

# PLANTAS DE TRIGO EDITADAS CON CRISPR/Cas9

**FIDi**ciencia



**ALUMNADO:**

*Paula Maestre Aguilar (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))*  
*Paula Resina Cruces (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))*  
*Paloma Garrido Berenguer (1º Bach, CES Lope De Vega (Córdoba))*  
*Ávaro Giménez Arcos (1º Bach, CES Lope De Vega (Córdoba))*

**PROFESORA COORDINADORA:**

*Dra. Elena León Rodríguez (IES Fidiana de Córdoba)*

**INVESTIGADORES:**

*Dr Francisco Barro Losada*  
*María Helena Guzmán López*

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>2.- OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>4</b>
<i>CULTIVO IN VITRO DE ESCUTELOS VEGETALES</i> .....	4
<i>SISTEMA CRISPR/CAS 9</i> .....	5
<i>BOMBARDEO DE MICROPARTÍCULAS</i> .....	6
<i>PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)</i> .....	6
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>7</b>
4.1.- <i>ASIGNACIÓN DE VARIABLES</i> .....	7
4.2.- <i>MATERIAL DE LABORATORIO</i> .....	7
4.3.- <i>DISEÑO EXPERIMENTAL</i> .....	9
4.4.- <i>PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN</i> .....	10
<b>5.- RESULTADOS</b> .....	<b>11</b>
5.1.- <i>PORCENTAJE DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS</i> .....	11
5.2.- <i>IDENTIFICACIÓN POR PCR DE PLANTAS TRANSFORMADAS</i> .....	12
5.3.- <i>EFICIENCIA DE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA</i> .....	13
5.4.- <i>IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS CON MUTACIONES EN LAS GLIADINAS</i> .....	13
<b>7.-DISCUSIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>14</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>14</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>15</b>

# PLANTAS DE TRIGO EDITADAS CON CRISPR/Cas9

P. Maestre-Aguilar<sup>1</sup>, P- Resina-Cruces<sup>1</sup>, P. Garrido-Berenguer<sup>1</sup>, A. Giménez-Arcos<sup>1</sup>, E. León-Rodríguez<sup>1</sup>  
H. Guzmán-López<sup>2</sup>, F. Barro-Losada<sup>2</sup>

1. IES Fidiaña

2. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC

*En la investigación realizada nuestro objetivo era editar genes de trigo mediante CRISPR/Cas9 para eliminar las proteínas que son perjudiciales para las personas celíacas (intolerantes al gluten). Para ello, es necesario emplear distintas técnicas, entre ellas, el cultivo in vitro de escutelos inmaduros de trigo, la preparación de plásmidos y reactivos CRISPR/Cas9 y el bombardeo de micropartículas, utilizada para introducir los reactivos y plásmidos en las células vegetales. En relación a los materiales utilizados tenemos en primer lugar los escutelos de granos de trigo harinero, seguidamente su transformación con vectores CRISPR/Cas9, una vez transformados pasados a un cultivo in vitro y por último la extracción de ADN y su caracterización por PCR. Se han bombardeado 262 escutelos de trigo, y tras el proceso de cultivo y selección in vitro, hemos recuperado 49 plantas, de las que 10 fueron positivas para Cas9. En relación a la embriogénesis, aproximadamente la mitad de los escutelos fueron embriogénicos. La eficiencia de regeneración fue del 18,7% mientras que la eficiencia de transformación fue del 3,8%. La identificación de las plantas transformadas se hizo mediante PCR para Cas9, y la identificación de las mutaciones se hizo en geles A-PAGE. Con estos datos podemos sacar distintas conclusiones: más del 60% de los escutelos producen embriones somáticos, el sistema de selección in vitro es altamente eficiente y permite regenerar en torno al 19%, mientras que el 20% de las plantas analizadas contenían el gen que codifica para Cas9.*

**Palabras clave:** trigo, gluten Crispr/Cas9, edición genómica

*In our research, we aimed to edit wheat genes using CRISPR/Cas9 to remove proteins that are detrimental to people with coeliac disease (gluten intolerance). To do this, it is necessary to use different techniques, including in vitro culture of immature wheat scutellum, preparation of plasmids and CRISPR/Cas9 reagents and microparticle bombardment, used to introduce the reagents and plasmids into plant cells. In relation to the materials used; we have firstly the scutellum of bread wheat grains, then their transformation with CRISPR/Cas9 vectors, once transformed they were transferred to an in vitro culture, and finally the extraction of DNA and its characterization by PCR. A total of 262 wheat scutellum were bombarded, and after the in vitro culture and selection process, 49 plants were recovered, of which 10 were positive for the Cas9 gene. Regarding embryogenesis, approximately half of the bombarded scutellum was embryogenic. Regeneration efficiency was 18.7% while transformation efficiency was 3.8%. Identification of transformed plants was done by PCR for the Cas9 gene, and identification of mutations was done on A-PAGE gels. From these data, we can draw different conclusions: more than 60% of the scutellum produce somatic embryos, the in vitro selection system is highly efficient and allows regeneration of about 19%, while 20% of the plants analyzed contained the gene coding for Cas9.*

**Keywords:** wheat, Crispr/Cas9 gluten, genome editing

## **1.- INTRODUCCIÓN**

Hoy en día el trigo es el cereal más cultivado del mundo (<http://faostat2.fao.org>, 2021). Esto es debido a su alta adaptabilidad, altos rendimientos y, principalmente, a las características biomecánicas únicas que posee la masa hecha con su harina (Shewry, 2009). A su vez, estas propiedades biomecánicas vienen dadas por la presencia de proteínas del gluten en el grano y son las responsables del uso de la harina de trigo en la elaboración de panes y otros productos, así como del uso del gluten como aditivo en la industria alimentaria. El trigo es un cultivo de especial importancia en nuestra dieta. Tanto es así que, a pesar del bajo contenido proteico (8-15%) en comparación al almidón (65-80%) que posee, constituye una de las fuentes de proteínas más importantes en la dieta humana (Shewry, 2009).

Las proteínas del gluten, también llamadas prolaminas, son las responsables de la calidad harinopanadera del trigo y constituyen el 80% de la carga proteica del grano (Shewry, 2009). Dentro de las mismas, se distinguen dos fracciones: gliadinas y gluteninas. A su vez, las gliadinas se clasifican en tres grupos:  $\alpha$ -,  $\omega$ - y  $\gamma$ -gliadinas; mientras que las gluteninas se dividen únicamente en dos grupos: gluteninas de alto y bajo peso molecular (HMW y LMW, de sus siglas en inglés, respectivamente).

Además de ser las principales responsables de la calidad de la harina de trigo, también están relacionadas con trastornos alimentarios como la enfermedad celíaca (EC), que afecta a un 1% de la población mundial, la sensibilidad al trigo no celíaca (STNC) y las alergias como el asma del panadero y anafilaxis inducida por el ejercicio dependiente del trigo (Sapone et al., 2011; Leonard et al., 2017). Por esta razón, el grupo de Francisco Barro en el Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC en Córdoba trabaja desde hace años en el desarrollo de variedades de trigo menos inmunogénicas (Gil-Humanes et al., 2010; Pistón et al., 2011, Sánchez-León et al., 2018).

El proyecto está basado en la edición de genes de CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) que es una familia de secuencias de ADN que se encuentran en el genoma de los organismos procariontes y la edición de proteínas nucleasas asociadas a estas secuencias (Cas) cuya función es cortar el ADN de una forma específica siendo guiadas por secuencias de ARN. Una vez producida la rotura del ADN, la célula activa un sistema de reparación del mismo denominado unión de extremos no homólogos (NHEJ, de sus siglas en inglés). Este proceso de reparación, sin embargo, es propenso a errores produciéndose deleciones o inserciones, lo que provoca la inactivación del gen.

## **2.- OBJETIVOS**

El principal objetivo de este trabajo es probar la eficacia de vectores y reactivos CRISPR/Cas9 para introducir mutaciones e inactivar genes de las  $\alpha$ -gliadinas de trigo.

## **3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### ***Cultivo in vitro de escutelos vegetales***

Las técnicas de cultivo in vitro son herramientas muy potentes ya que nos permiten regenerar plantas enteras a partir de células individuales. Para ello, se utilizan medios de cultivo artificiales suplementados con los nutrientes que las células necesitan para su crecimiento (Figura 1). Además, también se añaden hormonas vegetales que nos van a permitir inducir divisiones celulares y controlar su crecimiento. Con ello conseguimos una desdiferenciación programada de una célula somática en una célula embrionaria. En el medio de cultivo también se añade un agente selectivo, de forma que podamos distinguir las células transformadas de las no transformadas. Después de varios cambios de medio donde también cambiamos el balance hormonal, vamos regenerando las plantas de trigo, que

finalmente son transferidas a macetas y aclimatadas en invernaderos con condiciones climáticas muy controladas.



Figura 1. Placa petri mostrando los escutelos inmaduros de trigo en proceso de regeneración in vitro.

### Sistema CRISPR/Cas 9

Cas9 es una enzima endonucleasa de ADN dirigida por un ARN guía. Esta enzima es capaz de utilizar este ARN guía y examinar todo el ADN de la planta buscando secuencias homólogas a este ARN guía. Una vez reconocido el ADN objetivo, Cas9 corta las dos cadenas de ADN inactivando el gen (Figura 2). Esta técnica permite editar o corregir el genoma, ya que Cas9 funciona a modo de tijeras moleculares que cortan y pegan secuencias de ADN con gran precisión y control. En esta investigación se usa para generar inactivaciones de algunos de los genes que codifican para las proteínas perjudiciales para las personas celíacas, aprovechando las vías de reparación de ADN que se activan tras el corte de Cas9. El gen de esta enzima se introduce en el escutelo de trigo en un plásmido a través del bombardeo de micropartículas.

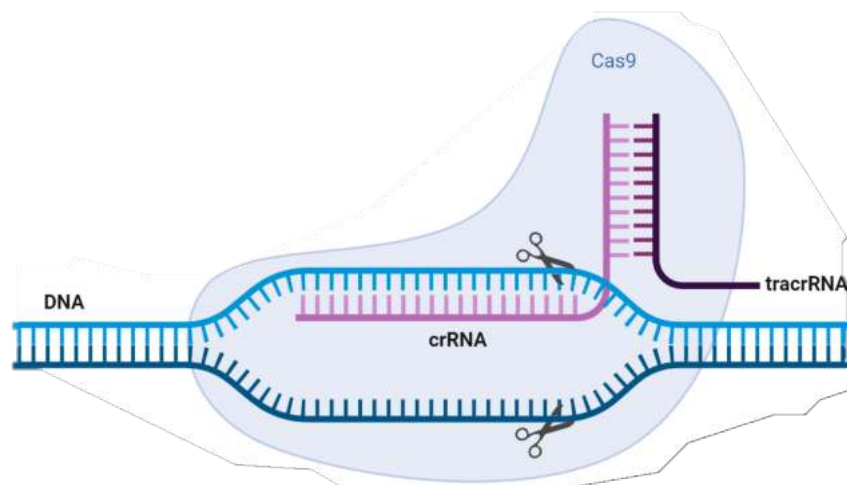


Figura 2. Esquema de Cas9 y el complejo de ARN guía en el ADN objetivo. Las tijeras indican los puntos de corte de del ADN.



### **Bombardeo de micropartículas**

Es una técnica utilizada para introducir ADN, principalmente en forma de plásmido, en el interior de las células. En este sistema, los plásmidos de ADN se precipitan sobre partículas de oro de unas 0,6 micras de diámetro. Posteriormente, estas partículas son aceleradas a gran velocidad sobre las células vegetales, en nuestro caso los escutelos de trigo. Para ello, se utiliza un dispositivo basado en una cámara de helio, con discos de ruptura que permiten controlar la presión de disparo (Figura 3). En el dispositivo hay diferentes pisos, donde se colocan las células objetivo, lo que nos permite también controlar la penetración de las partículas en las células vegetales. Las partículas de oro cubiertas con el ADN penetran entonces en el interior de las células, alcanzando el núcleo, donde el plásmido consigue integrarse en el ADN de la célula vegetal y es posteriormente procesado por las polimerasas, expresando los genes contenidos en el plásmido, y sintetizando las proteínas, en nuestro caso Cas9, que posteriormente procesa el ADN utilizando los ARN guías.

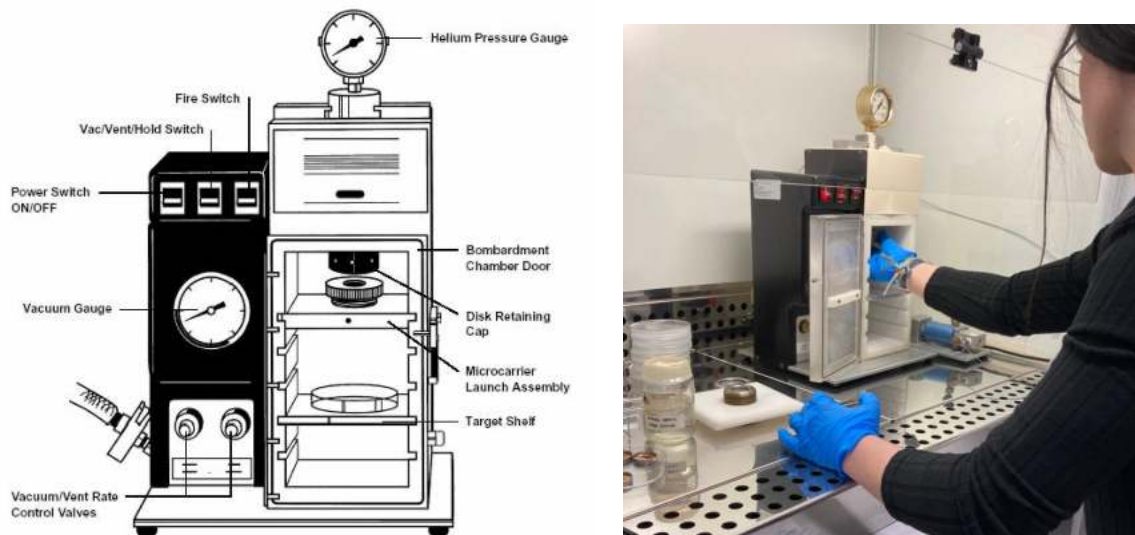


Figura 3. Esquema del dispositivo utilizado para el bombardeo de partículas (izquierda) y el procesamiento de escutelos de trigo utilizados en esta investigación (derecha).

### **PCR (reacción en cadena de la polimerasa)**

Esta es una técnica que permite la amplificación rápida de millones de réplicas de un segmento específico de ADN, para estudiarlo con mayor detalle. Lo que se necesita es una polimerasa de ADN, nucleótidos, cebadores (para seleccionar un segmento del genoma que se amplificará), magnesio. Todos estos reactivos se mezclan con el ADN de la planta y conseguimos la amplificación de nuestro gen objetivo definido por los cebadores que estamos utilizando que son específicos para Cas9. El proceso se puede dividir en 3 fases: primero se desnaturaliza el ADN de doble cadena por calor (desnaturalización), después los cebadores se unen a las hebras individuales anteriormente separadas (alineación) y por último los cebadores se alargan por la ADN polimerasa utilizando los nucleótidos añadidos en la mezcla y crea dos copias de la hebra de ADN original (elongación). Este proceso se repite durante varios ciclos, lo que permite una amplificación secuencial del gen objetivo. Posteriormente, este ADN puede utilizarse con diversos propósitos como la secuenciación o su estudio en geles de agarosa.

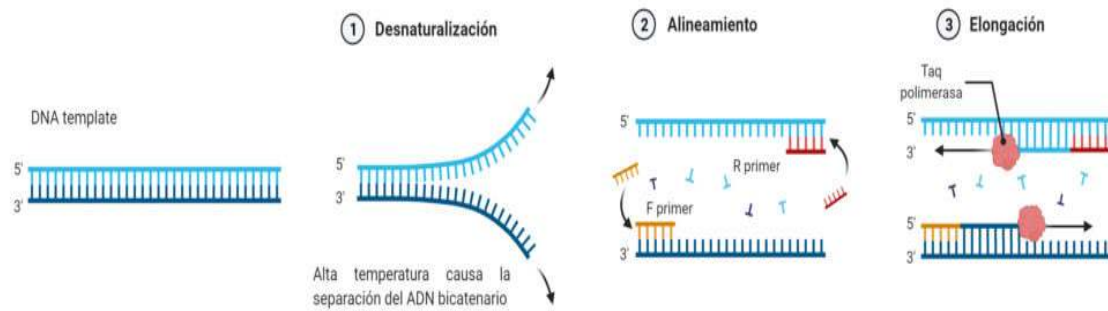


Figura 4. Esquema del funcionamiento de la PCR donde se observa las tres fases y el proceso de elongación del gen objetivo utilizando los cebadores (primers) como molde.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.-Asignación de variables

En este proyecto de investigación vamos a utilizar dos tipos de variables.

La variable independiente es la especie de las plantas de trigo bombardeadas, en nuestro caso trigo harinero hexaploide (AABBDD) de la variedad Bobwhite (BW208).

Las variables dependientes son:

- Porcentaje de callos que producen embriones somáticos o con embriogénesis
- Número de plantas que sobreviven y son analizadas
- Número de plantas llevan los plásmidos con Cas9
- Número de plantas que han sido modificadas genéticamente.

### 4.2.- Material de laboratorio

En este proyecto de investigación se han utilizado en primer lugar escutelos de los granos inmaduros de trigo harinero de la variedad BW208. Estos escutelos serán bombardeados con partículas de oro cubiertas con el plásmido que contiene el gen para Cas9. Este plásmido, además, contine un gen que confiere resistencia a fosfotricina, que es el componente activo de muchos herbicidas, y servirá como sistema de selección para distinguir las células transformadas. Una vez bombardeados, estos escutelos se pondrán en placas de Petri con los nutrientes necesarios para que se puedan desarrollar, adicionalmente se le añade al medio el herbicida adecuado para realizar selección in vitro, y las hormonas necesarias para inducir divisiones celulares y regenerar las plantas completas. Cuando estas plantas estén lo suficientemente desarrolladas se pasarán a magenta y posteriormente a tierra en un invernadero con condiciones muy controladas para facilitar su desarrollo posterior (Figura 5).

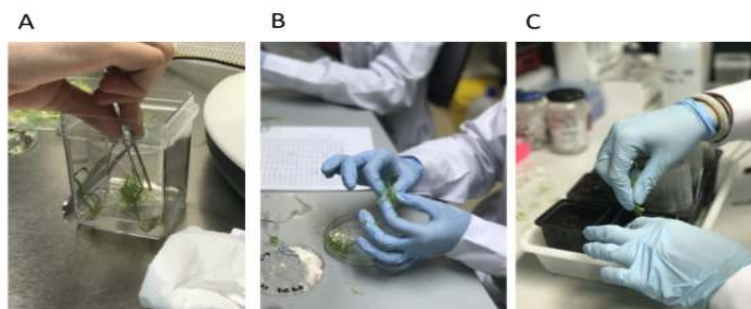


Figura 5. Plantas de trigo en cultivo in vitro en magentas (A), placas petri (B) y su aclimatación a tierra (C)

## Instrumentos

En las Figuras 6 y 7 se muestran los principales instrumentos y utensilios necesarios para realizar la investigación.

- Pistola de bombardeo, como se muestra en la Figura 3.
- Reactivos y material plástico desechable para el bombardeo de partículas, incluyendo las partículas de oro de 0,6 micras.
- Termociclador; para realizar PCR
- Fuente de electroforesis; aparato que suministra la corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel.
- Cubetas de electroforesis: depósito donde se coloca el gel, y que se llena con un tampón para facilitar el paso de la corriente eléctrica
- Cámara de flujo laminar; lugar que proporciona un espacio seguro, de esterilidad, donde podemos trabajar sin peligro de contaminaciones
- Placas Petri y magentas para el cultivo de los escutelos y plántulas
- Macetas de diferentes tamaños y tierra con abono para el cultivo de plantas
- Micropipetas de diferentes volúmenes que usamos para transferir las cantidades exactas a la mezcla con la que bombardearemos los escutelos.
- Puntas de micropipetas
- Tubos para centrifuga
- Microcentrifuga; máquina que se utiliza para realizar un pulso de centrifuga a la mezcla de ADN y oro y así, desechar el sobrenadante utilizando la pipeta.
- Cámara de cultivo in vitro: lugar donde que reúne las condiciones adecuadas para que se desarrollen los escutelos.
- Reactivos varios como Etanol al 70%, lejía comercial, agua destilada estéril, cloruro de Calcio, espermidina, Tampones, etc.

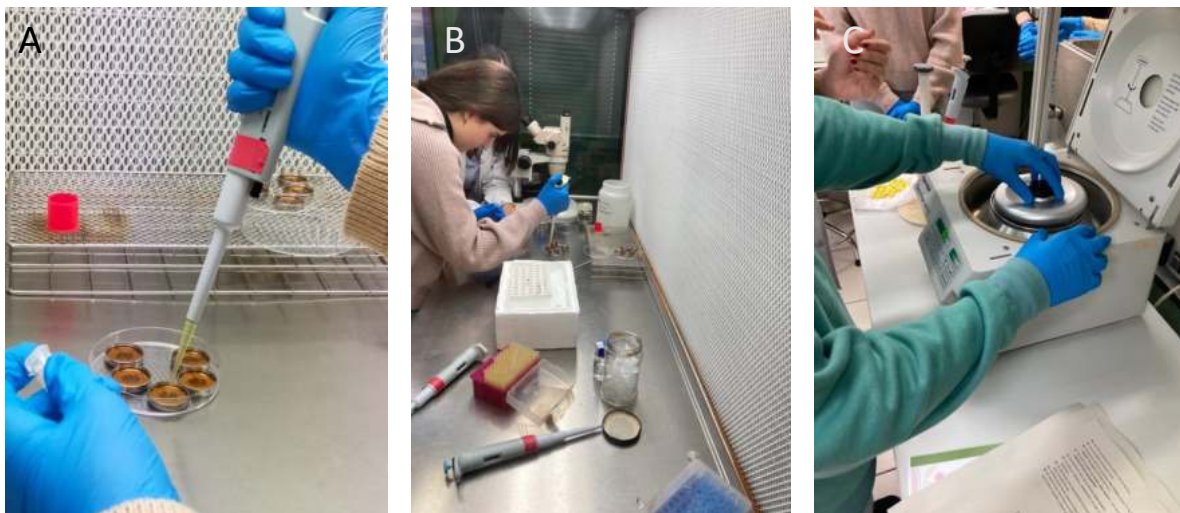


Figura 6. Instrumentos, reactivos y utensilios usados en la investigación: (A) Micropipeta, puntas y material plástico para el bombardeo, (B) Cámara de flujo laminar, puntas, reactivos y material plástico, (C) Microcentrifuga.



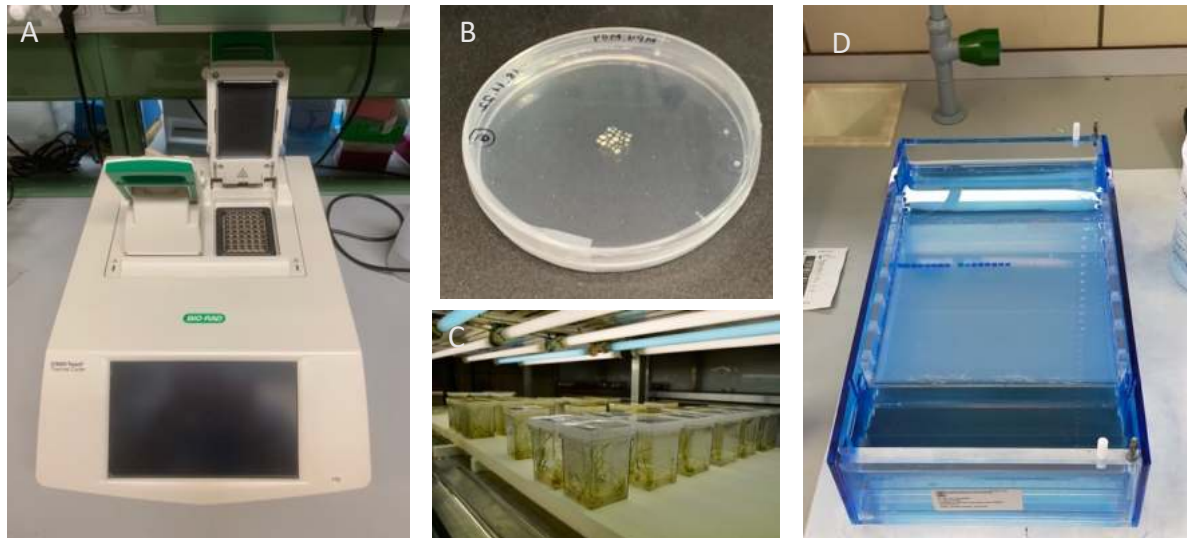


Figura 7. Instrumentos, reactivos y utensilios usados en la investigación. (A) Termociclador, (B) Placas Petri con escutelos de trigo, (C) Magentas con plántulas de trigo, (D) Cubeta de electroforesis con las muestras de PCR cargadas (pocillos azules).

#### 4.3.- Diseño experimental

En este proyecto de investigación se han utilizado escutelos de granos inmaduros de trigo harinero como objetivo para la introducción en sus células de las partículas de oro cubiertas con el plásmido que tiene el gen Cas9 y una resistencia a un herbicida. El procedimiento experimental que se ha seguido es el siguiente:

1.- Esterilización de los granos inmaduros de trigo. Esto debe realizarse en dos etapas; la primera con etanol al 70% durante un minuto, y después con lejía comercial durante 10 minutos. Posteriormente se lavarán varias veces con agua destilada estéril

1.- Aislamiento de escutelos. Esta fase es muy importante realizarla dentro de la cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad y prevenir la aparición de contaminaciones durante el proceso de cultivo *in vitro*. Debemos aislar 25 escutelos en cada placa de bombardeo, esterilizando el bisturí y las pinzas cada 4-5 aislamientos. Los escutelos aislados se colocan en el centro de una placa (Figura 7) que contiene el medio MP4, que además de los nutrientes necesarios contiene la hormona Picloram a una concentración de 4 mg/L. Una vez aislados todos los escutelos necesarios, se sellan las placas con parafilm y se dejan en la cámara de cultivo en condiciones de 25° y oscuridad hasta el bombardeo.

2.- Preparación de plásmidos con construcción CRISPR/Cas y bombardeo con partículas: descongelar en hielo picado las partículas de oro, CaCl<sub>2</sub>, espermidina y los plásmidos. Preparar la cámara de la pistola de bombardeo, esterilizando todo el plástico necesario, así como los aparatos del sistema de transformación genética y bombardeo, como se muestra en la Figura 3. A continuación se realizan los bombardeos necesarios siguiendo el protocolo previamente optimizado en el laboratorio.

3.- Cultivo *in vitro*. Una vez bombardeados los escutelos, las placas se dejan en la cámara de cultivo en condiciones de 25°C y oscuridad. Pasadas tres semanas del bombardeo, se pasa al medio de regeneración RZ.PPT2, que contiene los nutrientes necesarios y la hormona Zeatina (Z) y el agente selectivo Fosfotricina (PPT) a una concentración de 2 mg/L, y se incuban a 25° en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 12/12 luz/oscuridad. A partir de seis semanas después del bombardeo se realiza un nuevo pase cada tres semanas, desechando algunas plantas que no logran desarrollarse y las que lo consiguen se pasan a magenta si su crecimiento lo pide y cuando hayan desarrollado un buen sistema radicular y varias hojas se pasan a tierra.

En este periodo se han tomado los siguientes datos:

- a) Número de escutelos con embriogénesis, para calcular el porcentaje de embriogénesis.
- b) Número de escutelos que regenerarán, para calcular el porcentaje de regeneración.
- c) Número de plantas que se pasan a maceta y sobreviven a la aclimatación.
- d) PCR del gen Cas9 y Electroforesis en geles de agarosa para detectar el fragmento del ADN introducido.
- e) Geles para detectar examinar el perfil de gliadinas de plantas que fueron Cas9 positivas.

#### **4.4.-Planificación de la investigación**

La investigación se ha realizado en cuatro sesiones que se organizaron de la siguiente manera:

1. La primera sesión (23/11/22) se explicó en que consistiría el trabajo y se procedió a preparar la mezcla de ADN y oro para realizar los bombardeos de los escutelos previamente aislados. Con esto introducimos el gen Cas9 y los ARN guías en el interior de las células de los escutelos de trigo.
2. La segunda sesión (11/01/23) se determinó la capacidad embriogénica de los escutelos de trigo y se pasaron a otro medio de cultivo para inducir la regeneración, como se detalla en el punto 4.3. En todo momento se trabajó en una cámara de flujo laminar para mantener la esterilidad del material y de los explantes vegetales para evitar las contaminaciones.
3. En la tercera sesión (08/02/23) en algunos casos también se volvieron a pasar los escutelos a otra placa nueva, o a una magenta o a macetas, dependiendo del nivel de desarrollo de los explantes/plántulas (Figura 5). Además, se extrajo ADN para hacerles una PCR y detectar la presencia del gen Cas9.
4. En la cuarta sesión (08/03/23) se pasaron más plantas a magenta o maceta tierra. Posteriormente, en la sala de reuniones del IAS se analizaron los datos, se realizó el reparto de tareas de la memoria y se trabajó sobre el diseño del póster.
5. Los granos de las plantas fueron recogidos por la investigadora M. Helena Guzmán que con ayuda del investigador José Antonio Berlanga analizaron las semillas en geles A-PAGE para detectar las mutaciones en las alpha-gliadinas de trigo.

#### **● Sesiones online mediante documentos compartidos en Google-Drive**

También se han trabajado los documentos en forma plantilla en carpetas compartidas online con Google drive. De esta manera, todo el grupo ha trabajado en el desarrollo de los documentos y van siguiendo las indicaciones de la tutora IES coordinadora. Los trabajos que se han realizado son los siguientes:

- a) Preparación de un resumen/abstract
- b) Preparación de la memoria de investigación
- c) Elaboración de un póster/panel
- d) Elaboración de una presentación en diapositivas
- e) redacción del texto de la exposición para la defensa en el congreso

## 5.- RESULTADOS

### 5.1.- Porcentaje de callos embriogénicos

En la Figura 8 se muestra la respuesta embriogénica de los escutelos de trigo harinero al cultivo *in vitro*. Esta respuesta se determinó cuantificando el porcentaje de embriogénesis de cada escutelo en relación al total de superficie de cada escutelo. La primera imagen (A) de la Figura 8 nos muestra un callo sin nada de embriogénesis, mientras que el resto de imágenes muestran porcentajes crecientes de embriogénesis del 20% (B), 30% (C), 70% (D) y 90% (E). La superficie embriogénica es perfectamente distinguible ya que tiene un aspecto brillante, no acuoso, donde los embriones con formas más o menos esféricas son claramente visibles a lo largo de la superficie. En cambio, las regiones no embriogénicas presentan un aspecto acuoso, y no se observan estructuras circulares que anticipen la presencia de embriones somáticos.

Esta fase es de vital importancia, ya que solo las estructuras embriogénicas presentes en la superficie de los escutelos serán capaces de regenerar plantas. La identificación temprana de estas estructuras permita, además, optimizar el proceso de cultivo *in vitro*, ya que solo los escutelos que presentan estas estructuras se pasan al siguiente medio de cultivo.

La cuantificación de la capacidad embriogénica en los escutelos utilizados en esta investigación se muestra en la Figura 9. Como se observa, aunque aproximadamente el 35% de los escutelos no presentaron respuesta embriogénica, el 65% restante sí que presentó embriogénesis. Así, el 28% de los escutelos presentó una superficie embriogénica inferior al 25%, mientras que el 25% de los escutelos mostraron porcentajes de superficie embriogénica entre el 25 y el 50%. Finalmente, el 8 y el 5% de los escutelos mostraron porcentajes de superficie embriogénica entre el 50-70% y más del 75% de superficie respectivamente (Figura 9).

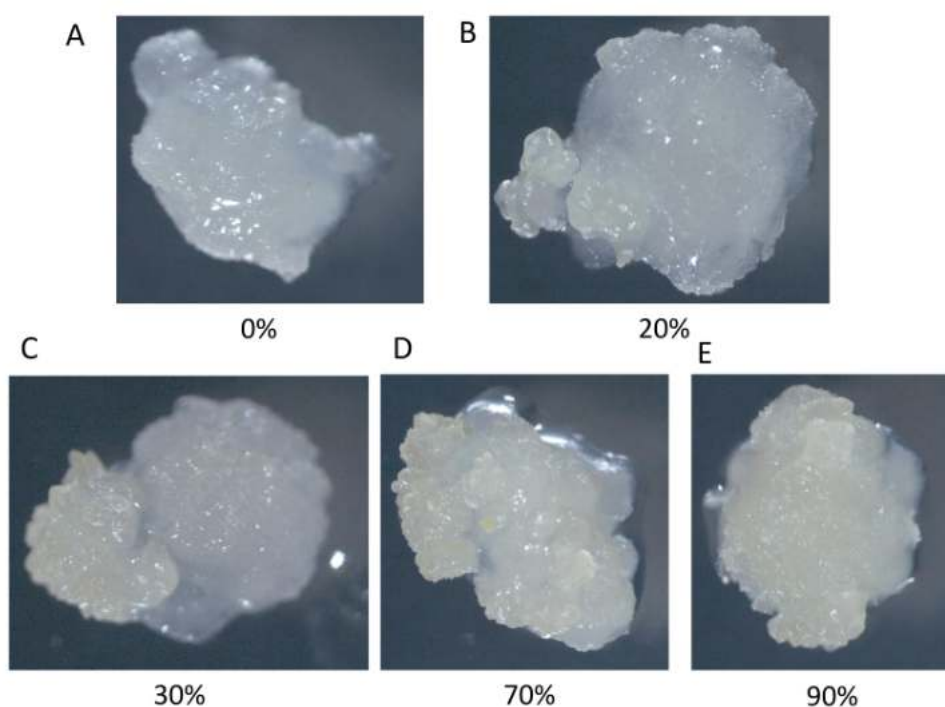


Figura 8: Imágenes de la fase de embriogénesis somática de los escutelos de trigo. Los porcentajes de la superficie de los escutelos que presentan estructuras embriogénicas se indican en cada imagen.

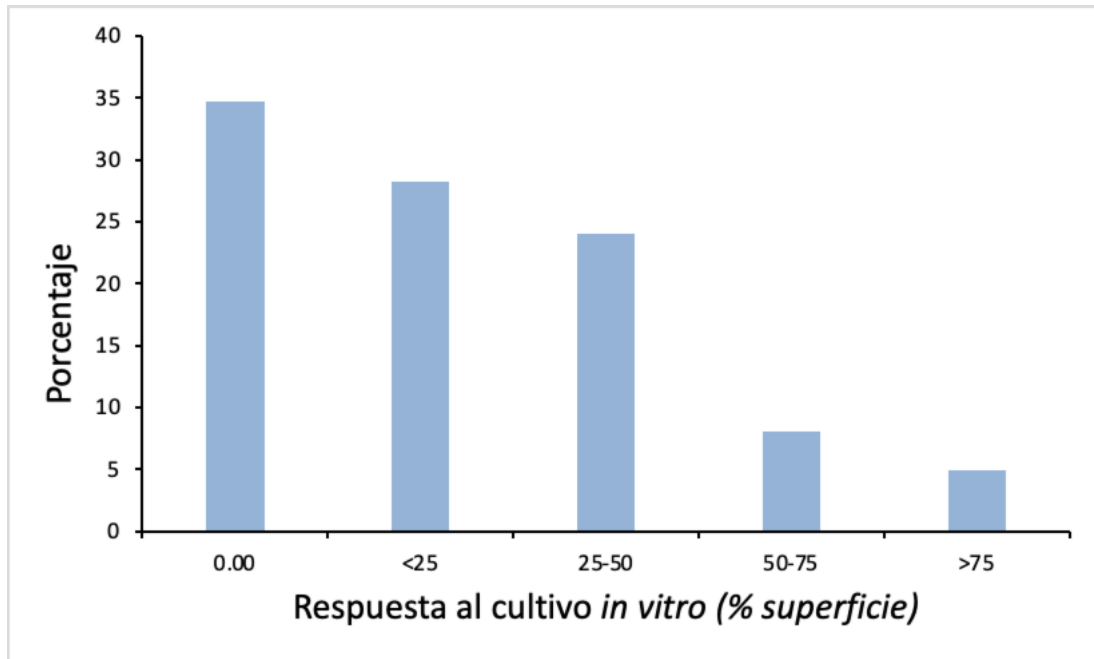


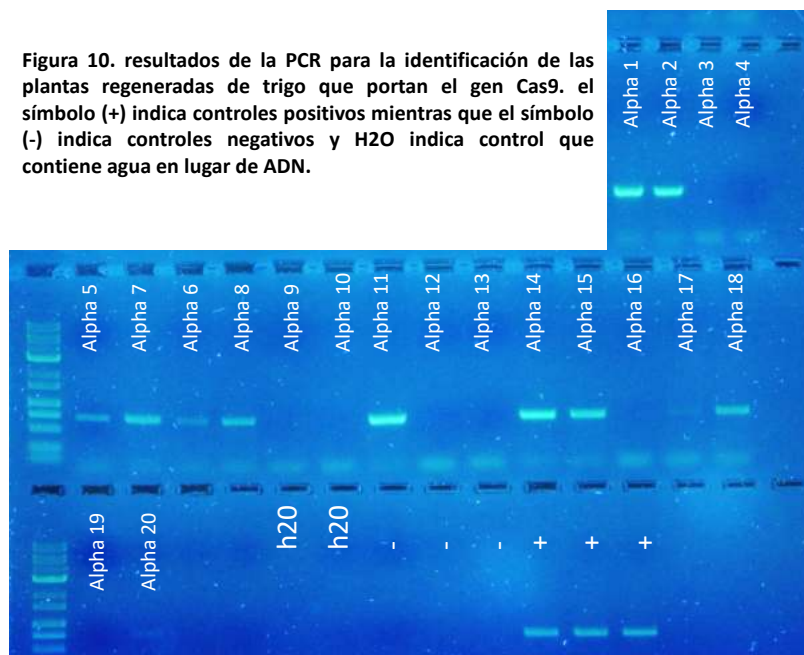
Figura 9. Resultados de la cuantificación de la superficie embriónica de los escutelos utilizados en esta investigación.

### 5.2.-Identificación por PCR de plantas transformadas

Las plantas regeneradas fueron analizadas mediante PCR utilizando cebadores específicos para el gen Cas9 que había sido previamente diseñados en el laboratorio de Genómica Funcional del IAS. Los resultados de la PCR de Cas9 de las plantas generadas y su posterior electroforesis en gel de agarosa para la identificación del producto de PCR se muestran en la Figura 10. De las 20 plantas analizadas en este gel, 10 contenían el gen Cas9, indicando que se trata de plantas transformadas.

Además, se puede apreciar que la PCR salió sin contaminación porque los carriles correspondientes al agua y los controles negativos salieron sin banda y los tres últimos que eran positivos salieron con una banda coincidente con el tamaño esperado de la amplificación. Los pocillos que contenían el ADN de las plantas regeneradas como Alpha1 a Alpha20. Como se aprecia, algunos de estos pocillos amplificaron el gen de Cas9, concluyendo que eran plantas transformadas.

Figura 10. resultados de la PCR para la identificación de las plantas regeneradas de trigo que portan el gen Cas9. el símbolo (+) indica controles positivos mientras que el símbolo (-) indica controles negativos y H2O indica control que contiene agua en lugar de ADN.



### 5.3.- Eficiencia de la transformación genética

En la Tabla 1, mostramos los resultados generales de la generación de plantas transformadas, indicándose el total de escutelos bombardeados, las plantas regeneradas, las plantas han sido positivas mediante PCR para el gen Cas9, y las eficiencias de regeneración y transformación respectivamente. Como se observa, de los 262 escutelos bombardeados conseguimos regenerar un total de 49 plantas lo que implica una eficiencia de regeneración de un 18,7%. Por su parte, 10 plantas fueron positivas para la PCR para el gen Cas9, lo que nos da una eficiencia de transformación del 3,8%.

**Tabla 1. Eficiencia de la regeneración y transformación de escutelos de trigo**

Escutelos bombardeados	Plantas regeneradas	Plantas Cas9 +	Eficiencia de regeneración (%)	Eficiencia de transformación (%)
262	49	10	18,7	3,8

### 5.4.- Identificación de plantas con mutaciones en las gliadinas

A continuación, las plantas identificadas como PCR positivas que contienen el gen Cas9, produjeron semillas en el invernadero del IAS-CSIC. Estas semillas fueron recogidas por los investigadores del grupo de Genómica Funcional y analizadas en geles A-PAGE. Para ello se extrajeron las proteínas del grano y se fraccionaron en geles, permitiendo la identificación de las tres fracciones de gliadinas, incluyendo las alpha-gliadinas, que son el objetivo de los ARN guías y de Cas9 en esta investigación.

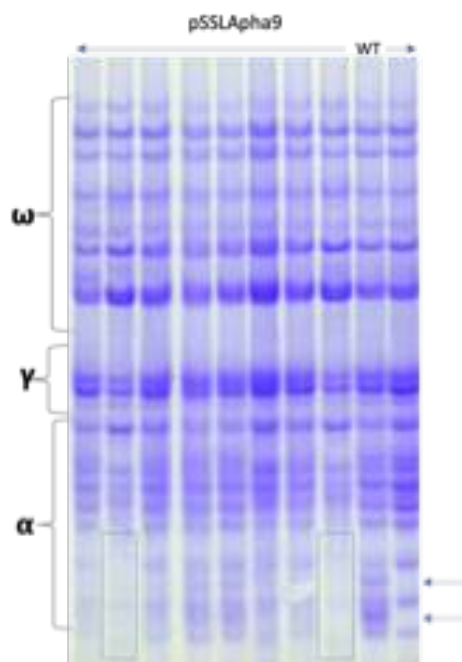


Figura 11. Gel A-PAGE de gliadinas del trigo procedente de líneas transformadas con el vector pSSLAlpha9. En el carril WT se muestra el patrón de proteínas de un trigo control. El resto de carriles corresponde a granos procedentes de una línea transformada con el vector indicado.

Como se observa, que en la región de las alpha-gliadinas han desaparecido bandas individuales (flechas) o un conjunto de bandas (rectángulos), demostrando la eficiencia de los ARN guías en introducir mutaciones en estos, ya que la ausencia de bandas esta posiblemente asociado con la presencia de mutaciones introducidas por estos ARN guías.



## 7.-DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación era usar la tecnología CRISPR/Cas9 de edición genética para introducir mutaciones en los genes de las alpha-gliadinas de trigo. Para usar esta tecnología es imprescindible tener una excelente eficiencia en el cultivo *in vitro* y en la regeneración de plantas. En nuestro caso, hemos seguido los protocolos descritos en Barro et al. (1999) y la eficiencia de regeneración está en torno al 19% y la de transformación en torno al 3,8%. Estas eficiencias están por debajo de las descritas por otros autores para trigo (Ishida et al., 2015; Hayta et al., 2019). Sin embargo, estos autores utilizan sistemas de transformación diferentes y genotipos de trigo también diferentes, lo que indicaría que las eficiencias de regeneración y transformación son altamente dependientes tanto del sistema de transformación utilizado como del genotipo de trigo. La tecnología CRISPR/Cas tiene una gran potencialidad para la mejora genética de los cultivos, particularmente en caracteres relacionados con la calidad (Chakravorty, et al., 2022), lo que permitiría desarrollar variedades con gran valor añadido y que son muy difíciles de obtener utilizando aproximaciones clásicas.

La tecnología CRISPR/Cas se está utilizando ampliamente para la mejora de trigo y otras plantas cultivas. En el caso de trigo, una de las áreas de mayor potencialidad es el desarrollo de variedades resistentes a enfermedades producidas por hongos. Por ejemplo, el mildiu es un hongo que causa grandes pérdidas a los agricultores, sobre todo en china. En China, donde el hongo es común, puede llegar a destruir hasta el 40% de un cultivo. Obtener variedades resistentes es especialmente útil para agricultores en países en vías de desarrollo que podrían no tener acceso a plaguicidas. Recientemente se ha publicado la obtención de variedades resistentes a este hongo utilizando la edición genética (Li et al., 2022). Y lo más importante es que esta resistencia se ha obtenido sin perjudicar la producción de trigo.

En el caso de las gliadinas de trigo, en esta investigación hemos realizado una aproximación similar a la descrita por Sánchez-León et al. (2018), aunque con vectores diferentes. Ellos utilizaron dos ARN guías en dos vectores diferentes y nosotros los hemos combinado en un único vector. Los resultados que hemos obtenido son muy similares a los descritos en su trabajo, lo que corroboraría la eficiencia de los ARN guías en diferentes vectores de transformación.

## 8. CONCLUSIONES

Después de analizar los datos obtenidos gracias a la investigación, podemos sacar varias conclusiones:

1. Más del 60% de los escutelos de trigo producen embriones somáticos.
2. El sistema de selección *in vitro* es altamente eficiente y permite regenerar en torno al 20%.
3. En torno al 20% de las plantas transformadas analizadas contenían el gen que codifica para Cas 9.
4. El sistema CRISPR/Cas9 permite la edición de genes que codifican para las proteínas responsables de las intolerancias al gluten.

## 9. AGRADECIMIENTOS

Finalmente queremos agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de este proyecto. En primer lugar, a los investigadores Helena Guzmán y Francisco Barro del IAS-CSIC que nos han ayudado tanto en este proceso, tanto en la fase experimental como en la elaboración de la memoria. A nuestra tutora del instituto IES Fidiana, Elena León, quien ha coordinado nuestra investigación. Al centro de investigación IAS-CSIC que nos ha abierto sus puertas para poder

realizar nuestro proyecto. Al proyecto fidiciencia2.0 que nos ha brindado la oportunidad de investigar más allá de una clase común. A nuestros institutos IES Fidiana y CES Lope de Vega. A todos los padres que tanto nos han apoyado. Y a todos los profesores que nos han ayudado. Muchas gracias.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Asociación de Biotecnología Vegetal Agrícola, Agro-Bio (22/02/2022). “Con edición genética crean variedad de trigo resistente al mildew polvoso”. Agro-Bio. <https://agrobio.org/noticias/con-edicion-genetica-crean-variedad-de-trigo-resistente-al-mildew-polvoso>

Autoría: Investigadores del IFAPA: Ana Aguado Puig; Nieves Capote Maínez; Ana Trujillo Ferrusola; Eduardo de La Lastra Alcalde (23/07/2020). “¿Qué es la PCR y para qué se utiliza?”. <https://idescubre.fundaciondescubre.es/noticias/que-es-la-pcr-y-para-que-se-utiliza/>

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12. doi: 10.1126/science.1138140. PMID: 17379808.

Barro, F., Martin, A., Lazzeri, P.A. et al. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica* 108, 161–167 (1999).

Chakravorty, M., Nanda, M., Arora, N., Singh, S., Kumar, V., and Deshwal, S. (2022). CRISPR-Cas9 mediated genome tailoring to improve nutritional quality and shelf life in crops: A review. *Plant Gene*, 100369. doi: 10.1016/j.plgene.2022.100369.

Elena Camacho (07/10/2020). “¿Qué es el CRISPR/Cas9?”. [https://www.cope.es/actualidad/tecnologia/noticias/que-crispr-cas9-20201007\\_932436](https://www.cope.es/actualidad/tecnologia/noticias/que-crispr-cas9-20201007_932436)

Gil-Humanes J, Pistón F, Tollefsen S, Sollid LM, Barro F. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 28;107(39):17023-8. doi: 10.1073/pnas.1007773107. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20829492; PMCID: PMC2947919.

Hayta, S., Smedley, M.A., Demir, S.U. et al. An efficient and reproducible Agrobacterium-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods* 15, 121 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0503-z>

HE, Y., WANG, Q., ZENG, J., SUN, T., YANG, G., & HE, G. (2015). Current status and trends of wheat genetic transformation studies in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3), 438-452. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60934-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60934-5)

Ishida, Y., Hiei, Y., Komari, T. (2015). High Efficiency Wheat Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. In: Ogihara, Y., Takumi, S., Handa, H. (eds) *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. Springer, Tokyo. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55675-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55675-6_18)

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22745249; PMCID: PMC6286148.

- Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SM, Tuteja N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Front Plant Sci.* 2016 Apr 19;7:506. doi: 10.3389/fpls.2016.00506. PMID: 27148329; PMCID: PMC4835450.
- Leonard MM, Sapone A, Catassi C, Fasano A. Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity: A Review. *JAMA.* 2017 Aug 15;318(7):647-656. doi: 10.1001/jama.2017.9730. PMID: 28810029.
- Li C, Brant E, Budak H, Zhang B. CRISPR/Cas: a Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2021 Apr 15;22(4):253-284. doi: 10.1631/jzus.B2100009. PMID: 33835761; PMCID: PMC8042526.
- Li, S., Lin, D., Zhang, Y., Deng, M., Chen, Y., Lv, B., et al. (2022). Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature*, 1–6. doi: 10.1038/s41586-022-04395-9.
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005 Feb;60(2):174-82. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3. PMID: 15791728.
- Pistón F, Gil-Humanes J, Rodríguez-Quijano M, Barro F. Down-regulating  $\gamma$ -gliadins in bread wheat leads to non-specific increases in other gluten proteins and has no major effect on dough gluten strength. *PLoS One.* 2011;6(9):e24754. doi: 10.1371/journal.pone.0024754. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21935456; PMCID: PMC3172295.
- Piston, F., Marín, S., Hernando, A. and Barro, F. (2009) Analysis of the activity of a  $\gamma$ -gliadin promoter in transgenic wheat and characterization of gliadin synthesis in wheat by MALDI-TOF during grain development. *Mol. Breed.* 23, 655–667.
- Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J.* 2018 Apr;16(4):902-910. doi: 10.1111/pbi.12837. Epub 2017 Nov 24. PMID: 28921815; PMCID: PMC5867031.
- Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, Stefanile R, Mazzarella G, Tolone C, Russo MI, Esposito P, Ferraraccio F, Cartenì M, Riegler G, de Magistris L, Fasano A. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med.* 2011 Mar 9;9:23. doi: 10.1186/1741-7015-9-23. PMID: 21392369; PMCID: PMC3065425.
- Shewry, P.R, Wheat, *Journal of Experimental Botany*, Volume 60, Issue 6, April 2009, Pages 1537–1553, <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
- Spiegato. “¿Qué es el bombardeo de partículas?”. <https://spiegato.com/es/que-es-el-bombardeo-de-particulas>