo o benciloxicarbonilo), así como aminoácidos naturales y no naturales protegidos en el extremo carboxi (por ejemplo, como un éster o amida de bencilo, fenilo o alquilo(C₁-C₆); o como una α -metilbencilamida). Los expertos en la técnica conocen otros grupos protectores de amino y carboxi adecuados (véase, por ejemplo, Greene, T.W.; Wutz, P.G.M., *Protecting Groups In Organic Synthesis*; segunda edición, 1991, Nueva York, John Wiley & sons, Inc. , y los documentos allí citados). Un aminoácido puede enlazarse al resto de un compuesto a través del extremo carboxi, extremo amino o mediante cualquier otro punto de unión conveniente, tal como, por ejemplo, a través del azufre de la cisteína.

La invención abarca composiciones de proteínas aisladas o considerablemente purificadas. En el contexto de la presente invención, un polipéptido «aislado» o «purificado» es un polipéptido que existe separado de su entorno natural y, por lo tanto, no es un producto de la naturaleza. Un polipéptido puede existir en forma purificada o puede existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora transgénica. Por ejemplo, una proteína «aislada» o «purificada», o una parte con actividad biológica de esta, está considerablemente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o considerablemente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Una proteína que está considerablemente libre de material celular incluye preparaciones de proteína o polipéptido que tienen menos de alrededor de 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando la proteína de la invención, o una parte con actividad biológica de esta, se produce de forma recombinante, preferentemente, el medio de cultivo representa menos de alrededor de 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de precursores químicos o sustancias químicas que no sean proteínas de interés. La presente invención también abarca fragmentos y variantes de las proteínas descritas o proteínas de longitud parcial codificadas por estas. «Fragmento» o «parte» hace referencia a una longitud completa o menos que la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de, un polipéptido o una proteína.

Una «variante» de una molécula es una secuencia considerablemente similar a la secuencia de la molécula natural.

«Aislado/a» significa alterado/a o extraído/a del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico

o un péptido presente naturalmente en un animal vivo no está «aislado», sino que el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está «aislado». Un ácido nucleico aislado o una proteína aislada pueden existir en forma sustancialmente purificada o pueden existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora. A menos que se especifique particularmente de otro modo en la presente, las proteínas, los complejos de viriones, los anticuerpos y otras moléculas biológicas que forman la materia de la presente invención se aíslan o pueden aislarse.

La expresión «identidad considerable» en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia que tiene al menos 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, o 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 % u 89 %, al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 % o 94 %, o 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de referencia a través de una ventana de comparación indicada. La alineación óptima se realiza mediante el uso del algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970). Una indicación de que dos secuencias peptídicas son considerablemente idénticas es que un péptido es inmunológicamente reactivo con anticuerpos generados contra el segundo péptido. Por lo tanto, un péptido es considerablemente idéntico a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por una sustitución conservadora.

A continuación, la invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no taxativos.

EJEMPLO 1

Mejora de la administración de genes y la eficiencia de las mutaciones en el sistema genómico del trigo con CRISPR-Cas9 mediante biolística

Resumen

El descubrimiento del sistema de edición de genes CRISPR-Cas9 revolucionó el campo de la genómica vegetal. A pesar de las ventajas en la facilidad de diseño de ARNg y el bajo costo del sistema CRISPR-Cas9, todavía quedan obstáculos por superar en las bajas eficiencias de mutación, específicamente, en el trigo hexaploide. Junto con la administración de genes y la frecuencia de transformación, el cuello de botella en la tasa de mutación tiene el potencial de frenar los avances en la edición genómica del trigo. En este estudio, se evaluaron nueve combinaciones de parámetros de bombardeo mediante el uso de tres tamaños de partículas de oro y tres presiones de disco de ruptura para establecer frecuencias de transformación estables óptimas en el trigo. Mediante el uso del mejor protocolo de transformación y un casete de inactivación del gen de la fitoeno desaturasa, se sometieron embriones transformados a cuatro tratamientos de temperatura y se compararon las eficiencias de

mutación. El uso de partículas de oro de 0,6 μm para el bombardeo aumentó las frecuencias de transformación en todas las presiones de administración. Un tratamiento térmico de 34 °C durante 24 horas dio como resultado la mayor eficiencia de mutación con una reducción mínima o nula en la frecuencia de transformación. El tratamiento a 34 °C produjo dos eventos mutantes M_0 con fenotipos albinos, lo que requiere mutaciones bialélicas en los tres genomas del trigo hexaploide. Mediante el uso de parámetros de transformación óptica y tratamiento térmico aumenta significativamente la eficiencia de mutación y puede ayudar al avance en los esfuerzos de investigación en la genómica del trigo.

Introducción

El desarrollo moderno de variedades de trigo se obtiene mediante transferencia génica directa o indirecta, generalmente, mediante *Agrobacterium* y bombardeo de partículas, respectivamente. A través de la transformación mediada por *Agrobacterium*, los genes seleccionados se transfieren de bacterias a células vegetales a través de vectores desarmados de *Agrobacterium* y, luego, se generan plantas enteras mediante cultivo de tejidos. La transformación mediada por *Agrobacterium* se ha establecido bien en una variedad de cultivos y es ventajosa para la transferencia intacta de fragmentos de ADN más grandes. Aunque la transformación mediada por *Agrobacterium* puede producir numerosos casos de eventos de copia única y administración de ADN T intacto, carece de coherencia entre especies, genotipos y tipos de tejidos, especialmente, en variedades más recalcitrantes. Esta especificidad limita la capacidad de impacto en múltiples cultivos o cultivares, además de más obstáculos regulatorios relacionados con la transferencia de la estructura principal binaria de *Agrobacterium*.

Por el contrario, el bombardeo de partículas es un método de transferencia directa de genes en el que el ADN se precipita sobre partículas de oro y se administra al tejido vegetal mediante el uso de gas helio a alta presión. En este sistema hay múltiples factores que se pueden ajustar para optimizar la administración de ADN, tal como el tamaño de las partículas de oro, la cantidad de partículas de oro, la presión de administración, la cantidad de ADN y la distancia desde el tejido vegetal. Se eligió utilizar el bombardeo de partículas como sistema de administración de genes porque depende menos de las especies y del genotipo. Aunque el bombardeo de partículas puede tener casos más elevados de eventos de copias múltiples, las copias a menudo están ubicadas en el mismo lugar, lo que permite una fácil segregación en generaciones futuras. Además, dado que el bombardeo de partículas es una forma de administración directa de genes, es un mecanismo que no está regulado y puede resultar en un proceso regulatorio más ágil.

Hoy en día, a la vanguardia de la modificación genética se encuentran la edición de genes y CRISPR. El sistema de edición de genes CRISPR-Cas9 se utiliza ampliamente para mejorar diversos

cultivos extensivos. El sistema permite a los investigadores utilizar repeticiones cortas de ADN endógeno en el genoma de la planta derivado de bacteriófagos para identificar ubicaciones específicas en el genoma para la edición de genes. Junto con estas repeticiones de ADN, la proteína Cas9 está programada para cortar el ADN bicatenario en ubicaciones precisas y permite la edición específica del sitio dentro del genoma de la planta. La capacidad de realizar ediciones genéticas específicas de un sitio en una planta le da a esta tecnología una ventaja sobre los métodos tradicionales de modificación genética que insertan ADN al azar. El sistema CRISPR-Cas9 permite no solo la inserción de ADN nuevo en las plantas sino también la eliminación o el silenciamiento de genes individuales dentro del genoma que pueden conferir una variedad de fenotipos ventajosos.

Las eficiencias de mutación que utilizan el sistema CRISPR-Cas9 varían ampliamente entre las especies de monocotiledóneas. Las eficiencias de mutación del arroz pueden superar una tasa de mutación de 60 %, mientras que las eficiencias de mutación del trigo permanecen en alrededor de 10 % o menos. Sin embargo, la eficiencia de las mutaciones se ve afectada en gran medida por los componentes individuales de una construcción. La selección adecuada de promotores para impulsar la expresión de Cas9 y ARNGs puede aumentar los niveles de expresión y, en última instancia, tener un impacto positivo en la eficiencia de la mutación en plantas transformadas. Además, la evaluación de la eficiencia de la secuencia de ARNGs *in vivo* antes de la transformación estable es fundamental para maximizar la eficiencia de la mutación. Incluso la secuencia de la proteína Cas9 puede afectar la eficiencia de la mutación, mediante la optimización de codones y la presencia o ausencia de intrones. A nivel de planta, la eficiencia de la mutación depende del establecimiento de un protocolo de cultivo de tejidos eficaz que dependa predominantemente de la identificación de un buen explante inicial. Otro enfoque para aumentar la tasa de mutación en las plantas son los efectos de los tratamientos con temperatura. El efecto de los tratamientos con temperatura sobre la eficiencia de las mutaciones se ha demostrado en cultivos de células de mamíferos. El sistema CRISPR-Cas9 se estableció sobre un principio derivado de la inmunidad adaptativa de *Streptococcus pyogenes* a los virus. *S. pyogenes* crece de forma más dinámica a 40 °C. Es razonable esperar que la proteína Cas9 sea más eficiente a temperaturas más altas. Estudios recientes han informado efectos positivos del tratamiento con temperatura sobre la actividad del ARNG en las plantas.

El gen de la fitoeno desaturasa (PDS) se aplica comúnmente como demostración de tasas de mutación experimentales debido a su fenotipo visual y su amplia conservación entre especies. El gen PDS participa en la vía de síntesis de carotenoides en las plantas. Una mutación recesiva o inactivación del gen PDS interrumpe la formación de betacaroteno y confiere un fenotipo albino visual. La inactivación de PDS se ha demostrado en una variedad de especies que incluyen, de modo no taxativo,

Arabidopsis, arroz, plátano, yuca y melón. La inactivación de PDS, fenotipo albino, no se ha informado previamente en trigo hexaploide M_0 porque es probable que requiera mutaciones bialélicas en los seis locus de los tres genomas.

Encontrar una buena combinación de estos factores para aumentar la eficiencia de la mutación de CRISPR en el trigo es una herramienta valiosa para facilitar la producción de cultivares de trigo sólidos que puedan resistir los efectos del cambio climático más rápido que otros enfoques. En este estudio, se establecen parámetros para el bombardeo de partículas que dan como resultado frecuencias de transformación mejoradas, así como tratamientos con temperatura posteriores para aumentar la eficiencia de las mutaciones en el trigo hexaploide. También se informa la generación exitosa de eventos mutantes triples recesivos de PDS en la generación M_0 que muestran el fenotipo albino. Además, se demuestra el fenotipo albino en plantas de progenie M_1 derivadas de un evento editado con mutaciones monoalélicas y bialélicas en los tres genomas diferentes.

Material y métodos

Material vegetal

Semillas de *Triticum aestivum* L. cv. Los campos se sembraron semanalmente y se cultivaron en cámaras de crecimiento durante días de 16 horas a 24 °C y noches de 8 horas a 15 °C. Los niveles de luz se establecieron en aproximadamente 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a la altura de la cabeza. Se cosecharon espigas inmaduras 10-14 días después de la floración con un embrión inmaduro (IE) con un tamaño de 1,7-2,2 mm. Las espigas inmaduras se recolectaron hasta 5 días antes del bombardeo y se almacenaron a 4-6 °C. Un día antes del bombardeo, se recolectaron semillas inmaduras de espigas inmaduras y se esterilizaron en la superficie mediante el uso de lejía al 20 % (v/v) (hipoclorito de sodio al 8,25 %) más una gota de Tween 20 durante 15 minutos antes de un triple enjuague con agua esterilizada. Luego, se aislaron los IE y se colocaron con el escutelo hacia arriba en medio DBC3 y se incubaron a 26 °C durante la noche.

Plásmidos

Se usaron plásmidos, pAct1IHPT-4, pAct1IDsRED y pRGE610-PDS-PS2, para la transformación (**Figuras 1A-1C**). pAct1IHPT4 y pAct1IDsRED contienen genes de higromicina fosfotransferasa (*hpt*) y *DsRED*, respectivamente, cada uno bajo el control de los promotores de actina 1 del arroz, su intrón (*act1I*) y el terminador nos 3'. pRGE610-PDS-PS2 contiene el gen Cas9 y casetes de ARNg y se creó mediante las siguientes etapas. Primero, el promotor U6 de trigo con casete de detección azul-blanco se amplificó a partir de pTaU6-ARNgs (obsequio de Daniel Voytas) con los cebadores TaU6Lac-HindIII-F (5'-TAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGAT-3' SEQ ID NO:1) y

TaU6Lac-SbfI-R (5'-GCCCTGCAGGTCTAGATATCTCGAGGGTACCAAAGTCTGAG-3' SEQ ID NO:2). Se digirió pRGE32 (obsequio de Yinong Yang, Addgene ID 63159) con SbfI y HindIII para liberar el casete de ARNs original. Luego, el fragmento de PCR de la primera etapa se ligó a la estructura principal de pRGE32 digerido para crear pRGE610. A continuación, se amplificaron dos fragmentos de pGTR (obsequio de Yinong Yang, Addgene ID 63143). El primer fragmento, producto de TaU6-L5AD-BtgZI-F (5'-CGGGTCTCACTTGGCGATGTCTTGGTCTGCTTGACAAAGCACCAGTGG-3' SEQ ID NO:3) y PDS-PS2-gR (5'-TAGGTCTCAAGGTGGTCATTGCACCAGCCGGG-3' SEQ ID NO:4), contenía un ARNt y la primera mitad del espaciador PS2 de ARNs con salientes de 4 pb en cada sitio para permitir el ensamblaje de Golden Gate con el segundo fragmento. El segundo fragmento, producto de PDS-PS2-gF (5'-CGGGTCTCCACCTTCTTTTCAGCGTTTTAGAGCTAGAA-3' SEQ ID NO:5) y L3AD-BtgZI-R (5'-TAGGTCTCCAAACGCGATGGAGCGACAGCAAACAAAAAAGCACCAGTCTG-3' SEQ ID NO:6), contenía la segunda mitad de PS2 seguido por el andamiaje de ARNs y salientes para el ensamblaje del Golden Gate en cada sitio. Se utilizó el kit de ensamblaje NEB® Golden Gate (BsaI-HF®v2) para combinar ambos fragmentos. El producto resultante se usó como plantilla para los cebadores TaU6-S5AD-BtgZI-F (5'-CGGGTCTCACTTGGCGATGTCTTGGTCTGCTTG-3' SEQ ID NO:7) y S3AD-BtgZI-R (5'-TAGGTCTCCAAACGCGATGGAGCGACAGCAAAC-3' SEQ ID NO:8) para producir suficiente producto de ensamblaje Golden Gate para la digestión con BtgZI. Luego, el producto digerido con BtgZI se ligó a la estructura principal de pRGE610 digerida con BsaI, para finalmente crear pRGE610-PDS-PS2.

Transformación estable mediante bombardeo de partículas

Para el bombardeo se utilizaron IE aislados de espigas inmaduras (**Figura 2A**) y preincubados a 26 °C durante la noche. El día del bombardeo, se colocaron los IE encima de un papel de filtro de 40 mm en una placa de medio osmótico de DBC3 que contenía manitol y sorbitol (0,2 M cada uno) (**Figura 2B**). Cuatro horas después del tratamiento con el agente osmótico, los IE se bombardearon mediante el uso de una pistola de partículas Bio-Rad PDS-1000/He (**Figura 2C**). Se recubrieron dos miligramos de partículas de oro (0,4, 0,6 y 1,0 µm) con 5 µg de una mezcla de pAct1IHPT4 y pAct1IDsRED o pAct1IHPT4 y pRGE610-PDS-PS2 en una relación de 1:2. Cada preparación de partículas se resuspendió en 85 µL de EtOH al 100 % y se esparcieron 7,5 µL en el centro de un macroportador dentro de un soporte de macroportador. Las preparaciones de partículas se usaron para bombardeo con un dispositivo biolístico Bio-Rad PDS-1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA) a 3 presiones de suministro

diferentes (650, 900 y 1100 psi). Cada placa de IE fue bombardeada dos veces por tratamiento. Después del bombardeo, los IE se transfirieron del papel de filtro a los medios expuestos y se incubaron durante la noche a 26 °C con luz tenue ($3\text{-}10\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Dieciséis horas después del bombardeo, los IE se transfirieron a medio DBC3 y se incubaron a 26 °C durante 1 semana en condiciones de luz tenue.

5 Después del período de descanso, los IE pasaron por 3 rondas de selección a través de medios DBC3 que contenían 30 mg/l de higromicina B, y cada ronda de selección duró 3 semanas (**Figura 2D**). Después de la tercera ronda de selección, se inició la regeneración mediante el uso de medio DBC6 (Cho et al. 2015) que contenía 30 mg/l de higromicina B y se incubó a 26 °C con luz intensa ($90\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y se subcultivó cada 3 semanas. Una vez que los brotes tuvieron aproximadamente 0,5 cm de altura (**Figura**

10 **2E**), los brotes se transfirieron a un medio de enraizamiento WR para la formación de raíces. Luego, las plántulas se transfirieron al suelo una vez que tuvieron suficientes brotes para soportar el trasplante al suelo (**Figura 2F**).

Tratamiento con temperatura de embriones inmaduros bombardeados

15 Los IE bombardeados se sometieron a distintos tratamientos térmicos de 26 °C, 30 °C, 34 °C y 37 °C 4 días después del bombardeo durante 24 horas, y se incubaron en incubadoras microbiológicas de impacto Heratherm (n.º de cat. 50125590, Thermo Scientific, Grand Island, NY). Se evaluaron IE no bombardeados con tratamientos de temperatura para determinar la respuesta del cultivo de tejidos. Los IE se aislaron en medio DBC3 y se incubaron durante 1 día. Al día siguiente, se colocaron en medio

20 osmótico DBC3 durante 20 horas para replicar el mismo tratamiento que los IE bombardeados. Luego, los IE se transfirieron nuevamente al medio DBC3 durante 3 días y, luego, se dividieron y se trataron con tratamientos térmicos de 26 °C, 30 °C, 34 °C y 37 °C durante 24 horas. Se permitió que los IE crecieran y proliferaran hasta formar callos durante 5 semanas, momento en el cual se pesó colectivamente el callo en cada placa para comparar.

Visualización fluorescente

Se visualizaron imágenes fluorescentes de IE, callos y plántulas de eventos transgénicos de campo con un estereomicroscopio fluorescente Leica M165 FC, equipado con Leica DFC7000 T (JH Technologies, Fremont, CA), mediante el uso de dos filtros microscópicos, campo claro y ET DSR con

30 excitación de 545 nm y emisión de 620 nm. El microscopio está vinculado a un software de imágenes de cámara, Leica Application Suite versión 4.9, que se utilizó para capturar las imágenes fluorescentes. La detección de la actividad fluorescente se midió con diferentes aumentos.

Detección de transgenes y mutaciones de CRISPR/Cas9

El ADN genómico se extrajo del tejido foliar de acuerdo con un método de extracción CTAB. Los transgenes *dsRED*, *hpt* y *Cas9* se confirmaron mediante PCR mediante el uso de cebadores específicos de secuencia (**Figura 3**). Las amplificaciones se realizaron en una reacción de 25 µl con
 5 mezcla maestra de PCR DreamTaq (2X) (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY). Para cada reacción de PCR, se cargaron 23 µL en un gel de agarosa al 0,8 % para electroforesis.

Para la detección de mutaciones de PDS, se seleccionó como diana un fragmento dentro del rango de la mutación deseada mediante cebadores específicos de homoalelo en cada genoma (**Figura 3** y se amplificó mediante PCR). El producto de PCR amplificado se cortó y se extrajo el ADN de las
 10 muestras de gel mediante el uso del kit de extracción de gel Qiagen QIAquick® (QIAGEN, Chatsworth, CA). Las muestras de ADN purificadas se utilizaron para la secuenciación de Sanger. La eficiencia de la mutación se calculó como la cantidad de eventos únicos mutados por tratamiento dividido por la cantidad total de eventos regenerados a partir del mismo tratamiento.

Detección de mutaciones M1

Se eligió la línea de mutación heterocigota PC14A que contenía mutaciones monoalélicas en los genomas A y D y una mutación bialélica heterocigota en el genoma B para la detección de progenie de última generación. Se recolectaron IE M₁ con un tamaño de 2,0-3,0 mm de la planta M₀. La superficie de los IE se esterilizó con lejía al 20 % más una gota de Tween 20 durante 15 minutos. Los IE
 20 esterilizados se enjuagaron tres veces con agua esterilizada para eliminar el exceso de lejía. Luego, se extirparon los embriones inmaduros y se colocaron en el medio WR con el escutelo hacia abajo para su germinación. Una vez que las plántulas germinaron, se evaluó visualmente el fenotipo de la progenie y se tomaron muestras para el genotipado y el análisis de mutaciones.

Resultados y análisis

Optimización de parámetros de bombardeo de partículas para transformación de plantas

Tamaño de partícula de oro y frecuencia de transformación

La expresión transitoria de DsRED impulsada por el promotor de actina 1 de arroz y su intrón se detectó inicialmente 1 día después del bombardeo de partículas y fue clara 2 a 3 días después del
 30 bombardeo (**Figura 4A**). Se formaron sectores con expresión de DsRED (**Figura 4B**) y se generaron plántulas transformadas de manera estable 6-8 semanas y 10-12 semanas después del bombardeo, respectivamente (**Figuras 4C y D**).

Se evaluaron tres tamaños de partículas de oro, 0,4 µm, 0,6 µm y 1,0 µm, para comparar sus

efectos sobre la frecuencia de transformación. El tamaño y el peso de las partículas individuales influyen en su capacidad para transportar físicamente el ADN a la célula vegetal. Se observó que las partículas de oro de 0,6 μm tuvieron el mejor desempeño en la frecuencia de transformación en todas las presiones de suministro con una frecuencia promedio de 22,6 % (**Figura 5**).

Las partículas de 0,4 μm obtuvieron el segundo mejor desempeño, pero con una frecuencia de transformación promedio de 10,7 % que midió muy por debajo de la de 0,6 μm . Sin embargo, las partículas de 1,0 μm produjeron la frecuencia de transformación promedio más baja de 9,0%. En este estudio, se usó el mismo peso de partículas de oro y la misma cantidad de ADN por preparación, lo que significa que las partículas de mayor tamaño tendrán menos partículas que las de menor tamaño.

Teóricamente, las partículas de 1,0 μm tienen 4,5 y 16,7 veces menos cantidad de partículas por peso que las partículas de 0,6 μm y 0,4 μm , respectivamente, porque el volumen (peso) de las partículas de oro se calcula como $(4/3)\pi r^3$ (r = radio) (**Figura 6A**). Por lo tanto, el uso de partículas de oro de 1,0 μm dio como resultado una frecuencia de transformación más baja probablemente debido a una menor cantidad de partículas por bombardeo en comparación con las partículas de 0,6 μm (**Figura 5; Figura 6A**). Además, las partículas grandes pueden dañar las células más allá de su capacidad de recuperación y, posteriormente, afectan negativamente a la regeneración de las plantas transgénicas. Sin embargo, los presentes resultados de la comparación de 0,4 μm frente a 0,6 μm mostraron que la frecuencia de transformación (22,6 %) con partículas de 0,6 μm fue 2,1 veces mayor que (10,7 %) con partículas de 0,4 μm (**Figura 5**), a pesar de que la cantidad de partículas de 0,6 μm eran 3,7 veces menor que la de 0,4 μm (**Figura 6A**). Esto posiblemente se deba a la menor cantidad de ADN que recubre las partículas de 0,4 μm o a la capacidad reducida de las partículas de 0,4 μm para penetrar las células diana de los IE, en comparación con las partículas de 0,6 μm .

El cálculo teórico del área de superficie de una esfera ($4\pi r^2$) muestra que el tamaño de las partículas de oro se correlaciona positivamente con el área de superficie (**Figura 6B**). A medida que aumenta el diámetro o radio de una partícula de oro, también aumenta el área de superficie de la esfera. Esto significa que el tamaño de las partículas altera la capacidad de retención de ADN de una sola partícula. De 0,4 μm a 1,0 μm de diámetro, la superficie aumenta 6,25 veces. En este estudio, se usó el mismo peso de partículas de oro y la misma cantidad de ADN por preparación, lo que significa que, en teoría, las partículas de oro de 1,0 μm pueden contener 6,25 veces más ADN que las partículas de 0,4 μm , lo que permite un mayor porcentaje de administración de ADN en el momento del impacto con las células vegetales. Estos datos respaldan esta teoría, lo que indica que la eficiencia de la coexpresión aumenta a medida que aumenta el diámetro de las partículas (**Figura 7B**), aunque la expresión transitoria de DsRED fue más débil con tamaños más pequeños de partículas (**Figura 7A**). La eficiencia de la

coexpresión se calcula como la cantidad de eventos que expresan visualmente dsRED sobre la cantidad total de eventos generados. El tamaño de partícula de 1,0 μm tuvo la mayor eficiencia de coexpresión de 46,9 %, 0,6 μm en el medio con 32,4 % y 0,4 μm fue la más baja con una eficiencia de coexpresión de 14,3 % (**Figura 7B**). Sin embargo, al optimizar la transformación, no se seleccionó 1,0 μm como candidato debido a su baja frecuencia de transformación, independientemente de su alto desempeño de administración de ADN.

Presión de ruptura de administración y eficiencia de transformación

Diferentes especies y tipos de tejido pueden requerir diferentes presiones de ruptura para optimizar la frecuencia de transformación. Se evaluaron tres presiones de ruptura, 650 psi, 900 psi y 1100 psi para cada uno de los tres tamaños de partículas (**Figura 5**). Para el tamaño de partícula de 0,4 μm , tanto 650 psi como 900 psi dieron como resultado frecuencias de transformación más altas de 12,9 % y 13,6 %, respectivamente, en comparación con 1100 psi (7,7 %). Las presiones de ruptura de 650 psi, 900 psi y 1100 psi dieron como resultado frecuencias similares para el tamaño de partícula de 0,6 μm al 24,3 %, 21,6 % y 21,9 %, respectivamente. El tamaño de partícula de 1,0 μm dio como resultado las frecuencias de transformación más bajas de 7,9 %, 9,0 % y 10,3 % para las presiones de ruptura de 650 psi, 900 psi y 1100 psi. Al analizar estos datos, se halló que una presión de ruptura de 650 psi era óptima para los tamaños de partícula de 0,4 μm y 0,6 μm , mientras que 1100 psi era óptima para el tamaño de partícula de 1,0 μm . Sin embargo, dadas las bajas frecuencias de transformación, no se recomienda 1,0 μm a cualquier presión de ruptura.

Inicialmente, se planteó la hipótesis de que cuanto más pequeño fuera el tamaño de las partículas, mayor sería la presión de ruptura para maximizar la administración de las partículas al tejido. Sin embargo, se descubrió que incluso el uso del tamaño de partícula más pequeño, 0,4 μm , a la presión más baja de 650 psi era óptimo. El tamaño de partícula de 1,0 μm es más grande y pesado y funciona mejor a 1100 psi, lo que permite concluir que se requiere una presión más alta para la administración de partículas más grandes al tejido vegetal, lo que indica que las partículas de oro de mayor tamaño pueden tener más resistencia para penetrar las células vegetales.

Optimización de la eficiencia de la mutación en trigo editado con el gen PDS

Tratamientos a alta temperatura y eficiencia de mutación

Aunque la proteína Cas9 puede ser más activa y eficiente a 40 °C, las células vegetales no pueden sobrevivir a una exposición prolongada a una temperatura tan alta. La clave para encontrar la temperatura óptima es aquella que satisfaga tanto a las proteínas como a las plantas. Se iniciaron experimentos de

cultivo de tejidos con tratamiento térmico para evaluar el crecimiento de callos de 10 embriones en campo en medios DBC3 estándar después del tratamiento con DBC3 osmótico con un intervalo de temperatura de 26 °C, 30 °C, 34 °C y 37 °C durante 1 día para monitorear la morfología del tejido a lo largo del tiempo. Para cuantificar el efecto del tratamiento térmico sobre el tejido del callo, se pesó el tejido 35 días después del aislamiento. La evaluación del peso del tejido calloso de cada tratamiento permitió cuantificar los efectos del tratamiento térmico. Tanto el tratamiento térmico de 30 °C como el de 34 °C tuvieron un peso similar al control sin tratamientos térmicos con 1,59 g y 1,70 g, respectivamente, mientras que el control a 26 °C pesó 1,66 g (**Figura 8**). Esto demostró que las células vegetales son capaces de un crecimiento normal o acelerado a largo plazo después de someterlas a una temperatura ligeramente aumentada durante un corto período de tiempo. La placa de 37 °C, sin embargo, creció a un ritmo más lento y pesaba solo 1,37 g. Esto nos dice que las temperaturas más altas, incluso durante períodos cortos de tiempo, afectan negativamente el crecimiento del tejido con el tiempo. Los efectos negativos sobre la tasa de crecimiento afectarán las frecuencias de transformación y, por lo tanto, la eficiencia de las mutaciones de los experimentos.

Se diseñó un experimento propio de eficiencia de mutación de PDS para confirmar los efectos del tratamiento térmico sobre la eficiencia de mutación en plantas en una escala significativa junto con el experimento de frecuencia de transformación dsRED + HPT. Se eligieron los parámetros de bombardeo en función del conjunto de datos con la expresión transitoria de dsRED y la eficiencia de transformación más prometedoras. Se usó 0,6 μm a 2 presiones de ruptura diferentes, 650 psi y 1100 psi, y se evaluó un total de 4 tratamientos de temperatura 26 °C, 30 °C, 34 °C y 37 °C durante 24 horas, 4 días después del bombardeo (**Figura 9**). Se esperaban frecuencias de mutación más altas a temperaturas más altas debido al aumento de la actividad de Cas9 reportado previamente a temperaturas más altas, consistente con estudios previos que evaluaron 22 °C, 28 °C, 32 °C y 37 °C en protoplastos de arroz, plantas de maíz y *Arabidopsis*. En el estudio anterior, las temperaturas entre 28 °C y 32 °C demostraron aumentar la actividad de Cas9 *in vivo*. Sin embargo, sus eficiencias de mutación se registraron mediante la producción de mutantes M_1 mediante tratamiento térmico de plantas de maíz M_0 que contienen Cas9 y ARNg; las plántulas transgénicas no se produjeron mediante transformación en arroz. Se agregó 34 °C como tratamiento porque es la temperatura a la que se trata la semilla cosechada antes de la germinación. Se creía que sería la temperatura más alta que no afectaría negativamente la morfología y la supervivencia del tejido, lo que permitiría a las células vegetales regenerar plántulas M_0 completas, mientras que la proteína Cas9 puede funcionar a una temperatura más estrechamente alineada con su origen bacteriano, lo que permitiría una mayor actividad proteica. En este estudio, se descubrió que, independientemente de los parámetros de bombardeo, un tratamiento térmico a 34 °C tiene el efecto

positivo más drástico en la frecuencia de mutación, hasta 2,8 veces mayor que cualquier otra temperatura (**Figura 9**). Para un tratamiento térmico de 34 °C para ambas presiones de ruptura, 650 psi y 1100 psi, con un tamaño de partícula de 0,6 µm, la frecuencia de mutación en los niveles de eventos transgénicos fue de 17,2 % y 42,1 %, respectivamente. Todos los demás tratamientos térmicos para los mismos parámetros de bombardeo fueron comparables. Para la presión de ruptura de 650 psi y 1100 psi, las eficiencias de mutación midieron 9,1 % y 15,0 % para el tratamiento de 26 °C, 8 % y 18,2 % para la temperatura de 30 °C y, finalmente, 11,8 % y 12,5 % para la temperatura de 37 °C, respectivamente. Hubo una tendencia a tener mayores eficiencias de mutación a 1100 psi que a 650 psi (**Figura 9**). Como resultado de estos datos, se puede concluir que 34 °C es la temperatura óptima a la que tanto la planta como el Cas9/ARNg sobreexpresado pueden operar para lograr la mayor eficiencia de mutación.

Mediante el uso de tratamientos térmicos, se pudo obtener una variedad de genotipos mutantes M₀ dentro de genomas singulares, así como en múltiples genomas. En la generación M₀, 79,3 % (23/29) de los mutantes producidos fueron mutaciones de genoma único, 6,9 % (2/29) fueron mutaciones de dos genomas y 13,8 % (4/29) fueron mutantes triples. De los cuatro mutantes triples, dos eventos M₀ contienen mutaciones bialélicas en los tres genomas, lo que da como resultado el fenotipo albino inactivado para PDS; todas las mutaciones estaban fuera de marco. (**Figura 10; Figura 11**). Para obtener el fenotipo PDS albino, se requieren mutaciones bialélicas en los tres genomas o mutaciones en los 6 locus. Hasta donde se sabe, este es el primer informe sobre la generación de plantas de trigo con el fenotipo albino de PDS en el nivel M₀. Estudios anteriores han logrado inactivaciones de mutantes M₀ triples, pero no pudieron lograr un fenotipo en la generación M₀. Se generaron inactivaciones de mutación triple en el gen *TaQsd1* para la inhibición de la brotación previa a la cosecha en la generación M₁ cruzando un mutante M₀ triple que consiste en dos mutaciones bialélicas y una mutación monoalélica con WT en campo y segregándolo en generaciones futuras. Estos dos mutantes triples bialélicos M₀ derivaron del tratamiento térmico a 34 °C, lo que respalda la hipótesis de que el tratamiento térmico del material transformado aumenta la actividad de la proteína Cas9/ARNg, lo que da como resultado mayores eficiencias de mutación. Para demostrar el fenotipo albino en plantas de progenie M₁ derivadas de un evento editado en el gen PDS, se usó el evento PC14A que tiene mutaciones monoalélicas en los genomas A y D y una mutación bialélica heterocigota en el genoma B. La progenie M₁ de 2 de 28 plántulas germinadas de PC14A demostró el fenotipo albino y mostró un patrón de segregación 15:1 (**Figura 12; Figura 13**). El análisis de genotipificación de estos 2 eventos de fenotipo albino dio como resultado mutaciones bialélicas homocigotas en los genomas A y D y una mutación bialélica heterocigota en el genoma B (**Figura 13**), lo que confirma que el fenotipo albino requiere mutaciones bialélicas en los tres genomas.

En conclusión, se mejoraron las eficiencias de transformación en campo en todas las presiones de administración mediante el uso de partículas de oro de 0,6 μm para el bombardeo. También se demostró con éxito un aumento en la eficiencia de la mutación mediante tratamientos térmicos posteriores al bombardeo. Un tratamiento térmico de 34 °C durante 24 horas después del bombardeo dio como resultado la frecuencia de mutación más alta y derivó un fenotipo albino mutante en la generación M_0 que requiere mutaciones bialélicas en los tres genomas del trigo hexaploide. Mediante el uso de parámetros de transformación óptica y un tratamiento térmico a 34 °C aumenta significativamente la eficiencia de mutación en trigo hexaploide y puede ayudar al avance en los esfuerzos de investigación en la genómica del trigo. Los resultados de este estudio pueden aplicarse para optimizar la frecuencia de transformación y mejorar la eficiencia de la mutación en otras especies de cultivos.

EJEMPLO 2

Efecto de la cantidad de gotas de suspensión de micropartículas de oro recubiertas de proteínas por volumen sobre el tiempo de secado y el área de cobertura del macroportador

Materiales vegetales y producción de tejidos de callos embriogénicos

Semillas de *Triticum aestivum* L. cv. Los campos se sembraron semanalmente y se cultivaron en cámaras de crecimiento durante días de 16 horas a 24 °C y noches de 8 horas a 15 °C. Los niveles de luz se establecieron en aproximadamente 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a la altura de la cabeza. Se cosecharon espigas inmaduras 10-14 días después de la floración con un embrión inmaduro (IE) con un tamaño de 1,7-2,2 mm. Las espigas inmaduras se recolectaron hasta 5 días antes del bombardeo y se almacenaron a 4-6 °C. Un día antes del bombardeo, se recolectaron semillas inmaduras de espigas inmaduras y se esterilizaron en la superficie mediante el uso de lejía al 20 % (v/v) (hipoclorito de sodio al 8,25 %) más una gota de Tween 20 durante 15 minutos antes de un triple enjuague con agua esterilizada. Luego, se aislaron los IE y se colocaron con el escutelo hacia arriba en medio DBC3 (Cho et al. 1998) y se incubaron a 26 °C durante la noche.

Preparación de partículas de oro para el bombardeo

La proteína DsRED purificada se precipitó en partículas de oro de 0,6 μm (Bio-Rad, Hercules, CA) con el polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI. Brevemente, para 4 disparos, se mezclaron suavemente 80 μl de proteína DsRED purificada a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con 30 μl de partículas de oro estériles (10 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de suspensión de agua) y 2,0 μl de TransIT-2020. Las partículas de oro DsRED se granularon en una mini microcentrífuga a 2000g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante

y las partículas de oro se resuspendieron en 40 μ l de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 4 macroportadores (10 μ l cada uno) al colocar 1, 2, 3 y 20⁺ gotas y dejar que se sequen al aire en una campana del flujo laminar. Cas9-RNP se precipitaron en partículas de oro de 0,6 μ m (Bio-Rad, Hercules, CA) mediante el uso del polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI). Después de cargar 10 μ l de suspensión de partículas de oro en cada microportador, se midió el tiempo necesario para secar la suspensión de partículas. Además, se cargan otros 10 μ l de suspensión de partículas de oro en el disco microportador después de secar la primera dispersión de 10 μ l de suspensión de partículas de oro.

10 **Bombardeo de RNP o proteínas DsRED**

Cuatro horas antes del bombardeo, los IE se colocaron en papel de filtro de 55 mm en el centro de un medio osmótico DBC3 suplementado con manitol 0,2 M y sorbitol 0,2 M. Mediante el uso de los microportadores preparados que portaban micropartículas de oro recubiertas con RNP o DsRED, los IE se dispararon una vez para cada muestra mediante el uso de la pistola de genes PDS-100/He (Bio-Rad, Hercules, CA) con presión de ruptura de 1100 psi (**Tabla 1**) y se transfirieron del papel de filtro directamente al medio anterior y se incubaron a 28 °C durante 20 horas. Luego, los IE bombardeados se transfirieron a medio DBC3 sin osmótico y se incubaron en la oscuridad a 28 °C.

Tabla 1. Diseño experimental para el efecto de la cantidad de gotas de suspensión de micropartículas de oro recubiertas de proteínas por volumen sobre el tiempo de secado y el área de cobertura del macroportador.

	n.º de gotas de DsRED o RNP	
	1	20 o más
Tiempo necesario para secar la suspensión de partículas (min)	>120 min	15-20 min
Área de cobertura de partículas	+	++(+)

25 **Visualización fluorescente**

Se visualizaron imágenes fluorescentes de IE para evaluar el daño tisular, el n.º de focos de DsRED y la distribución/área de cobertura de los focos de DsRED en IE individuales mediante el uso de un estereomicroscopio fluorescente Leica M165 FC, equipado con Leica DFC7000 T (JH Technologies, Fremont, CA); mediante el uso de dos filtros microscópicos, campo claro y ET DSR con excitación de

545 nm y emisión de 620 nm. El microscopio está vinculado a un software de imágenes de cámara, Leica Application Suite versión 4.9, que se utilizó para capturar las imágenes fluorescentes. El daño tisular y la fluorescencia de DsRED se midieron con diferentes aumentos entre 1 y 3 días después del bombardeo.

5 **Resultados**

Solo tomó de 15-20 minutos secar al aire completamente 10 µl de suspensión de partículas de oro recubiertas con RNP cuando 10 µl de suspensión de partículas se colocó como 20 o más gotas sobre un microportador, mientras que tomó 2 horas o más la colocación de 1 gota (**Tabla 1**). Otros informaron de un resultado similar cuando dejaron secar al aire a 22 °C durante 16 horas cuando se esparcieron 12 µl de solución de proteína DsRed directamente sobre el conjunto de macroportadores. Sin embargo, no evaluaron múltiples gotas. Además, el presente estudio demostró que detectar múltiples gotas pequeñas de suspensión de partículas era menos pegajoso y cubría más área de los embriones inmaduros de manera más uniforme, en comparación con detectar una sola gota grande (**Tabla 1**).

15 **EJEMPLO 3**

Efecto de la cantidad de bombardeos de micropartículas de oro recubiertas con proteínas sobre la eficiencia de la administración de proteínas y el daño al tejido diana

Materiales vegetales y producción de tejidos de callos embriogénicos

20 Semillas de *Triticum aestivum* L. cv. Los campos se sembraron semanalmente y se cultivaron en cámaras de crecimiento durante días de 16 horas a 24 °C y noches de 8 horas a 15 °C. Los niveles de luz se establecieron en aproximadamente 130 µmol m⁻² s⁻¹ a la altura de la cabeza. Se cosecharon espigas inmaduras 10-14 días después de la floración con un embrión inmaduro (IE) con un tamaño de 1,7-2,2 mm. Las espigas inmaduras se recolectaron hasta 5 días antes del bombardeo y se almacenaron a 4-6 °C.

25 Un día antes del bombardeo, se recolectaron semillas inmaduras de espigas inmaduras y se esterilizaron en la superficie mediante el uso de lejía al 20 % (v/v) (hipoclorito de sodio al 8,25 %) más una gota de Tween 20 durante 15 minutos antes de un triple enjuague con agua esterilizada. Luego, se aislaron los IE y se colocaron con el escutelo hacia arriba en medio DBC3 y se incubaron a 26 °C durante la noche.

30 ***Preparación de partículas de oro para el bombardeo***

La proteína DsRED purificada se precipitó en partículas de oro de 0,6 µm (Bio-Rad, Hercules, CA) con o sin el polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI). Brevemente, para 3 disparos, se mezclaron suavemente 60 µl de proteína DsRED purificada a 0,1 µg/µl con 30 µl de

partículas de oro estériles (10 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de suspensión de agua) +/- 1,5 μl de TransIT-2020. Las partículas de oro DsRED se granularon en una mini microcentrífuga a 2000g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 30 μl de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 3 macroportadores (10 μl cada uno) al colocar varias gotas pequeñas y dejar que se sequen al aire en una campana del flujo laminar.

Bombardeo de proteínas DsRED

Cuatro horas antes del bombardeo, los IE se colocaron en papel de filtro de 55 mm en el centro de un medio osmótico DBC3 suplementado con manitol 0,2 M y sorbitol 0,2 M. Mediante el uso de los microportadores preparados que portaban micropartículas de oro recubiertas con DsRED, los IE se dispararon de una a cinco veces para cada muestra mediante el uso de la pistola de genes PDS-100/He (Bio-Rad, Hercules, CA) con presión de ruptura de 1100 psi y se transfirieron del papel de filtro directamente al medio anterior y se incubaron a 28 °C durante 20 horas. Luego, los IE bombardeados se transfirieron a medio DBC3 sin osmótico y se incubaron en la oscuridad a 28 °C.

Visualización fluorescente

Se visualizaron imágenes fluorescentes de IE y callos de con un estereomicroscopio fluorescente Leica M165 FC, equipado con Leica DFC7000 T (JH Technologies, Fremont, CA), mediante el uso de dos filtros microscópicos, campo claro y ET DSR con excitación de 545 nm y emisión de 620 nm. El microscopio está vinculado a un software de imágenes de cámara, Leica Application Suite versión 4.9, que se utilizó para capturar las imágenes fluorescentes. El daño tisular y la detección de actividad fluorescente se midieron con diferentes aumentos entre 1 y 7 días después del bombardeo.

EJEMPLO 4

Administración de RNP a tejidos de callos de arroz y generación de plantas editadas

Materiales vegetales y producción de tejidos de callos embriogénicos

Se cultivaron plantas del cultivar de arroz Nipponbare (*Oryza sativa* ssp. Japonica) en una mezcla de suelo compuesta por partes iguales de césped y mezcla de luz solar n.º 4 en el invernadero con puntos de ajuste de temperatura de 27 °C/22 °C en condiciones de luz ambiental con días de duración de 12 horas en Kord de 6 pulgadas, macetas de 1,835 L. Todas las plantas se fertilizaron con 125 mL de solución de hierro al 1 % p/v una semana después del trasplante. Se agregaron 1000 mL de fertilizante JR Peter's Blue 20-20-20 al 5 % p/v a cada planta a las 3 y 11 semanas después de la germinación. Las

plantas bien regadas recibieron un suministro constante de agua manteniendo una condición inundada en la bandeja. Se cosecharon panículas inmaduras 12-15 días después de la floración con un embrión inmaduro (IE) con un tamaño de 1,8-2,5 mm. Se recogieron granos inmaduros y rugosos de panículas inmaduras y se esterilizaron en la superficie mediante el uso de etanol al 70 % durante 5 minutos y se enjuagaron con agua esterilizada. Luego, los granos se lavaron con lejía al 20 % (v/v) (hipoclorito de sodio al 8,25 %) más una gota de Tween 20 durante 15 minutos antes de un enjuague triple con agua esterilizada. Luego, se aislaron los IE y se colocaron con el escutelo hacia arriba en medio de inducción de callos OsCIM2 [sales y vitaminas N6, 30 g/L de maltosa, 0,1 g/L de mioinositol, 0,3 g/L de hidrolizado enzimático de caseína, 0,5 g/L de L-prolina, 0,5 g/L de L-glutamina, 2,5 mg/L de 2,4-D, 0,2 mg/L de BAP, CuSO₄ 5 mM, 3,5 g/L de Phytigel, pH 5,8] y se incubaron en la oscuridad a 28 °C para iniciar la inducción de callos. Se utilizaron callos embriogénicos de seis a 8 días de edad como dianas para el bombardeo con RNP.

Conjunto de RNP de Cas9-ARNg

Se hibridó una relación de 1:1 de ARNtracr y ARNcr específico de la diana (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) para formar *un dúplex de ARNg funcional*. La proteína Cas9 con una etiqueta de localización nuclear doble en el extremo C (QB3 Macrolab, Berkeley) y ARNg formaron un complejo *in vitro* para formar RNP de Cas9-ARNg. Para cada bombardeo de muestras con 2 disparos, se montó una reacción de 40 µl. Se mezclaron completamente 3,0 µg de ARNGs, 4 µl de 10X NEBuffer 3.1 y agua libre de nucleasas. Luego, por goteo, se agregó lentamente 3,2 µg de Cas9 con mezcla constante, seguido de una incubación de 20 minutos a 37 °C. Las mezclas de RNP resultantes se almacenaron en hielo hasta que se prepararon las partículas de oro.

Preparación de partículas de oro para el bombardeo

Cas9-RNP se precipitaron en partículas de oro de 0,6 µm (Bio-Rad, Hercules, CA) mediante el uso del polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI). Brevemente, para 2 disparos, se mezclaron suavemente 40 µl de la mezcla de Cas9-RNP, tal como se describió anteriormente, con 20 µl de partículas de oro estériles (10 µg µl⁻¹ de suspensión de agua) y 1,0 µl de TransIT-2020 y se incubaron en hielo durante 20 min. Las partículas de oro recubiertas con Cas9-RNP se granularon en una mini microcentrífuga a 2000 g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 20 µl de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 2 macroportadores (10 µl cada uno) al colocar varias gotas pequeñas y dejar que se sequen al aire en una campana del flujo laminar. Cada placa se bombardeó dos veces mediante el

uso de los 2 macroportadores preparados.

Bombardeo y regeneración de RNP

Cuatro horas antes del bombardeo, los callos se colocaron en papel de filtro de 55 mm en el centro de un medio osmótico OsCIM2 suplementado con manitol 0,2 M y sorbitol 0,2 M. Mediante el uso de los dos microportadores preparados que portaban micropartículas de oro recubiertas con Cas9-RNP, se disparó dos veces contra tejidos para cada muestra mediante el uso de la pistola de genes PDS-100/He (Bio-Rad, Hercules, CA) con presión de ruptura de 1100 psi. Los tejidos bombardeados se transfirieron del papel de filtro directamente al medio siguiente y se incubaron a 28 °C durante 20 horas. Los tejidos FEC bombardeados se transfirieron a medios de OsCIM2 en la oscuridad a 28 °C durante 8 semanas con subcultivos según fuera necesario. Luego, los tejidos se transfirieron al medio de regeneración OsReg [sales de MS y vitaminas, sacarosa 30 g/L, sorbitol 30 g/L, NAA 0,5 mg/L y BAP 1 mg/L] y se incubaron a 28 °C, luz de 16 horas, 90 mmol m⁻² s⁻¹. Cuando las plántulas regeneradas alcanzaron al menos 1 cm de altura, se transfirieron a un medio de enraizamiento (sales MS y vitaminas, 20 g/L de sacarosa, 1 g/L de mioinositol) y se incubaron a 28 °C en condiciones de luz de 16 horas (150 mmol m⁻² s⁻¹) y 8 h de oscuridad hasta que se establecieron las raíces y las hojas tocaron la tapa del Phytatray™. Luego, las plántulas se transfirieron al suelo.

Detección de mutaciones de CRISPR/Cas9

El ADN genómico se extrajo del tejido foliar de plantas individuales de los grupos (grupos) con resultados positivos de secuenciación de amplicones de acuerdo con un método de extracción de CTAB. Las amplificaciones por PCR mediante el uso de un conjunto de cebadores, Pi21 F4 (5'-GACCAAAGCCTGTCTATCTGCATT-3' SEQ ID NO:9) y Pi21 R6 (5'-AGACGTCGACGATGAGGATCT CCT-3' SEQ ID NO:10), para amplificar fragmentos de 471 pb se realizaron en una reacción de 25 µl con mezcla maestra de PCR DreamTaq (2X) (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY). Para cada reacción de PCR, se cargaron 23 µL en un gel de agarosa al 0,8 % para electroforesis. El producto de PCR amplificado se cortó y se extrajo el ADN de las muestras de gel mediante el uso del kit de extracción de gel Qiagen QIAquick® (QIAGEN, Chatsworth, CA). Las muestras de ADN purificadas se utilizaron para la secuenciación de Sanger para determinar patrones de mutación.

RESULTADOS

En total, se generaron más de 100 plantas de arroz M₀ a partir de callos de arroz bombardeados

con RNP inducidas a partir de embriones inmaduros. Se extrajo ADN genómico de muestras de hojas seleccionadas al azar de 29 plantas de arroz M_0 y se utilizaron para la secuenciación Sanger para detectar patrones de mutación. Dos de 29 plantas mostraron mutaciones, lo que da una eficiencia de mutación de 6,9 %. Una planta tenía una mutación bialélica homocigota (inserción de 1 pb) mientras que otra tenía una mutación bialélica heterocigota (inserción G e inserción A en cada locus) (**Figura 14**).

EJEMPLO 5

Administración de RNP a embriones inmaduros de trigo y generación de plantas editadas

10 ***Materiales vegetales y producción de tejidos de callos embriogénicos***

Semillas de *Triticum aestivum* L. cv. Los campos se sembraron semanalmente y se cultivaron en cámaras de crecimiento durante días de 16 horas a 24 °C y noches de 8 horas a 15 °C. Los niveles de luz se establecieron en aproximadamente $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a la altura de la cabeza. Se cosecharon espigas inmaduras 10-14 días después de la floración con un embrión inmaduro (IE) con un tamaño de 1,7-2,2 mm. Las espigas inmaduras se recolectaron hasta 5 días antes del bombardeo y se almacenaron a 4-6 °C. Un día antes del bombardeo, se recolectaron semillas inmaduras de espigas inmaduras y se esterilizaron en la superficie mediante el uso de lejía al 20 % (v/v) (hipoclorito de sodio al 8,25 %) más una gota de Tween 20 durante 15 minutos antes de un triple enjuague con agua esterilizada. Luego, se aislaron los IE y se colocaron con el escutelo hacia arriba en medio DBC3, se incubaron a 26 °C durante la noche y se usaron como dianas para el bombardeo con RNP.

Conjunto de RNP de Cas9-ARNg

Se hibridó una relación de 1:1 de ARNtracr y ARNcr específico de la diana (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) para formar un dúplex de ARNg funcional. La proteína Cas9 con una etiqueta de localización nuclear doble en el extremo C (QB3 Macrolab, Berkeley) y ARNGs formaron un complejo *in vitro* para formar RNP de Cas9-ARNg. Para cada bombardeo de muestras con 2 disparos, se montó una reacción de 40 μl . Se mezclaron completamente 3,0 μg de ARNGs, 4 μl de 10X NEBuffer 3.1 y agua libre de nucleasas. Luego, por goteo, se agregó lentamente 3,2 μg de Cas9 con mezcla constante, seguido de una incubación de 20 minutos a 37 °C. Las mezclas de RNP resultantes se almacenaron en hielo.

Preparación de partículas de oro para el bombardeo

Cas9-RNP se precipitaron en partículas de oro de 0,6 μm (Bio-Rad, Hercules, CA) mediante el

uso del polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI). Brevemente, para 2 disparos, se mezclaron suavemente 40 μl de la mezcla de Cas9-RNP, tal como se describió anteriormente, con 20 μl de partículas de oro estériles ($10 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ de suspensión de agua) y 1,0 μl de TransIT-2020 y se incubaron en hielo durante 20 min. Las partículas de oro recubiertas con Cas9-RNP se granularon en una mini microcentrífuga a 2000 g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 20 μl de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 2 macroportadores (10 μl cada uno) al colocar varias gotas pequeñas y dejar que se sequen al aire en una campana del flujo laminar. Cada placa se bombardeó dos veces mediante el uso de los 2 macroportadores preparados.

Bombardeo y regeneración de RNP

Cuatro horas antes del bombardeo, los IE se colocaron en papel de filtro de 55 mm en el centro de un medio osmótico DBC3 suplementado con manitol 0,2 M y sorbitol 0,2 M. Mediante el uso de los dos microportadores preparados que portaban micropartículas de oro recubiertas con Cas9-RNP, los IE se dispararon dos veces para cada muestra mediante el uso de la pistola de genes PDS-100/He (Bio-Rad, Hercules, CA) con presión de ruptura de 1100 psi. Los tejidos bombardeados se transfirieron del papel de filtro directamente al medio siguiente y se incubaron a 28 °C durante 20 horas. Los IE bombardeados se transfirieron a medios DBC3 sin agente osmótico en condiciones de luz tenue ($10\text{-}30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 28 °C durante 9 semanas con subcultivos según fuera necesario. El tejido altamente regenerado procedente de cada IE se transfirió a medio DBC6 para su regeneración. Las plántulas resultantes se transfirieron a medios de enraizamiento y se incubaron con mucha luz ($90\text{-}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 28 °C y se cultivaron hasta 10-15 cm antes de trasplantarlas al suelo.

Análisis de secuenciación de amplicones de última generación

Para determinar las tasas de mutación para las plántulas regeneradas agrupadas 3-4 meses después del bombardeo mediante secuenciación de amplicones, se realizó PCR con cebadores específicos de la diana (cebador directo: 5'-GCTCTTCCGATCTccatgtcacccgaagccatg-3' SEQ ID NO:11 y cebador inverso: 5'-GCTCTTCCGATCTgcgactgcgagcacttacag-3' SEQ ID NO:12) amplificando aproximadamente 370 pb alrededor del sitio de corte mediante el uso de polimerasa Phusion High Fidelity (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los cebadores contenían un extremo 5' compatible con la preparación de la biblioteca Illumina NGS. Los productos de PCR se ligaron a adaptadores Illumina TruSeq y se purificaron. Las bibliotecas se prepararon mediante el uso de un kit NEBNext (Illumina, San Diego, CA) de acuerdo con las pautas del fabricante. Las muestras se secuenciaron en profundidad

en un Illumina iSeq con lecturas finales emparejadas de 200-300 pb hasta una profundidad de aproximadamente 10.000 lecturas por muestra. Se usó Cortado para analizar los resultados de la edición. Brevemente, las lecturas se recortaron con el adaptador, luego, se fusionaron mediante superposición en lecturas individuales. Estas lecturas unidas se alinearon luego con la secuencia de referencia diana.

5

Detección de mutaciones de CRISPR/Cas9

El ADN genómico se extrajo del tejido foliar de plantas de trigo individuales de los grupos (grupos) con resultados positivos de secuenciación de amplicones de acuerdo con un método de extracción de CTAB. Las amplificaciones por PCR mediante el uso de cebadores específicos de homoalelos en todo el genoma (**Tabla 2**) se realizaron en una reacción de 25 µl con mezcla maestra de PCR DreamTaq (2X) (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY). Para cada reacción de PCR, se cargaron 23 µL en un gel de agarosa al 0,8 % para electroforesis. El producto de PCR amplificado se cortó y se extrajo el ADN de las muestras de gel mediante el uso del kit de extracción de gel Qiagen QIAquick (QIAGEN, Chatsworth, CA). Las muestras de ADN purificadas se utilizaron para la secuenciación de Sanger para determinar patrones de mutación.

15

Tabla 2. Conjuntos de cebadores utilizados para la detección de plantas editadas con genoma derivadas del bombardeo de RNP

Genoma	Nombre	Secuencia	Tamaño de banda (pb)
Genoma A	Pi21(A)11F	AACTATGATTGCTTTGCCGG (SEQ ID NO:13)	985
	Pi21(A)10R	GGCGGCCAGCAATTAGCA (SEQ ID NO:14)	
Genoma B	Pi21(B)4F	TGAAAATACCATTGCTTGGTCA (SEQ ID NO:15)	1,211
	Pi21(B)113R	CACGTCAATGCAGTCCAAAGC (SEQ ID NO:16)	
Genoma D	Pi21(D)8F	CTCGGTGCGATATGACCGAATAA (SEQ ID NO:17)	1,245
	Pi21(D)12R	CCACATCAATGTAGTCCATGC (SEQ ID NO:18)	

20 **RESULTADOS**

Los resultados de la secuenciación de amplicones mostraron que 14 de 31 grupos de plantas Mo tenían mutaciones (**Tabla 3**); cada grupo contenía de 5 a 15 plantas.

25

Tabla 3. Resultados de la secuenciación de amplicones de 31 grupos de plantas de trigo M₀

Grupo n.º	Eficiencia de mutación	Grupo n.º	Eficiencia de mutación
2	++++	23	-
3	+	24	-
4	++++	25	-
5	+++	26	-
6	++	30	-
7	-	31	-
9	-	32	+++
13	+++++	35	-
14	++++	36	-
15	+	37	-
16	+++++	38	-
17	++++	39	-
18	++	40	-
19	++++	41	-
20	+++	42	-
21	-		

Dieciocho plantas recolectadas de los 3 grupos de mutaciones más altas se genotipificaron de forma independiente mediante secuenciación de Sanger; al menos 10 plantas tenían una mutación (Figura 16).

EJEMPLO 6

Impacto de la temperatura y el tiempo en la edición de genes mediada por ribonucleoproteína Cas9 libre de ADN en protoplastos y embriones inmaduros de trigo

Compendio

El avance de la modificación genética de precisión para mejorar las características de los cultivos es importante frente al rápido crecimiento demográfico, el cambio climático y las enfermedades. Con este fin, se ha adoptado ampliamente la tecnología de rotura de cadena doble dirigida que utiliza Cas9 guiada por ARN para la edición del genoma en plantas. La administración basada en bombardeo de partículas o *Agrobacterium* de plásmidos que codifican Cas9 y ARN guía (ARNg) es común, pero

requiere optimización de la expresión y a menudo da como resultado una integración aleatoria del ADN plásmido en el genoma de la planta. Avances recientes han descrito la edición de genes mediante la administración de Cas9 y ARNg como ribonucleoproteínas (RNP) preensambladas en varios tejidos vegetales, pero con una eficiencia moderada en las plantas regeneradas resultantes. En este informe se describen mejoras en la edición de genes mediada por Cas9-RNP en trigo. Se demuestra que los ensayos de Cas9-RNP en protoplastos son una herramienta rápida y eficaz para la selección racional de ARNg óptimos para la edición de genes en embriones inmaduros (IE) regenerables, y que el tratamiento a alta temperatura mejora las tasas de edición de genes en ambos tipos de tejidos. También se muestra que la edición mediada por Cas9 persiste durante al menos 14 días en IE de trigo bombardeados con partículas de oro. Las plantas de trigo editadas regeneradas en este trabajo se recuperan a altas tasas en ausencia de ADN exógeno y selección. Con este método, se producen inactivaciones de un conjunto de tres genes homólogos, así como dos genes de susceptibilidad efectores patógenos que resultan en insensibilidad a los efectores necrotróficos correspondientes producidos por *Parastagonospora nodorum*. El establecimiento de una tecnología de edición de genes sin ADN altamente eficiente es prometedor para acelerar la producción de diversidad de rasgos en una amplia gama de cultivos.

Introducción

En medio de una población en rápido crecimiento y las amenazas que plantean el cambio climático y las enfermedades, existe la necesidad de avanzar en la biotecnología de cultivos para aumentar la velocidad y precisión del desarrollo varietal de los cultivos. Cas9 se ha convertido en una herramienta de edición de genes vegetales de elección por su precisión y programabilidad para diseñar diversidad alélica para obtener rasgos beneficiosos que respalden la seguridad alimentaria mundial. Guiado por el ARN, Cas9 produce eficientemente roturas de cadena doble específicas de secuencia en el ADN genómico. Luego, se activan los mecanismos de reparación de roturas de cadena doble del hospedador. La unión de extremos no homólogos (NHEJ), la vía predominante y a menudo propensa a errores en las plantas, puede provocar inserciones o eliminaciones (indeles) en el sitio de corte de Cas9 durante la reparación. La explotación de este sistema permite la eliminación selectiva de genes endógenos.

Se han desarrollado Cas9 y ARN guía (ARNg) que codifican sistemas de ADN plásmido y se han administrado a plantas y especies de cultivos importantes, incluidos *Arabidopsis*, papa, tomate, soja, maíz, cebada, arroz y trigo, mediante *Agrobacterium tumefaciens* o bombardeo de partículas. Estos métodos se basan en la integración aleatoria de casetes de Cas9-ARNg en el genoma y en la optimización de la expresión para cada sistema vegetal. Como resultado, el proceso de edición de genes se ve

obstaculizado por variables como la elección del promotor y del terminador al clonar construcciones y la cantidad de copias y la ubicación de integración de los transgenes tras la transformación. Además, la edición de genes mediante estos métodos plantea preocupaciones sobre la regulación transgénica. Dejando a un lado la regulación, los transgenes a menudo pueden segregarse mediante mejoramiento, pero el proceso es laborioso, requiere mucho tiempo y es particularmente difícil para plantas con genomas complejos. Además, los cultivos con tiempos de generación prolongados o aquellos que se propagan vegetativamente, como la yuca y el plátano, no pueden mejorarse para segregar transgenes. Ha habido informes en los que se ha logrado la edición de genes de plantas mediante la expresión transitoria de Cas9 y ARNg, sin embargo, no se ha logrado un control experimental total sobre el destino de la integración y el seguimiento del transgén. Por estos motivos, el avance de la tecnología de edición del genoma libre de ADN puede resultar útil.

La administración directa de ribonucleoproteínas (RNP) de Cas9-ARNg preensambladas es una de esas tecnologías y se ha demostrado en varios sistemas de protoplastos de plantas para inducir mutaciones específicas. Algunos han producido plantas editadas a partir de células individuales transfectadas; sin embargo, la regeneración de protoplastos de trigo y otros cultivos no es factible con los métodos actuales. También se ha informado la edición basada en Cas9-RNP de embriones regenerables de maíz, arroz y trigo mediante biolística. Las partículas de oro recubiertas con Cas9-RNP se bombardean con alta presión en embriones inmaduros (IE) que finalmente se regeneran en plantas mediante cultivo de tejidos. Se ha utilizado la administración conjunta de vectores de ADN con marcadores selectivos o genes auxiliares junto con Cas9-RNP para mejorar la eficiencia de la edición. Sin embargo, a falta de selección, las tasas de edición han sido generalmente bajas.

El uso de Cas9-RNP para generar plantas editadas proporciona beneficios únicos. Debido a que los reactivos de edición de genes se entregan como complejos preensamblados, los investigadores no necesitan optimizar los vectores de ADN, el tejido de la planta hospedadora no soporta la carga de transcribir o traducir Cas9 o ARNg, y el cultivo para la segregación es innecesario debido a la ausencia de transgenes. Además, las Cas9-RNP, que existen en una cantidad finita en el tejido diana, son finalmente degradadas por proteasas y nucleasas endógenas. Sin embargo, todavía hay margen para mejorar el proceso de edición y aumentar la eficiencia.

Las bajas tasas de edición mediada por Cas9 en el tejido vegetal pueden indicar que la endonucleasa no está alcanzando su máximo potencial debido a condiciones ambientales subóptimas. Los estudios en organismos como *Arabidopsis*, cítricos y trigo han demostrado que Cas9 genera indeles más específicos a temperaturas elevadas.

Aquí presentamos avances en la edición de genes basada en Cas9-RNP en el cultivo alimentario

mundial: el trigo. Para determinar si se puede aprovechar la temperatura para mejorar la edición mediada por Cas9-RNP, exploramos los efectos del tratamiento térmico en protoplastos e IE de trigo transfectedos. Examinamos la relación de eficiencia de edición entre protoplastos no regenerables e IE regenerables y monitoreamos la tasa de edición a lo largo del tiempo. Demostramos que el tratamiento a

5 temperaturas elevadas aumenta la eficiencia de la edición de genes en ambos sistemas de tejidos y encontramos que la técnica de transfección RNP de bombardeo con partículas de oro da como resultado una edición sostenida del tejido al menos 14 días después del bombardeo. También encontramos que las tasas de edición en protoplastos se correlacionan linealmente con las tasas de edición en IE. Por lo tanto, se pueden instituir ensayos rápidos de protoplastos *in vivo* como un paso estándar en el proceso de edición

10 de genes para seleccionar los ARNg más eficaces para la edición y regeneración de genes de IE. Por último, regeneramos plantas de trigo editadas mediante transfección biolística Cas9-RNP. Como prueba del método, nos dirigimos simultáneamente a tres ortólogos homólogos de trigo de un gen de arroz, *Pi21*(Os04g0401000), y generamos con éxito líneas con knockouts en todas las copias. También nos dirigimos a los genes del trigo *Tsn1* y *Snn5*, produciendo líneas que son insensibles a los efectores

15 patógenos SnToxA y SnTox5 de *Parastagonospora nodorum* y establecimos la edición mediada por Cas9-RNP libre de selección y ADN como una técnica eficiente y factible para generar genes knockout específicos en el trigo.

RESULTADOS

20 Transfección Cas9-RNP y el efecto de la temperatura en la edición de genes de protoplastos de trigo

Primero cuantificamos la viabilidad celular después del tratamiento térmico de protoplastos no transfectedos para determinar la viabilidad de probar temperaturas más altas para la edición de genes de protoplastos de trigo. Se aislaron protoplastos de plántulas de trigo parcialmente etioladas y se incubaron

25 a 25°C, 30°C o 37°C durante 16 horas seguido de 25°C durante 8 horas. Durante el período de 24 horas, se controló la viabilidad de los protoplastos cada 8 horas mediante tinción con azul de Evans y microscopía. La viabilidad de los protoplastos tratados a 37°C disminuyó notablemente en comparación con los tratados a 25°C y 30°C (**Figura 17**) y sufrieron la evaporación del medio. Por lo tanto, se concluyó que el proceso de edición de genes de protoplastos no es susceptible de un tratamiento térmico

30 a 37°C.

Para este estudio se seleccionaron y sintetizaron comercialmente cinco ARN guía únicos (ARNgs), *Pi21gD*, *Tsn1g2*, *Tsn1g3*, *Snn5g1* y *Snn5g2*. Para evaluar la eficacia de los ARNg *in vivo* y determinar el efecto de la temperatura en la edición de genes de protoplastos de trigo, se ensamblaron y

transfectaron Cas9-RNP en protoplastos de mesófilo de trigo. Cas9 purificado con una etiqueta de localización nuclear doble C-terminal se formó en complejo con ARNGs. Las RNP de ARNGs-Cas9 resultantes se transfectaron en protoplastos de trigo utilizando polietilenglicol (PEG). Los protoplastos transfectados se trataron a 25°C o 30°C y se recogieron para análisis genotípico después de 24 horas.

- 5 Las tasas de edición en los loci objetivo se determinaron mediante secuenciación de amplicones de próxima generación (NGS). Con incubación a 25°C y 30°C, las tasas de edición promedio oscilaron entre 2,5-50% y 5,8-62% respectivamente. A pesar de esta variabilidad entre diferentes RNP de ARNGs-Cas9, la eficiencia de edición fue consistentemente mayor en los protoplastos tratados a 30 °C en comparación con 25 °C para cualquier ARNGs determinado (**Figura 18**), lo que sugiere que un tratamiento con
- 10 temperatura más alta es ventajoso para la edición de genes mediada por RNP. en protoplastos de trigo.

Entrega biolística de Cas9-RNP y el efecto de la temperatura en la edición de genes de embriones inmaduros de trigo

- Para determinar si un tratamiento a alta temperatura mejora de manera similar la edición basada en Cas9-RNP en IE de trigo como lo hace en los protoplastos, las RNP se transfectaron en IE mediante bombardeo de partículas. El proceso experimental se resume en **la Figura 19A**. El ARN guía único y Cas9 se formaron complejos *in vitro*, se adsorbieron en partículas de oro de 0,6 µm y se administraron biolísticamente con una pistola de partículas presurizadas con helio. Para cada ARNGs y temperatura que se probaron, se bombardearon e incubaron 30 IE a 26 °C, 30 °C o 37 °C durante 16 horas. Luego se
- 15 mantuvieron a 26°C en medios de inducción de callos antes de inducir la regeneración aproximadamente 63 días después del bombardeo (dpb). El ADN plasmídico no se entregó conjuntamente con ninguna de las Cas9-RNP, y la inducción y regeneración de callos se realizaron en condiciones libres de selección. De cada conjunto de 30 embriones transfectados con RNP, diez se recolectaron aleatoriamente y se agruparon para análisis genómico a 14 dpb y nuevamente a 48 dpb. Los diez embriones restantes se
- 20 conservaron para su regeneración en plantas M₀. Todos los brotes independientes se aislaron y trataron como plantas M₀ individuales. Las plantas se trasplantaron de medios de cultivo de tejidos al suelo aproximadamente 100 dpb. Cada planta M₀ resultante se genotipó de forma independiente y la tasa de porcentaje de tejido editado se calculó como el porcentaje de alelos mutantes entre el total de alelos en el conjunto de plantas M₀. El porcentaje de plantas editadas también se calculó como porcentaje del
- 25 número de plantas con alguna edición entre el número total de plantas M₀ regeneradas. Todo el análisis genómico se realizó mediante amplicón NGS.

El tratamiento con temperatura elevada de 30 °C y 37 °C condujo a porcentajes más altos de tejido editado en comparación con 28 °C para las cinco RNP de ARNGs-Cas9 en todos los puntos

temporales (**Figura 19B**). Las tasas de edición de tejido fueron mayores a 48 dpb que a 14 dpb y las tasas de edición en el conjunto de tejido regenerante M_0 fueron comparables a las de 48 dpb. De los diez embriones por tratamiento a los que se permitió regenerar, se produjeron entre 10 y 40 plantas M_0 . Se obtuvieron plantas con mutaciones de tipo salvaje, heterocigotas, bialélicas y homocigotas en los loci diana. La eficiencia de edición en los regenerantes M_0 se resume en **la Figura 20**.

La edición mediada por Cas9-RNP se mantiene en el tiempo

En particular, las tasas de edición de genes se duplicaron con creces, independientemente del tratamiento de temperatura, en tejido analizado a 48 dpb en comparación con 14 dpb (**Figura 19B**). Para investigar más a fondo la diferencia en las tasas de edición a lo largo del tiempo, se determinó el número de alelos mutantes únicos en los puntos temporales de 14 y 48 dpb. Con una mínima excepción, hubo más alelos mutantes únicos a 48 dpb en comparación con 14 dpb (**Figura 21A, Figura 22**).

Se bombardearon 50 IE adicionales con Snn5g1-Cas9 RNP para determinar el período de tiempo que Cas9 permanece presente en el tejido biolísticamente transfectado. El análisis de transferencia Western se realizó con muestras de tejido de 10 embriones tomadas a 0, 2, 7 y 14 dpb. Dada la cantidad finita de proteína Cas9 administrada por el bombardeo de RNP y la rápida división y crecimiento celular en cada IE a lo largo del tiempo, normalizamos el experimento por el volumen extraído del tejido total procedente de diez IE en cualquier momento dado, en lugar de la proteína total extraída. Cas9 se detectó en tejido en los cuatro puntos temporales con una intensidad de banda decreciente con el tiempo (**Figura 21B**). Cas9 no se detectó en embriones que no fueron sometidos a bombardeo de Cas9-RNP. Debido a la gran masa de tejido debido al crecimiento exponencial de callos de IE, no fue factible extraer proteínas ni realizar análisis de transferencia Western en muestras de diez embriones de 48 dpb. En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad de edición mediada por Cas9 se mantiene durante al menos 14 días después de la administración biolística de Cas9-RNP en embriones de trigo inmaduros. Cuando se utiliza este método, la degradación de la proteína Cas9 en el tejido objetivo no es tan rápida como se había planteado anteriormente, y la evaluación de la eficiencia de la edición debe realizarse entre 14 y 48 dpb para una mayor precisión.

Las tasas de edición relativas en protoplastos se correlacionan linealmente con las tasas de edición en regenerantes M_0 de embriones inmaduros bombardeados

Las diferentes RNP de ARNgs-Cas9 utilizadas en este estudio confirieron diferentes niveles de eficacia tanto en protoplastos transfectados con PEG como en embriones transfectados biolísticamente. Para determinar si las tasas de edición en los dos sistemas de tejido se correlacionaban entre sí, la

eficiencia de edición promedio de cada ARNGs-Cas9 RNP en protoplastos tratados a 30 °C se representó frente a su eficiencia de edición en IE bombardeados tratados con 48 dpb a 30 °C, así como el M₀ 30°C conjunto de tejido regenerante tratado. Se aplicó un modelo de regresión lineal a los datos, revelando una correlación lineal positiva con $R^2 = 0,744$ y $R^2 = 0,994$, respectivamente (**Figura 23A-23B**). Aunque un estudio de un mayor número de ARNGs fortalecería esta asociación, los datos actuales sugieren que la eficiencia de edición en protoplastos puede predecir la eficiencia de edición en IE. Dada la correlación positiva entre las tasas de edición mediadas por RNP en protoplastos y en IE transfectadas biolísticamente, puede ser beneficioso calificar primero rápidamente la eficiencia de varios candidatos de ARNG en protoplastos para optimizar la tasa más alta de tejido regenerante editado.

Eliminación mediada por Cas9-RNP de genes de sensibilidad efectora necrotrófica de *Parastagonospora nodorum*

En este estudio, se produjeron 20 plantas editadas con M₀ *Tsn1* a partir de 30 embriones transfectados mantenidos para la regeneración. De ellos, 14 tenían mutaciones heterocigotas y 6 tenían mutaciones bialélicas u homocigotas. Se infiltraron hojas secundarias completamente expandidas de un subconjunto de plantas editadas con M₀ *Tsn1*, plantas M₀ *Tsn1* WT y Fielder cultivadas a partir de semillas con SnToxA expresado en *Pichia pastoris*. Después de 72 horas, las plantas M₀ heterocigotas, M₀ WT y Fielder tenían lesiones necróticas que se extendían desde el sitio de infiltración. Mientras tanto, las plantas M₀ con mutaciones bialélicas u homocigotas no mostraron necrosis (**Figura 24A-24M**).

De manera similar, se produjeron un total de 24 plantas editadas con M₀ *Snn5* a partir de 30 embriones transfectados mantenidos para la regeneración. De esos, 14 tenían mutaciones heterocigotas y diez tenían mutaciones homocigotas o bialélicas. Las hojas secundarias completamente expandidas de un subconjunto de plantas editadas con M₀ *Snn5*, plantas M₀ *Snn5* WT y Fielder cultivadas a partir de semillas se infiltraron con filtrados de cultivo que contenían SnTox5. Después de 72 horas, los heterocigotos M₀ con deleciones en el marco, las plantas M₀ WT y Fielder exhibieron lesiones necróticas. Sin embargo, los resultados para los heterocigotos M₀ mostraron una mezcla de fenotipos que van desde sensibles hasta insensibles. Dos plantas heterocigotas con una eliminación en el marco de un alelo parecían insensibles a SnTox5. En particular, todas las plantas con mutaciones bialélicas u homocigotas que condujeron a una terminación prematura fueron insensibles a SnTox5 (**Figura 25A-25M**).

Estos resultados demuestran que se pueden introducir mutaciones con pérdida de función en ambas copias de un gen dentro de la generación M₀, lo que lleva a insensibilidad a efectores fúngicos necrotróficos agrónomicamente relevantes. Los heterocigotos M₀ y las plantas bialélicas pueden autofecundarse para establecer líneas con mutaciones nocivas homocigotas en los genes de

susceptibilidad. El método biolístico con tratamiento térmico a 30°C o 37°C es muy eficiente y las plantas editadas se pueden identificar a partir de una pequeña cantidad de regenerantes sin el uso de selección en cultivo de tejidos.

5 ANÁLISIS

Las RNP basadas en CRISPR se han utilizado para editar varias especies de plantas y tipos de tejidos. En este trabajo, mejoramos la tecnología Cas9-RNP sin ADN para la edición del genoma en trigo. Establecemos el tratamiento térmico como parámetro para aumentar la tasa de edición *in vivo*, mostramos que la edición basada en bombardeo de partículas se mantiene durante más de 14 días y demostramos que los resultados de los ensayos de protoplastos se pueden utilizar como indicador para predecir las tasas de edición en regenerables, tejido y como herramienta para clasificar la eficacia del ARNg. Al administrar reactivos de edición de genes como complejos de proteína-ARN, se evitan varias complicaciones asociadas con la administración de *Agrobacterium tumefaciens* y vectores de ADN biolístico.

Se ha demostrado que Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, una bacteria que crece de manera óptima a 37 °C, exhibe una mayor actividad de escisión a 37 °C en comparación con 22 °C *in vitro*. Las transfecciones y regeneración de protoplastos de plantas e IE se realizan normalmente a temperatura ambiente (25 °C y 26 °C respectivamente). Aunque la modulación de la temperatura no se ha realizado previamente en experimentos de edición de genes de protoplastos, un aumento de la temperatura para los estudios de edición de genes de plantas basados en ADN ha dado como resultado frecuencias de mutación específicas más altas. La aplicación del tratamiento de temperatura para aumentar la eficiencia de edición mediada por Cas9-RNP en cualquier sistema de tejido vegetal no se ha demostrado previamente. Aquí, encontramos que 16 horas de exposición de protoplastos transfectados con Cas9-RNP a 30 °C aumentaron notablemente la formación de indel en el sitio de corte de Cas9 (**Figura 18**). De manera similar, 16 horas de exposición de IE bombardeados con Cas9-RNP a 30 °C o 37 °C dieron como resultado una mayor formación de indel objetivo. En IE analizados a 48 dpb logramos tasas de edición de 10,4-34,9 % con tratamiento a 30 °C, 6,63-24,39 % con tratamiento a 37 °C y solo 3,36-14,25 % con incubación estándar a 26 °C (**Figura 19B**). Curiosamente, el beneficio del tratamiento con mayor temperatura fue consistente entre los dos tejidos diana y en los cinco sitios diana diferentes evaluados. En nuestro trabajo, no hubo defectos discernibles en la regenerabilidad de los IE tratados a una temperatura más alta en comparación con los 26 °C estándar. No detectamos correlación positiva o negativa entre el tratamiento de temperatura y el número de plantas M_0 recuperadas.

Informes anteriores han descrito la administración biolística de Cas9-RNP en células

embrionarias de trigo y maíz en ausencia de ADN y selección. Ambos lograron frecuencias moderadas de mutagénesis dirigida en las plantas regeneradas. Observamos que cada uno de los estudios analizó la eficiencia de edición en los IE 2 dpb y logró universalmente <1% de edición específica. Por el contrario, las eficiencias de edición en tejido vegetal regenerado fueron sustancialmente mayores, oscilando entre 1,3% y 4,7% en un informe y entre 2,4% y 9,7% en un segundo informe. Para investigar esta discrepancia entre puntos de tiempo, monitoreamos la eficiencia de edición a 14 dpb, 48 dpb y en los regenerantes M₀ en nuestro estudio. Independientemente del tratamiento de temperatura o la secuencia de ARNg, las frecuencias de edición a 48 dpb fueron considerablemente más altas que a 14 dpb (**Figura 19B**). El porcentaje de tejido editado en el conjunto de plantas M₀ fue comparable al de 48 dpb. La diferencia observada en la eficiencia de edición entre puntos de tiempo anteriores y plantas M₀ regeneradas fue consistente con informes anteriores.

En células de mamíferos, se demostró que Cas9 es indetectable 48 a 72 horas después de la transfección de Cas9-RNP mediante nucleofección. Por esta razón, se ha pensado que la degradación enzimática de Cas9-RNP *in vivo* es rápida y que la edición debe ocurrir dentro de los primeros días de la transfección. En el presente estudio, si las Cas9-RNP se degradaran completamente del tejido antes del punto de tiempo de 14 dpb, toda la edición de genes tendría que haber ocurrido antes de los 14 dpb. En consecuencia, se habría esperado detectar aproximadamente el mismo número de alelos únicos a 14 dpb y 48 dpb si la proliferación de células editadas y no editadas se produjera al mismo ritmo. Por el contrario, se observaron tasas de mutagénesis consistentemente más altas, así como un mayor número de alelos únicos en los puntos temporales posteriores a 48 dpb (**Figura 19B, Figura 21A, Figura 22**), lo que sugiere que Cas9 puede estabilizarse de alguna manera durante al menos 14 días. y liberado gradualmente dentro de los IE de trigo después de la administración biolística para una edición sostenida en el tiempo. Como evidencia adicional en apoyo de esta hipótesis, se detectó proteína Cas9 en muestras de tejido de 10 embriones tomadas a 2, 7 y 14 dpb (**Figura 21B**). En conjunto, estos resultados indican que Cas9 se mantiene en el tejido al menos 14 dpb y facilita la edición sostenida y gradual del tejido a lo largo del tiempo cuando se administra como Cas9-RNP mediante bombardeo con partículas de oro. Es necesaria una mayor exploración bioquímica para comprender el mecanismo de esta estabilización y edición persistente de Cas9.

Se han utilizado numerosos sistemas de protoplastos vegetales para mutagénesis dirigida utilizando Cas9-RNP. Aunque el método es útil para producir plantas editadas con Cas9-RNP para protoplastos que sean susceptibles de regeneración, la mayoría de las plantas de cultivo no pueden regenerarse fácilmente de esta manera. Aunque los protoplastos del trigo son recalcitrantes a la regeneración mediante la metodología existente, los protoplastos del estudio actual demuestran ser un

sistema de detección beneficioso. Las tasas de edición mediadas por Cas9-RNP en protoplastos se correlacionaron linealmente con las tasas de edición en IE. Debido a que la transfección biolística Cas9-RNP de IE requiere mucho tiempo, energía, recursos y compromiso, se prefiere un medio para la selección racional de secuencias de ARNg para una eficiencia de edición óptima. Es de destacar que hubo diferencias importantes en las tasas de mutación de los 5 ARNg utilizados en este estudio. Desafortunadamente, el software predictivo existente para seleccionar ARNg no se traduce tras la experimentación. Por lo tanto, al intentar seleccionar el mejor ARNg para producir la tasa más alta de edición estable en IE regenerables, los ensayos de protoplastos transitorios pueden servir como una vía rápida para clasificar los ARNg y pronosticar las tasas de edición en tejido regenerable bombardeado con Cas9-RNP.

El cálculo de la eficiencia de edición en regenerantes M_0 tiene el potencial para resultar confuso. Para ser explícitos en nuestro análisis, presentamos las tasas de edición de regenerantes de dos maneras. El porcentaje del total de alelos editados en el conjunto de regenerantes M_0 se indica como "% de tejido editado", mientras que "% de plantas editadas" es el porcentaje del total de plantas editadas entre todas las plantas M_0 (**Figura 19B, Figuras 23A-23B, Figura 20**). El primero tiene como objetivo comparar la eficiencia de edición general de manera más justa entre tipos de tejidos y puntos temporales, teniendo en cuenta el bialelismo, la homocigosidad y la heterocigosidad de las plantas regeneradas. El último valor es más relevante para evaluar la capacidad del método para producir plantas individuales con ediciones genéticas.

Pi21 se caracterizó por primera vez en arroz (*Oryza sativa*) como un regulador negativo de la resistencia a la enfermedad del añublo. Identificamos supuestos ortólogos en trigo que consistían en tres genes homólogos. La funcionalidad del trigo *Pi21* no se ha evaluado formalmente, pero podría desempeñar un papel en la susceptibilidad a enfermedades. Se seleccionó el trigo *Pi21* como objetivo para demostrar el método de edición del gen Cas9-RNP sin ADN en un gen presente en los tres subgenomas diploides (AABBDD). *Pi21gD* fue diseñado para atacar simultáneamente los seis alelos. A pesar de la complejidad genética, pudimos regenerar plantas con mutaciones bialélicas u homocigotas en los tres subgenomas para una variedad completa de genotipos, incluidos dos con knockouts triples mutantes homocigotos dentro de la generación M_0 .

Los genes del trigo *Tsn1* y *Snn5* reconocen los efectores patógenos de *Parastagonospora nodorum* SnToxA y SnTox5 respectivamente. *Tsn1* es un gen con características similares a las del gen de resistencia que incluyen proteína quinasa, unión de nucleótidos y repeticiones ricas en leucina, y el efector necrotrófico ToxA es producido por al menos tres patógenos fúngicos del trigo económicamente importantes. *Snn5* pertenece a una clase diferente y contiene proteína quinasa y dominios proteicos

importantes del esperma, pero al igual que *Tsn1*, funciona como objetivo para un efector necrotrófico que conduce a la susceptibilidad a enfermedades. Por lo tanto, *Tsn1* y *Snn5* son objetivos prácticos para la alteración mediante la edición de genes sin ADN. Utilizando la administración biolística libre de ADN de Cas9-RNP, generamos con éxito plantas con mutaciones heterocigotas, bialélicas y homocigotas dentro de la generación M_0 a partir de tan solo diez IE por tratamiento. Se demostró que los mutantes bialélicos y homocigotos de *Tsn1* y *Snn5* son insensibles a SnToxA y SnTox5 respectivamente. Debido a la alta tasa de edición, particularmente usando Snn5g1 y Snn5g2 con tratamiento térmico a 30°C y 37°C, la selección de plantas M_0 para ediciones fue completamente factible. A diferencia de informes anteriores, se puede prescindir razonablemente de un esquema de selección con la edición mediada por Cas9-RNP siempre que los ARNg se prueben previamente en protoplastos y se consideren altamente efectivos.

En resumen, la mejora del tratamiento térmico de la edición de trigo mediada por Cas9-RNP combinada con un enfoque basado en protoplastos para seleccionar ARNg óptimos, y los hallazgos de que la edición se mantiene durante más de 2 semanas avanzan en este enfoque de edición de ADN y genes sin selección en cultivos. El avance presentado a esta tecnología se puede aplicar a numerosos cultivos que son susceptibles al bombardeo de partículas y fomenta el establecimiento de protocolos de regeneración y cultivo de tejidos en especies de cultivos que se propagan vegetativamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para este estudio se utilizó el cultivar de campo de trigo alohexaploide (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, genomas AABBDD).

Conjunto de RNP de Cas9-ARNg

Se formaron complejos *in vitro* con la proteína Cas9 con una etiqueta de localización nuclear doble en el extremo C (QB3 Macrolab, Universidad de California, Berkeley) y ARNg con modificaciones de 2'-O-Metil en las 3 primeras y últimas bases, y enlaces fosforotioato 3' entre las 3 primeras y las 2 últimas bases (Synthego, Menlo Park, CA) para formar RNP de Cas9-ARNg.

Para cada transfección de protoplastos, se montó una reacción de 25 μ l. Se mezclaron completamente 10 μ g de ARNg, 2,5 μ l de 10X NEBuffer 3.1 (New England Biolabs, Ipswich, MA), y agua libre de nucleasas. Luego, por goteo, se agregó lentamente 10 μ g de Cas9 con mezcla constante, seguido de una incubación de 20 minutos a 37 °C.

Para cada transfección biolística de IE, se montó una reacción de 40 μ l. Se mezclaron

completamente 6,4 µg de ARNgs, 4 µl de 10X NEBuffer 3.1 y agua libre de nucleasas. Luego, por goteo, se agregó lentamente 12,8 µg de Cas9 con mezcla constante, seguido de una incubación de 20 minutos a 37 °C. Las mezclas de RNP resultantes se almacenaron en hielo hasta la transfección.

5 Aislamiento y transfección de protoplastos

Se utilizaron plántulas parcialmente etioladas como tejido donante para el aislamiento de protoplastos. La superficie de las semillas se esterilizó con lejía al 20 % (v/v) y se enjuagó con agua esterilizada. Las plántulas se cultivaron en condiciones estériles sobre papel de filtro húmedo en la oscuridad durante 12-14 días a 25 °C con exposición a la luz ambiental durante 6 horas cada 5 días. Se aislaron protoplastos de trigo del tejido del donante. Para cada transfección, se agregó 25 µl de mezcla de RNP de Cas9-ARNg, tal como se definió anteriormente, a 5×10^5 protoplastos. Se realizó la transfección mediada por PEG. Los protoplastos se recolectaron 24 horas después de la transfección para su análisis.

15 Preparación de partículas de oro para el bombardeo

Cas9-RNP se precipitaron en partículas de oro de 0,6 µm (n.º 1652262, Bio-Rad, Hercules, CA) mediante el uso del polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI). Brevemente, para cada transfección de 30 IE, se mezclaron suavemente 40 µl de la mezcla de Cas9-RNP, tal como se describió anteriormente, con 20 µl de partículas de oro estériles ($10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de suspensión de agua) y 1 µl de TransIT-2020 y se incubaron en hielo durante 20 min. Las partículas de oro recubiertas con Cas9-RNP se granularon en una mini microcentrífuga a 2000 g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 20 µl de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 2 macroportadores (10 µl cada uno) al colocar varias gotas pequeñas y dejar que se sequen al aire en una campana del flujo laminar. Para una única transfección, cada conjunto de 30 IE se bombardeó dos veces mediante el uso de los 2 macroportadores preparados.

Bombardeo y regeneración de embriones inmaduros

Las plantas se cultivaron a 24 °C, días de 16 horas y 15 °C, noches de 8 horas bajo una intensidad de luz de $130 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se cosecharon semillas inmaduras que contenían IE, con un tamaño de 1,7-2,2 mm de espigas de trigo 10-13 días después de la floración, se esterilizó la superficie en lejía al 20 % (v/v) con una gota de Tween 20 y se enjuagaron tres veces con agua esterilizada, seguido de extracción de los IE. Los IE se colocaron en medio DBC3, con el escutelo hacia arriba y se incubaron durante la noche a 26 °C antes de la transfección biolística. Cuatro horas antes del bombardeo, los IE se colocaron

en papel de filtro de 55 mm en el centro de un medio osmótico DBC3 que contenía manitol 0,2 M y sorbitol 0,2 M. Mediante el uso de los dos microportadores preparados que portaban micropartículas de oro recubiertas con Cas9-RNP, los IE se dispararon dos veces mediante el uso de la pistola de genes PDS-100/He (Bio-Rad, Hercules, CA) con presión de ruptura de 1100 psi. Los IE bombardeados se transfirieron del papel de filtro directamente al medio siguiente y se incubaron a 26 °C, 30 °C o 37 °C durante 16 horas. Los IE se transfirieron a medios DBC3 estándar en condiciones de luz tenue ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 26 °C durante 9 semanas con subcultivos según fuera necesario. El tejido calloso procedente de cada IE se transfirió a medio DBC6 para su regeneración. Las plántulas resultantes se transfirieron a medios de enraizamiento y se incubaron con mucha luz ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 26 °C y se cultivaron hasta 4-6 pulgadas antes de trasplantarlas al suelo.

Análisis de secuenciación de amplicones de última generación

Para determinar las tasas de mutación mediante secuenciación de amplicones, se realizó una PCR para amplificar aproximadamente 225 pb, incluidas las secuencias diana de ARNg (**Figura 26**) mediante el uso de la polimerasa Phusion High Fidelity (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los cebadores contenían un extremo 5' compatible con la preparación de la biblioteca Illumina NGS (**Figura 27**). Los productos de PCR se ligaron a adaptadores Illumina TruSeq y se purificaron. Las bibliotecas se prepararon mediante el uso de un kit NEBNext (Illumina, San Diego, CA) de acuerdo con las pautas del fabricante. Las muestras se secuenciaron en profundidad en un Illumina iSeq con lecturas finales emparejadas de 200 pb hasta una profundidad de aproximadamente 10.000 lecturas por muestra. Se usó Cortado para analizar los resultados de la edición. Brevemente, las lecturas se recortaron con el adaptador, luego, se fusionaron mediante superposición en lecturas individuales. Estas lecturas unidas se alinearon luego con la secuencia de referencia diana. Las tasas de edición se calculan contando cualquier lectura con una inserción o eliminación que se superponga al sitio de corte o que ocurra dentro de una ventana de 3 pb a cada lado del sitio de corte. Los SNP que ocurren dentro de la ventana alrededor del sitio de corte no se cuentan. Luego, el total de lecturas editadas se divide por el número total de lecturas alineadas para obtener el porcentaje de edición.

Análisis de transferencia Western

El tejido vegetal total procedente de 10 IE en diferentes momentos se congeló en LN2, se molió hasta obtener un polvo fino con un mortero y se resuspendió en 200 μl de tampón de muestra Laemmli 2x (Bio-Rad, Hercules, CA) con 2-mercaptoetanol. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y los extractos de proteínas solubles totales (25 μl o 40 μl por pocillo) se separaron en geles de poliacrilamida

prefabricados Mini-PROTEAN TGX al 4-20 % (Bio-Rad, Hercules, CA) y posteriormente se transfirieron a un Membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m (GVS, Sanford, ME). Para la detección de la proteína Cas9, se utilizaron anticuerpo monoclonal de ratón anti-CRISPR/Cas9 C-terminal (SAB4200751; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y reactivo ProSignal Dura ECL (Genesee Scientific, San Diego, CA). Se utilizó la escalera de proteínas preteñida PageRuler Plus (10–250 kDa, Thermo Fisher, Waltham, MA) como marcador de peso molecular, y se utilizó la proteína Cas9 con una etiqueta de localización nuclear doble C-terminal (QB3 Macrolab, Universidad de California, Berkeley). utilizado como control positivo.

10 Producción de SnToxA

SnToxA se expresó en la cepa de levadura *Pichia pastoris* X33 y se cultivó en caldo de levadura peptona-dextrosa (10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 100 ml de dextrosa al 20 % en 900 ml de agua destilada) durante 48 horas a 30 °C. El filtrado del cultivo se recogió y se filtró a través de una membrana de filtro HVLP de 0,45 μ m (Merk Millipore Ltd., Cork, Irlanda) y se dializó durante la noche frente a agua usando un tubo de diálisis Snake Skin con corte de peso molecular de 3,5 kDa (Thermo Scientific, IL, EE. UU.). El filtrado dializado se cargó en una columna de intercambio catiónico HiPrep SpXL 16/10 (GE Healthcare Piscataway, Nueva Jersey). La proteína no unida se eliminó de la columna mediante lavado utilizando un tampón acetato de sodio (pH 5,0) 20 mM antes de una elución en gradiente de SnToxA utilizando un tampón que consistía en cloruro de sodio 300 mM y acetato de sodio 20 mM (pH 5,0). Las fracciones que contenían SnToxA se recogieron y congelaron antes de la liofilización para aumentar la concentración de SnToxA. Las muestras liofilizadas se disolvieron en un tampón que consistía en sal de sodio MOPS 5 mM (Alfa Aesar, MA, EE. UU.) y agua, antes de la infiltración en las plantas.

25 Producción de SnTox5

La cepa de *P. nodorum* Sn79+Tox5-3, generada transformando *SnTox5* en la cepa avirulenta de *P. nodorum* Sn79-1087, se utilizó para preparar los filtrados de cultivo que contenían SnTox5. En resumen, se cultivó Sn79+Tox5-3 en medio agar V8-patata dextrosa hasta que se liberaron las esporas de los picnidios. Las placas se inundaron con 10 ml de agua destilada estéril y se usaron 500 μ l de suspensión de esporas para inocular 60 ml de medio Fries líquido (5 g de tartrato de amonio, 1 g de nitrato de amonio, 0,5 g de sulfato de magnesio, 1,3 g de fosfato de potasio [dibásico].], 3,41 g de fosfato potásico [monobásico], 30 g de sacarosa, 1 g de extracto de levadura en 1000 ml de agua destilada). Los cultivos se cultivaron en un agitador orbital a 100 rpm durante una semana antes de dos semanas de

crecimiento estacionario en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Los filtrados del cultivo se filtraron a través de una capa de Miracloth (EMD Millipore Corp, MA, EE. UU.) y se concentraron 5 veces utilizando filtros centrífugos Amicon Ultracel - 3K (Merk Millipore Ltd., Cork, Irlanda). Los filtrados de cultivo se diluyeron en una proporción de 1:1 con agua estéril antes de la infiltración en las plantas.

Infiltraciones efectoras necrotróficas

Se realizaron infiltraciones con filtrados de cultivo que contenían SnToxA y SnTox5. Se realizaron tres infiltraciones por planta y la sensibilidad se evaluó en una escala binaria a los 3 días post infiltración.

EJEMPLO 7

Edición de genes mediada por RNP en yuca

Materiales vegetales y producción de estructuras embriogénicas organizadas (OES) y tejidos de callos embriogénicos friables (FEC)

Las plántulas de yuca cultivadas *in vitro* (cv. 92/02324) se mantuvieron en medio de agar MS2 para el alargamiento del tallo y un crecimiento estable. Se mantuvieron brotes en crecimiento bien desarrollados en cámaras de crecimiento en placas de Petri o Phytatrays™, de tres a cuatro brotes por bandeja, siguiendo las condiciones descritas por Taylor et al. (Taylor et al., 2012). Se generaron OES y FEC utilizados como tejidos diana de edición genética de 92/02324. Se extirparon lóbulos de hojas inmaduros de cultivos de brotes micropropagados de 4 a 6 semanas de edad, se colocaron en medio MS2 50P, que es medio basal de Murashige y Skoog suplementado con 20 g/l de sacarosa (MS2) más picloram 50 µM, y se incubaron en la oscuridad a 28 °C durante 4 semanas para la inducción de OES. La OES obtenida se cortó de los explantes utilizando unas pinzas finas y se hizo pasar a través de una malla de alambre de 1 mm. Se colocaron juntos de siete a diez fragmentos de tejido resultantes para formar un grupo. Se cultivaron de cinco a seis de estos grupos en cada placa de Petri que contenía medio basal de Gresshoff y Doy suplementado con 20 g/l de sacarosa y picloram 50 µM (GD2 50P) suplementado con tirosina 500 µM y se incubaron en la oscuridad durante 5 días. Después de 5 días, los tejidos se transfirieron a medio nuevo del mismo tipo y se cultivaron en la oscuridad durante tres a cuatro semanas más. Pequeños grupos de FEC formados después de este tiempo se separaron cuidadosamente del tejido no embriogénico utilizando pinzas finas y se subcultivaron en GD2 50P fresco suplementado con tirosina y mox. Después de 21 días más, la FEC se mantuvo en el mismo medio para bombardearla con partículas de oro recubiertas con RNP.

Conjunto de RNP de Cas9-ARNg

La proteína Cas9 con una etiqueta de localización nuclear doble en el extremo C (QB3 Macrolab, Berkeley) y ARNGs (IDT, Coralville, IA) formaron un complejo in vitro para formar RNP de Cas9-ARNg. Para 3 disparos por cada bombardeo de muestra, se montó una reacción de 60 µl. Se mezclaron completamente 9,6 µg de ARNGs, 6 µl de 10X NEBuffer 3.1 y agua libre de nucleasa. Luego, por goteo, se agregó lentamente 19,2 µg de Cas9 con mezcla constante, seguido de una incubación de 20 minutos a 37 °C. Las mezclas de RNP resultantes se almacenaron en hielo hasta que se prepararon las partículas de oro.

Preparación de partículas de oro para el bombardeo

Cas9-RNP se precipitaron en partículas de oro de 0,6 µm (Bio-Rad, Hercules, CA) mediante el uso del polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI). Brevemente, para 3 disparos, se mezclaron suavemente 60 µl de la mezcla de Cas9-RNP, tal como se describió anteriormente, con 30 µl de partículas de oro estériles (10 µg µl⁻¹ de suspensión de agua) y 1,5 µl de TransIT-2020 y se incubaron en hielo durante 20 min. Las partículas de oro recubiertas con Cas9-RNP se granularon en una mini microcentrífuga a 2000 g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 30 µl de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 3 macroportadores (10 µl cada uno) al colocar varias gotas pequeñas y dejar que se sequen al aire en una campana del flujo laminar. Cada muestra se bombardeó tres veces mediante el uso de los 3 macroportadores preparados.

Bombardeo y regeneración de OES/FEC

Cuatro horas antes del bombardeo, los OES y/o FEC se colocaron en papel de filtro de 55 mm en el centro de un medio osmótico MS2 50P/GD2 50P suplementado con manitol 0,2 M y sorbitol 0,2 M. Mediante el uso de los tres microportadores preparados que portaban micropartículas de oro recubiertas con Cas9-RNP, se disparó tres veces contra tejidos para cada muestra mediante el uso de la pistola de genes PDS-100/He (Bio-Rad, Hercules, CA) con presión de ruptura de 1100 psi. Los tejidos bombardeados se transfirieron del papel de filtro directamente al medio siguiente y se incubaron a 28 °C, 30 °C o 34 °C durante 20 horas. Los tejidos OES bombardeados se mantuvieron en medio MS2 50P durante 3 semanas y se pasaron al siguiente paso para la inducción de FEC. Los ejemplares de FEC bombardeados se transfirieron a medio GD2 50 en luz tenue (10 µmol m⁻² s⁻¹) a 28 °C durante 8 a 12 semanas con subcultivos según fuera necesario. Los tejidos se transfirieron a regeneración de embriones

(medio Etapa 1, MS2 suplementado con NAA 5 μ M) durante 21 días, seguido de medio de maduración de embriones (Etapa 2, MS2 suplementado con NAA 0,5 μ M). Los brotes se recuperaron en MS2 que contenía BAP 2 μ M y se mantuvieron en agar MS2.

5 ***Análisis de secuenciación de amplicones de última generación***

Para determinar las tasas de mutación para los tejidos de OES/FEC 2 semanas después del bombardeo o las plántulas regeneradas agrupadas 3-4 meses después del bombardeo mediante secuenciación de amplicones, se realizó PCR con cebadores específicos de la diana, amplificando aproximadamente 200-300 pb alrededor del sitio de corte mediante el uso de polimerasa Phusion High Fidelity (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los cebadores contenían un extremo 5' compatible con la preparación de la biblioteca Illumina NGS. Los productos de PCR se ligaron a adaptadores Illumina TruSeq y se purificaron. Las bibliotecas se prepararon mediante el uso de un kit NEBNext (Illumina, San Diego, CA) de acuerdo con las pautas del fabricante. Las muestras se secuenciaron en profundidad en un Illumina iSeq con lecturas finales emparejadas de 200-300 pb hasta una profundidad de aproximadamente 10.000 lecturas por muestra. Se usó Cortado para analizar los resultados de la edición. Brevemente, las lecturas se recortaron con el adaptador, luego, se fusionaron mediante superposición en lecturas individuales. Estas lecturas unidas se alinearon luego con la secuencia de referencia diana.

Detección de mutaciones de CRISPR/Cas9

El ADN genómico se extrajo del tejido foliar de plantas individuales de los grupos (grupos) con resultados positivos de secuenciación de amplicones de acuerdo con un método de extracción de CTAB. Las amplificaciones por PCR mediante el uso de cebadores específicos de secuencia para amplificar un fragmento dentro del intervalo de la mutación deseada se realizaron en una reacción de 25 μ L con mezcla maestra de PCR DreamTaq (2X) (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY). Para cada reacción de PCR, se cargaron 23 μ L en un gel de agarosa al 0,8 % para electroforesis. El producto de PCR amplificado se cortó y se extrajo el ADN de las muestras de gel mediante el uso del kit de extracción de gel Qiagen QIAquick (QIAGEN, Chatsworth, CA). Las muestras de ADN purificadas se utilizaron para la secuenciación de Sanger para determinar patrones de mutación.

30

EJEMPLO 8

Edición de genes mediada por RNP en cacao

Materiales vegetales y producción de tejidos donantes para bombardeo de RNP

Se utilizaron flores inmaduras para iniciar embriones somáticos primarios de cacao (cvs.

INIAPG-038, Matina 1-6 y CCN-51). Se generaron tejidos de cotiledón a partir de embriones somáticos primarios de cotiledón cultivados *in vitro* y se utilizaron para el bombardeo con RNP.

Conjunto de RNP de Cas9-ARNg

5 La proteína Cas9 con una etiqueta de localización nuclear doble en el extremo C (QB3 Macrolab, Berkeley) y ARNg (IDT, Coralville, IA) formaron un complejo *in vitro* para formar RNP de Cas9-ARNg. Para 3 disparos por cada bombardeo de muestra, se montó una reacción de 60 μ l. Se mezclaron completamente 9,6 μ g de ARNgs, 6 μ l de 10X NEBuffer 3.1 y agua libre de nucleasa. Luego, por goteo, se agregó lentamente 19,2 μ g de Cas9 con mezcla constante, seguido de una incubación de 20 minutos a 37 °C. Las mezclas de RNP resultantes se almacenaron en hielo hasta que se prepararon las partículas de oro.

Preparación de partículas de oro para el bombardeo

15 Cas9-RNP se precipitaron en partículas de oro de 0,6 μ m (Bio-Rad, Hercules, CA) mediante el uso del polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI). Brevemente, para 3 disparos, se mezclaron suavemente 60 μ l de la mezcla de Cas9-RNP, tal como se describió anteriormente, con 30 μ l de partículas de oro estériles (10 μ g μ l⁻¹ de suspensión de agua) y 1,5 μ l de TransIT-2020 y se incubaron en hielo durante 20 min. Las partículas de oro recubiertas con Cas9-RNP se granularon en una mini microcentrífuga a 2000 *g* durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 30 μ l de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 3 macroportadores (10 μ l cada uno) al colocar varias gotas pequeñas y dejar que se sequen al aire en una campana del flujo laminar. Para una única transfección, cada conjunto de 30 IE se bombardeó dos veces mediante el uso de los 3 macroportadores preparados.

Bombardeo y regeneración de OES/FEC

25 Cuatro horas antes del bombardeo, se cortaron tejidos de cotiledón derivados de embriones somáticos primarios en tamaños de 4-10 mm y se colocaron en papel de filtro de 55 mm en el centro de un medio osmótico de crecimiento de callos secundarios (SCG) suplementado con manitol 0,2 M y sorbitol 0,2 M. Mediante el uso de los tres microportadores preparados que portaban micropartículas de oro recubiertas con Cas9-RNP, se disparó tres veces contra tejidos para cada muestra mediante el uso de la pistola de genes PDS-100/He (Bio-Rad, Hercules, CA) con presión de ruptura de 1100 psi. Los tejidos bombardeados se incubaron a 28 °C, 30 °C o 34 °C durante 20 horas, se transfirieron a medio SCG y se incubaron en la oscuridad a 28 °C durante 8-12 semanas con subcultivo según fuera necesario. Luego,

los tejidos se transfirieron a ED4 (medio de desarrollo de embriones que contiene sacarosa al 4 %) durante 2-4 semanas y, posteriormente, a ED3 (medio de desarrollo de embriones que contiene sacarosa al 3 %). Cuando los embriones en germinación tenían una longitud de aproximadamente 15-20 mm, el proceso de conversión comenzó al colocarlos en medio ED6 (desarrollo de embriones que contiene sacarosa al 6 %); se expusieron a bajos niveles de luz de diodos emisores de luz (LED), $10\text{-}30\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Estos embriones se incubaron a 28 °C y, luego, las placas de Petri se envolvieron con cinta 3M Micropore (St. Paul, MN) para permitir el intercambio de gases. Después de 2-3 semanas en ED6, los embriones se transfirieron a un medio ligero de desarrollo embrionario (EDL) y, luego, se mantuvieron en EDL con transferencias cada dos semanas. A medida que los cultivos se desarrollaron, fueron expuestos lentamente a intensidades de luz LED más altas, $30\text{-}60\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Cuando las plántulas alcanzaron 2,5 cm de altura, se transfirieron a un Phytatray™ II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que contenía 100 mL de medio de enraizamiento y se sellaron con cinta 3M Micropore.

Análisis de secuenciación de amplicones de última generación

Para determinar las tasas de mutación para los tejidos de cotiledón 2 semanas después del bombardeo o embriones somáticos de callos/tejidos agrupados 2-3 meses después del bombardeo mediante secuenciación de amplicones, se realizó PCR con cebadores específicos de la diana, amplificando aproximadamente 200-300 pb alrededor del sitio de corte mediante el uso de polimerasa Phusion® High Fidelity (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los cebadores contenían un extremo 5' compatible con la preparación de la biblioteca Illumina NGS. Los productos de PCR se ligaron a adaptadores Illumina TruSeq y se purificaron. Las bibliotecas se prepararon mediante el uso de un kit NEBNext (Illumina, San Diego, CA) de acuerdo con las pautas del fabricante. Las muestras se secuenciaron en profundidad en un Illumina iSeq con lecturas finales emparejadas de 200-300 pb hasta una profundidad de aproximadamente 10.000 lecturas por muestra. Se usó Cortado para analizar los resultados de la edición. Brevemente, las lecturas se recortaron con el adaptador, luego, se fusionaron mediante superposición en lecturas individuales. Estas lecturas unidas se alinearon luego con la secuencia de referencia diana.

Detección de mutaciones de CRISPR/Cas9

El ADN genómico se extrajo de los embriones somáticos o del tejido foliar de plántulas individuales de los grupos con resultados positivos de secuenciación de amplicones de acuerdo con un método de extracción de CTAB. Las amplificaciones por PCR mediante el uso de cebadores específicos de secuencia para amplificar un fragmento dentro del intervalo de la mutación deseada se realizaron en

una reacción de 25 µl con mezcla maestra de PCR DreamTaq (2X) (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY). Para cada reacción de PCR, se cargaron 23 µL en un gel de agarosa al 0,8 % para electroforesis. El producto de PCR amplificado se cortó y se extrajo el ADN de las muestras de gel mediante el uso del kit de extracción de gel Qiagen QIAquick (QIAGEN, Chatsworth, CA). Las muestras de ADN purificadas se utilizaron para la secuenciación de Sanger para determinar patrones de mutación.

EJEMPLO 9

Dispersión óptima de suspensión de micropartículas de oro recubiertas con proteína, RNP o RNP/ADN por volumen para mejorar el tiempo de secado y el área de cobertura de las micropartículas

Materiales vegetales y producción de tejidos de callos embriogénicos

Semillas de *Triticum aestivum* L. cv. Los campos se sembraron semanalmente y se cultivaron en cámaras de crecimiento durante días de 16 horas a 24 °C y noches de 8 horas a 15 °C. Los niveles de luz se establecieron en aproximadamente 130 µmol m⁻² s⁻¹ a la altura de la cabeza. Se cosecharon espigas inmaduras 10-14 días después de la floración con un embrión inmaduro (IE) con un tamaño de 1,7-2,2 mm. Las espigas inmaduras se recolectaron hasta 3 días antes del bombardeo y se almacenaron a 4-6 °C. Un día antes del bombardeo, se recolectaron semillas inmaduras de espigas inmaduras y se esterilizaron en la superficie mediante el uso de lejía al 20 % (v/v) (hipoclorito de sodio al 8,25 %) más una gota de Tween 20 durante 15 minutos antes de un triple enjuague con agua esterilizada. Luego, se aislaron los IE y se colocaron con el escutelo hacia arriba en medio DBC3 (Cho et al. 1998) y se incubaron a 28 °C durante la noche.

Preparación de partículas de oro para el bombardeo

La proteína DsRED purificada (Takara Bio, San Jose, CA) se precipitó en partículas de oro de 0,6 µm (Bio-Rad, Hercules, CA) con el polímero lipídico catiónico TransIT-2020 (Mirus, Madison, WI). Brevemente, para 4 disparos, se mezclaron suavemente 25,6 µl de proteína DsRED purificada a 1 µg/µl y 54,4 µl de agua estéril con 40 µl de micropartículas de oro estériles (20 µg µl⁻¹ de suspensión de agua) +/- 2 µl de TransIT-2020. Las micropartículas de oro DsRED se granularon en una mini microcentrífuga a 2000 g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 40 µl de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 4 macroportadores (10 µl cada uno) con 4 tratamientos diferentes descritos en la leyenda para la Tabla 4 y se dejó que se sequen al aire en una campana del flujo laminar.

Las RNP de Cas9 se precipitaron sobre partículas de oro de 0,6 μm con TransIT-2020, tal como se describió anteriormente con modificaciones. Brevemente, para 6 disparos, se mezclaron suavemente 120 μl de la mezcla de Cas9-RNP con 60 μl de partículas de oro estériles ($20 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de suspensión de agua) y 3,0 μl de TransIT-2020. Las partículas de oro de RNP de Cas9 se granularon en una mini microcentrífuga a 2000 g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 60 μl de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 6 macroportadores (10 μl cada uno) con 6 tratamientos diferentes descritos en la leyenda para la Tabla 4 y se dejó que se sequen al aire en una campana del flujo laminar.

Las RNP de Cas9+ADN de DsRED se precipitaron sobre partículas de oro de 0,6 μm con TransIT-2020, tal como se describió anteriormente con modificaciones. Brevemente, para 4 disparos, se mezclaron suavemente 80 μl de la mezcla de Cas9-RNP que contenía 0,67 μg del plásmido pAct1IDsRED (véase el Ejemplo n.º 1) con 40 μl de partículas de oro estériles ($20 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de suspensión de agua) y 2,0 μl de TransIT-2020. Las partículas de oro de RNP de Cas9+ADN de DsRED se granularon en una mini microcentrífuga a 2000 g durante 30 s. Se eliminó el sobrenadante y las partículas de oro se resuspendieron en 40 μl de agua estéril mediante sonicación breve. Las partículas de oro recubiertas se aplicaron inmediatamente a 4 macroportadores (10 μl cada uno) con 4 tratamientos diferentes descritos en la leyenda de la Tabla 4 y se dejó que se sequen al aire en una campana del flujo laminar.

Después de cargar 10 μl de suspensión de partículas de oro en cada microportador, se midió el tiempo necesario para secar la suspensión de partículas.

Bombardeo de proteínas DsRED, RNP o RNP+ADN

Cuatro horas antes del bombardeo, los IE se colocaron en el centro de una bandeja Petri que contenía medio osmótico DBC3 suplementado con manitol 0,2 M y sorbitol 0,2 M. Mediante el uso de microportadores preparados que contenían micropartículas de oro recubiertas con RNP/ADN plásmido de DsRED, se dispararon IE para cada muestra una vez mediante el uso de la pistola de genes PDS-100/He (Bio-Rad, Hercules, CA) con una presión de ruptura de 1100 psi (Tabla 4), se incubó a 28 °C durante 20 horas. Luego, los IE bombardeados se transfirieron a medio DBC3 sin osmótico y se incubaron en la oscuridad a 28 °C.

Para evaluar los patrones de distribución de micropartículas de oro, se bombardearon micropartículas de oro recubiertas con proteína DsRED o RNP directamente sobre medio DBC3 solidificado con Phytigel sin tejidos vegetales.

Visualización fluorescente

Se visualizaron imágenes fluorescentes de IE para evaluar el n.º de focos de DsRED y la distribución/área de cobertura de los focos de DsRED en IE individuales mediante el uso de un

estereomicroscopio fluorescente Leica M165 FC, equipado con Leica DFC7000 T (JH Technologies, Fremont, CA); mediante el uso de dos filtros microscópicos, campo claro y ET DSR con excitación de 545 nm y emisión de 620 nm.

La distribución de micropartículas de oro en cada tratamiento también se visualizó a simple vista y con un estereomicroscopio Leica M165 FC con luces de campo brillante para evaluar la distribución/área de cobertura de las micropartículas de oro bombardeadas directamente sobre medios sólidos DBC3.

RESULTADOS

Solo tomó de 20-25 minutos secar al aire completamente 10 µl de suspensión de partículas de oro recubiertas con RNP o proteína DsRED cuando 10 µl de suspensión de partículas se colocó como múltiples gotas (15 o más gotas) sobre un microportador, mientras que tomó 66 minutos la colocación de 1 gota (Tabla 4). Otros informaron de un resultado similar cuando dejaron secar al aire a 22 °C durante 16 horas cuando se esparcieron 12 µl de solución de proteína DsRed directamente sobre el conjunto de macroportadores. En el presente estudio, esparcir múltiples gotas de suspensión de partículas con una punta de pipeta en el momento del secado inicial de parte de las gotas redujo significativamente el tiempo de secado a 15 minutos y cubrió uniformemente todas las áreas diana circulares del disco macroportador con micropartículas de oro (Tabla 4). La aplicación de 1 gota de suspensión de partículas también redujo el tiempo de secado de las partículas de oro recubiertas con RNP de 66 minutos a 57 minutos y cubrió el área de cobertura del macroportador casi el doble en comparación con la aplicación de 1 gota sin esparcir.

La aplicación de gotas múltiples distribuyó las partículas de manera más uniforme en el medio sólido DBC3 después del bombardeo, mientras que la aplicación de una sola gota distribuyó partículas de oro concentradas en el centro del área de cobertura de las partículas (Tabla 4). El tratamiento de dispersión de múltiples gotas sobre el disco microportador produjo una distribución aún más uniforme de las partículas de oro, independientemente de la cantidad de gotas.

Tabla 4. Dispersión óptima de suspensión de micropartículas de oro recubiertas con proteína o RNP por volumen para mejorar el tiempo de secado y el área de cobertura de las micropartículas

	n.º de gotas de proteína o RNP					
DsRED		1 gota + dispersión ^c	2 gotas ^d		múltiples gotas ^f	múltiples gotas + dispersión ^g
Tiempo necesario para secar la suspensión de partículas (min)		55	45		25	15
Área de cobertura de partículas después del bombardeo ^a		+(+)	+(+)		++	++(+)
RNP	1 gota ^b	1 gota + dispersión	2 gotas	3 gotas ^e	múltiples gotas	múltiples gotas + dispersión
Tiempo necesario para secar la suspensión de partículas (min)	66	57	59	39	20	15
Área de cobertura de partículas después del bombardeo	+	+(+)	+(+)	++	++	++(+)

^a Área de distribución/coertura de micropartículas de oro bombardeadas directamente sobre medios sólidos DBC3

^b Se colocó una gota de 10 µl de suspensión de micropartículas en un disco macroportador

5 ^c Se colocó una gota de 10 µl de suspensión de micropartículas en un disco macroportador y, luego, se esparció con la punta de una pipeta en el momento del secado inicial de la gota

^d Se colocaron dos gotas de 5 µl de suspensión de micropartículas en un disco macroportador

^e Se colocaron tres gotas de suspensión de micropartículas (10 µl en total) en un disco macroportador

10 ^f Se colocaron > 15 gotas de suspensión de micropartículas (10 µl en total) en un disco macroportador

^g Se colocaron > 15 gotas de suspensión de micropartículas (10 µl en total) en un disco macroportador y, luego, se esparcieron con la punta de una pipeta en el momento del secado inicial de parte de las gotas.

15

Para visualizar la administración de RNP mediante bombardeo de partículas, se agregó el plásmido DsRED a la suspensión de partículas de oro. El tiempo necesario para secar la suspensión de micropartículas para múltiples gotas fue de 20 minutos, mientras que 1 gota necesitó 60 minutos (Tabla 5). Dos gotas y múltiples gotas mostraron un mayor número de focos con expresión de DsRED por IE en comparación con 1 gota. La dispersión de múltiples gotas mostró los mejores resultados con una distribución más uniforme de la administración de partículas en términos de número de focos con expresión de DsRED.

25

Tabla 5. Dispersión óptima de la suspensión de micropartículas de oro recubiertas con RNP/plásmido de ADN de DsRED por volumen para mejorar el tiempo de secado y el área/patrón de cobertura de las macropartículas

	n.º de gotas ADN de RNP+DsRED															
	1 gota + dispersión ^c				2 gotas ^d				múltiples gotas ^e				múltiples gotas + dispersión ^f			
Tiempo necesario para secar la suspensión de partículas (min)	60				40				20				15			
n.º de focos que expresan DsRED por IE ^a	>200	50-200	20-50	<20	>200	50-200	20-50	<20	>200	50-200	20-50	<20	>200	50-200	20-50	<20
n.º de IE ^b	11	10	5	14	22	6	13	9	19	9	14	8	23	12	10	5

^a IE: embrión inmaduro

^b Se bombardearon cincuenta IE por tratamiento de detección de micropartículas

^c Se colocó una gota de 10 µl de suspensión de micropartículas en un disco macroportador y, luego, se esparció con la punta de una pipeta en el momento del secado inicial de la gota

^d Se colocaron dos gotas de 5 µl de suspensión de micropartículas en un disco macroportador

^e Se colocaron > 15 gotas de suspensión de micropartículas (10 µl en total) en un disco macroportador

^f Se colocaron > 15 gotas de suspensión de micropartículas (10 µl en total) en un disco macroportador y, luego, se esparcieron con la punta de una pipeta en el momento del secado inicial de parte de las gotas.

Aunque la memoria descriptiva y los ejemplos anteriores describen completamente y permiten la presente invención, no se pretende que limiten el alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente se incorporan a la presente mediante referencia. Si bien en la memoria descriptiva anterior se ha descrito la presente invención en relación con determinadas modalidades de esta, y se han establecido muchos detalles con fines ilustrativos, será evidente para los expertos en la técnica que la invención es pasible de modalidades adicionales y que algunos de los detalles descritos en la presente pueden variar considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

El uso de los términos «un» y «una», «el» y «la», y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención se interpretará como inclusivo tanto del singular como del plural, a menos que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos «que

comprende», «que tiene», «que incluye» y «que contiene» deben interpretarse como términos abiertos (es decir, con el significado de «que incluye, de modo no taxativo»). Se pretende que la mención de intervalos de valores en la presente sirva simplemente como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado que entre en el intervalo, a menos que se indique de otro modo en la presente, y cada valor por separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. Se pretende que el uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal/es como») que se proporciona en la presente, sea meramente ilustrativo de la invención y no suponga una limitación al alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

En la presente se describen modalidades de la presente invención, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas modalidades pueden resultar evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnica empleen dichas variaciones según sea adecuado, y los inventores pretenden que la invención se practique de forma diferente a como se describe específicamente en la presente. Por consiguiente, la presente invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes de la materia mencionada en las reivindicaciones adjuntas según lo permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de estos está abarcada por la invención a menos que se indique de otro modo en la presente o que el contexto lo indique claramente de otro modo.