



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Desarrollo de un vector viral para la edición génica mediante CRISPR/Cas9 en *Vitis vinifera*

Memoria para optar al título de Bioquímica

Gabriela Paz Madrid Caviedes

Profesor Patrocinante

Dra. Daniela Seelenfreud H.
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director de Memoria

Dr. Humberto Prieto E.
Laboratorio de Biotecnología
Vegetal
La Platina
INIA

Co-Director de Memoria

M^a de los Ángeles Miccono I.
Laboratorio de Biotecnología
Vegetal
La Platina
INIA

Enero 2018

Agradecimientos

A mi familia, mis papas y hermano, todo lo que soy se lo debo a ustedes. Gracias por el apoyo y cariño incondicional durante todos estos años de estudio y esfuerzo.

A mis amigos, por hacer infinitamente más entretenido todo este proceso. A Franco, por soportar mis momentos de locura y ayudarme.

Al Dr. Humberto Prieto por su ayuda durante la realización de esta Memoria y por darme un espacio en su grupo de trabajo. A M^a de los Ángeles Miccono, por su apoyo, dedicación y guía en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que me ayudaron a desarrollarme profesionalmente en este período.

Al proyecto “Nuevas Tecnologías De Mejoramiento” financiado por Consorcio Biofrutales y CORFO-Chile 13CTI-21520-SP7 y Laboratorio de Biotecnología INIA, La Platina

Índice de Contenidos

Agradecimientos	3
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas.....	7
Abreviaturas	8
Resumen	1
Abstract	2
1 Antecedentes.....	3
1.1 Modificación Génica	3
1.2 El sistema CRISPR/Cas9	5
1.3 Edición génica en plantas	8
1.4 Replicones basados en geminivirus	9
1.4.1 Aplicación biotecnológica de replicones basados en geminivirus	11
2 Hipótesis.....	15
3 Objetivo General.....	15
4 Objetivos Específicos	15
5 Materiales y Métodos	16
5.1 Material vegetal.....	16
5.2 Vectores	16
5.3 Construcción del vector basado en geminivirus universal.....	17
5.4 Diseño y clonamiento de RNA guías	18
5.5 Clonamiento en <i>Escherichia coli</i>	19
5.6 Transformación de <i>Rhizobium radiobacter</i>	19
5.7 Preparación de <i>R. radiobacter</i> para transformación de vides.....	20
5.8 Agroinfiltración de <i>Vitis vinifera</i>	20
5.9 Transformación estable de <i>Vitis vinifera</i>	21
5.10 Extracción de DNA genómico	21
5.11 Identificación de edición en <i>Vitis vinifera</i> por PCR.....	21

5.12	PCR de genes de referencia	22
5.13	Determinación de eficiencia de edición en <i>Vitis vinifera</i>	22
5.14	Extracción de RNA y síntesis de cDNA	22
5.15	RT-PCR	23
5.16	Análisis estadístico	24
6	Resultados	25
6.1	Diseño y Construcción de vector GMV-universal	25
6.2	Diseño y clonamiento RNA guía	26
6.3	Edición de <i>Vvsweet4</i> en <i>Vitis vinifera</i>	29
6.3.1	Expresión transitoria y evaluación de RNA guía	29
6.3.2	Edición génica en embriones somáticos de <i>Vitis vinifera</i>	30
6.4	Expresión de cas9 en embriones somáticos de <i>Vitis vinifera</i>	33
6.5	Eficiencia de edición en embriones somáticos de <i>Vitis vinifera</i>	34
7	Discusión	35
7.1	Construcción de un vector basado en geminivirus para edición génica en <i>Vitis vinifera</i>	35
7.1.1	Diseño y construcción del vector	35
7.1.2	Consideraciones para la funcionalidad de la edición: gRNAs	35
7.2	Edición génica en <i>Vitis vinifera</i>	36
8	Conclusiones	40
9	Referencias	41
10	Material Suplementario	45

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismo de reparación de DSBs.....	5
Figura 2: Sistemas CRISPR/Cas9 nativo y sintético.....	7
Figura 3: Estrategia de edición de la nucleasa Cas9.....	8
Figura 4: Estructura y replicación de geminivirus en células vegetales.	11
Figura 5: Estrategia de replicones basados en geminivirus (RGV) para edición génica.	12
Figura 6: Ensamblaje del vector pGMV-Universal.....	25
Figura 7: Alineamiento de zonas de unión de vector pGMV-Universal..	26
Figura 8: Secuencia comparativa para gRNA en ‘Thompson Seedless’ y ‘Pinot Noir’	27
Figura 9: Clonamiento gRNA en vector pGMV-Universal.....	28
Figura 10: Análisis de edición en <i>VvSWEET4</i> de hojas agroinfiltradas de <i>Vitis vinifera</i>	30
Figura 11: Análisis de edición en <i>VvSWEET4</i> de embriones somáticos de <i>Vitis vinifera</i>	32
Figura 12: Análisis de RT-PCR de <i>cas9</i>	33
Figura 13: Eficiencia de edición de <i>VvSWEET4</i> en ES de <i>Vitis vinifera</i>	34
Figura Suplementaria 1: Mapa de vector pTC223.....	45
Figura Suplementaria 2: Mapa de vector pHSE401.....	46
Figura Suplementaria 3: Mapa de vector pGMV-Universal.....	47
Figura Suplementaria 4: Mapa de vector pHSE-SWEET4.....	48
Figura Suplementaria 5: Mapa de vector pGMV-SWEET4.....	49
Figura Suplementaria 6: Clonamiento de gRNAs en vector pHSE401	50
Figura Suplementaria 7: Análisi de edición en <i>VvSWEET4</i> de hoja agroinfiltradas con pHSE-SWEET4..	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de vectores utilizados.....	16
Tabla 2. Partidores para la construcción del vector pGMV-Universal.....	18
Tabla 3. Partidores usados en RT-PCR de <i>cas9</i>	24

Abreviaturas

ALS Acetolactato sintasa

BeYDV Virus del enanismo amarillo del poroto

CAI Índice de adaptación de codones

CRISPR/Ca9 Clustered regularly interspaced short palindromics repeats/CRISPR associated protein 9

crRNA CRISPR RNA

DNA Ácido desoxirribonucleico

DSB Corte doble hebra

dsDNA DNA de doble hebra

ES Embriones somáticos

gRNA RNA guía

HA Hoja agroinfiltrada

LIR Long intergenic region

LSL LIR-SIR-LIR

MGN Meganucleasa

mRNA RNA mensajero

NaCl Cloruro de sodio

NHEJ Unión de extremos no homólogos

NSD Nucleasa sitio-dirigida

NSE Nucleasa sitio-especifica

ori origen de replicación

PAM Motivo adyacente al protoespaciador

PCR Polymerase chain reaction

RCR Replicación por círculo rotatorio

Rep Proteína asociada a replicación

RGV Replicón basado en geminivirus

RH Recombinación homóloga

RNA Ácido ribonucleico

RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction

SIR Short intergenic region

ssDNA DNA hebra simple

T-DNA DNA transferencia

TALEN Nucleasas efectoras tipo activadores de la transcripción

tracrRNA RNA transactivador de crRNA

ZFN Nucleasas dedos de zinc

Resumen

La edición génica es una disciplina emergente que busca desarrollar estrategias y métodos para la modificación eficiente y específica del DNA en las células vivas. En plantas, la edición génica posee un gran potencial para la investigación básica y aplicada, permitiendo el estudio de genes, como también el mejoramiento de cultivos.

Las técnicas de edición génica actuales se basan especialmente en nucleasas sitio-específicas (NSE) como el sistema CRISPR/Cas9 (del inglés, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9*), que crea cortes de doble hebra (DSBs, del inglés *double strand breaks*) sitio-dirigidos en el genoma.

El sistema CRISPR/Cas9 está compuesto por la endonucleasa Cas9 y un RNA sintético llamado RNA guía (gRNA), que es complementario a una secuencia específica del genoma. Los gRNA y Cas9 forman un complejo, permitiendo el reconocimiento y corte del DNA blanco. Estos cortes se reparan con mayor frecuencia mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*), que tiene una alta propensión a inducir mutaciones por inserción o deleción (indels) en el sitio de corte que pueden inactivar la función de un gen. El reconocimiento del sitio de corte en el DNA también es dependiente de la presencia del motivo adyacente al protoespaciador (PAM), cuya secuencia consenso es NGG.

En *Vitis vinifera*, los niveles de expresión de los componentes de CRISPR/Cas9 en el núcleo celular presentan una barrera para lograr mutaciones eficientemente en el genoma. Con el objetivo de mejorar este sistema, desarrollamos un vector basado en replicones de DNA derivados del virus del enanismo del poroto amarillo para la expresión de Cas9 y los gRNA. Utilizando este vector, pudimos generar una deleción de 1.428 pb en la secuencia genómica del gen *VvSWEET4* en embriones somáticos de vides transformados con *Rizhobium radiobacter*. Nuestros resultados también mostraron un aumento de cuatro veces en la eficiencia de edición del gen blanco, en comparación a la edición mediada por un vector T-DNA clásico.

La estrategia propuesta hace posible la creación de modificaciones precisas del genoma de la vid sin la necesidad de una integración estable de los componentes del sistema CRISPR/Cas9.

Abstract

Genome engineering is a rapidly emerging discipline that aims to develop strategies and methods for efficient and targeted DNA modifications in living cells. In plant sciences, gene editing has enormous potential for basic and applied research allowing for both the study of individual genes and crop improvement.

Current genetic engineering techniques are mostly based on sequence-specific nucleases (SSNs), such as clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9. The CRISPR/Cas9 system is composed by a Cas9 endonuclease and a synthetic guide RNA (gRNA) complementary to a specific target sequence producing a DNA double-strand break (DSB) in the genome. These breaks are most frequently repaired by non-homologous DNA end joining (NHEJ) manner, which has a high tendency to induce insertion/deletion (indels) mutations at the break site that knock-out gene function. gRNAs can be designed and led to form editing complexes with Cas9 under *in vivo* conditions generating indels and eventually loss of function mutations. Additionally, the presence of a NGG sequence called Protospacer Adjacent Motif (PAM) in the target genome is a strict requisite for the generation of the DSB.

In *Vitis vinifera*, delivery of CRISPR/Cas9 reagents presents a barrier to efficiently achieve targeted genome modifications. To improve that efficiency, we developed a vector based on DNA replicons derived from the geminivirus Bean Yellow Dwarf Virus (BeYDV) for the expression of Cas9 and gRNAs. Using this vector, a 1428 bp deletion in the genomic sequence of the *VvSWEET4* gene was carried out using a *Rizhobium radiobacter*-mediated transformation of grapevine somatic embryos. Our results also showed a four-fold increase in the editing efficiency of the target gene, compared to a T-DNA based vector.

The proposed strategy makes possible the establishment of precise modifications in the grapevine genome without need of stable integration of the sequences encoding for the CRISPR/Cas9 components.

1 Antecedentes

1.1 Modificación Génica

La edición génica o la modificación específica del genoma, tiene en plantas un enorme potencial para la biología básica y aplicada, ya que facilita tanto el estudio de la función de genes, como también el mejoramiento de cultivos.

Durante las últimas décadas, se han generado modificaciones en el genoma a través de mutaciones de DNA, las cuales son producidas de manera estocástica, principalmente usando químicos mutagénicos como etil metil sulfonato (Puchta y Fauser 2014) o mediante radiación γ (Belhaj *et al.*, 2015). Estos métodos tienen la desventaja de generar grandes poblaciones de individuos mutagenizados que requieren trabajo a gran escala para identificar los fenotipos deseados en función de los genotipos asociados a éstos (Voytas, 2013). Otras aproximaciones como, la mutagénesis insercional con DNA de transferencia (T-DNA), transposones o retrotransposones, no logran la inactivación completa del gen y normalmente estas inserciones son al azar (Puchta y Fauser 2014). Asimismo la frecuencia y el tipo de mutaciones que se logran con estas técnicas siguen estando fuera del control del investigador y carecen de precisión y afectan de forma relevante otras zonas del genoma (Voytas, 2013).

Una de las técnicas ampliamente utilizadas para determinar la función de genes son los RNA de interferencia tales como siRNA y microRNA (Puchta y Fauser 2014). Estas técnicas silencian la expresión génica a través de la degradación enzimática del RNA mensajero (mRNA) con los cuales tienen complementariedad en su secuencia, lo que en consecuencia genera el bloqueo de la síntesis de proteínas (Auer y Frederick 2009). Existen casos exitosos donde se ha logrado el silenciamiento altamente específico y eficiente de genes endógenos aplicando esta tecnología. También con estas técnicas se ha conseguido silenciar secuencias virales confiriendo resistencia a diferentes virus (Jelly *et al.*, 2012). Sin embargo, estas modificaciones pueden ser reversibles e incompletas, ya que sólo actúan a nivel del transcrito y no pueden ser utilizadas para editar elementos genómicos como regiones regulatorias (Unniyampurath *et al.*, 2016).

En la actualidad, se ha desarrollado la edición génica basada en nucleasas sitio-específicas o sitio-dirigidas (NSE o NSD). Éstas incluyen meganucleasas (MGNs), nucleasas con dedos de zinc (ZFNs, del inglés *zinc-finger nucleases*), nucleasas efectoras tipo activadores de la transcripción (TALENs, del inglés *transcription activator-like effector nucleases*) y el sistema CRISPR/Cas9 (del inglés, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9*) (Sovová *et al.*, 2017).

Las NSE están diseñadas para reconocer secuencias específicas del DNA y producir cortes de doble hebra (DSBs, del inglés *double strand breaks*) cercanos al sitio de reconocimiento, lo que permite realizar mutagénesis sitio-dirigida o edición específica (Altpeter *et al.*, 2016). Este tipo de técnicas aprovechan la maquinaria de reparación del DNA de la célula para corregir los cortes creados por las nucleasas.

El mecanismo molecular más común para reparar cortes en el DNA en células somáticas de plantas es la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*) (Puchta y Fauser 2014).

En la reparación por NHEJ (**Figura 1**), luego de la inducción del quiebre de la hebra de DNA, los dos extremos del corte son protegidos de la degradación por la unión del heterodímero Ku. Posteriormente, una DNA ligasa específica (ligasa de tipo 4) es dirigida al sitio y liga los extremos, pudiendo ocurrir o no procesamiento en éstos, es decir, la inserción o deleción de algunos nucleótidos (*indels*) (Puchta y Fauser 2014). Esto es de gran interés para la biotecnología, ya que la presencia de estos *indels* resultaría en la disrupción del marco de lectura traduccional, lo que frecuentemente lleva a la inactivación del gen.

Una segunda vía de reparación de DSB es por reparación dirigida por homología o recombinación homóloga (RH) (**Figura 1**). En células somáticas vegetales, la RH corresponde a una vía de reparación menor en comparación a la NHEJ (Puchta y Fauser 2014). Por ejemplo, la frecuencia típica de RH en plantas varía entre 10^{-4} y 10^{-6} (Voytas, 2013) Por esta razón, la HR está recién comenzando a ser utilizada para la modificación génica.

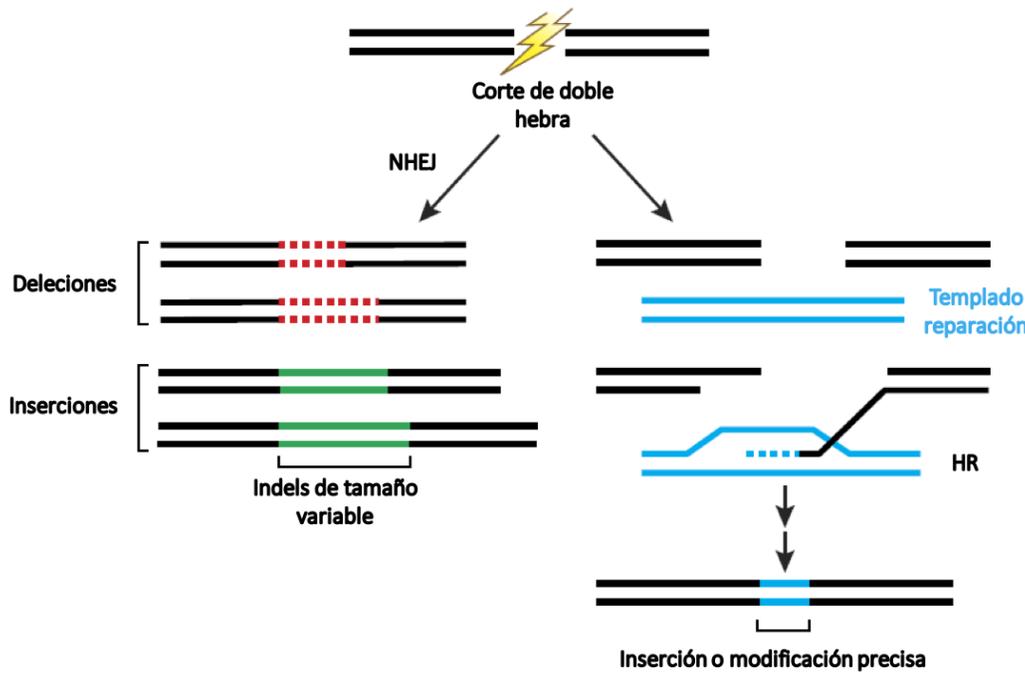


FIGURA 1: Mecanismo de reparación de DSBs. Los cortes de doble hebra producidos en el DNA pueden ser reparados por dos vías. La vía de NHEJ produce reparaciones imprecisas que pueden generar mutaciones por inserción o deleción de bases en el sitio de corte. La reparación por recombinación homóloga (HR) utiliza un templado de reparación y es posible su uso para introducir modificaciones precisas.

1.2 El sistema CRISPR/Cas9

El sistema de edición CRISPR/Cas9 fue descrito inicialmente como un sistema inmune adaptativo en procariontes (Jinek *et al.*, 2012). Éste se basa en secuencias cortas de RNA que permiten la detección y el silenciamiento de secuencias específicas de ácidos nucleicos extraños con el fin de proteger al organismo hospedero (Jinek *et al.*, 2012). Aunque el sistema está presente en múltiples genomas bacterianos, el mejor caracterizado es el sistema CRISPR tipo II de *Streptococcus pyogenes* (Stella y Montoya 2016). En *S. pyogenes*, el sistema está compuesto por un operón que contiene los genes *cas* y un arreglo CRISPR donde se van integrando pequeños fragmentos de DNA invasor (protoespaciador) entre las denominadas secuencias de repeticiones CRISPR (Sander y Joung 2014). El *locus* genómico CRISPR codifica la endonucleasa Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR), que forma un complejo con dos moléculas de RNA que se generan a partir del procesamiento del arreglo: el RNA CRISPR (crRNA) y el RNA transactivador de crRNA (tracrRNA) (Jinek *et al.*, 2012) (**Figura 2a**).

El crRNA está compuesto de una secuencia protoespaciadora (que proviene del fragmento de DNA foráneo almacenado), más una de las repeticiones CRISPR adyacentes (Sander y Joung 2014). El tracrRNA es transcrito desde otra zona del arreglo y es requerido para la maduración del pre-crRNA, que al unirse al crRNA facilita su posterior procesamiento por la RNasIII (Belhaj *et al.*, 2015). Cada crRNA hibrida con un tracrRNA y luego ambos forman un complejo con Cas9, donde la secuencia protoespaciadora del crRNA dirige a Cas9 hacia la secuencia complementaria en el DNA invasor, generándose un corte en ambas hebras del DNA, resultando en la degradación de éste. El reconocimiento del sitio de corte en el DNA también es dependiente de la presencia del Motivo Adyacente al Protoespaciador (PAM), cuya secuencia consenso es NGG. Estos tres nucleótidos permiten que el complejo Cas9:crRNA-tracrRNA se combine con la secuencia blanco (Belhaj *et al.*, 2015).

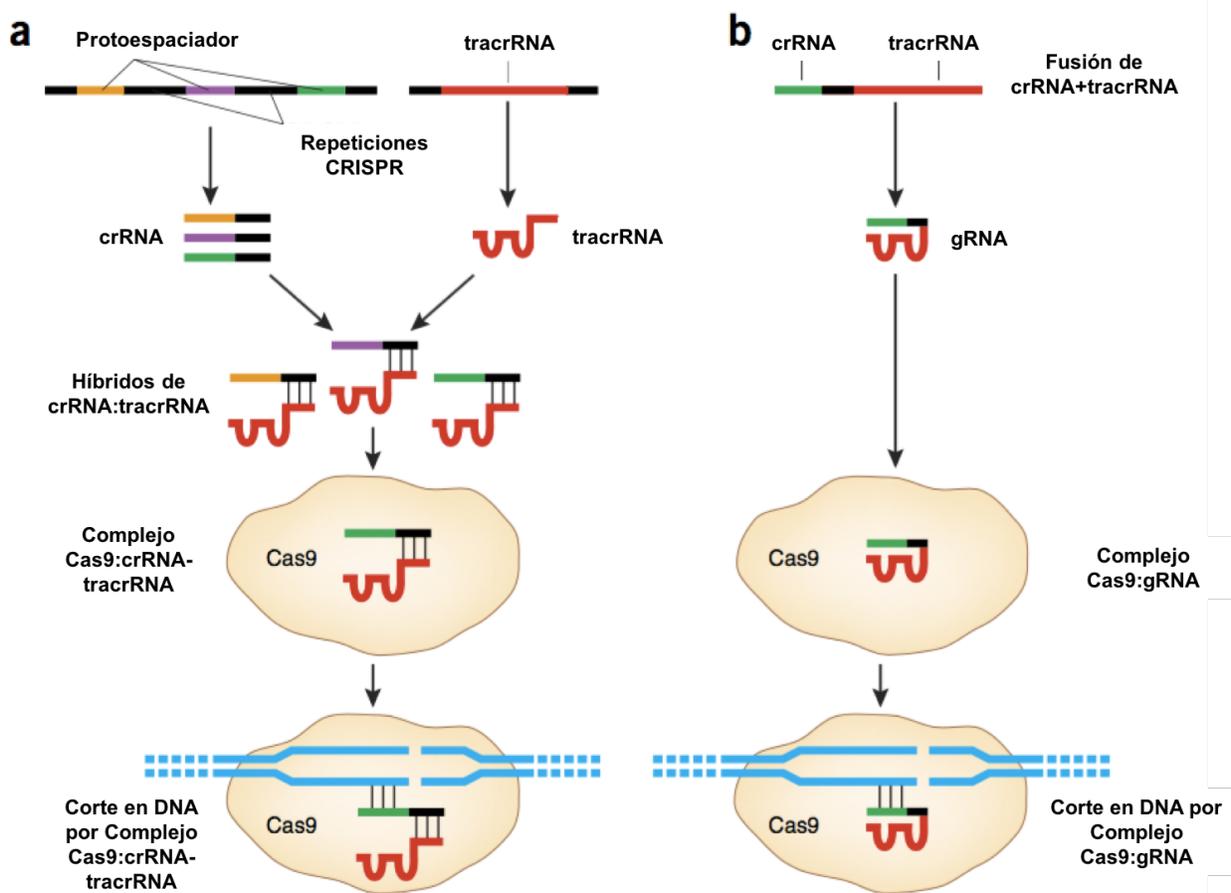


FIGURA 2: Sistemas CRISPR/Cas9 nativo y sintético.(a) Frente a DNA invasor, el sistema CRISPR/Cas9 nativo incorpora parte de las secuencias de DNA foráneo en su genoma en un arreglo génico, desde el cual se transcribe el crRNA y tracrRNA. El crRNA hibrida con un tracrRNA y luego se une a Cas9. El complejo crRNA-tracrRNA:Cas9 se une a DNA que contenga la secuencia PAM y una secuencia complementaria al crRNA y corta ambas hebras del DNA foráneo, al ocurrir un nuevo enfrentamiento.(b) El sistema sintético CRISPR/Cas9 fusiona los crRNA y tracrRNA, dando origen al gRNA. El gRNA contempla una secuencia de 20 pb complementaria al DNA blanco de edición, adyacente a la secuencia PAM, que forma un complejo con Cas9 permitiendo el reconocimiento y corte del DNA blanco. Adaptado de Sander y Joung (2014).

Para el uso biotecnológico de este sistema en particular, es posible fusionar el extremo 3' del crRNA con el extremo 5' del tracrRNA, lo que genera una molécula única de RNA llamada RNA guía (gRNA), que imita la estructura requerida para guiar el corte sitio-específico del DNA (Figura 2b) (Jinek *et al.*, 2012). El gRNA en conjunto con Cas9 forman una endonucleasa mediada por RNA y su especificidad está definida por los veinte nucleótidos presentes en el gRNA y por la presencia de la secuencia PAM en el extremo 3' del DNA blanco (Puchta y Fauser 2014) (Figura 3).

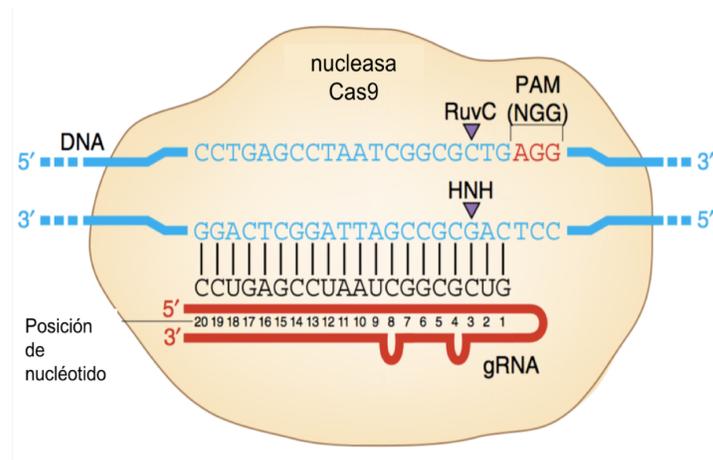


FIGURA 3: Estrategia de edición de la nucleasa Cas9. La nucleasa Cas9 realiza cortes de doble hebra en sitios del DNA que presentan complementariedad con los 20 nucleótidos del extremo 5' del gRNA y la secuencia PAM. Cas9 contiene los dominios nucleasa RuvC y HNH (flechas) necesarios para realizar el corte hacia el 5' de la secuencia PAM en ambas hebras. Adaptado de Sander y Joung (2014).

En consecuencia, para lograr inducir un DSB *in vivo* en un gen de interés, es necesario que en el genoma de la célula esté presente una secuencia de tipo N₂₀-NGG más la expresión y ensamblaje correcto de la endonucleasa Cas9 y el gRNA (**Figura 2**). De acuerdo a esto, es posible expresar múltiples RNA guías para un mismo gen o para distintos a la vez, lo que permite dirigir los cortes a diferentes sitios en el genoma de manera específica (Xing *et al.*, 2014), reduciendo los costos y tiempos necesarios para generar secuencias correctamente editadas.

Otra ventaja del sistema CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* es que Cas9 corresponde a una proteína única, en comparación a otras nucleasas compuestas por múltiples subunidades (como TALEN y ZFN) (Newman y Ausubel 2016). Además, al ser Cas9 una nucleasa nativa no es necesario agregar otras proteínas efectoras que permitan el corte, como es el caso de TALENs y ZFN, donde es necesario fusionar las proteínas de unión a DNA a una nucleasa, normalmente FokI (Voytas, 2013). Por otra parte, en contraste con los métodos ZFN y TALEN, que usan interacciones proteína-DNA para identificar el sitio de inducción de DSB, el sistema CRISPR/Cas9 es una nucleasa guiada por RNA y por lo tanto usa las reglas de Watson-Crick de complementariedad de bases entre un RNA guía y el sitio blanco en el DNA (Sander y Joung 2014), lo que simplifica su diseño e implementación.

1.3 Edición génica en plantas

Los primeros estudios en plantas donde se demostró la aplicación de CRISPR/Cas9 se realizaron en protoplastos de *A. thaliana* y en suspensiones celulares de *N. benthamiana* (Ceasar *et al.*, 2016), en los que se logró una mutagénesis dirigida basada en NHEJ con frecuencias de 5,6% y 38,5%, respectivamente

(Puchta y Fauser 2014). En 2013 se describió por primera vez la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 en arroz y trigo, ambos cultivos de alto interés económico (Ceasar *et al.*, 2016). En este trabajo se realizaron modificaciones dirigidas mediante NHEJ, obteniéndose frecuencias de mutación entre 14,5-38,0% en protoplastos de arroz y 28,5% en protoplastos de trigo (Puchta y Fauser 2014).

Además de estas plantas modelo, CRISPR/Cas9 se ha utilizado exitosamente en otros cultivos, tales como maíz, lechuga, papa, sorgo, soya, naranjo, tomate, berro y además en álamo (Bortesi *et al.*, 2016) usando distintos métodos de transferencia o entrega de DNA, los que incluyen la transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (PEG), transferencia mediada por *Rhizobium radiobacter* (ex *Agrobacterium tumefaciens*) en embriones y tejidos somáticos o bombardeo de cultivos celulares (Sander y Joung 2014). Mediante el uso de *R. radiobacter* no siempre es posible lograr niveles adecuados de Cas9 y gRNAs en el núcleo, por lo que se ve afectada la eficiencia de las ediciones (Altpeter *et al.*, 2016), lo cual representa una barrera para lograr modificaciones específicas del genoma de manera exitosa. En el caso de plantas leñosas como *Vitis vinifera* es aún más difícil tener éxito, debido a que este cultivo es recalcitrante a la transformación con *R. radiobacter* (Costa *et al.*, 2017). Aunque la expresión constitutiva de los componentes de CRISPR/Cas9 potencialmente podría lograr mayor eficiencia de edición, la persistencia de estos componentes en la célula también podría aumentar la frecuencia de mutaciones en sitios diferentes al blanco (mutaciones “*off-target*”), un fenómeno que ha sido reportado anteriormente con ZFN (Sander y Joung 2014). Normalmente, la transferencia de DNA a células de plantas involucra la integración del transgen en el genoma del hospedero. En el caso de las herramientas de edición, como CRISPR/Cas9, es importante que la expresión de los componentes sea transitoria pero en alta concentración (Altpeter *et al.*, 2016).

1.4 Replicones basados en geminivirus

Los virus de planta tienen el potencial de convertirse en poderosas herramientas para la edición génica, al conseguir altos niveles de expresión de NSE en los tejidos. Por décadas, se han usado virus de mamíferos con finalidades similares en terapia génica (Butler *et al.*, 2016).

Los vectores derivados de virus vegetales han sido aplicados ampliamente desde la década de 1980, tanto para la producción de proteínas recombinantes en plantas incluyendo anticuerpos y vacunas (Gleba *et al.* 2013), como también para inducir silenciamiento génico en genómica funcional (Lozano-Durán, 2016).

Últimamente, la aplicación potencial de replicones basados en geminivirus para propósitos de edición

génica ha atraído mucha atención, considerando su potencial adquirido evolutivamente para manipular eficientemente algunas funciones celulares. Estas estrategias virales pueden ser explotadas con fines biotecnológicos.

Los geminivirus poseen un genoma de DNA circular de hebra simple (ssDNA), del inglés *single stranded DNA*), que se replica en el núcleo utilizando la maquinaria de síntesis de DNA de la planta con el fin de obtener altos niveles de replicones, es necesaria sólo un tipo de proteína viral para generar una replicación exitosa (Lozano-Durán, 2016).

La familia *Geminiviridae* está dividida en cuatro géneros: *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Curtovirus* y *Begomovirus*. Los tres primeros tienen genomas de un componente con tamaños entre 2,7-2,8 kilobases (kb), mientras que los begomovirus pueden tener genomas bipartitos (Rybicki y Martin 2011).

La organización del genoma es característica para todos los géneros de esta familia (**Figura 4a**): constan de una estructura circular bidireccional, donde los marcos de lectura divergen en el sentido del virión (V) y en el complementario (C) desde una gran región intergénica (LIR, del inglés *long intergenic region*) y de un origen de replicación (ori) que contiene una horquilla con una secuencia invariable TAATATTAC en el bucle. La región LIR comprende elementos de los promotores de los genes de ambos sentidos, a los cuales se pueden unir factores de transcripción del hospedero (Rybicki y Martin 2011). Sólo en el género *Mastrevirus* existe una pequeña región intergénica (SIR, del inglés *small intergenic region*) que se encuentra en la convergencia de los marcos de lectura en sentido V y C. Esta región contiene un sitio de unión para un partidor que permite el inicio de la síntesis de la hebra complementaria, así como también señales de poliadenilación bidireccional (Rybicki y Martin 2011).

El genoma de los geminivirus codifica entre 5-7 proteínas involucradas en la replicación, el movimiento, la trasmisión y la patogénesis (Hanley-Bowdoin, *et al.*, 2013). El proceso de replicación (**Figura 4b**) comienza cuando el ssDNA es liberado desde el virión y convertido a DNA de doble hebra (dsDNA), del inglés *double stranded DNA*) mediante polimerasas del hospedero en el núcleo de la célula infectada (Rybicki y Martin 2011). Este dsDNA es usado como templado para la transcripción de los genes del virus y para su replicación a través de círculo rotatorio (RCR) generando múltiples copias del genoma viral (Rybicki y Martin 2011).

La transcripción temprana del genoma del virus en la célula vegetal produce principalmente la proteína asociada a replicación (Rep), que inicia la RCR al unirse a un sitio dentro de la región LIR (Rybicki y Martin 2011). La proteína Rep realiza un corte de hebra simple en la secuencia TAATATT^vAC y se une

covalentemente a la adenina del extremo 5' indicada en el corte, para permitir el desplazamiento de hebra por polimerasas celulares y así continuar con la RCR (Rybicki y Martin 2011). Luego, Rep recirculariza el ssDNA lineal desplazado por ligación, ayudada por el apareamiento de la región horquilla presente en el origen de replicación (Rybicki y Martin 2011).

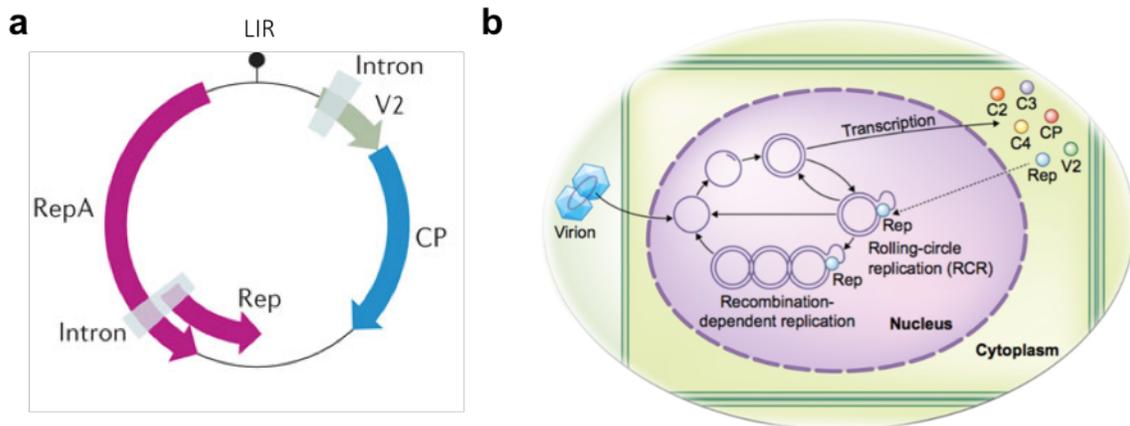


FIGURA 4: Estructura y replicación de geminivirus en células vegetales.(a) El genoma de geminivirus corresponde a una estructura circular bidireccional desde la región LIR, los marcos de lectura son divergentes desde esta región. (b) El proceso de replicación comienza cuando el DNA del virus ingresa a la célula y es transformado en DNA de doble hebra por la maquinaria celular, luego comienza la transcripción y traducción de las proteínas virales y simultáneamente la replicación por círculo rotatorio (RCR) que es mediada por Rep y factores de la célula. Adaptado de Lozano-Durán (2016).

1.4.1 Aplicación biotecnológica de replicones basados en geminivirus

Dentro del género *Mastrevirus*, el virus del enanismo amarillo del poroto (BeYDV, del inglés *bean yellow dwarf virus*) ha sido estudiado exhaustivamente como una herramienta molecular para la expresión de proteínas recombinantes, principalmente de importancia farmacológica (Hefferon, 2014). Las características que hacen que BeYDV sea atractivo para el diseño de vectores con usos biotecnológicos son: a) que su genoma se amplifica hasta un número de copias muy alto, b) esto es ejecutado principalmente por factores transcripcionales de la planta y c) posee un genoma de tamaño pequeño (2,5 kb) y estructura simple.

Las únicas secuencias requeridas para el desarrollo de un vector basado en BeYDV son Rep, LIR y SIR (Rybicki y Martin 2011). LIR y SIR permiten que una construcción lineal sea circularizada por la unión de dos secuencias LIR a través de la proteína viral Rep, formando replicones. Esto permite la creación de vectores con la estructura “LSL” (LIR SIR LIR) o estrategia de virus desarmados (Peyret y Lomonossoff

2015).

Esta estrategia presenta varias ventajas por sobre el uso de virus completos: se evitan los efectos negativos por la expresión de las otras proteínas virales (proteína de la cápside y del movimiento, principalmente); las limitaciones de tamaño de la secuencia son menos estrictas que con virus completo y las restricciones impuestas por la especificidad del hospedero son menos rigurosas (Lozano-Durán, 2016).

Recientemente, el grupo de Daniel Voytas combinó la edición mediada por CRISPR/Cas9 con replicones basados en BeYDV (**Figura 5**) (Baltes *et al.*, 2014). Se transformaron plantas de *Nicotiana tabacum* con un vector T-DNA de *R. radiobacter* modificado, que contenía las secuencias LSL (LIR-SIR-LIR) y la secuencia codificante para Rep. Las secuencias codificantes para Cas9 y gRNA contra el gen de acetolactato sintasa (*ALS*) fueron ubicadas entre LIR y SIR. En este trabajo, se demostró un aumento en la mutagénesis inducida por NHEJ en *ALS*, sugiriendo que es posible expresar los elementos de CRISPR/Cas9 desde un replicón basado en geminivirus (RGV) (Baltes *et al.*, 2014).

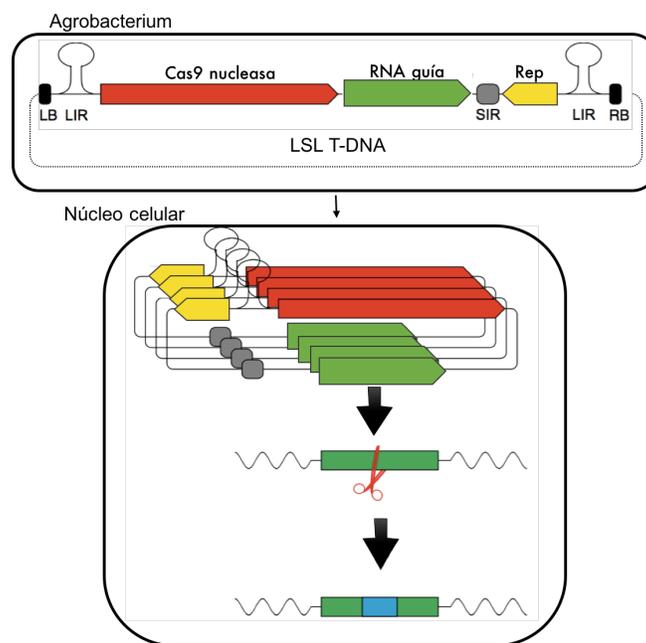


FIGURA 5: Estrategia de replicones basados en geminivirus (RGV) para edición génica. El LSL T-DNA contiene las secuencias de BeYDV más *Cas9*, gRNA y *Rep*. Éste es entregado al núcleo celular vegetal a través de transformación mediada por *R. radiobacter*. Una vez en el núcleo, *Rep* circulariza y genera múltiples copias del replicón. Por la acción del complejo *Cas9*:gRNA ocurre el DSB en el sitio blanco y la posterior edición génica. LB: left border (borde izquierdo) del T-DNA. RB: right border (borde derecho) del T-DNA.

La aplicación de RGV en plantas como método de entrega y expresión de NSE se ha desarrollado

rápidamente y existen varios estudios que prueban el éxito de esta estrategia en otras especies, como tomate (*Solanum lycopersicum*) (Čermák, *et al.*, 2015) y papa (*Solanum tuberosum* L.) (Butler *et al.*, 2016). Ambos trabajos lograron la modificación específica tanto de genes reporteros como endógenos. En tomates se alcanzó una frecuencia de mutación de hasta 29% en el *locus ANT1* con el sistema CRISPR/Cas9 entregado en un vector T-DNA LSL (Čermák *et al.*, 2015).

A partir de estos estudios, se desprende que la principal ventaja de la entrega de CRISPR/Cas9 a células vegetales a través de vectores T-DNA derivados de BeYDV, en comparación con vectores T-DNA clásicos, es que no es necesaria la inserción en el genoma de la planta para que ocurra la expresión de los elementos de CRISPR (Čermák *et al.*, 2015), esto debido a que, por su estructura LSL, el replicón se escinde del T-DNA lo que crea múltiples copias de éste. Por consiguiente, se obtienen niveles elevados de expresión de Cas9 y gRNA sin la necesidad de transformaciones estables. Esta expresión transitoria de Cas9 también evita posibles efectos citotóxicos por la expresión constitutiva de la nucleasa (Sander y Joung 2014).

A pesar de su aplicación en varios cultivos, el sistema CRISPR/Cas9 no ha sido estudiado a la fecha en profundidad en plantas perennes o leñosas, a pesar de la importancia económica de estas especies. Recientemente, se publicó un estudio sobre la capacidad de CRISPR/Cas9 de introducir mutaciones dirigidas al gen que codifica la L-idonato deshidrogenasa, que controla la biosíntesis de ácido tartárico en vides, como blanco de Cas9 en *Vitis vinifera* cv. Chardonnay (Ren *et al.*, 2016). Estos resultados nos muestran la capacidad de este sistema para convertirse en una herramienta poderosa para la modificación génica en vides.

Otro resultado importante de este trabajo fue el análisis de los niveles de expresión tanto de *cas9* como de los gRNA en las células, mostrando que los niveles se relacionaban con la eficiencia de edición. Se observó que, de los dos gRNA que se diseñaron, sólo sgRNA1 logró alta frecuencia de mutación en suspensiones celulares (Ren *et al.*, 2016) y esto se relacionó con los niveles de expresión de ambos guías. Los niveles del transcrito de sgRNA1 fueron extremadamente altos, como también los niveles de expresión de *cas9*. Por el contrario, las células y plantas transformadas con sgRNA2 presentaban bajos niveles de expresión de estos elementos y, por tanto, baja frecuencia de mutación (Ren *et al.*, 2016).

Los antecedentes presentados permiten proponer que tanto la abundancia de Cas9 como de los RNA guías, son factores limitantes para la edición génica. En este contexto, la aplicación de la estrategia de vectores basados en BeYDV presenta una excelente forma de superar estas limitaciones y lograr mayores

frecuencias en la edición de especies vegetales que presentan mayores complejidades técnicas en su manipulación genética que lo observado en plantas modelo.

En este trabajo se decidió utilizar el gen *VvSWEET4* como blanco de edición, ya que se ha visto que mutantes de *A. thaliana* que poseen el gen *AtSWEET4* inactivado son menos susceptibles al hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* (Chong *et al.*, 2014). Su ortólogo en vides es el gen *VvSWEET4*, el que es fuertemente inducido luego de la inoculación de hojas con éste hongo y ésta expresión se correlaciona con la presencia de marcadores típicos de infección ante este patógeno (Chong *et al.*, 2014). Además, los resultados también han mostrado que la expresión de *VvSWEET4* es aumentada por factores de virulencia de *B. cinerea* (Chong *et al.*, 2014).

El objetivo de esta memoria fue demostrar que, es posible aumentar la eficiencia de edición en el gen *VvSWEET4*, aplicando el sistema CRISPR/Cas9 combinado con vectores T-DNA basados en geminivirus y que la tasa de modificación generada por este sistema es más alta en comparación con el uso de vectores T-DNA clásicos.

2 Hipótesis

Replicones basados en el genoma del virus del enanismo amarillo del poroto (BeYDV) aumentan la expresión de *cas9* del sistema CRISPR/Cas9, mejorando la eficiencia de edición génica del sistema CRISPR/Cas9 en *Vitis vinifera*.

3 Objetivo General

Demostrar que el uso del sistema CRISPR/Cas9 combinado con replicones basados en BeYDV permite el aumento en la expresión de *cas9*, mejorando la eficiencia de modificación del gen *VvSWEET4* de *Vitis vinifera* en comparación a la expresión del sistema CRISPR/Cas9 vía T-DNA.

4 Objetivos Específicos

1. Desarrollar un vector basado en BeYDV que contenga los elementos del sistema CRISPR/Cas9 aplicable en *V. vinifera*.
2. Determinar los niveles de transcrito de *cas9* en vides transformados con ambos sistemas de expresión.
3. Comparar la eficiencia de edición por CRISPR/Cas9 generada por replicones BeYDV y por vectores T-DNA clásicos en *Vitis vinifera*.

5 Materiales y Métodos

5.1 Material vegetal

Para los ensayos de agroinfiltración, se utilizaron plantas de *Vitis vinifera* L. variedad 'Thompson Seedless' provenientes de cultivo *in vitro* aclimatadas por un mes en cámara de cultivo bajo condiciones controladas (fotoperiodo 16h/8h, 25°C). Para la generación de líneas estables, se usaron embriones somáticos (ES) de *Vitis vinifera* L. variedad 'Thompson Seedless', obtenidos desde hojas apicales de plántulas micro-propagadas *in vitro* según Tapia *et al.* (2009).

5.2 Vectores

En este trabajo se utilizaron diferentes vectores que se resumen en la **Tabla 1**. Los vectores LSL corresponden a replicones derivados de BeYDV, mientras que los vectores T-DNA son no-replicantes.

TABLA 1. RESUMEN DE VECTORES UTILIZADOS.

Vector	Contenido	Mapa	Referencia
pTC223	Vector LSL con cassette Cas9 y gRNA contra ANT1 de <i>Solanum lycopersicum</i>	Figura Suplementaria 1	Čermák <i>et al.</i> 2015
pHSE401	Vector T-DNA con cassettes de expresión Cas9 y clonamiento de hasta 4 gRNA.	Figura Suplementaria 2	Xing <i>et al.</i> 2014
pGMV-Universal	Vector LSL con cassettes de expresión Cas9 y clonamiento de hasta 4 gRNA.	Figura 10B y Figura Suplementaria 3	Este trabajo
pHSE-SWEET4	Vector T-DNA con cassettes de expresión de Cas9 y pareja de gRNA contra <i>VvSWEET4</i> .	Figura Suplementaria 4	Este trabajo
pGMV-SWEET4	Vector LSL con cassettes de expresión de Cas9 y pareja de gRNA contra <i>VvSWEET4</i> .	Figura Suplementaria 5	Este trabajo

5.3 Construcción del vector basado en geminivirus universal

El vector pGMV-Universal fue construido a través del ensamblaje de los siguientes productos de PCR: el *cassette* de clonamiento de gRNA obtenido desde el vector pHSE401 (Xing *et al.* 2014, Addgene plasmid # 62201) y las secuencias nucleotídicas LIR y SIR de las proteínas Rep y Cas9 más el esqueleto de replicación en bacterias a partir del vector pTC223 (Čermák *et al.* 2015, Addgene plasmid # 70019) utilizando la reacción “Gibson assembly”(Gibson, 2011). Para ello, se diseñaron 4 fragmentos que se superponen entre sí, mediante el programa SnapGene (GSL Biotech; www.snapgene.com). Los partidores para amplificar estos fragmentos se resumen en la **Tabla 2**.

Para amplificar cada fragmento se empleó la DNA polimerasa *KAPAHIFI* (KAPA Biosystems, Ciudad del Cabo, Sudáfrica), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El perfil térmico utilizado fue de 95°C por 2 min; 30 ciclos a 98°C por 20 s, 67°C por 15 s, 72°C por 4 min con 30 s, y una extensión final a 72°C por 2 min. Los productos se purificaron mediante el sistema comercial de extracción desde gel de agarosa *Zymoclean gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, Irvine, CA, EE.UU.), según el protocolo del fabricante. Luego, se cuantificó cada fragmento por fluorescencia usando Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

Para el ensamblaje del vector, se utilizaron 100 ng de cada fragmento más el Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) y la reacción se incubó a 50°C por 60 min. El producto de la reacción fue clonado en bacterias *E. coli* Top 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), seleccionado con kanamicina 100 mg/L y secuenciados para confirmar la correcta síntesis (Macrogen, Seúl, Corea del Sur). Para su aplicación posterior, el vector se purificó utilizando el sistema comercial de extracción de plasmidio *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante.

TABLA 1. PARTIDORES PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PGMV-UNIVERSAL.

Partidor	Vector Original	Secuencia 5'-3'	Referencia
Vector.For	pTC223	CGCCTTACAACGGCTCTCCCCTGACGCCGTCC	Este trabajo
Vector.Rev	pTC223	TGCGGAAGGCAAGTCGAAGCCCATGGGTCCGTAC	Este trabajo
Fragmento1.For	pHSE401	CTCCGGTGACGGACCCATGGGCTTCGACTTGCCTTCCGC	Este trabajo
Fragmento1.Rev	pHSE401	TGACTTGAAGTACTCTCGGTCAAGCTTATTGGTTTATCTCATCGGAACTG	Este trabajo
Fragmento2.For	pTC223	GAGATAAACCAATAAGCTTGACCGAGTGTACTTCAAGTCAGTG	Este trabajo
Fragmento2.Rev	pTC223	GAGATAAACCAATAAGCTTGACCGAGTGTACTTCAAGTCAGTG	Este trabajo
Fragmento3.For	pTC223	GGCCCTGCAATGGCACTGGAACCCCAAGCCC	Este trabajo
Fragmento3.Rev	pTC223	TCAGTCCGGGACGGCGTCAGGGGAGAGCCGTT	Este trabajo

5.4 Diseño y clonamiento de RNA guías

La estrategia experimental para la edición del gen que codifica el transportador de glucosa *SWEET4* (VIT_14s0066g01420) de *Vitis vinifera* consistió en el diseño de dos gRNAs lo suficientemente distantes entre sí para eliminar un fragmento de aproximadamente 1428 pb.

El diseño de los gRNAs se realizó utilizando el programa CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>). Los criterios de selección de los guías diseñados fueron: la

ubicación de los gRNA (en exón o intrón), su puntaje de eficiencia en el blanco y su potencial de inespecificidad (“*off-target*”). Debido a que el genoma de referencia desarrollado por GENOSCOPE corresponde a *Vitis vinifera* L. variedad ‘Pinot Noir’ y el material vegetal presente en el laboratorio corresponde a *Vitis vinifera* L. variedad ‘Thompson Seedless’, se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias de *VvSWEET4* con el programa CLC genomics workbench (CLC bio, Aarhus, Dinamarca) y se identificaron los sitios de homología entre ambos en presencia de los gRNA. La pareja de gRNA escogida se clonó en el vector pGMV-Universal y el vector de expresión pHSE401 (como vector tradicional de transformación) de acuerdo al protocolo descrito por Xing *et al.* (2014), empleando la estrategia de clonamiento “*Golden Gate*” (Engler, Kandzia, y Marillonnet, 2008). Los vectores resultantes, pGMV-SWEET4 y pHSE-SWEET4, fueron transformados en *E. coli* Top 10 (Invitrogen) y seleccionados con kanamicina 100 mg/L. Se verificó la correcta inserción de los gRNAs mediante PCR usando perfil térmico: 95°C durante 3 min; 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 61°C durante 1 min y 72°C durante 30 s y una extensión 72°C durante 1 min. Los partidores usados fueron: SecGMV.for (TCAAAGTCCCACATCGCTTAGA) y SecGMV.rev (TGAAGTACTCGGTCAAGCT) en pGMV-SWEET4 y SecHSE.for (TCAAAGTCCCACATCGCTTAGA) y SecHSE.rev (CATGTTGACCTGCAGGCATG) en pHSE-SWEET4. Finalmente, los clones positivos fueron secuenciados (Macrogen Inc.). Los vectores se purificaron usando el sistema comercial *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research), según las instrucciones del fabricante.

5.5 Clonamiento en *Escherichia coli*

Para el clonamiento de vectores, se utilizó la cepa TOP10 de *Escherichia coli* quimiocompetente (Invitrogen) siguiendo las instrucciones para la transformación bacteriana recomendadas por el fabricante. Se utilizó medio LB como medio de crecimiento bacteriano, constituido por 1% triptona, 0,5% extracto de levadura y 1 % de NaCl (Bertani, 1951). Para los cultivos en medio sólido se usó LB suplementado con agar 15 g/L (Oxoid, Cheshire, Inglaterra). Para la selección del vector pGMV-Universal y pHSE401 el medio se suplementó con kanamicina 100 mg/L. Para la recuperación bacteriana se utilizó LB líquido. El crecimiento y recuperación de las bacterias transformadas se realizó a 37°C y con agitación constante a 200 rpm.

5.6 Transformación de *Rhizobium radiobacter*

Los vectores pGMV-SWEET4 y pHSE-SWEET4 fueron introducidos en *R. radiobacter* cepa EHA105 electrocompetente. Para ello, se transformó según el protocolo de electroporación de Dower *et al.*

(1988), con algunas modificaciones. Se utilizó un electroporador Genepulser II system (BioRad, Hercules, CA, EEUU) con cubetas de 1x1 (BioRad) y los siguientes parámetros de electroporación: 1,25 kV, 25 μ FD y 400 Ω . La recuperación de las células se realizó agregando 900 μ L de medio YEB constituido por extracto de levadura 1g/L, sulfato de magnesio 0,1 g/L, sacarosa 5g/L, peptona de caseína 5 g/L, peptona de carne 5 g/L y agar 10 g/L (Sambrook *et al.*, 1989) con agitación constante a 200 rpm por 4 horas a 28°C. Luego, se sembraron 150 μ L de la suspensión bacteriana en placas de medio LB-agar (1,5%) suplementadas con kanamicina 100 mg/L y se cultivaron en oscuridad a 25°C durante tres días.

5.7 Preparación de *R. radiobacter* para transformación de vides

Para la transformación de plantas, tanto para la agroinfiltración como para la transformación estable, se prepararon inóculos *R. radiobacter* de cada clon bacteriano transformado con el vector requerido en 5 mL de medio LB líquido suplementado con el respectivo antibiótico de selección. Este inóculo se incubó durante 16 h a 28°C con agitación a 180 rpm. Luego, las suspensiones fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min y el sedimento re-suspendido en diferentes medios dependiendo de su posterior aplicación. Los cultivos adicionalmente se suplementaron con acetosiringona 100 μ M y se incubaron durante 2 h a 25°C con agitación a 180 rpm.

5.8 Agroinfiltración de *Vitis vinifera*

Con el fin de confirmar la capacidad de los gRNA diseñados de propiciar la edición esperada en vides, previo a una transformación estable, se llevó a cabo una transformación transitoria en plantas de vid. Para ello, se llevó a cabo el protocolo descrito por Zottini *et al.* (2008) con algunas modificaciones. El medio de infiltración contenía 50 mM MES pH 5.6, 2 mM Na₃PO₄, 0.5% glucosa y 100 μ M acetosiringona. Con éste, se ajustó la concentración de las suspensiones a una OD₆₀₀ de 0,2 y se incubó en oscuridad durante 2 h a 25°C con agitación suave. Para los experimentos de infiltración se usaron plantas aclimatadas por un mes, seleccionándose hojas jóvenes de 2/3 del tamaño de una hoja adulta. La agroinfiltración se realizó por presión con la suspensión bacteriana contenida en jeringas de 3 ml sin aguja en la cara abaxial de la hoja. Se realizaron múltiples infiltraciones por hoja (~15 infiltraciones/hoja). Posteriormente, las plantas fueron trasladadas nuevamente a la cámara de cultivo bajo condiciones estándar de crecimiento. Las muestras (2 hojas por vector) para extracción de DNA genómico se recolectaron a los 10 y 14 días post infiltración (dpi) y se almacenaron a -20°C para su posterior procesamiento.

5.9 Transformación estable de *Vitis vinifera*

La transformación genética de *Vitis vinifera* L. 'Thompson Seedless' se realizó según el protocolo descrito por Li *et al.* (2008). Inicialmente, los ES se precultivaron por 7 días en medio DM. Para la etapa de transformación, los ES fueron incubados en una suspensión de 40 mL de *R. radiobacter* previamente transformado, diluido en medio DM durante 10 min y luego se co-cultivaron en DM sólido durante 48 h en oscuridad. Luego, se procedió a lavar y traspasar los ES a medio DMcc (medio DM, suplementado con cefotaxime y carbenicilina, 200 mg/L cada uno). Los ES transformados con pHSE-SWEET4 y pHSE-401 fueron seleccionados por 21 días en higromicina 3 mg/L. Los ES transformados con pGMV-SWEET4 y pGMV-Universal se mantuvieron en medio DMcc sin antibiótico de selección. Se tomaron muestras de ~50 mg desde cada experimento de transformación a los 7, 14 y 21 dpi y se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento.

5.10 Extracción de DNA genómico

Se realizó la extracción de DNA genómico de acuerdo al protocolo de Steenkamp *et al.* (1994). La integridad del DNA se verificó mediante la visualización del DNA en gel de agarosa al 1,5%. Posteriormente, el DNA se cuantificó usando el sistema comercial dsDNA BR Assay Kit para Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

5.11 Identificación de edición en *Vitis vinifera* por PCR

La detección de los eventos de edición se llevó a cabo mediante PCR convencional utilizando partidores diseñados fuera de los sitios de corte de la pareja de gRNA, con el fin de detectar diferencias de tamaño del amplicón al ocurrir la edición.

La reacción de PCR se realizó con los siguientes componentes: 12,5 ng de DNA genómico, KAPA Taq Buffer A 1X, dNTPs 0,2 mM, 0,5 U de Kapa Taq DNA Polimerasa (KAPA Biosystems) y 0,4 µM de los partidores Sweet4.F (TCACGGTCTGTTTTTCGTTCT) y Sweet4.R (CCAACCAAGCCGTATCCCAT) en embriones somáticos y Sweet4.F2 (CACGGTCTGTTTTTCGTTCTTG) y Sweet4.R2 (GGCAAAGCACACCTATTACCT) en hojas infiltradas, en un volumen final de 20 µL. El perfil térmico para la amplificación del fragmento de edición fue: 95°C durante 3 min; 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 61°C durante 30 s y 72°C durante 30 s; y una extensión a 72°C durante 1 min. El perfil térmico para la amplificación del fragmento no editado fue: 95°C durante 3 min; 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 61°C durante 30 s y 72°C durante 1 min 45 s; y la extensión final a 72°C durante 2 min.

El producto de PCR fue visualizado en el equipo de electroforesis capilar *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical Technologies, EE.UU.) usando *dsDNA 915 Reagent Kit* (Advanced Analytical Technologies, Ankeny, IA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

5.12 PCR de genes de referencia

Con el objetivo de determinar la eficiencia de la edición del gen *VvSWEET4*, se realizó la amplificación mediante PCR del gen de referencia Ubiquitina1 (*VvUbi1*, VIT_16s0098g01190). Las condiciones de reacción utilizadas fueron: *KAPA Taq Buffer A* 1X, dNTPs 0,2 mM, 0,5 U de *Kapa Taq* DNA Polimerasa (KAPA Biosystems) y 0,4 μ M de los partidores *Ubi1.for* (GCCGCACTCTTGCTGATT) y *Ubi1.rev* (GATGGCTCAATAATACCACCAC). El programa térmico para la amplificación del gen fue: 95°C durante 3 min; 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 30 s y una extensión final a 72°C durante 1 min. El producto de PCR fue visualizado en el equipo de electroforesis capilar *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical Technologies) usando *dsDNA 915 Reagent Kit* (Advanced Analytical Technologies) según las instrucciones del fabricante.

5.13 Determinación de eficiencia de edición en *Vitis vinifera*

Los datos obtenidos desde la electroforesis capilar fueron analizados con el programa *PROSize*® 2.0 (Advanced Analytical Technologies) para establecer las concentraciones de cada producto de PCR, tanto del gen editado *VvSWEET4* como del gen de referencia *VvUbi1*. Se determinó la frecuencia de mutación, que corresponde a la eficiencia de edición, aplicando la fórmula detallada a continuación:

$$\text{Frecuencia de mutación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ mol. de fragmento PCR Editado}}{\text{N}^\circ \text{ mol. de fragmento PCR Ubi1}}$$

El número de moléculas presentes en la muestra editada se calculó usando el número de Avogadro, la concentración en ng/ μ L y el largo en pares de bases de cada amplicón. La determinación fue relativa al gen *VvUbi1* en una muestra WT (ES sin transformar).

5.14 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Para el análisis de la expresión génica a nivel transcripcional, se tomaron ~40 mg (peso fresco) de ES transformados. El RNA fue extraído y purificado usando una modificación del sistema *PureLink*® Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific). Se molieron los ES utilizando esferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (Biospec, Bartlesville, OK, EE.UU.). Luego, se añadió 250 μ L de *PureLink*® Plant RNA Reagent frío (4°C) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente (T° amb). Luego, se procedió a centrifugar a

12.000 x g por 2 min a T° amb. Al sobrenadante recuperado se le añadieron 50 µL de NaCl 5M y 150 µL de cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania) frío (4°C). Se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, donde se añadió 1 volumen de alcohol isopropílico (Merck, Alemania), el cual se incubó durante 10 min a T° amb. Se realizó una nueva ronda de centrifugación a 12.000 x g por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 500 µL de etanol 75% frío.

Este paso se repitió dos veces. Finalmente, se resuspendió el RNA en 20 µL de H₂O libre de nucleasas con 1 µL de RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y se almacenó a -80°C.

La integridad del RNA se comprobó en el equipo de electroforesis capilar *Fragment Analyzer* usando los kits *High Sensitivity RNA Analysis Kit* y *Standard Sensitivity RNA Analysis Kit* (Advanced Analytical Technologies). La concentración del RNA se determinó con *Qubit RNA HS Assay Kit* en Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific). El RNA purificado fue tratado con DNasa RQ1 (Promega) según las instrucciones del fabricante previo a su uso en la síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA purificado usando el sistema *GoScript Reverse Transcription* (Promega) de acuerdo al protocolo del fabricante, utilizando oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/mL, Promega) como partidador. Finalmente, se agregó 1 µL de RNasa H (New England Biolabs) y se incubó a 37°C por 20 min. La concentración del cDNA se determinó con el kit *Qubit ssDNA Assay Kit* en Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

5.15 RT-PCR

La determinación de los niveles de expresión de *cas9* en ES transformados con pGMV-SWEET4 y pHSE-SWEET4 se llevó a cabo mediante un PCR sobre el cDNA obtenido desde las muestras. Para esto, a partir de 10 ng de cDNA se amplificó un fragmento de *cas9* usando los partidores detallados en la **Tabla 3**. Las condiciones de reacción fueron: *KAPA Taq Buffer A* 1X, dNTPs 0,2 mM, 0,5 U de *Kapa Taq DNA Polymerase* (KAPA Biosystems) y 0,4 µM de los partidores. El perfil térmico para la amplificación fue: 95°C durante 3 min; 40 ciclos de 95°C durante 30 s, 63°C durante 30 s y 72°C durante 30 s; 72°C durante 1 min. El PCR fue detenido a los 30, 35 y 40 ciclos para distinguir los niveles de expresión.

Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Cada gel se fotografió usando una cámara Canon EOS Rebel T6. Para estimar la concentración de DNA las bandas correspondientes al mRNA de *cas9* se usó un estándar de peso molecular *Kapa Universal DNA Ladder* (KAPA Biosystems) donde la concentración de DNA de cada banda está determinada por el fabricante.

La intensidad de las bandas presentes se estimó con el programa ImageJ, según Antiabong *et al.*, 2016. Al comparar la intensidad de una banda del marcador molecular con la banda de interés, se estima la concentración de esta. Se normalizó la concentración de *cas9* usando EF1 α (VIT_06s0004g03220).

TABLA 2 PARTIDORES USADOS EN RT-PCR DE *CAS9*.

	Partidor Foward (5'-3')	Partidor Reverse (5'-3')
GMV-<i>cas9</i>	CTCATCTACCTCGCTCTCGC	GCCTTAGCATCCACACCTGA
HSE-<i>cas9</i>	CGAGCAGCACAAGCATTAC	CGTCAGGGTGAAGAGATGAA
EF1α	GAACTGGGTGCTTGATAGGC	AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA

5.16 Análisis estadístico

Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres replicas técnicas con su desviación estándar y se analizaron con el programa GraphPad PRISM® v7 aplicando el análisis de significancia t-test no pareado.

6 Resultados

6.1 Diseño y Construcción de vector GMV-universal

La replicación de BeYDV requiere de tres elementos: la secuencias LIR y SIR y la proteína de replicación Rep. Al ubicar dos secuencias LIR en los extremos se genera que una construcción lineal sea circularizada por la unión de las secuencias LIR por parte de la proteína viral Rep, formando replicones. Esto permite la creación de vectores con la estructura “LSL”. Dado que al utilizar la estrategia de virus desarmados se elimina la capacidad de movimiento célula-célula e ingreso a la célula del virus, se usó *R. radiobacter* para dirigir entregar la construcción al núcleo celular vegetal.

Con esta información se diseñó un vector con la orientación LSL que contuviera dentro del replicón el *cassette* de expresión para Cas9 y un *cassette* de clonamiento de hasta cuatro gRNA en un esqueleto de T-DNA de *R. radiobacter* (**Figura 6B y Figura Suplementaria 3**).

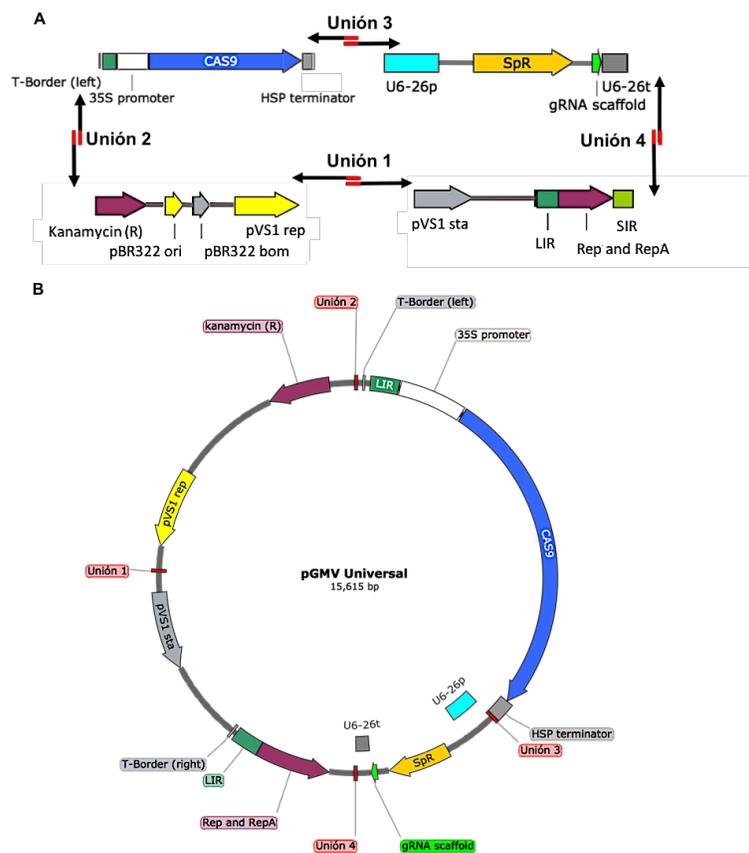


FIGURA 6: Ensamblaje del vector pGMV-Universal. (A) La estrategia de síntesis se basó en la unión de fragmentos amplificados con partidores complementarios entre ellos. Los principales componentes del vector pGMV Universal son el *cassette* de expresión de *cas9* (unión 2 a unión 3), el *cassette* de clonamiento para gRNAs (unión 3 a unión 4), ambas secuencias LIR y la secuencia codificante para Rep (unión 1 a unión 4). Además, los componentes para expresión en plantas basados en un vector binario T-DNA fueron incluidos (unión 1 a unión 4 y unión 1 a unión 2) (B) Mapa de vector pGMV-Universal final.

Según la estrategia de síntesis, se dividió el vector en cuatro fragmentos de entre 2,5 a 4 kb que fueron unidos mediante Gibson Assembly (**Figura 6A**). Los sitios de unión fueron secuenciados usando partidores que los flanquean, para confirmar el correcto ensamblaje (**Figura 7 y Figura Suplementaria 3**). En todos los casos, la secuenciación mostró el correcto armado del vector pGMV-Universal con respecto al diseño realizado. Las zonas de unión corresponden a 40 pb de complementariedad, donde no se observó ninguna variación en la secuencia nucleotídica entre el vector diseñado *in silico* y el sintetizado.

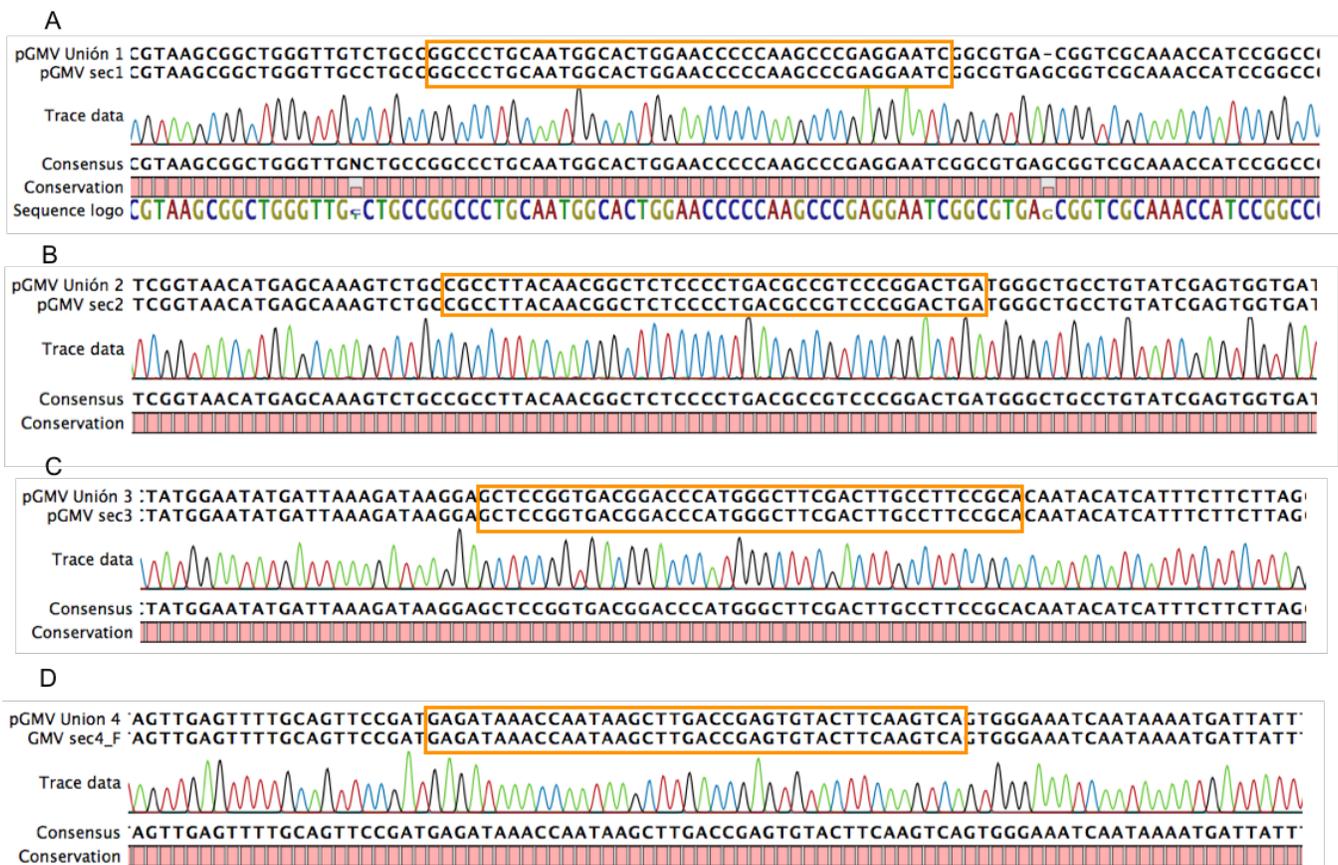


FIGURA 7: Alineamiento de zonas de unión de vector pGMV-Universal. Para la síntesis del vector pGMV-Universal, se diseñaron cuatro fragmentos con los componentes deseados. Cada recuadro anaranjado destaca los 40 pb donde ocurrió la unión de los fragmentos. La secuencia superior corresponde al vector diseñado *in silico* y la secuencia inferior a la obtenida mediante Gibson Assembly. (A) Alineamiento de la Unión 1, (B) Alineamiento de la Unión 2 (C) Alineamiento de la Unión 3, (D) Alineamiento de la Unión 4.

6.2 Diseño y clonamiento RNA guía

El genoma de referencia para *Vitis vinifera* corresponde al obtenido desde la variedad 'Pinot Noir' por lo que al utilizar como modelo biológico *V. vinifera* cv. 'Thompson Seedless' fue necesario comprobar el nivel de conservación entre las secuencias de *VvSWEET4* para ambos cultivares. En las regiones con 100%

de conservación se decidió diseñar los gRNA para producir la inactivación del gen de interés. Para esto se diseñó una pareja de gRNA. El primer gRNA se localizó en el exón 1 (**Figura 8A**), el segundo gRNA se localizó en el intrón 3 (**Figura 8B**) del gen *VvSWEET4*.

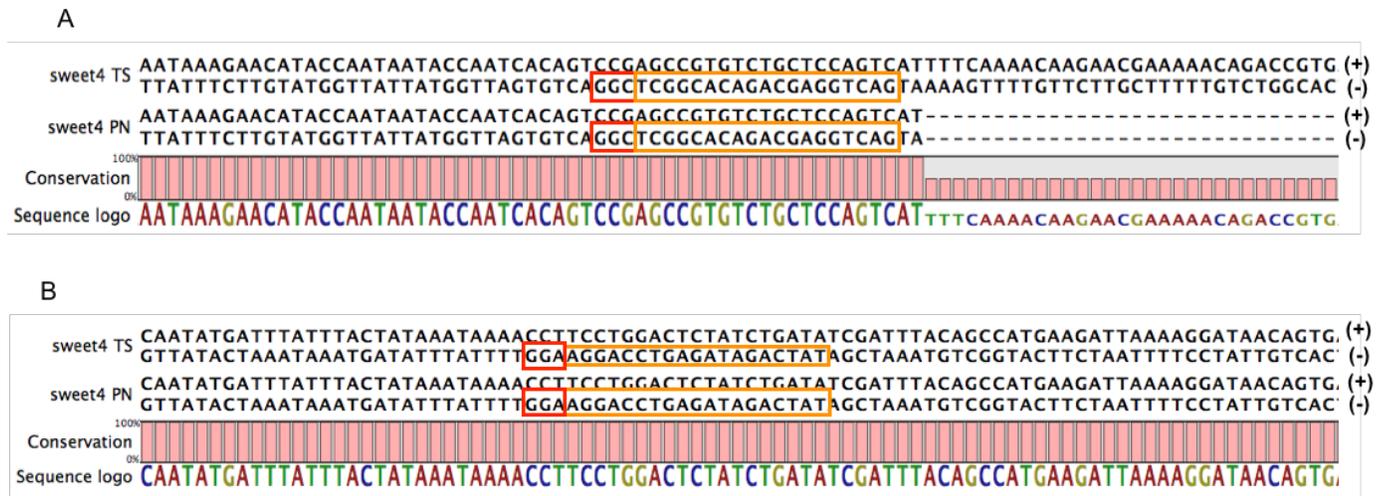


FIGURA 8: Secuencia comparativa para gRNA en ‘Thompson Seedless’ y ‘Pinot Noir’. Se muestra el alineamiento de las regiones donde se diseñaron los gRNA en el gen *VvSWEET4* de los cultivares de *V. vinifera* ‘Thompson Seedless’ (TS) y ‘Pinot Noir’ (PN). El recuadro rojo corresponde a las secuencias PAM de ambos gRNA y el recuadro anaranjado a las 19 pb blanco del gRNA. **(A)** Zona de alineamiento con gRNA1. **(B)** Zona de alineamiento con gRNA2. Se muestran la hebra positiva (+) y negativa (-).

Una vez diseñados los gRNA, se procedió a clonarlos en el vector pGMV-Universal con la técnica Golden Gate. Utilizando la enzima de restricción tipo IIS *BsaI*, se logró insertar las secuencias de los dos gRNA en la orientación adecuada en el *cassette* de clonamiento (**Figura 9A**). Este procedimiento se llevó a cabo además con el vector pHSE401. Posteriormente, se confirmó la construcción de cada uno de los vectores finales. Los resultados de secuenciación muestran, en ambos casos, la correcta inserción del fragmento que contiene ambos gRNA (**Figura 9B y Figura Suplementaria 6**).

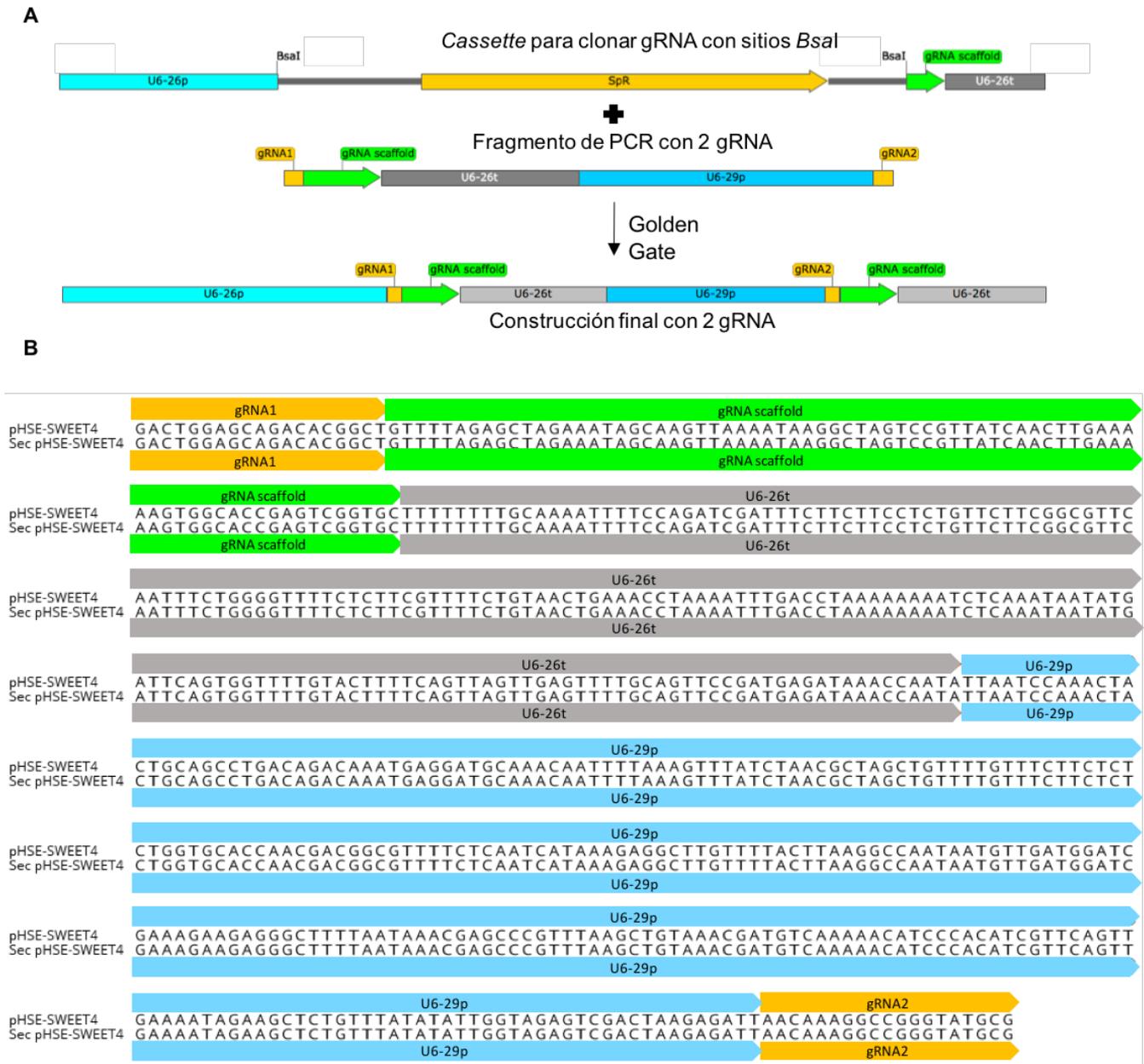


FIGURA 9: Clonamiento de gRNAs en vector pGMV-Universal. (A) Estrategia de clonamiento de gRNAs en vector pGMV-Universal. El cassette de clonamiento y un producto de PCR con los gRNA a clonar son cortados con la enzima *BsaI* y ligados mediante Golden Gate (B) Alineamiento de secuencia de pGMV-SWEET4 predicha con el resultado de secuenciación de plasmidio pGMV-SWEET4, que proviene de un clon de *E. coli* positivo para la inserción de los gRNAs. U6-26p promotor U6 de *A. thaliana*. U6-26t terminador U6 de *A. thaliana*. U6-29p promotor U9 de *A. thaliana*.

6.3 Edición de *Vvsweet4* en *Vitis vinifera*

6.3.1 Expresión transitoria y evaluación de RNA guía

Debido a la complejidad intrínseca en el proceso de transformación estable de embriones somáticos de vides, se decidió evaluar previamente la capacidad de producir la edición del complejo Cas9:gRNA en un sistema transitorio vía agroinfiltración de hojas de plantas de vid aclimatadas.

Se recolectaron muestras de hojas agroinfiltradas (HA) a los 10 y 14 dpi y se utilizó PCR para detectar en DNA genómico la edición de *VvSWEET4*. La reacción generó dos productos de amplificación diferentes: el correspondiente al gen no editado (o *wild type*) de ~1623 pb y un amplicón de ~214 pb en el caso de ocurrir la edición. Esta banda se puede observar en muestras de HA en ambos tiempos y tanto con el pGMV-SWEET4 (**Figura 10A**) como con el vector pHSE-SWEET4 (**Figura Suplementaria 7**).

Con el fin de comprobar la ocurrencia de la edición, se secuenciaron las bandas de 214 pb. Los análisis mostraron la pérdida del fragmento de ~1428 pb esperado junto con *indels* en ambos sitios de corte (**Figura 10B**).

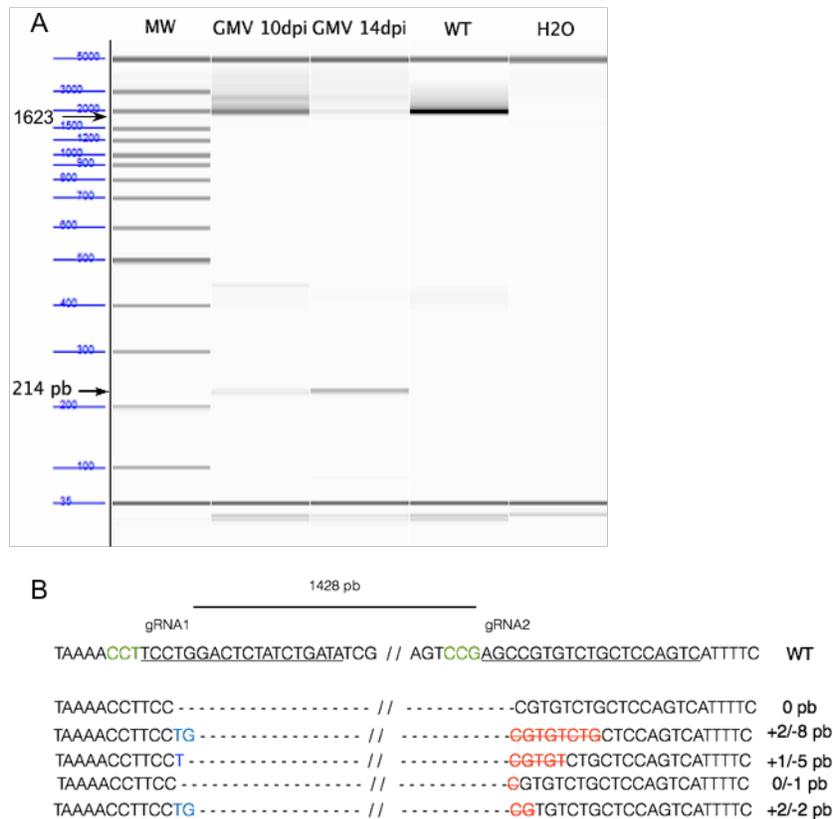


FIGURA 10: Análisis de edición en VvSWEET4 de hojas agroinfiltradas de *Vitis vinifera*. (A) Detección de edición mediante PCR. La zona blanco fue amplificada a partir de DNA genómico de HA con el vector pGMV-SWEET4 y WT y luego resueltos por electroforesis capilar. El fragmento de 214 pb correspondiente a la edición se puede observar en todas las muestras. WT, HA no transformados. H₂O, control sin templado. (B) Secuencias representativas de los eventos de edición en HA transformadas con pGMV-SWEET4. Se observan inserciones (azul) y deleciones (rojo) en los sitios de corte de cada gRNA, como también reparación precisa en el sitio de corte del gRNA1 y gRNA2.

6.3.2 Edición génica en embriones somáticos de *Vitis vinifera*.

Para obtener plantas completas de vid que posean modificaciones genéticas, el método utilizado fue la transformación de embriones somáticos de este cultivar con *R. radiobacter*. Luego de la transformación, los ES son regenerados y se obtienen plantas con la modificación deseada. Cualquier modificación que ocurra en la etapa de ES se debería mantener luego de la regeneración. De acuerdo a lo anterior, y con el fin de determinar la edición génica en estadíos tempranos, se decidió tomar muestras de embriones transformados previo al paso de regeneración.

Para la detección de la edición, se usó la estrategia de PCR que produce dos amplicones de distinto tamaño, donde el correspondiente a *VvSWEET4* editado es de ~120 pb. De acuerdo a los antecedentes (Baltes et al., 2014), se esperaba que a partir de 5 dpi ya fuera posible detectar la edición mediada por Cas9:gRNA expresado desde el vector pGMV-SWEET4, por lo que se tomaron muestras a 7, 14 y 21 dpi (**Figura 11A**). El mismo proceso se realizó con los ES transformados con el vector pHSE-SWEET4.

En todos los casos fue posible detectar la banda correspondiente al gen editado, como también la banda de ~1.528 correspondiente al gen *wild type*. La especificidad de la banda editada se pudo comprobar por que no se encontró presente en una muestra de ES no transformados (**Figura 11A**).

Los resultados de secuenciación nuevamente demostraron que el fragmento que debe ser escindido entre los sitios de corte de ambos gRNA en *VvSWEET4* no se encontró presente tanto en las muestras obtenidas de ES transformados con pGMV-SWEET4 como con pHSE-SWEET4. Además, se evidenció la presencia de *indels* en las zonas de corte de ambos gRNAs diseñados (**Figura 11B y 11C**).

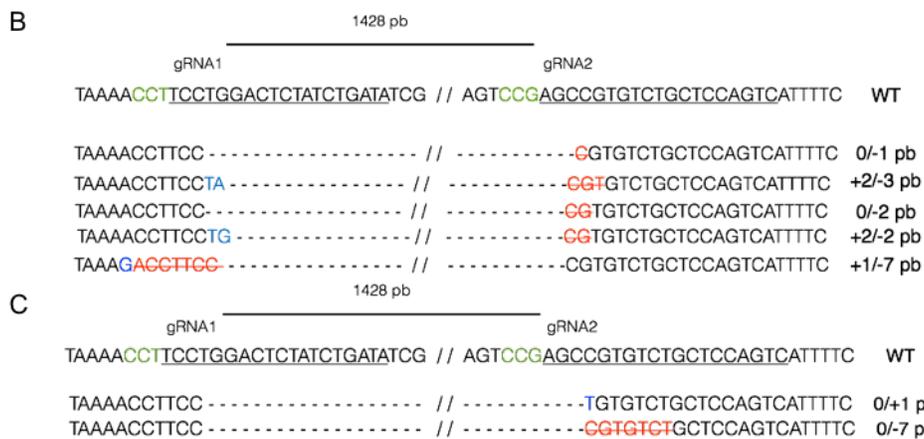
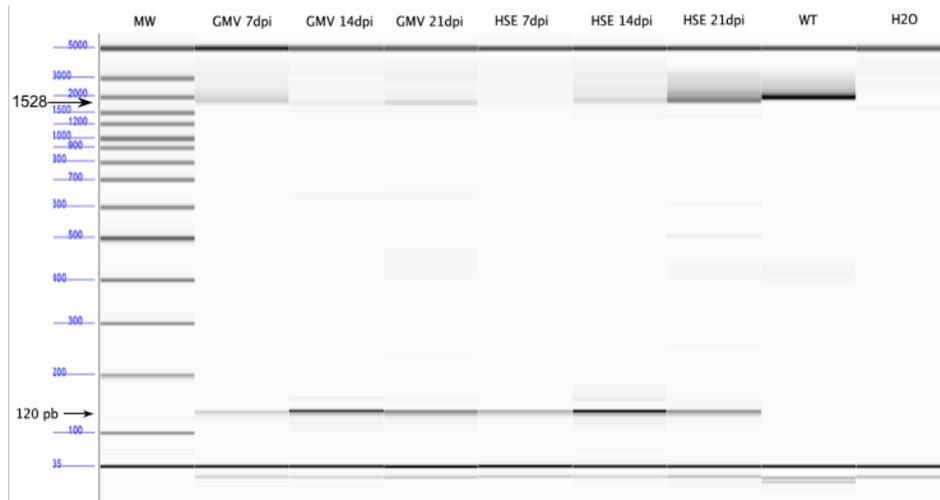


FIGURA 11: Análisis de edición en *VvSWEET4* de embriones somáticos de *Vitis vinifera*. (A) Detección de edición mediante PCR. La zona blanco fue amplificada por PCR a partir de DNA genómico de ES transformados con el vector pGMV-SWEET4 o pHSE-SWEET4 y Es sin transformar (WT) y luego resueltos por electroforesis capilar. El fragmento de 120 pb correspondiente a la edición se puede observar en todas las muestras a partir de los 7 dpi. WT, ES no transformados. H₂O, control sin templado. (B) y (C) Secuencias representativas de los eventos de edición en ES transformados con pGMV-SWEET4 (B) y pHSE-SWEET4 (C). En ambos se puede observar la pérdida de ~1428 pb ubicados entre los gRNA diseñados, como también inserciones (azul) y deleciones (rojo) en los sitios de corte de cada gRNA. También se observa reparación precisa en el sitio de corte del gRNA1 y gRNA2.

6.4 Expresión de *cas9* en embriones somáticos de *Vitis vinifera*

Los altos niveles de replicación de los vectores basados en geminivirus (Baltes *et al.*, 2014) permiten pensar que los niveles de mRNA de *cas9* expresados desde pGMV-SWEET4 también deberían ser altos y que esta alza promovería una mejora en la eficiencia de edición.

Para determinar la expresión de *cas9* se realizó un RT-PCR sobre cDNA obtenido desde ES transformados con pGMV-SWEET4 y pHSE-SWEET4 en muestras obtenidas a los 14 dpi (G14 y H14) y 21 dpi (G21 y H21). Los resultados mostraron que, aparentemente, habría una menor cantidad de mRNA de *cas9* en los ES transformados con pGMV-SWEET4 en comparación con los ES transformados con pHSE-SWEET4. Esto se observó una diferencia significativa en la concentración de producto de PCR entre H14 y G14 y entre H21 y G21, respectivamente, a los 35 ciclos (**Figura 12A**) y 40 ciclos (**Figura 12B**) de amplificación.

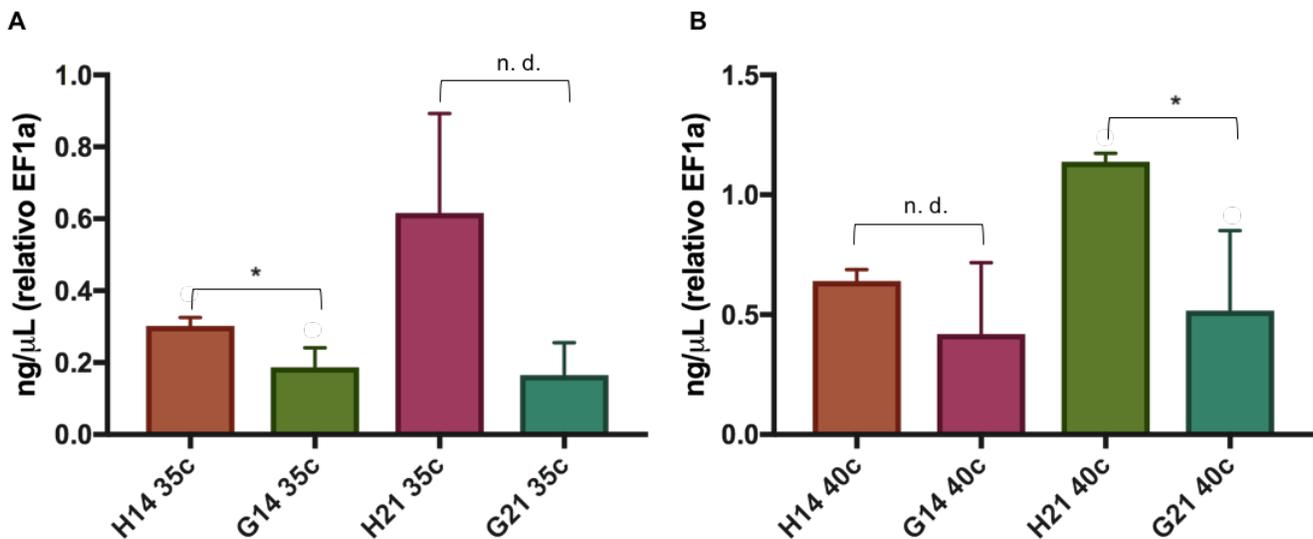


FIGURA 12: Análisis de RT-PCR de *cas9*. Expresión transcripcional relativa de *cas9* en ES transformados con pGMV-SWEET4 y pHSE-SWEET4 en muestras obtenidas a los 14 dpi (G14 y H14) y 21 dpi (G21 y H21). La reacción se detuvo a los 35c (A) y 40c (B). Los datos corresponden al promedio de tres réplicas técnicas con la SD. * representa diferencia significativa determinada con t-test ($p < 0,05$). n.d. representa que no existe diferencia significativa con t-test.

6.5 Eficiencia de edición en embriones somáticos de *Vitis vinifera*

La aplicación de replicones basados en geminivirus para aumentar la eficiencia de edición génica se debe a dos factores principales. El primero es el alto número de copias que logran en el núcleo de la planta, lo que permite tener mayor disponibilidad de los componentes del sistema CRISPR/Cas9, la nucleasa Cas9 y los gRNA. El segundo factor es la capacidad de la proteína viral Rep de interferir con el ciclo celular de las células vegetales (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

Es por esto que se evaluó la eficiencia de edición en ES transformados con pGMV-SWEET4 y con pHSE-SWEET4, un vector T-DNA no replicante. Para esto, se determinó el número de copias del gen *VvSWEET4* editado relativo al número de copias del gen de referencia *VvUbi1*. Esto corresponde a la eficiencia con que el complejo Cas9:gRNA produce la edición en el gen de interés (**Figura 13**).

Al comparar los resultados obtenidos con ambos sistemas, se observó una tendencia a una mayor eficiencia de edición por parte del vector basado en geminivirus, pGMV-SWEET4, con respecto al vector T-DNA clásico, pHSE-SWEET4 (**Figura 13**).

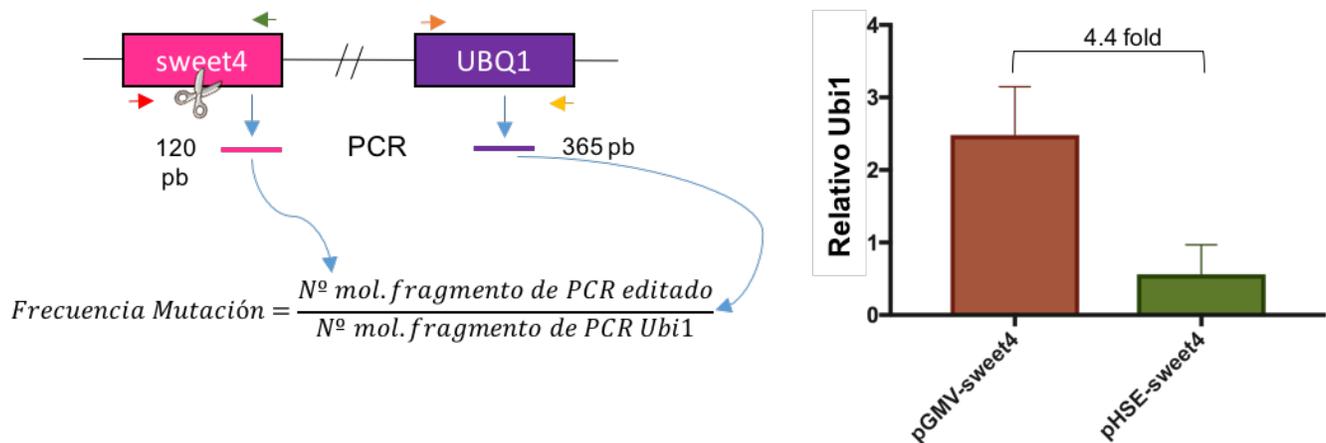


Figura 13: Eficiencia de edición de *VvSWEET4* en ES de *Vitis vinifera*. Número de moléculas del gen *VvSWEET4* editado con respecto al número de moléculas de *VvUbi1* en embriones somáticos transformados con pGMV-SWEET4 y pHSE-SWEET4. Los datos corresponden al promedio de tres réplicas técnicas con la SD.

7 Discusión

7.1 Construcción de un vector basado en geminivirus para edición génica en *Vitis vinifera*

7.1.1 Diseño y construcción del vector

Dentro de las estrategias virales de las que se hacen uso en ingeniería genética, se ha descrito la aplicación de forma exitosa de vectores derivados de BeYDV en *A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *S. tuberosum* (Baltes *et al.*, 2014; Butler *et al.*, 2016; Čermák *et al.*, 2015). En el presente trabajo se generó un vector que, basado en esta información, fuera de carácter más general respecto de su uso en plantas, siendo un vector que mezcla la capacidad de replicación del geminivirus BeYDV con los componentes del sistema CRISPR/Cas9 (**Figura 6**), cuya capacidad fue evaluada a través de la aplicación en la edición génica de vides. La estrategia de síntesis se basó en el uso de la tecnología Gibson Assembly, en la que luego de optimizar el diseño de partidores y el tamaño de los fragmentos, permitió la unión perfecta de éstos, creando el vector pGMV-Universal (**Figura 7**). Este resultado posibilita proyectar la estrategia de clonamiento y síntesis a través del uso de Gibson Assembly para continuar desarrollando vectores basados en replicones que permitan mejorar la expresión de los componentes de otros sistemas de manipulación genética en plantas, como vectores cisgénicos, microRNAs artificiales o nuevos tipos de nucleasas Cas.

7.1.2 Consideraciones para la funcionalidad de la edición: gRNAs

Existen varios factores que afectan la capacidad del complejo Cas9:gRNA de generar cortes en el DNA (Wu *et al.*, 2014) y, con ello, lograr eventos exitosos de edición génica. Uno de los primeros factores relevantes es la secuencia de los gRNA y de su región semilla (i.e. las 10-12 bases más próximas a la PAM). Esta zona ha demostrado ser fundamental en el apareamiento/reconocimiento del gRNA y su secuencia blanco, influyendo así directamente en la actividad Cas9 (Wu *et al.*, 2014). Por esta razón, al diseñar los gRNA se debe considerar las posibles diferencias de secuencia entre el genoma de referencia utilizado para el diseño de esta estructura y el genoma del clon o variedad en el que se trabaja. En el caso de *Vitis vinifera*, fue necesario identificar zonas de homología entre el genoma de referencia 'Pinot Noir' y nuestra variedad de trabajo 'Thompson Seedless'. El alineamiento entre las secuencias del gen *VvSWEET4* en ambas variedades mostró zonas donde existía 100% de conservación y, por lo tanto, era posible diseñar gRNAs promisorios (**Figura 7**). Además, fue necesario determinar que el PAM estuviera presente en la secuencia blanco, ya que dicho motivo es un requerimiento estricto para la identificación del sitio de corte por parte de Cas9 (Jinek *et al.*, 2012).

El uso principal que se da a la edición génica mediada por CRISPR/Cas9 es generar un cambio en el marco de lectura, así se impide la transcripción y traducción completa logrando la inactivación del gen blanco (Newman y Ausubel 2016). Mientras el grado de edición de la secuencia blanco puede ser variable, se obtendrían mejores resultados en este sentido a través de deleciones de segmentos de mayor tamaño en ésta. Dado que la reparación del corte de doble hebra (vía NHEJ) no es siempre precisa y conlleva generalmente a la generación de *indels* en el sitio, varios estudios han demostrado que las reparaciones imprecisas ocurren con suficiente frecuencia para ser utilizadas en edición génica (Voytas, 2013).

En líneas generales, el uso de un sólo gRNA posee este tipo de desventajas; solo 2/3 de los *indels* resultan en un cambio de marco de lectura y, además, estas mutaciones pueden escapar al mecanismo de regulación de degradación de mRNA y producir proteínas truncadas o, por *splicing* alternativo, pueden resultar isoformas que compensen e incluso cambien la función del gen (Canver *et al.*, 2017). Como solución a esta desventaja, nuestro trabajo planteó el uso de una pareja de gRNAs, la que generó una deleción de un fragmento de ~1.428 pb (**Figura 10 y 11**) del gen; con esto se buscó lograr una efectiva inactivación del transportador de glucosa SWEET4. Aplicando esta estrategia se eliminaron tres de los seis exones originales, lo que debería evitar la transcripción regular del gen y, por lo tanto, la traducción del transportador.

El uso de parejas de gRNA también podría permitir generar deleciones en porciones no-codificantes del genoma, lo que expande la aplicación de CRISPR/Cas9 a la edición de elementos regulatorios o de RNAs no codificantes (Vidigal y Ventura, 2015).

7.2 Edición génica en *Vitis vinifera*

Un resultado relevante de este trabajo fue la implementación de un sistema de análisis rápido para la verificación de la funcionalidad de los editores diseñados. La estrategia de agroinfiltración de hojas de vid permitió confirmar de forma funcional la efectividad de los gRNA diseñados antes de realizar experimentos de mayor plazo temporal. Al utilizar transformación estable de ES debemos generar un balance entre evaluar la funcionalidad del sistema de edición de forma temprana *versus* destruir al individuo editado. La deleción esperada fue detectada a los 10 días post agroinfiltración de hojas (**Figura 10**) y para realizar éste experimento fue necesario utilizar sólo dos hojas. Es necesario indicar que la generación de individuos estables (transgénicos o editados) a través de ES requiere al menos 6 meses.

Hasta la fecha existen 4 trabajos que aplican CRISPR/Cas9 para producir mutaciones en distintos genes de vid, pero ninguno de éstos propone mejoras en el sistema. El presente trabajo es el primero en demostrar la factibilidad de usar replicones basados en geminivirus asociados a CRISPR/Cas9 para producir edición génica y aumentar la eficiencia de ésta en *Vitis vinifera*.

La transformación estable de ES con *R. radiobacter* permitió lograr la edición del gen *VvSWEET4*. Usando tanto el vector pGMV-SWEET4 como el vector pHSE-SWEET4 fue posible detectar la disminución de tamaño esperada en la amplificación del gen en todas las muestras analizadas. Sin embargo, también fue posible detectar la amplificación del gen no editado. La persistencia de éste se explicaría por la presencia de células que no fueron transformadas en las que, por tanto, no pudo ocurrir la edición del gen blanco. Este continúa siendo un factor limitante de la transferencia génica mediada por *R. radiobacter* en vides a través del uso de ES.

Los resultados de secuenciación del gen *VvSWEET4* editado mostraron interesantes eventos de reparación en los sitios de corte, donde existe un predominio de deleciones de varias bases, inserción de una o dos bases, como también algunos eventos de reparación precisa (**Figura 11**). Con el uso de la estrategia de gRNAs pareados, la deleción de 1.428 pb era el evento que se deseaba obtener, ya que del gen *VvSWEET4* de un tamaño de 2.151 pb se eliminó más de la mitad de la secuencia génica. Esto demuestra que la aplicación de gRNAs diseñados en pareja es una estrategia viable para inactivar genes en vides y que la deleción puede ser de más de 1 kb.

Al determinar los niveles de transcripción de *cas9* y compararlos entre los embriones transformados con pGMV-SWEET4 y pHSE-SWEET4, los resultados obtenidos no son los esperados (**Figura 12**), puesto que la literatura indica que al existir altos niveles de replicación del vector era lógico esperar niveles elevados de los transcritos expresados a partir de él. En este caso, los niveles de mRNA de *cas9* transcrito desde pGMV-SWEET4 son significativamente menores a lo expresado desde pHSE-SWEET4. Esto puede tener varias explicaciones. La principal es que este menor nivel de mRNA se debe a que la velocidad con que son traducidos podría ser más alta. Esto se debería a que existe una diferencia en la optimización de codones de las secuencias codificantes de *cas9* entre ambos vectores. El vector pHSE401 está optimizado para *Zea mays*, una monocotiledónea que tiene un uso de codones completamente diferente a *V. vinifera* (Codon usage database, Nakamura *et al.*, 2000), mientras que el vector pGMV-Universal está optimizado para *Arabidopsis thaliana* cuyo uso de codones es muy similar al de vides (Nakamura *et al.*,

2000). Esto no influye en la secuencia peptídica de Cas9, pues la proteína traducida desde ambos vectores es la misma.

El Índice de Adaptación de Codones (CAI por sus siglas en inglés) permite predecir el nivel de expresión de un gen. Utilizando la herramienta CAIcal (Puigbo *et al.*, 2008) es posible determinar que el CAI de *cas9* en pGMV-Universal es significativamente superior al de *cas9* en pHSE401 y, por lo tanto, su velocidad de traducción sería mayor. Esto permitiría pensar que si existe una mayor cantidad de Cas9 embriones transformados con pGMV-SWEET4.

Para corroborar esto será necesario realizar un ensayo de ELISA y cuantificar Cas9 en ambos sistemas. A pesar de no observarse los altos niveles de mRNA de *cas9* esperados, es posible que los niveles de gRNAs sí se encuentren elevados. Para determinar esto se proyecta cuantificar estos niveles utilizando RT-PCR.

De igual forma, se observó una tendencia clara a una mayor eficiencia de edición de *VvSWEET4* en los embriones donde se aplicó el sistema de replicón basado en geminivirus, en comparación a los embriones que fueron modificados usando el vector pHSE-SWEET4 (**Figura 13**). Este podría ser el resultado más importante de este trabajo, dado que existen varias limitantes en el proceso de transformación mediado por *R. radiobacter* en vides y otros frutales de tipo leñoso (Costa *et al.*, 2017) que afectan la factibilidad de edición de estas especies. El aumento de eficiencia observado en nuestro trabajo podría permitir la obtención de un mayor número de plantas regeneradas con ediciones en genes de interés al favorecer que cada célula infectada pueda ser editada.

Desde una perspectiva biotecnológica, el uso de nuestro vector permitiría expresar el sistema CRISPR/Cas9 sin necesidad de una inserción estable en el genoma de la planta y de forma transitoria (Baltes *et al.*, 2014; Čermák *et al.*, 2015), llevando luego a la generación de individuos editados de forma estable. En nuestro caso, este paso aún deberá ser demostrado, lo cual será posible una vez que la población de plantas obtenidas luego de la transformación tenga el grado de desarrollo adecuado para la extracción de DNA. Será primordial demostrar esto, ya que según la normativa chilena respecto a nuevas variedades generadas por nuevas tecnologías, las plantas generadas por esta vía no son consideradas Organismo Genéticamente Modificado (Costa *et al.*, 2017) y, por lo tanto, serían consideradas variedades convencionales.

La aplicación del sistema de edición génica mediante CRISPR/Cas9 desarrollado en este trabajo permitirá favorecer el avance de esta tecnología en otros frutales de tipo leñoso que presentan limitantes similares a las de la vid.

8 Conclusiones

En este trabajo se logró construir un vector que combina los componentes de la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 con los elementos de replicación del geminivirus BeYDV necesarios para establecer un sistema que potencia la actividad del complejo Cas9:gRNA. La transformación de este vector en embriones somáticos de *Vitis vinifera* permitió editar exitosamente el gen *VvSWEET4* en esta especie.

La aplicación de las estrategias propuestas en este trabajo, como el uso de parejas de gRNAs y la técnica de agroinfiltración para la determinación de la capacidad de corte de los gRNA, han logrado implementar de mejor forma el proceso de edición génica en vides.

A pesar de no demostrarse un aumento en los niveles de expresión de *cas9* usando el vector pGMV-SWEET4 en los embriones transformados con este vector, si se observó un aumento en la eficiencia de edición de *VvSWEET4*, en comparación a la lograda con un vector T-DNA clásico no replicativo.

9 Referencias

- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A., Brutnell, T. P., Citovsky, V., ... Stewart, C. N. (2016). Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*, tpc.00196.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
- Antiabong, J. F., Ngoepe, M. G., & Abechi, A. S. (2016). Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary World*, 9(9), 935–939. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.935-939>
- Auer, C., & Frederick, R. (2009). Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. *Trends in Biotechnology*, 27(11), 644–651. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.08.005>
- Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P., & Voytas, D. F. (2014). DNA Replicons for Plant Genome Engineering. *The Plant Cell*, 26(1), 151–163. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119792>
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.007>
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 62(3), 293–300.
- Bortesi, L., Zhu, C., Zischewski, J., Perez, L., Bassié, L., Nadi, R., ... Schillberg, S. (2016). Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1111/pbi.12634>
- Butler, N. M., Baltes, N. J., Voytas, D. F., & Douches, D. S. (2016). Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Frontiers in Plant Science*, 7(1045), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01045>
- Canver, M. C., Bauer, D. E., Dass, A., Yien, Y. Y., Chung, J., Masuda, T., ... Orkin, S. H. (2017). Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells (The Journal of Biological Chemistry (2014) 289 (21312-21324) DOI: 10.1074/jbc.M114.5646. *Journal of Biological Chemistry*, 292(6), 2556. <https://doi.org/10.1074/jbc.A114.564625>
- Cesar, S. A., Rajan, V., Prykhodzij, S. V., Berman, J. N., & Ignacimuthu, S. (2016). Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(9), 2334–2344. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.009>
- Čermák, T., Baltes, N. J., Čegan, R., Zhang, Y., & Voytas, D. F. (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biology*, 16(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0796-9>
- Chong, J., Piron, M. C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., & Mestre, P. (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6589–6601. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru375>

- Costa, L. D., Malnoy, M., & Gribaudo, I. (2017). Breeding next generation tree fruits : technical and legal challenges. *Nature Publishing Group*, 4(September), 1–11. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.67>
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(5), 6127–6145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn907>
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE*, 3(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- Gibson, D. G. (2011). Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods in Enzymology*, 498, 349–361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2>
- Gleba, Y., Marillonnet, S., & Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: The “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.003>
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(11), 777–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3117>
- Hefferon, K. L. (2014). DNA Virus Vectors for Vaccine Production in Plants: Spotlight on Geminiviruses. *Vaccines*, 2(3), 642–653. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030642>
- Jelly, N. S., Schellenbaum, P., Walter, B., & Maillot, P. (2012). Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic Research*, 21(6), 1319–1327. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9611-5>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(August), 816–822. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Li, Z. T., Dhekney, S. A., Dutt, M., & Gray, D. J. (2008). An improved protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(3), 311–321. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9378-9>
- Lozano-Durán, R. (2016). Geminiviruses for biotechnology: The art of parasite taming. *New Phytologist*, 210(1), 58–64. <https://doi.org/10.1111/nph.13564>
- Nakamura, Y., Gojobori, T., & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases; its status 1999. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 292. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.292>
- Newman, M., & Ausubel, F. M. (2016). Introduction to Gene Editing and Manipulation Using CRISPR/Cas9 Technology. *Current Protocols in Molecular Biology*, 115(July), 31.4.1–6. <https://doi.org/10.1002/cpmb.14>
- Peyret, H., & Lomonossoff, G. P. (2015). When plant virology met *Agrobacterium*: The rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnology Journal*, 13(8), 1121–1135.

<https://doi.org/10.1111/pbi.12412>

- Puchta, H., & Fauser, F. (2014). Synthetic nucleases for genome engineering in plants: Prospects for a bright future. *Plant Journal*, *78*(5), 727–741. <https://doi.org/10.1111/tpj.12338>
- Puigbo, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S. (2008). CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*, *3*(38).
- Ren, C., Liu, X., Zhang, Z., Wang, Y., Duan, W., Li, S., ... Schmittgen, T. D. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific Reports*, *6*, 32289. <https://doi.org/10.1038/srep32289>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, *32*(4), 347–55. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Sovová, T., Kerins, G., Demnerová, K., & Ovesná, J. (2017). Genome Editing with Engineered Nucleases in Economically Important Animals and Plants: State of the Art in the Research Pipeline. *Current Issues in Molecular Biology*, *21*, 41–62.
- Steenkamp J, Wiid I, Lourens A, van H. P. (1994). Improved method for DNA extraction from *Vitis vinifera*. *Am J Enol Vitic.*, *45*, 102–6.
- Stella, S., & Montoya, G. (2016). The genome editing revolution: A CRISPR-Cas TALE off-target story. *BioEssays*, *38*, S4–S13. <https://doi.org/10.1002/bies.201670903>
- Tapia, E., Sequeira, Á., Castro, Á., Montes, C., Zamora, P., López, R., ... Prieto, H. (2009). Development of grapevine somatic embryogenesis using an air-lift bioreactor as an efficient tool in the generation of transgenic plants. *Journal of Biotechnology*, *139*(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.09.009>
- Unniyampurath, U., Pilankatta, R., & Krishnan, M. N. (2016). RNA interference in the age of CRISPR: Will CRISPR interfere with RNAi? *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms17030291>
- Vidigal, J. A., & Ventura, A. (2015). Rapid and efficient one-step generation of paired gRNA CRISPR-Cas9 libraries. *Nature Communications*, *6*(May), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms9083>
- Voytas, D. F. (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 327–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105552>
- Wu, X., Kriz, A. J., & Sharp, P. A. (2014). Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative Biology*, *2*(2), 59–70. <https://doi.org/10.1007/s40484-014-0030-x>
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., ... Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
- Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F., & Lo Schiavo, F. (2008).

Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Reports*, 27(5), 845–853.
<https://doi.org/10.1007/s00299-008-0510-4>

10 Material Suplementario

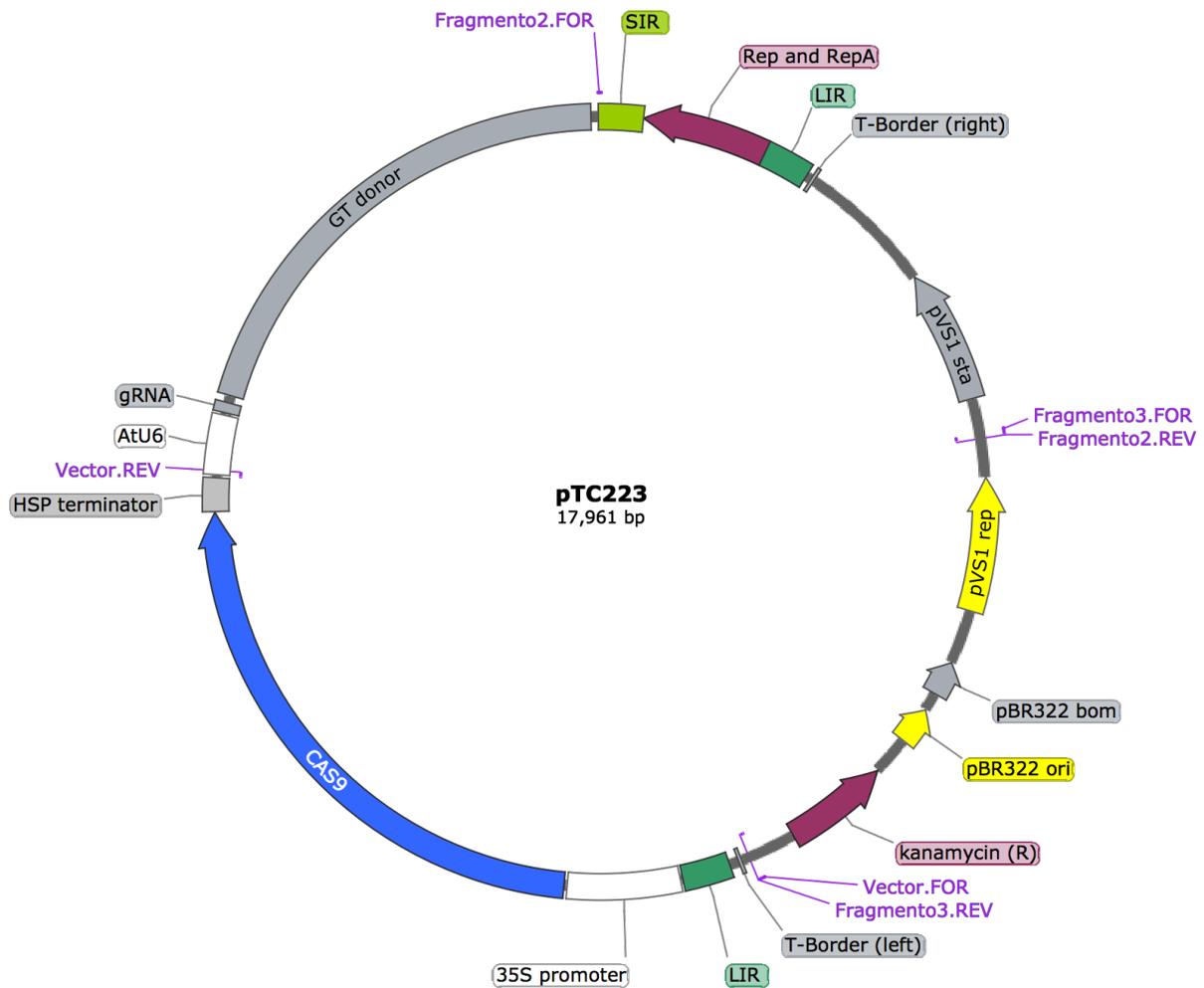


Figura Suplementaria 1: Mapa de vector pTCC223. Vector utilizado para la construcción del vector pGMV-Universal. Se usaron las parejas de partidores indicadas en la imagen (en morado) para amplificar los fragmentos que contenían los elementos de interés (Tabla 2). Adaptado de Čermák et al., 2015.

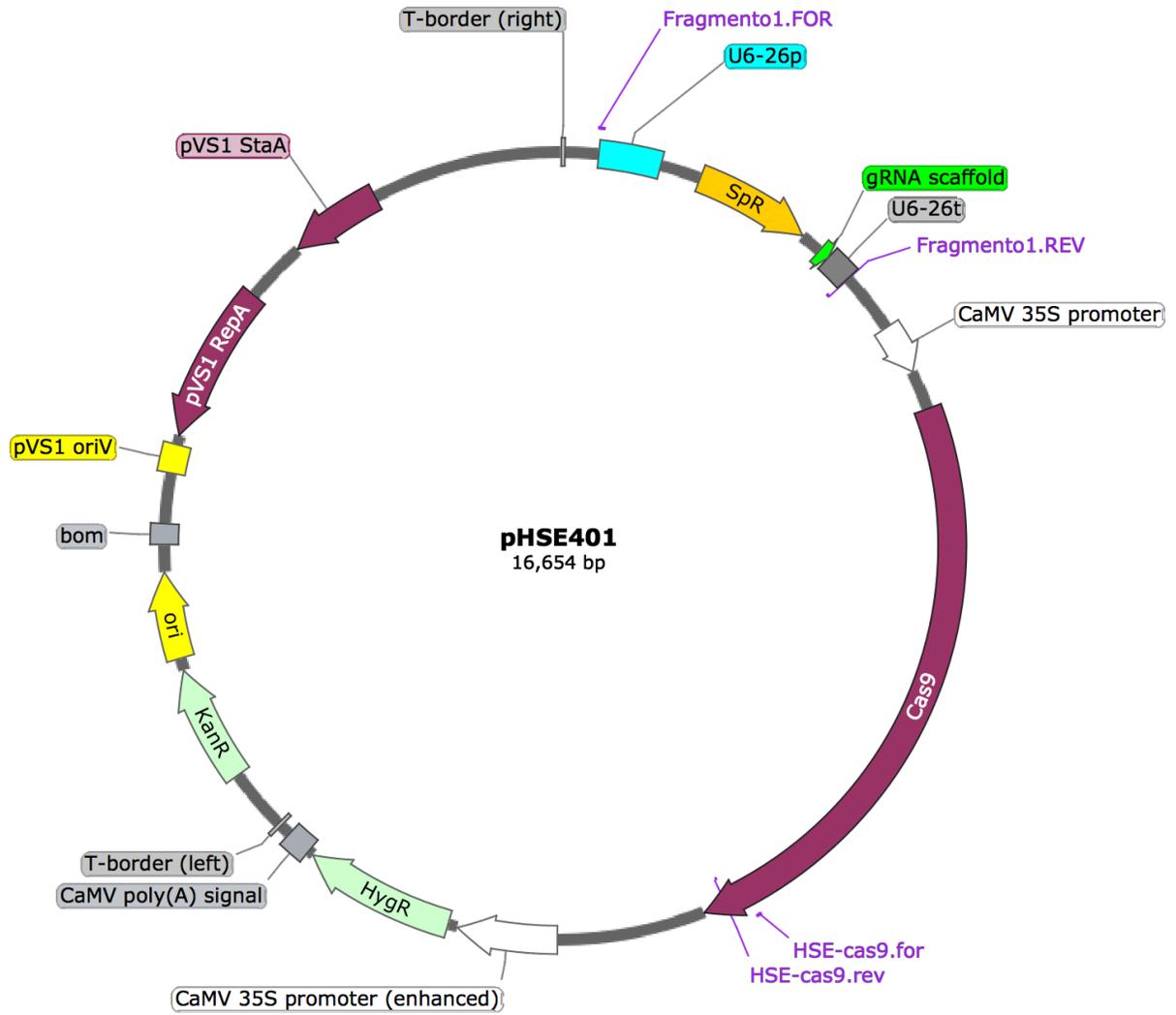


Figura Suplementaria 2: Mapa de vector pHSE401. A partir de este vector se obtuvo el *cassette* de clonamiento de gRNAs para la construcción del vector pGMV-Universal. El fragmento fue amplificado con la pareja de partidores Fragmento1.For y Fragmento1.Rev (en morado, Tabla 2). Adaptado de Xing *et al.*, 2014.

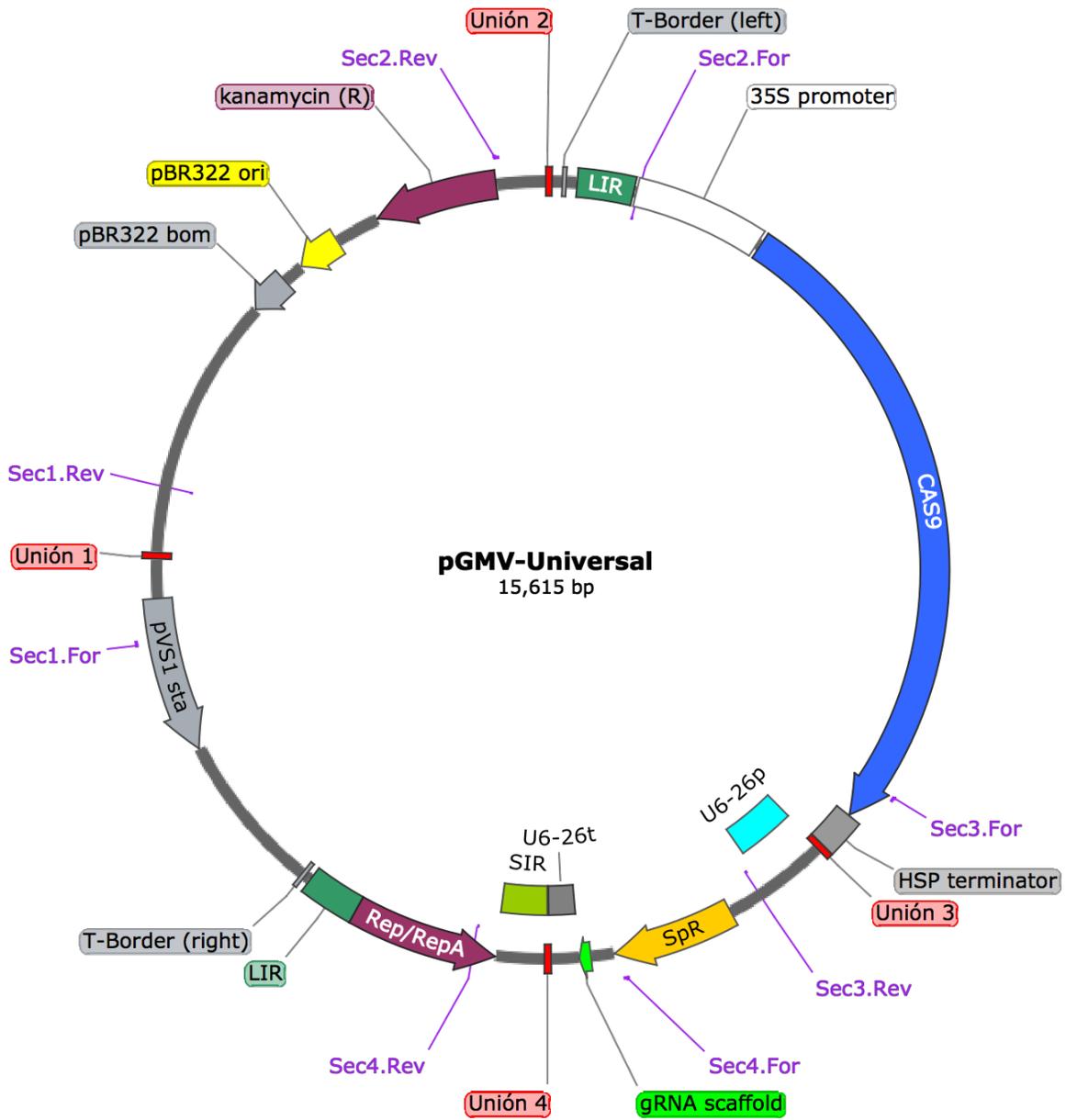


Figura Suplementaria 3: Mapa de vector pGMV-Universal. Este vector fue ensamblado usando la estrategia de Gibson Assembly. Para determinar la correcta unión de los fragmentos, se secuenció el vector final usando parejas de partidores que flanquean las cuatro zonas de unión (en morado).

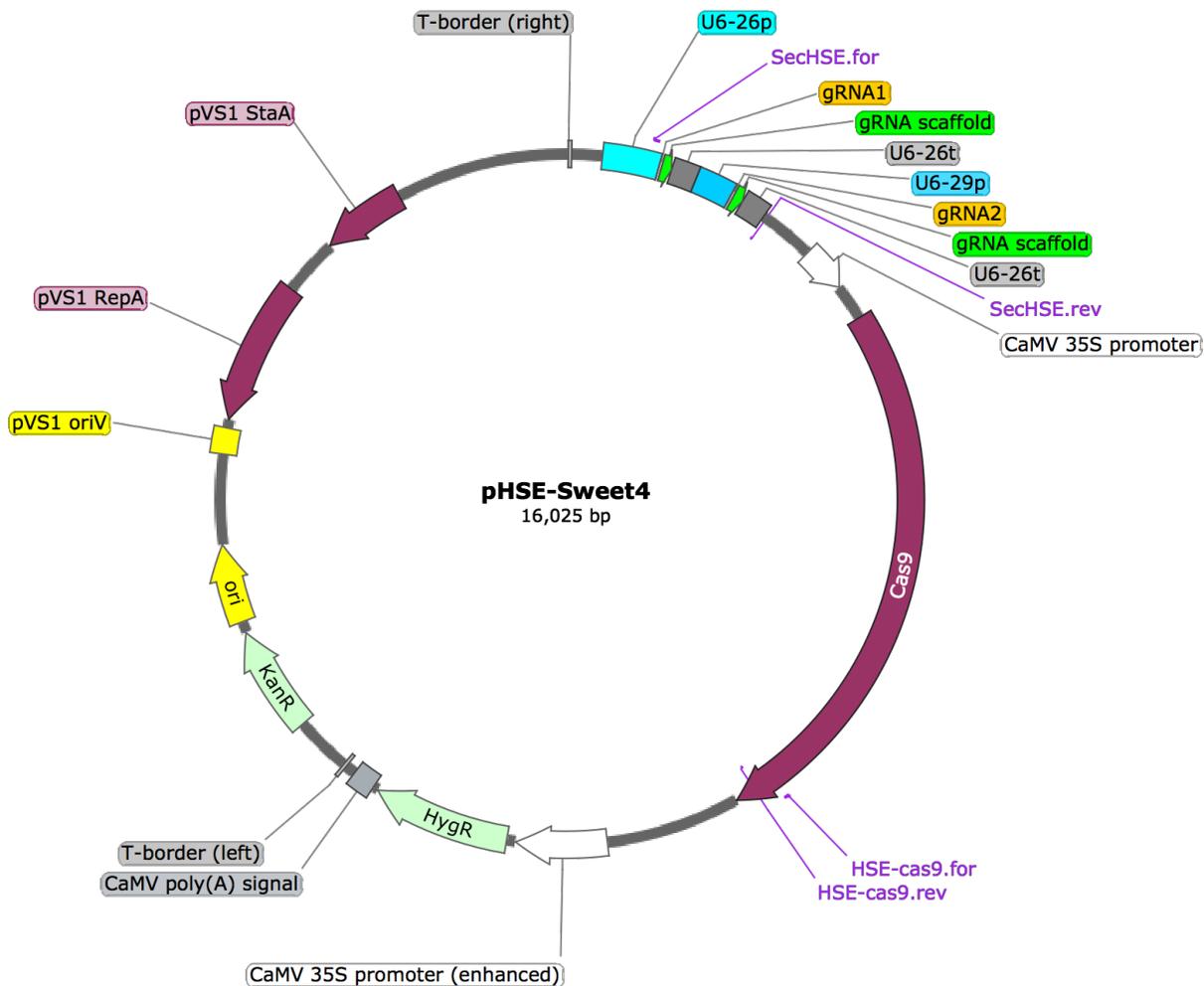


Figura Suplementaria 4: Mapa de vector pHSE-Sweet4. Este vector fue creado al clonar la pareja de gRNA contra el gen *VvSWEET4* en el vector pHSE401. Fue secuenciado usando la pareja de partidores SecHSE.for y SecHSE.rev (en morado) para determinar la correcta inserción de los gRNA. La pareja de partidores HSE-cas9.for y HSE-cas9.rev (en morado) su utilizó para los ensayos de RT-PCR (Tabla 3).

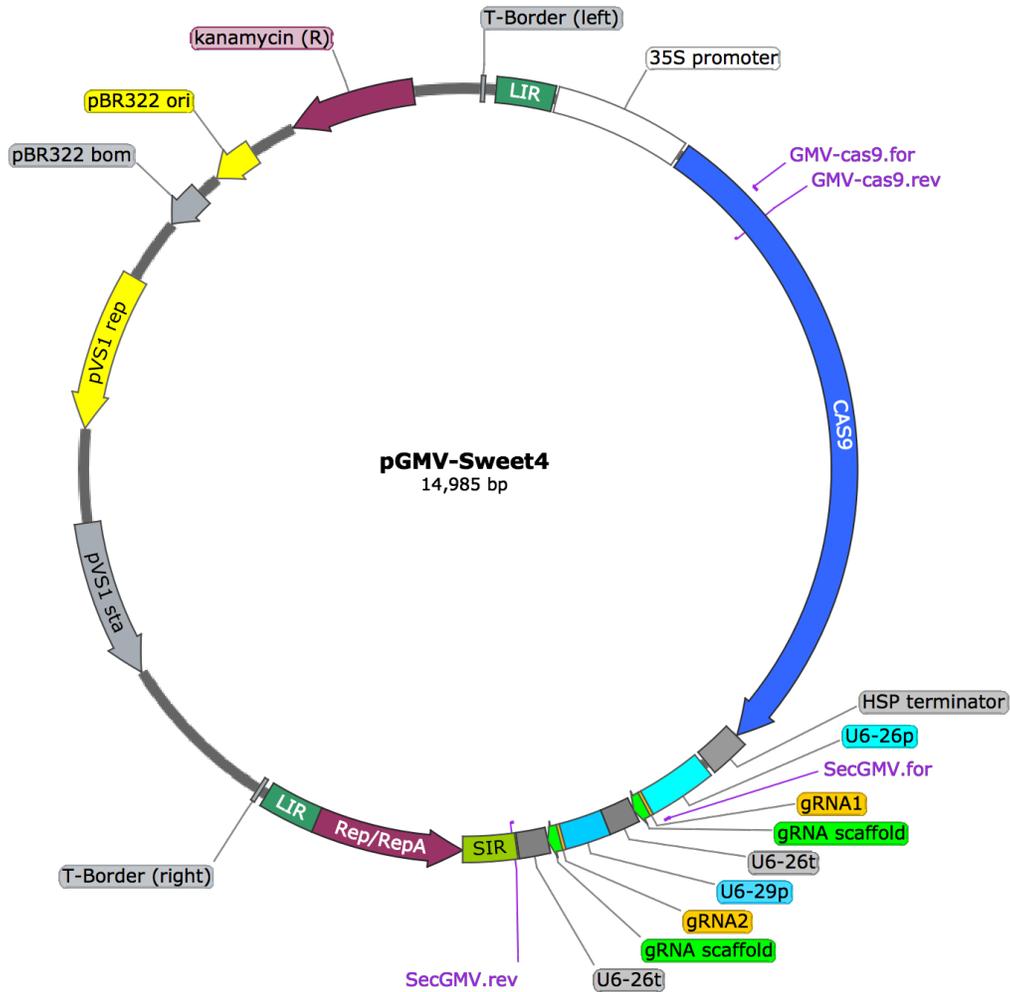


Figura Suplementaria 5: Mapa vector pGMV-Sweet4. Este vector fue creado al clonar la pareja de gRNA contra el gen *VvSWEET4* en el vector pGMV-Universal. Fue secuenciado usando la pareja de partidores SecGMV.for y SecGMV.rev (en morado) para determinar la correcta inserción de los gRNA. La pareja de partidores GMV-cas9.for y GMV-cas9.rev (en morado) su utilizó para los ensayos de nivel de expresión del mRNA de cas9 (Tabla 3).

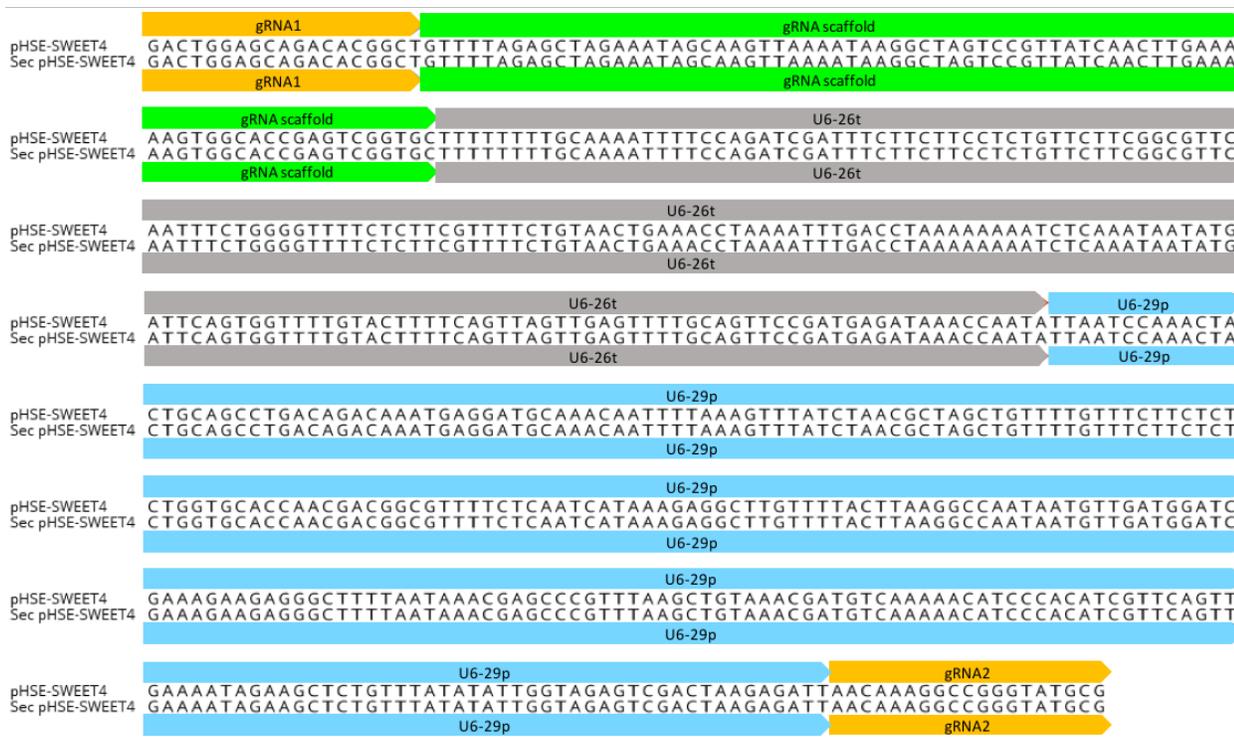


Figura Suplementaria 6: Clonamiento de gRNAs en vector pHSE401. El resultado de secuenciación del plasmidio pHSE-SWEET4 (secuencia inferior) proveniente de un clon de *E. coli* positivo para la inserción de gRNAs fue alineado con la secuencia predicha del vector pHSE-SWEET4 (secuencia superior). En amarillo, secuencias de gRNA. En verde, secuencia de scaffold de gRNA. En gris, secuencia del terminador U6-26t. En celeste, secuencia del promotor U6-29p.

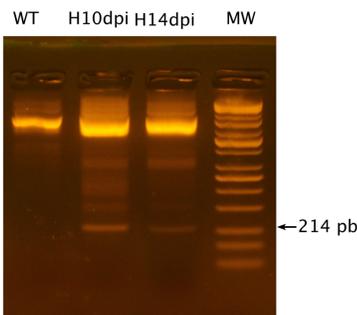


Figura Suplementaria 7: Análisis de edición en *VvSWEET4* de hojas agroinfiltradas con pHSE-SWEET4. Detección de edición mediante PCR convencional. La banda de 214 pb corresponde al gen editado en muestras de hojas agroinfiltradas con pHSE-SWEET4 a los 10 y 14 dpi. WT, hojas no infiltradas.

