



Implementación de la técnica CRISPR/Cas9 en *Rosa* spp. para la edición del gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS): Fase I

Gaona Guamán, Karla Vanessa

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

22 de julio del 2021



Document Information

Analyzed document	Tesis 2_Vanessa Gaona.docx (D110675471)
Submitted	7/22/2021 9:30:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	4%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.arkund.com



FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR

Sources included in the report

W	URL: http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/23027/1/T-ESPE-044033.pdf Fetched: 1/12/2021 2:26:46 AM		1
SA	HUELAMO_MONTORO_VB50493_20210517_1102_c007.pdf Document HUELAMO_MONTORO_VB50493_20210517_1102_c007.pdf (D105668627)		1
SA	GUAITA_CESPEDES_LA04355_20180703_1100_c007.pdf Document GUAITA_CESPEDES_LA04355_20180703_1100_c007.pdf (D40519153)		1
SA	García Vega, Jorge-sistema CRISPRCas9 para la producción de mutaciones en Aabidopsis-2017_2018_Extraordinaria_Julio_71676020Q.pdf Document García Vega, Jorge-sistema CRISPRCas9 para la producción de mutaciones en Aabidopsis-2017_2018_Extraordinaria_Julio_71676020Q.pdf (D40554455)		1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / TESIS_MIGUEL CRIOLLO_DEFINITIVA.docx Document TESIS_MIGUEL CRIOLLO_DEFINITIVA.docx (D80539425) Submitted by: fjflores2@espe.edu.ec Receiver: fjflores2.espe@analysis.arkund.com		5
W	URL: https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/cibiogem/convocatorias-de-la-cibiogem/convocatorias-fondo-cibiogem/6032-nuevas-tecnicas-de-mejoramiento-de-plantas-elementos-de-analisis-y-recomendaciones-sobre-su-enfoque-regulatorio/file Fetched: 7/3/2021 3:03:48 AM		1
W	URL: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19673/PardoPinon_Marta_TFG_2017.pdf.pdf Fetched: 4/28/2020 11:50:04 PM		1
SA	TFG CRISPR REDACCIÓN versión 6 junio-convertido.pdf Document TFG CRISPR REDACCIÓN versión 6 junio-convertido.pdf (D53501223)		1
W	URL: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/173979/Desarrollo-de-un-vector-viral-para-la-edición-genica-mediante-CRISPRCas9-en-vitis-vinifera.pdf?sequence=1&isAllowed=yMar Fetched: 7/22/2021 9:31:00 PM		1
SA	Zurita, Daniela.docx Document Zurita, Daniela.docx (D29753356)		1



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado "**Implementación de la técnica CRISPR/Cas9 en Rosa spp. para la edición del gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS): Fase I**" fue realizado por la señorita **Gaona Guamán, Karla Vanessa** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangoquí, 23 de julio de 2021



Firma digitalizada por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR

.....
Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C. C. 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Gaona Guamán, Karla Vanessa**, con C.C. 1726334970, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Implementación de la técnica CRISPR/Cas9 en Rosa spp. para la edición del gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS): Fase I"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 22 de julio de 2021

Gaona Guamán, Karla Vanessa

C.C.: 1726334970



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, Gaona Guamán, Karla Vanessa, con C.C. 1726334970, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Implementación de la técnica CRISPR/Cas9 en Rosa spp. para la edición del gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS): Fase I"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 22 de julio de 2021

Gaona Guamán, Karla Vanessa

C.C.: 1726334970

Dedicatoria

A mi familia, mis padres José y Rosita, y mi hermano Paúl. Me enseñaron que la familia siempre está unida y que el éxito de uno es la alegría de todos.

A mi padre quien con sus enseñanzas me guió por el camino de la justicia, humildad y perseverancia, por recorrer junto a mi cada paso y enseñarme a levantar en cada caída.

A mi madre, por su dulzura, amor y sabiduría; por enseñarme bondad, calidad humana y darme las herramientas para construir mi futuro. Te estaré eternamente agradecida.

Todos mis logros serán continuamente dedicados a ustedes.

Karla Vanessa Gaona Guamán

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a la empresa Conectiflor S.A y al Ing. Sebastián Recalde por darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

Al Dr. Francisco Flores del Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por ser un excelente tutor y docente de la institución. Gracias por compartir sus conocimientos y permitirme realizar la investigación en sus instalaciones.

A mi familia, gracias por confiar en mi y enseñarme el significado de unión. Toda la vida estaré agradecida por el apoyo y amor incondicional que me han brindado. Gracias por enseñarme a no rendirme y a siempre hacer el bien en cada decisión.

A Luis, por tomar mi mano y caminar juntos en cada aventura. Gracias por darme la oportunidad de amar intensamente y apoyar mis iniciativas con entusiasmo

A mis amigas, Alisson, Denisse, Emi, Karen, Cris y Mafer; por enseñarme que si existen las amistades eternas. Gracias por todas las risas y encuentros, todos ellos han sido parte de mi crecimiento personal y profesional

También agradezco a mis amigos, Jany, Cami, Mario, Esteban, Stefy; por convivir juntos en la universidad y por su sincera amistad. Me han brindado momentos únicos, me apoyaron y dieron consejos cuando los necesite. Mi vida universitaria no hubiera sido igual sin ustedes y espero tenerlos siempre a mi lado en el futuro.

Finalmente agradezco a iGEM Ecuador y a IEEE-ESPE por ser los grupos universitarios donde encontré crecimiento personal, profesional y amistades que perdurarán muchos años.

Índice de contenido

Resultado del análisis de Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Listado de tablas	10
Listado de figuras	10
Listado de abreviaturas	11
Resumen	12
Abstract	13
Capítulo I: Introducción	14
Formulación del problema.....	14
Justificación del problema	15
Objetivos	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos	16
Capítulo II: Marco teórico	17
CRISPR/Cas9.....	17
Elementos del sistema CRISPR/Cas9.....	17
CRISPR/Cas9 en plantas	19
Diseño y evaluación de sgRNA.....	20
Influencia de variabilidad alélica.....	21
Mecanismos de entrega a plantas	21
Edición <i>genética en Rosa spp.</i>	23
Enzima fitoeno desaturasa (PDS).....	24
Hipótesis	25
Capítulo III: Materiales y métodos	26
Zona de estudio	26
Recolección de muestra vegetal	26

Extracción de ADN	26
Cuantificación de ADN y análisis de calidad	26
Amplificación del gen de la enzima PDS por PCR convencional	27
Elección de la región objetivo	27
Diseño de cebadores.....	27
Amplificación de ADN	28
Análisis de variabilidad alélica	29
Edición del gen de la enzima PDS con CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i>	30
Diseño de ARN guías	30
Transcripción <i>in vitro</i> de sgRNA.....	31
Purificación <i>in vitro</i> de sgRNA transcrito	32
Ensayo de escisión <i>in vitro</i> con CRISPR/Cas9.....	33
Capítulo IV: Resultados.....	36
Extracción y cuantificación de ADN	36
Amplificación del gen de la enzima PDS por PCR convencional	37
Elección de la región objetivo	37
Diseño de cebadores.....	38
Amplificación de ADN	39
Análisis de variabilidad alélica	41
CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i> del gen de la enzima PDS	42
Diseño de ARN guías	42
Transcripción, purificación y escisión <i>in vitro</i> CRISPR/Cas9.....	44
Capítulo V: Discusión	51
Análisis del gen de la enzima PDS en <i>Rosa spp.</i>	51
CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i> del gen de la enzima PDS	52
Diseño de ARN guías	52
Ensayo de escisión <i>in vitro</i>	54
Capítulo VI: Conclusiones	55
Capítulo VII: Recomendaciones.....	56
Capítulo VIII: Bibliografía.....	57

Listado de tablas

Tabla 1: Componentes para una reacción de PCR convencional.....	28
Tabla 2: Programación del termociclador para PCR del ADN objetivo	29
Tabla 3: Componentes de amplificación de sgRNA para una reacción	31
Tabla 4: Componentes de la transcripción de sgRNA para una reacción.....	32
Tabla 5: Componentes de amplificación del gen PDS.....	33
Tabla 6: Programación del termociclador para PCR del ADN objetivo	34
Tabla 7: Componentes para ensayo de escisión	35
Tabla 8: Primers diseñados para la amplificación del gen PDS de <i>Rosa spp.</i>.....	38
Tabla 9: Características termodinámicas de los primers utilizados	38
Tabla 10: Productos de PCR para el gen PDS.....	40
Tabla 11: sgRNA diseñados para ensayos in vitro CRISPR/Cas9 en rosas.....	43
Tabla 12: Cebadores para la transcripción in vitro de sgRNA.....	44
Tabla 13: Cuantificación de transcritos sgRNA purificados.....	45
Tabla 14: Tamaño de fragmentos generados para el exón 5	47
Tabla 15: Tamaño de fragmentos generados para el exón 6	48
Tabla 16: Tamaño de fragmentos generados para el exón 7	49
Tabla 17: Tamaño de fragmentos generados para el exón 8	50

Listado de figuras

Figura 1: Esquema del mecanismo de edición del genoma por CRISPR/Cas9	18
Figura 2: Mecanismos de reparación de DSB formadas por nucleasa sitio específico.....	19
Figura 3: Mecanismos de entrega de CRISPR-Cas9 en células vegetales.....	22
Figura 4: Limpieza de extremos de secuencia para el gen de enzima PDS.....	30
Figura 5: Espectro de cuantificación de ADN para la variedad K.....	36
Figura 6: Dominio proteico de la enzima fitoeno desaturasa de <i>Rosa chinensis</i> ...	37
Figura 7: Amplificación del gen PDS mediante gradiente de temperatura	39
Figura 8: Amplificación del gen PDS en los exones 7-8.....	40
Figura 9: Resultados de identidad y similaridad para la región 5-6.....	41
Figura 10: Resultados de identidad y similaridad para la región 7-8.....	42
Figura 11: Plantillas de sgRNA amplificado para cada exón	45
Figura 12: Amplificación de la región 5-6 del gen PDS de las variedades de rosa.....	46
Figura 13: Ensayo de escisión <i>in vitro</i> mediante CRISPR/Cas9 del exón 5.....	47
Figura 14: Ensayo de escisión in vitro mediante CRISPR/Cas9 del exón 6.....	48
Figura 15: Ensayo de escisión in vitro mediante CRISPR/Cas9 del exón 7.....	49
Figura 16: Ensayo de escisión in vitro mediante CRISPR/Cas9 del exón 8.....	50

Listado de abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

EDTA: Ácido Etilenodiaminatetraacético

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

PVP: Polivinilpirrolidona

IVT: Transcripción *in vitro*

Resumen

Las rosas son los arbustos ornamentales más importantes del mundo, su edición genética busca mejorar características físicas para satisfacer la demanda comercial y reducir las pérdidas de los cultivares por ataques de plagas o estrés ambiental. El mecanismo de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR) es un sistema de la naturaleza conformado por un ARN guía (sgRNA) y la endonucleasa Cas utilizados como una herramienta conjunta de edición génica. El presente proyecto de titulación tiene como objetivo el implementar la tecnología CRISPR/Cas9 en la edición genética de cuatro variedades de rosas en el gen de la enzima Fitoeno desaturasa (PDS). Se implementó esta tecnología para la edición *in vitro* de los exones 5, 6, 7 y 8 de PDS de rosas, como una prueba de concepto que permita validar CRISPR/Cas9 en estas plantas. Primero se realizó la extracción de ADN y amplificación del gen objetivo, posteriormente se analizó la variabilidad alélica de la región en todas los cultivares para diseñar los sgRNA. Las guías obtenidas tuvieron altos porcentajes de especificidad y mínimos efectos off-target, en consecuencia, se obtuvo un experimento exitoso en escisión *in vitro* de todos los exones por CRISPR/Cas9. Se recomienda realizar estudios *in vivo* para evaluar la eficiencia del ensayo y determinar los mutantes mediante estudios de restricción.

Palabras clave:

- ROSA SPP.
- CRISPR/CAS9
- EDICIÓN GENÉTICA
- FITOMEJORAMIENTO
- FITOENO DESATURASA (PDS)

Abstract

Roses are the most important ornamental flowers in the world; genetic editing of these plants seeks to improve their phenotype to meet commercial demand and reduce losses due to pest attacks or environmental stress. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) mechanism is a natural system consisting of a guide RNA (sgRNA) and Cas endonuclease used as a joint gene editing tool. The objective of this project was to implement CRISPR/Cas9 technology for the genetic edition of the Phytoene desaturase (PDS) gene of four rose varieties. This technology was implemented for in vitro gene editing of exons 5, 6, 7 and 8 of PDS in roses as a proof of concept to validate CRISPR/Cas9 in these plants. First, DNA extraction and amplification of the target gene was performed, then the allelic variability of the region was analyzed in all cultivars to design the sgRNAs. The obtained guides had high specificity percentages and minimal off-target effects, consequently, a successful experiment was obtained in the in vitro excision of Cas9 in all exons. In vivo studies are recommended to evaluate the efficiency of the assay and to determine mutants by restriction assays.

Key words:

- **ROSE SPP.**
- **CRISPR/CAS9**
- **GENE EDITING**
- **PLANT BREEDING**
- **PHYTOENE DESATURASE (PDS)**

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La agricultura y las industrias que dependen de recursos vegetales buscan la producción de plantas con características mejoradas utilizando sistemas específicos y sencillos (Wada et al., 2020). Las tecnologías de edición del genoma mediante nucleasas específicas de secuencia son herramientas actuales para el estudio de funcionalidad de genes y fitomejoramiento (Zhong et al., 2018) entre ellas se encuentran las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), las proteínas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), y el sistema de repeticiones palindrómicas cortas (CRISPR) (Dalla et al., 2019).

El sistema ZFN es una combinación entre i) los dominios proteicos dedos de zinc que se unen al ADN reconociendo trinucleótidos y ii) el dominio catalítico de la endonucleasa de restricción *FokI* que genera múltiples cortes de doble cadena (DSB) en el genoma (Bortesi & Fischer, 2015; Dalla et al., 2019; Peña, 2017). Al igual que las nucleasas de dedos de zinc, los TALENs funcionan como dímeros enteramente proteicos donde la escisión del genoma depende de *FokI*, sin embargo nacen como alternativa a ZFN ya que su construcción es más sencilla y permite modificaciones dirigidas del ADN (Bortesi & Fischer, 2015; Peña, 2017).

El sistema CRISPR es la herramienta para edición de genomas más estudiada por su simplicidad y especificidad en la edición genética (Madrid & Gabriela, 2018). A diferencia de ZFN y TALEN consta de un ARN quimérico y una única proteína monomérica encargados del reconocimiento y escisión del ADN, respectivamente; además, no requiere de ingeniería de proteínas por lo que es posible probar varios ARN para cada gen objetivo (Bortesi & Fischer, 2015).

CRISPR puede desarrollarse de novo o adaptarse a un sistema anteriormente estudiado para una especie evolutivamente cercana, sin embargo, con el fin de evaluar este sistema de edición génica, es necesario la aplicación de pruebas de concepto antes de diseñar la modificación de características de fitomejoramiento. Generalmente, la desactivación de un gen cuyo mutante tiene un fenotipo de fácil detección visual es la primera aplicación de la tecnología CRISPR en plantas (Dalla et al., 2019; S. Shan et al., 2020).

Justificación del problema

Las rosas son consideradas como el cultivo florícola más importante y representa aproximadamente el 30% del mercado mundial (Foucher et al., 2015). Sus características ornamentales, terapéuticas y cosméticas las convierten en plantas altamente demandadas con siembras anuales que superan los 240 millones y generan más de 888 millones de dólares en el mercado minorista (Davey et al., 2000).

El género *Rosa* tiene aproximadamente 200 especies de las cuales más del 50% son poliploides. Los cultivares modernos son híbridos interespecíficos derivados de 8 a 20 especies entre las que destacan *R. canina*, *R. chinensis*, *R. gallica*, *R. gigantea*, *R. moschata*, *R. multiflora*, *R. phoenicea*, *R. rugosa* y *R. wichurana*; y que han generado rasgos diversos como la capacidad de floración, color, fragancia, tamaño entre otros (Nguyen & Nhung, 2019; Raymond et al., 2018).

El mejoramiento de *Rosa* spp. mediante el método convencional (cruce sexual) es difícil de alcanzar debido a la elevada heterocigosidad y la ausencia de líneas endogámicas (Davey et al., 2000) además de causar problemas en la hibridación sexual, formación y germinación de semillas y prologando tiempo en la obtención del producto (Nguyen & Nhung, 2019). Técnicas de edición genética precisas como

CRISPR, podrían ser consideradas como una alternativa a los métodos tradicionales debido a la alta especificidad con la que se pueden realizar alteraciones genéticas y la rapidez con la que se pueden producir nuevos cultivares (Nishihara et al., 2018).

Objetivos

Objetivo General

- Implementar la primera fase de la técnica de CRISPR/Cas9 en *Rosa* spp. para la edición del gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS).

Objetivos Específicos

- Determinar la variación alélica del gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS) mediante PCR, secuenciación y análisis bioinformático
- Diseñar el ARN guía para la edición de la enzima fitoeno desaturasa (PDS) en *Rosa* spp.
- Efectuar un ensayo para seleccionar ARN guías efectivos mediante la escisión *in vitro* de CRISPR/Cas9.

Capítulo II: Marco teórico

CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 fue identificado por primera vez en *Streptococcus pyogenes* como parte del sistema inmunológico para protegerse de bacteriófagos invasores (Wiedenheft et al., 2012). La tecnología funciona mediante dos fases, adquisición e interferencia. Durante la primera etapa se da la inyección de ADN exógeno (espaciador de 32 nucleótidos) por el fago invasor a la célula huésped, esta secuencia se inserta en la región CRISPR (repeticiones en tándem de 29 nucleótidos) del organismo procarionta y activa el sistema de defensa celular (Barrangou et al., 2007; Thurtle & Lo, 2018).

La fase de interferencia involucra el silenciamiento del ADN extraño gracias a los DSB generados por la endonucleasa Cas, de esta forma se induce la inmunidad adaptativa tipo II en las células contra futuras infecciones virales (Karvelis et al., 2013; Thurtle & Lo, 2018).

Elementos del sistema CRISPR/Cas9

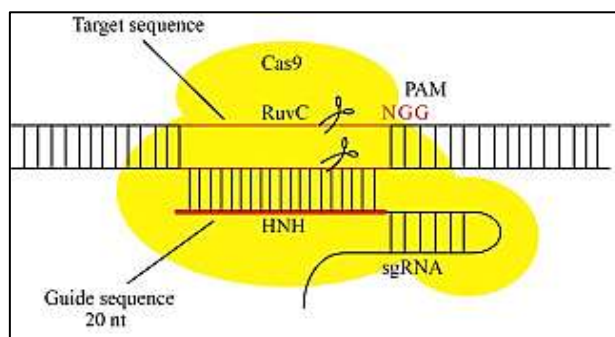
El sistema CRISPR de tipo II se compone de pequeños ARN CRISPR interferentes maduros (crRNA) que se unen a ARN CRISPR transactivantes (tracrRNA) para activar y dirigir a la endonucleasa Cas9 (Bortesi & Fischer, 2015). El proceso de edición genética mediante CRISPR/Cas9 (Figura 1) inicia con el diseño de un ARN guía pequeño (sgRNA) que posee una horquilla con la misma función que el complejo tracrRNA-crRNA, lo que permite generar el emparejamiento de bases entre el sgARN y el ADN diana (S. Shan et al., 2020).

La especificidad de unión está determinada por la secuencia del motivo adyacente al protoespaciador ([PAM]: NGG) que es identificada por el complejo sgRNA-

Cas9 y se encuentra junto la secuencia diana, es decir, si el espaciador es complementario al ADN de interés yuxtapuesto a PAM, la nucleasa Cas9 creará DSB tres nucleótidos aguas arriba de PAM (X. Liu et al., 2017; Qi et al., 2013).

Figura 1

Esquema del mecanismo de edición del genoma por CRISPR/Cas9



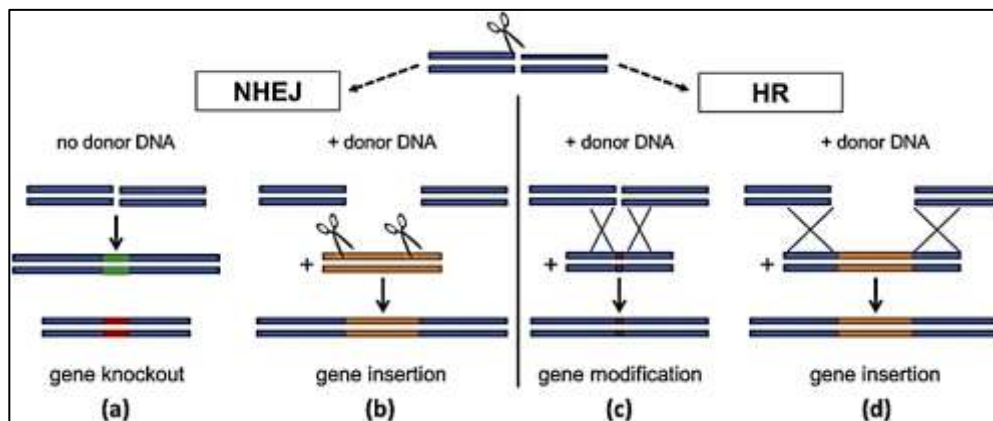
Nota. La endonucleasa Cas9 realiza DSB en el ADN con dos dominios de escisión. RuvC es el dominio que escinde la hebra no homóloga (opuesta al ADN bicatenario) mientras que HNH corta la hebra complementaria al crRNA. Adaptado de Application of CRISPR/Cas9 in plant biology, 7(3), 292–302, Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017), Acta Pharmaceutica Sinica B.

Si la escisión es efectiva, inicia un mecanismo de reparación celular (Figura 2) mediante dos vías: i) la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o ii) la reparación dirigida por homología (HDR) (Zaidi et al., 2020). NHEJ es la más común y se caracteriza por que la unión de los extremos de ruptura genera inserciones o deleciones (indeles) de uno o más nucleótidos (Noman et al., 2016); además, este proceso deriva en la pérdida de función proteica o eliminación del gen (Dalla et al., 2019). Por otro lado, el sistema HDR es el mecanismo de reparación precisa, ya que se activa solo si se

proporciona una plantilla de ADN exógeno, originando knock-in o reemplazo de genes (Zaidi et al., 2020).

Figura 2

Mecanismos de reparación de DSB formadas por nucleasa sitio específico



Nota. NHEJ resulta en a) inserción o delección de nucleótidos para la eliminación de genes o b) inserción de genes mediante un ADN donante. La modificación de genes por HR se da por c) introducción de nucleótidos precisos o d) inserción de genes completos. Tomado de The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. 33(1), 41–52. Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). Biotechnology Advances.

CRISPR/Cas9 en plantas

La edición genómica mediante CRISPR en plantas inicia con la elección del gen de interés ubicado aguas arriba de la secuencia PAM y el diseño de un sgRNA específico y complementario a la secuencia objetivo (Lowder et al., 2016). Posteriormente los constructos de sgRNA-Cas9 se clonan en vectores de expresión binarios (dependiendo si se trata de tecnologías *in vitro* o *in vivo*), y finalmente, se realiza la entrega del sistema a las células vegetales. Las plantas editadas son

identificadas mediante secuenciación y ensayos de restricción incluso en generaciones posteriores (Dalla et al., 2019).

Diseño y evaluación de sgRNA

La construcción de la guía de ARN es un gran desafío debido a que se deben cumplir los criterios de especificidad y eficacia, para ello se usan modelos predictivos y softwares bioinformáticos que identifican los sitios de destino y evalúan los efectos off-target (Cui et al., 2018). Existen varias consideraciones en el diseño que permiten obtener resultados deseados, por ejemplo, se recomienda que la longitud del espaciador en el sgRNA sea de aproximadamente 20 nucleótidos y que no contenga polyT para evitar la terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III; además, se sugiere un alto contenido de GC (50-70%) del gen de escisión para mejorar el emparejamiento de bases (S. Shan et al., 2020).

Las herramientas computacionales han permitido diseñar sgRNA de alta eficiencia y fáciles de usar en múltiples organismos, entre los softwares más comunes para la edición del genoma vegetal se encuentran CRISPR-P, CRISPOR, CRISPR-PLANT y CRISPR-GE (G. Liu et al., 2020).

CRISPOR es una plataforma web que trabaja con más de 417 genomas para la validación de secuencias guía. Este programa se caracteriza por ser de fácil manejo y permitir seleccionar protoespaciadores óptimos en tres pasos: i) ingresar la secuencia a analizar de hasta 2000 pb, ii) elegir un genoma para examinar los sitios fuera del objetivo y iii) elegir la nucleasa y sus variantes (Concordet & Haeussler, 2018). Los resultados se presentan en formato gráfico y de tabla que contienen información sobre las secuencias de los protoespaciadores, sus posiciones con las cadenas de ADN indicadas, sitios PAM y la referencia a los “cebadores de clonación / PCR”. Además, los

sgRNA propuestos se clasifican por especificidad y su eficacia se evalúa mediante dos algoritmos diferentes (Gerashchenkov et al., 2020).

Influencia de variabilidad alélica

Los sistemas CRISPR se basan en el emparejamiento de bases de Watson-Crick para mediar la escisión genómica, por lo tanto, la variación alélica de genes de edición afecta la focalización de sgRNA-Cas9 disminuyendo la homología de secuencia en los sitios dentro y fuera del objetivo (Canver et al., 2018). La presencia de variantes de secuencia pueden afectar los ensayos de varias formas: i) generar desajustes entre los sgRNA y el gen objetivo, ii) atenuar la actividad de Cas9, iii) alterar las secuencias PAM por mutaciones o destrucción de la región y iv) provocar toxicidad celular (Pinello et al., 2016).

El análisis de variabilidad alélica inicia con la identificación del gen objetivo mediante PCR y sigue con el procesamiento mediante herramientas bioinformáticas como Basic Local Alignment Search Tool del NCBI (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Este método permite comparar una región de ADN o proteína con secuencias de bases de datos determinadas y entrega alineamientos con puntajes de identidad y significancia estadística (Marín, 2013). Finalmente, se identifican las zonas conservadas mediante alineamientos múltiples para diseñar las guías del sistema CRISPR (Canver et al., 2018).

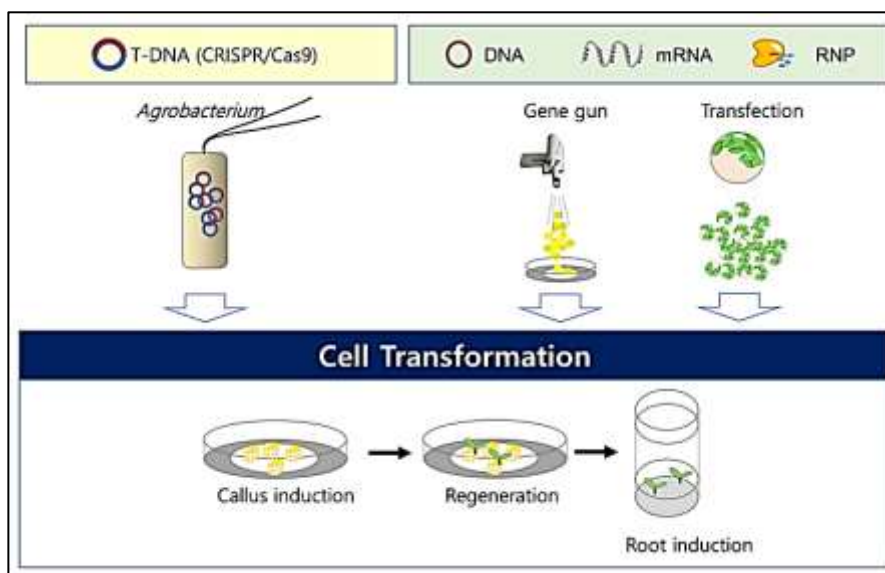
Mecanismos de entrega a plantas

Posterior al diseño y construcción de sgRNA-Cas9 se da la clonación en vectores de expresión de plantas bajo promotores ideales, sin embargo, este paso depende si el sistema es *in vitro* o *in vivo*, pues es recomendable realizar la validación

in vitro primero. Después, los constructos se administran a la planta a través de mecanismos de entrega (Figura 3) mediados por ADN o ARN, o por complejos proteicos de ribonucleótidos (Dalla et al., 2019; Lowder et al., 2016).

Figura 3

Mecanismos de entrega de CRISPR-Cas9 en células vegetales



Nota. La obtención de plantas modificadas con ingeniería genética implica métodos transgénicos o no transgénicos, siendo el mecanismo de ribonucleoproteínas (RNP) el más destacado por su especificidad, eficiencia y no transgénesis. *Tomado de DNA-free genome editing with preassembled CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins in plants. 28, 61–64. Park, J., & Choe, S. (2019). Transgenic Research.*

El sistema de entrega común en plantas es la transformación de casetes de expresión CRISPR/Cas9 mediada por *Agrobacterium* a través de embriones, callos, hojas y órganos florales. Es el método más prometedor debido a la alta eficiencia y

estabilidad de la edición, sin embargo, necesita de un vector binario preciso y su desarrollo genera plantas transgénicas (Lowder et al., 2016; Sandhya et al., 2020).

Los casetes CRISPR/Cas9 pueden administrarse a las células utilizando plásmidos de expresión o complejos ribonucleoproteicos (RNP: [sgRNA-Cas9]) en lugar de ADN transferido (T-DNA) con *Agrobacterium*; para ello, las tecnologías más comunes son: la entrega de partículas con biobalística o la transformación de protoplastos con polietilenglicol (PEG) (Park & Choe, 2019; Sandhya et al., 2020).

La primera consiste en la transferencia de genes usando una “pistola de biobalística” que generalmente utiliza partículas de oro, tungsteno o plata portadoras de RNPs (Svitashev et al., 2015). A pesar de ser un método altamente demandado por la ausencia de un vector binario CRISPR/Cas9, posee limitantes como la necesidad de condiciones estrictamente controladas, menor eficiencia de edición y altos costos (Sandhya et al., 2020).

El uso de protoplastos por otra parte, permite pruebas rápidas y rutinarias. Consiste en la entrega de RNPs o del plásmido con sgRNA-Cas9 a protoplastos incubados con PEG como agente de fusión (Sandhya et al., 2020). Su principal limitante es la difícil regeneración de plantas enteras que aún no se ha logrado en algunas especies; aun así, su ventaja más apetecida es que permite obtener plantas editadas sin ADN extraño (Kuluev et al., 2019).

Edición *genética en Rosa spp.*

La tecnología de secuenciación del genoma ha mejorado considerablemente a lo largo del tiempo, lo que ha permitido obtener información relevante para el mejoramiento de los rasgos de plantas ornamentales. En los últimos años ya se han

reportado la secuencia genómica de *Rosa chinensis*, *Rosa multiflora* y *Rosa roxburghii* (Ahn et al., 2020) y con ello estudios acerca de genes relacionados a características potenciales a optimizar (Nanjaraj et al., 2018).

La edición genética en rosas busca mejorar características físicas para satisfacer la demanda comercial al igual que reducir el uso de agroquímicos durante la cosecha y poscosecha. Los requerimientos para transformación genética vegetal son: i) Sistema de cultivo de tejidos para generar plantas completas y fértiles; ii) Vectores apropiados para la transformación; iii) Protocolo de edición completamente funcional; iv) Herramienta de análisis para detectar transformantes (Arzate et al., 2014).

Enzima fitoeno desaturasa (PDS)

Antes de iniciar con el diseño de la edición genética para la mejora de la especie de interés es necesario una prueba de concepto. La desactivación de un marcador, es decir, un gen que al mutarlo da como resultado un fenotipo que permite una detección visual sencilla, es la más común. Uno de los marcadores más utilizados en plantas es el gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS) debido a que el mutante de pérdida de función tiene un fenotipo albino y tiene la ventaja de ser un gen de copia única en los genomas de las plantas (Dalla et al., 2019; S. Shan et al., 2020).

PDS es una de las enzimas esenciales de la vía de biosíntesis de carotenoides, se encarga de la desaturación del fitoeno incoloro en ζ -caroteno para formar licopeno. Debido a que PDS interactúa con múltiples metabolitos como el ácido giberélico (GA), el ácido abscísico (ABA), la cadena fitol de la clorofila, entre otros; su desactivación afecta la fotosíntesis y producción de carotenoides, lo que conduce al albinismo y lento crecimiento de la planta (Nishitani et al., 2016; Tian, 2015).

A pesar de que CRISPR ya ha sido implementada en plantas ornamentales como orquídeas (Kui et al., 2017) y petunia (Xu et al., 2020; Yu et al., 2020) ,y en especies de la familia de las rosáceas como manzana, pera (Charrier et al., 2019; Osakabe et al., 2018) y fresa (Wilson et al., 2019); no se han reportado estudios en rosas, sobre todo en la desactivación de un marcador; por lo tanto, es necesario implementar pruebas de concepto para demostrar el éxito de edición del genoma de esta planta mediante tecnología CRISPR/Cas9.

Hipótesis

El sistema CRISPR/Cas9 *in vitro* puede ser implementado en *Rosa* spp. para la edición del gen de la enzima fitoeno desaturasa (PDS).

Capítulo III: Materiales y métodos

Zona de estudio

El presente proyecto de titulación fue desarrollado en el laboratorio de diagnóstico molecular IDgen ubicado en la ciudad de Quito en la provincia de Pichincha con una duración de 7 meses desde su planteamiento en marzo 2021 hasta su presentación en septiembre 2021.

Recolección de muestra vegetal

El material vegetal fue proporcionado de la empresa Conectiflor S.A. representantes de International Rose Breeder en Ecuador. La recolección consistió en obtener cuatro variedades de *Rosa* spp. con hojas jóvenes y en desarrollo. Posteriormente, las hojas seleccionadas se cortaron y almacenaron a -20°C por periodos máximos de 20 días.

Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN de hojas jóvenes de rosa se basó en (Ferdous et al., 2012) como un método de extracción de ADN rápido sin nitrógeno líquido a temperatura ambiente. Las soluciones utilizadas corresponden al buffer de extracción, solución CTAB 2X, cloroformo: alcohol isoamílico: fenol, isopropanol y etanol (70%). El proceso no se detallada debido a la ley de confidencialidad manejada por “Royal Flower”

Cuantificación de ADN y análisis de calidad

Se utilizó el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 que entrega valores de concentración y calidad del ácido nucleico. Se utilizó 1 uL de ADN extraído y

se analizaron los valores de concentración (ng/uL) junto con la relación de absorbancia A260/280 y A260/230.

La integridad del ADN se visualizó mediante un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y TBE 1X, se cargaron 5 uL de ADN con 3 uL de buffer de carga *Blue Juice* 10X y la corrida mantuvo las condiciones de 95V y 250 mA durante 35 minutos. El gel resultante se visualizó en un Transiluminador UV.

Amplificación del gen de la enzima PDS por PCR convencional

Elección de la región objetivo

Para que se dé un correcto silenciamiento genético, es importante apuntar al dominio de la proteína objetivo. El dominio proteico de la enzima fitoeno desaturasa fue determinado con el software UniProt (<https://www.uniprot.org/>) con número de identificación Q1KMK7 para *Rosa chinensis*. Posteriormente se eligió la región de silenciamiento. Estudios recientes de (Osakabe et al., 2018) mostraron que la mayor eficiencia de mutación se logró al apuntar al exón 7 del gen PDS de manzana y parcialmente en el exón 6, por lo que se consideraron los exones 5, 6, 7 y 8 para los ensayos.

Diseño de cebadores

Se diseñaron dos pares de primers mediante la herramienta bioinformática Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y su análisis mediante el software OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). El primer par de primers amplifica para los exones 5 y 6 (región 5-6) mientras que el segundo para los exones 7 y 8 (región 7-8). Los criterios utilizados para la elección del set de cebadores fueron: longitud de 18-22 nucleótidos, contenido de CG de 40-60%,

extremo 3' con C o G, temperatura de fusión (T_m) entre 60°C y 75°C con una diferencia de 5°C entre sí, extremos 3' de los primers no complementarios para evitar la producción de primers-dimer, y energía de Gibbs entre -1.6 a -9.0 kcal/mol. La especificidad de los cebadores se evaluó mediante Primer-Blast.

Amplificación de ADN

La amplificación del gen de la enzima PDS se realizó mediante PCR convencional utilizado *2X PCR Taq Master Mix with Dye* junto con los reactivos mostrados en la Tabla 1. Además, se compararon los resultados con el diseño *in silico* realizado en la plataforma web Benchling (<https://benchling.com>)

Tabla 1

Componentes para una reacción de PCR convencional

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen de trabajo
2X PCR Taq Master Mix with Dye	2X	1X	12,5 uL
Primer Forward	10 uM	1 uM	1 uL
Primer Reverse	10 uM	1 uM	1 uL
ADN	-	100-200 ng/ul	1 uL
Agua libre de nucleasas	-	-	8,5 uL
		Volumen final	25 uL

Nota: Basado en User Guide: 2X PCR Taq Master Mix with Dye. Applied Biological Materials Inc., 2019

Las condiciones del programa del termociclador se muestran en la Tabla 2. Para determinar la temperatura de hibridación (T_a) óptima de los pares de primers, se realizó

un gradiente de temperatura en el programa en base a la Tm de los cebadores diseñados. Finalmente se visualizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% TBE 1X con bromuro de etidio y un marcador de 100 pb, con condiciones de 95V y 250 mA durante 35 minutos. El gel resultante se visualizó en un Transiluminador UV.

Tabla 2

Programación del termociclador para PCR del ADN objetivo

Etapa	Temperatura (C°)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	95	180
Desnaturalización	95	30
Hibridación	Gradiente	30
Extensión	72	60
Extensión final	72	300

Nota: Basado en User Guide: 2X PCR Taq Master Mix with Dye. Applied Biological Materials Inc., 2019

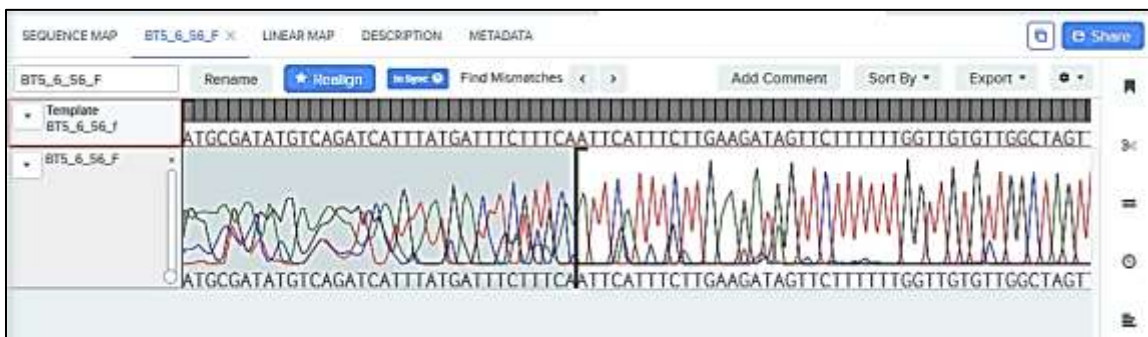
Análisis de variabilidad alélica

Los amplicones obtenidos en la PCR convencional fueron secuencias mediante tecnología Sanger para confirmar las secuencias de nucleótidos y diseñar los ARN guía. El análisis de secuencias se realizó a través de la Benchling, primero se hizo la limpieza de los extremos 5' y 3' de baja calidad de las secuencias forward y reverse, se identificaron las posibles regiones indicadores de heterocigosidad (dobles picos) y se construyó una secuencia consenso en la que se identificaron los exones de interés (Figura 4). Una vez obtenida la secuencia consenso por variedad de rosa, se realizó el alineamiento con el software Sequence Identity And Similarity (SIAS) para identificar el grado de similitud. Finalmente, se generó una secuencia consenso general para cada

región de exones, se alinearon en BLAST para identificar homología con la base de datos y se identificaron las regiones conservadas para el diseño de los ARN guías.

Figura 4

Limpieza de extremos de secuencia para el gen de enzima PDS



Nota. Secuencia forward del gen PDS correspondiente a una variedad de *Rosa* spp. mediante el software Benchling.

Edición del gen de la enzima PDS con CRISPR/Cas9 *in vitro*

Diseño de ARN guías

El diseño del sgRNA para cada exón se realizó con base en la secuencia consenso general con la identificación de ubicación de los exones. Se utilizó la plataforma web CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) con el organismo *Rosa chinensis* (faRoseObdh1) y la endonucleasa Cas9 como datos de entrada. El sgRNA se seleccionó con base en los criterios de: altas puntuaciones predictivas (>95), elevados valores de especificidad (>40) y, baja evaluación fuera de marco y efectos off-target. Además, se evaluó la presencia de la región PAM en la secuencia consenso y la región entregada por el software.

Transcripción in vitro de sgRNA

La transcripción del sgRNA se llevó a cabo con el Kit *Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription* (Takara Bio USA, Inc.). Primero se realizó la amplificación por PCR de la plantilla de sgRNA utilizando los reactivos de la Tabla 3. Para ello se colocaron las reacciones en un termociclador con el programa recomendado en el kit. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, TBE 1X y un marcador de 100 pb con condiciones de 95V y 250 mA durante 35 minutos. El gel resultante se visualizó en un Transiluminador UV.

Tabla 3

Componentes de amplificación de sgRNA para una reacción

Reactivo	Cantidad
PrimeSTAR Max Premix (2X)	12.5 uL
Plantilla Scaffold Guide-it	1 uL
Cebador sgRNA diseñado	0.5 uL
Agua libre de RNasas	11 uL
Volumen final	25 uL

Nota: Basado en Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems User Manual

El producto de amplificación se utilizó como molde para el ensayo de transcripción. Se colocaron los reactivos de la Tabla 4 en tubo y se incubó en Baño María a 37°C por 4 horas, luego se agregaron 2 uL de ADNasa y se incubó a la misma temperatura por 15 minutos. Finalmente, el sgRNA transcrito se almacenó a -20°C hasta su uso posterior

Tabla 4

Componentes de la transcripción de sgRNA para una reacción

Reactivo	Cantidad
sgRNA amplificado	5
Buffer de transcripción <i>in vitro</i>	7
Guide-it Polimerasa T7 Mix	3
Agua libre de RNasas	5
Volumen final	20 uL

Nota: Basado en Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems User Manual

Purificación in vitro de sgRNA transcrito

Para la purificación del sgRNA se utilizó el Kit *Guide-it™ IVT RNA Clean-Up* (Takara Bio USA, Inc.). Se agregaron 78 µL de agua libre de ARNasa al sgRNA transcrito y se transfirió el total a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, posteriormente se colocaron 30 µL de tampón de unión IVT y se agitó durante 5 segundos en vórtex. Se añadieron a la mezcla 130 µL de isopropanol y se volvió a agitar. Más adelante, se utilizó una columna de centrifugación de limpieza de ARN IVT en un tubo de recolección y se cargó la muestra por inversión. Se centrifugó a 11000 xg durante 30 segundos a temperatura ambiente y se eliminó el flujo continuo.

La columna se colocó nuevamente en un tubo de recolección y se adicionaron 600 µL de tampón de lavado IVT, después se centrifugó a 11000 xg durante 30 segundos a temperatura ambiente y se desechó el flujo continuo. Finalmente, se empleó un nuevo tubo de corrección, se añadieron 250 µL de tampón de lavado IVT y se centrifugó por 2 minutos. Para diluir el sgRNA se colocó la columna en un nuevo

tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se añadieron 15 µL de agua libre de RNasa y se centrifugó a 11000 xg durante 1 min a temperatura ambiente. La pureza de la guía se analizó utilizando 1 uL de la muestra en el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000.

Ensayo de escisión in vitro con CRISPR/Cas9

El screening de sgRNA y escisión del gen objetivo se realizó con el *Kit Guide-it sgRNA Screening* (Takara Bio USA, Inc.). Se inició con la amplificación del gen de la enzima PDS utilizando los reactivos mostrados en la Tabla 5 para una reacción y el programa de la Tabla 6. Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio TBE 1X y un marcador de 100 pb con condiciones de 95V y 250 mA durante 35 minutos. El gel resultante se visualizó en un Transiluminador UV.

Tabla 5

Componentes de amplificación del gen PDS

Reactivo	Cantidad
2X TERRA PCR direct buffer (Mg ²⁺ , dNTP)	25 uL
Primer Forward	1 uL
Primer Reverse	1 uL
Terra PCR Direct Polymerase Mix (1.25 U/µl)	1 uL
Agua libre de RNasas	20 uL
ADN (100-200 ng/uL)	1 uL
Volumen final	50 uL

Nota: Basado en Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems User Manual

Tabla 6

Programación del termociclador para PCR del ADN objetivo

Etapa	Temperatura (C°)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	98	120
Desnaturalización	98	10
Hibridación	62	15
Extensión	72	60
Extensión final	72	60

Nota: Basado en Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems User Manual

El ensayo de escisión *in vitro* inicia con la formación del complejo sgRNA-Cas9. Se incorporaron 1 uL del sgRNA purificado con 0.5 uL de Guide-it Recombinant Cas9 Nuclease (500 ng/μl), posteriormente, se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos en un termociclador. Mas adelante se colocaron los reactivos de la Tabla 7 en un tubo de PCR y se incubó en un termociclador de acuerdo a las recomendaciones del kit. El producto de PCR corresponde al amplicón generado en el paso anterior. La solución fue incubada con 3 uL de RNAsa a 37°C por 30 min para eliminar los restos de sgRNA

El análisis de escisión por la Cas9 del gen PDS se realizó en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio y TBE 1X con condiciones de 85V y 250 mA durante 45 minutos. El gel resultante se visualizó en un Transiluminador UV. Además, se comparó la eficiencia de corte con el diseño *in silico* con el software Benchling.

Tabla 7*Componentes para ensayo de escisión*

Reactivo	Cantidad
Producto PCR	5 uL
15X Cas9 Reaction Buffer	1 uL
15X BSA	1 uL
Agua libre de nucleasas	6.5 uL
sgRNA-Cas9	1.5 uL
Volumen final	15 uL

Nota: Basado en Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems User Manual

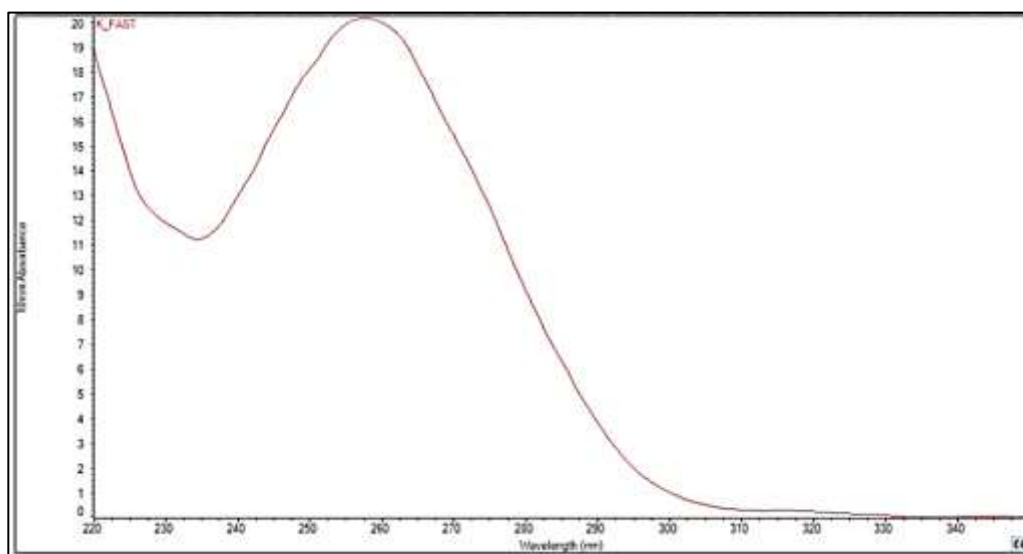
Capítulo IV: Resultados

Extracción y cuantificación de ADN

Para el presente proyecto de investigación se utilizaron cuatro variedades de *Rosa* spp. nombradas como K, CB, SB y BT. No se colocaron los nombres de las especies debido a la ley de confidencialidad manejada por “Royal Flower”. Se extrajo el ADN de todas las variedades obteniendo valores de A260/280 de 1.7-2.1, A260/230 de 1.5-1.9 y una concentración media de 200-500 ng/uL. En la Figura 5 se muestra el espectro de cuantificación obtenido para una de las variedades de rosa.

Figura 5

Espectro de cuantificación de ADN para la variedad K



Nota. El eje Y representa la longitud de onda (nm) y el eje X la absorbancia de la muestra. Imagen generada en software NanoDrop 2000

Amplificación del gen de la enzima PDS por PCR convencional

Elección de la región objetivo

Se determinó el dominio de la región PDS objetivo (Figura 6) con 441 aminoácidos; dentro de este, se escogió la zona de edición genética con base en los estudios anteriores de la enzima PDS en manzana, pera (Charrier et al., 2019; Osakabe et al., 2018) y fresa (Wilson et al., 2019).

Figura 6

Dominio proteico de la enzima fitoeno desaturasa de Rosa chinensis

10	20	30	40	50
MSQWACVSAT	NLSYQANLIN	TQNPQTTPRY	DALSFHGSEI	VARNFGFLSS
60	70	80	90	100
QATTSIGKRL	RKGALPLKVV	CVDYPRPELD	NTVNFLEAAL	LSSSFRASSR
110	120	130	140	150
PAKPLKVIVIA	GAGLAGLSTA	KYLADAGHKP	ILLEARDVLG	GKIAAWKDKD
160	170	180	190	200
GDWYETGLHI	FFGAYPNIQN	LFGELGIDDR	LQWKEHSMIF	AMPNKPGEFS
210	220	230	240	250
RFDFPEVLPA	PLNGIWAALK	NNEMLTWPEK	VKFAIGLVPA	ILGGQAYVEA
260	270	280	290	300
QDGLTVKEWM	RKQGIPDRVT	TEVFIAMSKA	LNFINPELS	MQCILIALNR
310	320	330	340	350
FLQEKHGSKM	AFLDGSPPER	LCQPIVDHIQ	SLGGEVRLNS	RLQKIELNND
360	370	380	390	400
GTVKSFVLQN	NSVIEADAYV	SASPVDIFKL	LVPENWKEIP	YFKKLDKLVG
410	420	430	440	450
VPVINVHIWF	DRKLNKYDH	LLFSRSPLLS	VYADMSVTCK	EYYPNQSML
460	470	480	490	500
ELVFAPAEW	ISRSSEIID	ATLKEKAKLF	PDEIAADQSK	AKILKYHVVK
510	520	530	540	550
TPRSVYKTIP	DCEPCRPLQR	SPLEGFYLTG	DYTKQKYLAS	MEGAVLSGKL
560	570			
CAQAI	VQDYE	LLVARGQKRL	AEAGAR	

Nota. La zona amarilla corresponde al dominio funcional de la proteína y la zona verde representa a la zona de edición escogida. Tomado de la plataforma UniProt.

Diseño de cebadores

Con base en los criterios termodinámicos y características presentados en la sección 3.4.2. para el diseño y selección de cebadores (Tabla 9), se obtuvieron las secuencias de los primers (se mantienen bajo reserva de confidencialidad). Además, la PCR *in silico* generó productos de amplificación mostrados en la Tabla 8 para cada región.

Tabla 8

Primers diseñados para la amplificación del gen PDS de Rosa spp.

Nombre	Tamaño de amplicón
PDS_ROSA_E5,6 F	1171 pb
PDS_ROSA_E5,6 R	
PDS_ROSA_E7,8 F	979 pb
PDS_ROSA_E7,8 R	

Nota: El tamaño de producto corresponde al diseño *in silico* en la plataforma Benchling

Tabla 9

Características termodinámicas de los primers utilizados

Nombre	Tm (°C)	CG (%)	Horquillas	Heterodímero		Autodímero
				ΔG (Kcal/mol)		
PDS_ROSA_E5,6 F	63.3	42.9	-0.63	-5.02	-4.67	
PDS_ROSA_E5,6 R	64.6	52.6	-0.49	-4.88	-3.9	
PDS_ROSA_E7,8 F	53.1	42.9	-0.7	-5.02	-5.24	
PDS_ROSA_E7,8 R	52.5	42.9	-0.28	-5.02	-4.67	

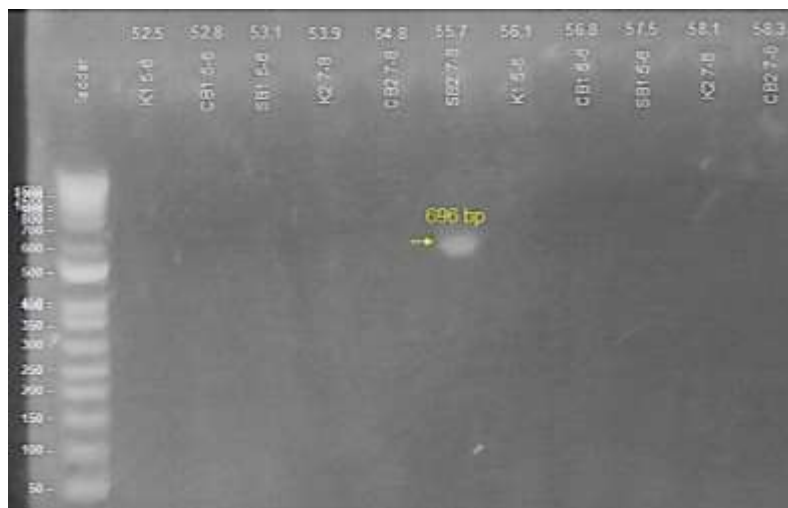
Nota: Obtenido de la plataforma web OligoAnalyzer

Amplificación de ADN

Para determinar la temperatura de unión (T_a) de los primers se realizó un gradiente de temperatura de 52.5°C a 58.3°C en base a la temperatura melting (T_m) de los mismos. Se identificó que la temperatura adecuada para los cebadores PDS_ROSA_E7,8 F y PDS_ROSA_E7,8 R de 55.7°C (Figura 7), sin embargo, los primers de la región 5-6 no generaron producto a esas temperaturas. Se realizó un nuevo gradiente de temperatura de 54.8°C a 63.7°C, obteniendo una banda definida a T_a de 60°C para los primers PDS_ROSA_E5,6 F y PDS_ROSA_E5,6 R.

Figura 7

Amplificación del gen PDS mediante gradiente de temperatura



Nota. Visualización de gel de agarosa 1% con bromuro de etidio TBE 1X con marcador molecular BioLit ProxiO 1kb DNA Ladder. Imagen procesada en el software Image Lab.

Finalmente, se realizó la PCR con las condiciones de la Tabla 2. En la Tabla 10 se presentan los tamaños de productos de PCR y en la Figura 8 los amplicones generados para la región 7-8.

Tabla 10*Productos de PCR para el gen PDS*

Par de primers	Variedades de rosa			
	K	CB	SB	BT
PDS_ROSA_E5,6 F PDS_ROSA_E5,6 R	1271 pb	1439 pb	1419 pb	1271 pb
PDS_ROSA_E7,8 F PDS_ROSA_E7,8 R	932 pb	919 pb	912 pb	912 pb

Nota: Los fragmentos obtenidos tienen tamaños similares a los analizados en el diseño *in silico* de la Tabla 8

Figura 8*Amplificación del gen PDS en los exones 7-8*

Nota. Visualización de gel de agarosa 1% con bromuro de etidio TBE 1X con marcador molecular 100bp Opti-DNA Marker. Imagen procesada en el software Image Lab.

Análisis de variabilidad alélica

Las secuencias consenso obtenidas de cada región por variedad de rosa se mantienen en confidencialidad. El análisis de variabilidad entregó un resultado promedio de identidad de 97.5% para la región 5-6 y de 84.78% para la región 7-8. De la misma forma, los coeficientes de similitud por pares de secuencias son superiores a 0.90 para la región 5-6, sin embargo, para la región 7-8 los coeficientes tienen valores de 0.59 a 0.88, siendo el alineamiento de las rosas BT con K el más bajo. La Figura 9 y Figura 10 presentan el detalle de resultados de identidad y similitud para cada región.

Figura 9

Resultados de identidad y similitud para la región 5-6

	CB5_6	K5_6	BT5_6	SB5_6
CB5_6	1	0.95	0.97	0.95
K5_6	0.92	1	0.92	0.91
BT5_6	0.96	0.94	1	0.93
SB5_6	0.96	0.94	0.95	1

GLOBAL SIMILARITY STATS				
min	=	0.91		
max	=	0.97		
mean	=	0.941666666666667		
stddev	=	0.0177169096878911		

	CB5_6	K5_6	BT5_6	SB5_6
CB5_6	100%			
K5_6	97.62%	100%		
BT5_6	98.54%	96.92%	100%	
SB5_6	97.69%	96.92%	97.28%	100%

IDENTITY STATS				
min	=	96.92		
max	=	98.54		
mean	=	97.495		
stddev	=	0.555750243664665		

Nota. Los valores de similitud (derecha) se presentan como coeficientes

El alineamiento de las secuencias consenso de la región 5-6 y región 7-8 (mediante BLAST entregó resultados de homología para el gen de la enzima fitoeno desaturasa de tres especies diferentes de rosa de la base de datos y más de 20 resultados para otras plantas. Para la región 5-6 se obtuvieron valores de identidad de 100%, 99.36% y 98.73% con *Rosa chinesis*, *Rosa multiflora* y *Rosa hybrida* de la enzima PDS, respectivamente. De la misma forma, los alineamientos con la secuencia

consenso de la región 7-8 generaron valores de identidad de 99.07% para *Rosa chinensis*, *Rosa multiflora*. Estos resultados confirman la amplificación del gen de interés y permiten continuar con los ensayos CRISPR/Cas9.

Figura 10

Resultados de identidad y similaridad para la región 7-8

K7-8	100%			
BT7-8	80.14%	100%		
CB7-8	91.24%	78.24%	100%	
SB7-8	84.68%	92.26%	82.15%	100%
K7-8	BT7-8	CB7-8	SB7-8	
IDENTITY STATS				
min	= 78.24			
max	= 92.26			
mean	= 84.785			
stddev	= 5.30581363537519			

	K7-8	BT7-8	CB7-8	SB7-8
K7-8	1	0.71	0.88	0.79
BT7-8	0.59	1	0.65	0.8
CB7-8	0.79	0.7	1	0.76
SB7-8	0.72	0.88	0.78	1
GLOBAL SIMILARITY STATS				
min	= 0.59			
max	= 0.88			
mean	= 0.754166666666667			
stddev	= 0.0821034239372648			

Nota. Los valores de similaridad (derecha) se presentan como coeficientes

CRISPR/Cas9 *in vitro* del gen de la enzima PDS

Diseño de ARN guías

Los sgRNA diseñados se mantienen bajo confidencialidad, sin embargo, los criterios utilizados para selección se presentan en la Tabla 11 junto con el análisis de puntuaciones predictivas, especificidad, eficiencia y valores fuera de marco; las guías se diseñaron en las regiones conservadas del análisis de variabilidad alélica. Los elementos fuera de objetivo fueron analizados en base al número de desajustes, es decir, el sgRNA_5 posee cinco efectos off target con cuatro desajustes en el genoma de *Rosa chinensis*. Los sgRNA escogidos presentan efectos fuera de objetivo en su mayoría en regiones intergénicas e intrónicas, sin embargo, en el caso del sgRNA_5 un

off-target con cuatro desajustes corresponde a un exón del cromosoma 6 de *Rosa chinensis* perteneciente a un gen no caracterizado.

Por otra parte, para sgRNA_6 se tienen dos off-target, de nueve, con cuatro desajustes correspondientes a exones del cromosoma 7 y cromosoma 3 de las proteínas extensina y UPF0481 At3g47200, respectivamente. De forma similar, el sgRNA_7 posee dos off-target, de diez, el primero con tres desajustes en el cromosoma 5 para la proteína que contiene repeticiones de anquirina NPR4, y el segundo con cuatro desajustes para el cromosoma 7 para una proteína no identificada. Finalmente, el sgRNA_8 no posee efectos off-target en regiones codificantes.

Tabla 11

sgRNA diseñados para ensayos in vitro CRISPR/Cas9 en rosas

Nombre	Especificidad	Eficiencia	Efectos off target
sgRNA_5	99	63	0-0-0-0-5
sgRNA_6	98	45	0-0-0-0-9
sgRNA_7	99	69	0-0-0-2-8
sgRNA_8	98	46	0-0-0-0-9

Nota: Los valores de especificidad y eficiencia se presentan en porcentaje

Las secuencias diseñadas fueron modificadas para formar un primer de PCR de 56 a 58 nt que posee: i) cuatro bases CCTC seguidas de la secuencia promotora de T7 en el extremo 5', ii) sitio de inicio de la transcripción de 0-2 residuos de guanina, iii) sgRNA diseñado y, iv) secuencia scaffold de 15 nt en el extremo 3'. En la Tabla 12 se presentan los cebadores utilizados para los ensayos de transcripción y escisión de CRISPR/Cas9 *in vitro* manteniendo las secuencias sgRNA bajo reserva.

Tabla 12

Cebadores para la transcripción in vitro de sgRNA

Nombre	Secuencia 5'-3'
sgRNA_5_F	CCTCTAATACGACTCACTATAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGTTTAAGAGCTATGC
sgRNA_6_F	CCTCTAATACGACTCACTATAGGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGTTTAAGAGCTATGC
sgRNA_7_F	CCTCTAATACGACTCACTATAGGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGTTTAAGAGCTATGC
sgRNA_8_F	CCTCTAATACGACTCACTATAGGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGTTTAAGAGCTATGC

Nota: Los colores representan las modificaciones del sgRNA. Promotor T7 (morado), residuos de guanina (rojo), sgRNA (verde), scaffold (anaranjado)

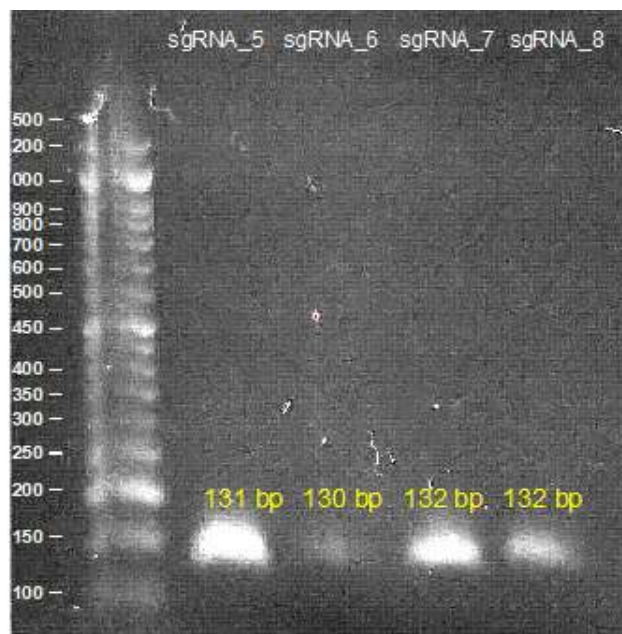
Transcripción, purificación y escisión in vitro CRISPR/Cas9

La amplificación de sgRNA para cada exón generó fragmentos de aproximadamente 130 pb ideales para la transcripción *in vitro* de la guía de ARN. En la Figura 11 se presentan las plantillas de sgRNA generadas por PCR correspondiente a la región 5-6 (carriles 1 y 2) y región 7-8 (carriles 3 y 4)

Posterior a la transcripción de sgRNA de cada exón, se realizó la purificación de las guías obteniendo los valores de concentración y calidad presentados en la Tabla 13. Estos indicadores de pureza por absorbancia permiten utilizar los transcritos para los ensayos de escisión *in vitro* debido a que mantienen los valores de 1.8-2.5 para A260/280 y A260/230.

Figura 11

Plantillas de sgRNA amplificado para cada exón



Nota. Gel de agarosa 2% con bromuro de etidio TBE 1X con marcador molecular 100bp Opti-DNA Marker. Imágenes procesadas en el software Image Lab.

Tabla 13

Cuantificación de transcritos sgRNA purificados

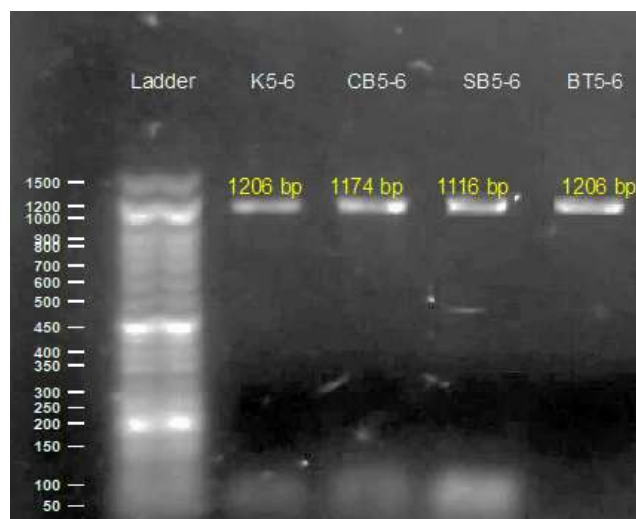
Nombre	Concentración (ng/uL)	A260/280	A260/230
sgRNA_5	800.5	2.17	1.96
sgRNA_6	955.6	2.14	2.44
sgRNA_7	1002	2.18	2.25
sgRNA_8	855.7	2.14	1.91

Nota: Valores obtenidos del software NanoDrop 2000

La amplificación de las regiones 5-6 y 7-8 del gen de interés entregó valores similares a los obtenidos como productos de PCR de la sección 4.2.3. (Tabla 10). Para la región 5-6 se consiguieron amplicones de 1166-1206 bp, mientras que para los exones 7-8 los amplicones formados tenían un tamaño de 915-932 bp. La Figura 12 presenta los amplicones formados de la primera región, la visualización de una sola banda clara permite una correcta evaluación posterior de escisión por la Cas9.

Figura 12

Amplificación de la región 5-6 del gen PDS de las variedades de rosa



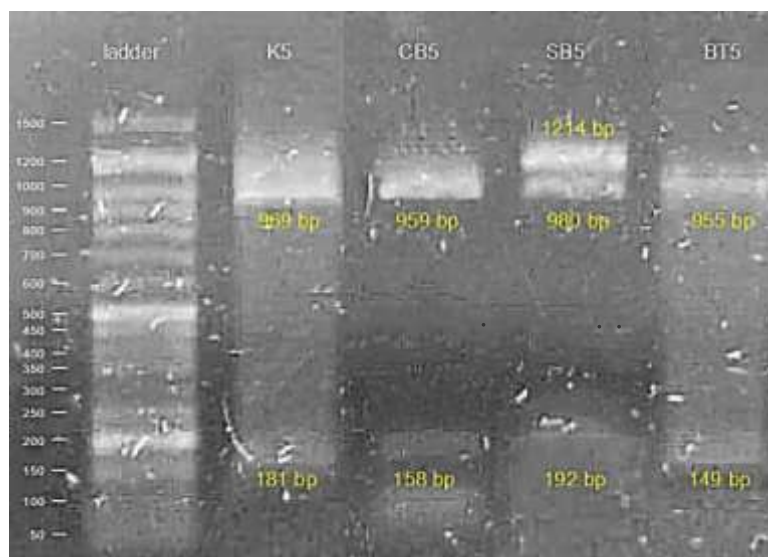
Nota. Geles de agarosa 1% con bromuro de etidio TBE 1X con marcador molecular 100bp Opti-DNA Marker. Imagen procesada en el software Image Lab.

El ensayo de escisión mediante CRISPR/Cas9 *in vitro* entregó dos bandas definidas por cada exón tratado. Las Tabla 14 -Tabla 17 presentan el tamaño de secuencias generadas y su comparación con los fragmentos del diseño *in silico*; se observa que los tamaños son similares por lo que se considera un ensayo exitoso; además, el fragmento de control de la Figura 16 incluido en el kit de tiene un tamaño de

614 pb, formó dos fragmentos de 350 bp y 264 bp al ser escindido por sgRNA-Cas9 lo que asegura la ausencia de contaminación en el ensayo.

Figura 13

Ensayo de escisión in vitro mediante CRISPR/Cas9 del exón 5



Nota. Geles de agarosa 1% con bromuro de etidio TBE 1X con marcador molecular 100bp Opti-DNA Marker. Imagen procesada en el software Image Lab

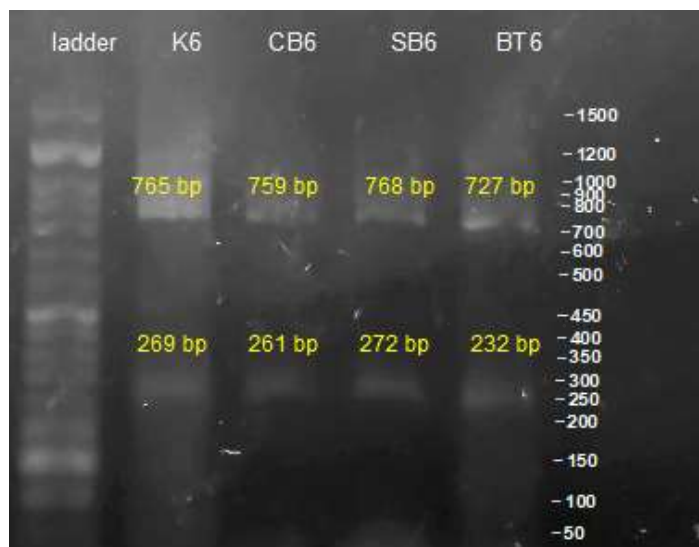
Tabla 14

Tamaño de fragmentos generados para el exón 5

Variedad de rosa	<i>In vitro</i>		<i>In silico</i>	
	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 1	Fragmento 2
K	969 pb	181 pb		
CB	959 pb	158 pb		
SB	980 pb	192 pb	937 pb	113 pb
BT	955 pb	149 pb		

Figura 14

Ensayo de escisión in vitro mediante CRISPR/Cas9 del exón 6



Nota. Geles de agarosa 1% con bromuro de etidio TBE 1X con marcador molecular 100bp Opti-DNA Marker. Imagen procesada en el software Image Lab

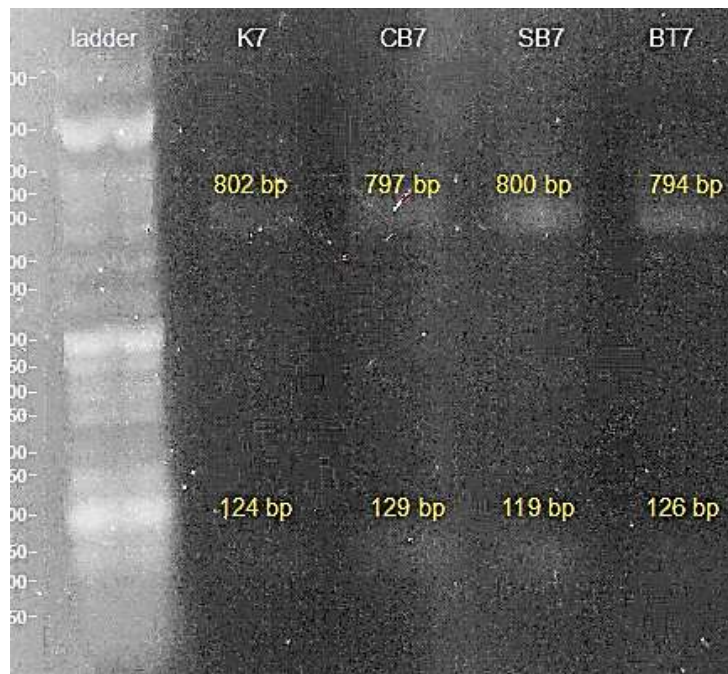
Tabla 15

Tamaño de fragmentos generados para el exón 6

Variedad de rosa	<i>In vitro</i>		<i>In silico</i>	
	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 1	Fragmento 2
K	765 pb	269 pb		
CB	759 pb	261 pb		
SB	768 pb	272 pb	787 pb	263 pb
BT	727 pb	232 pb		

Figura 15

Ensayo de escisión in vitro mediante CRISPR/Cas9 del exón 7



Nota. Geles de agarosa 1% con bromuro de etidio TBE 1X con marcador molecular 100bp Opti-DNA Marker. Imagen procesada en el software Image Lab

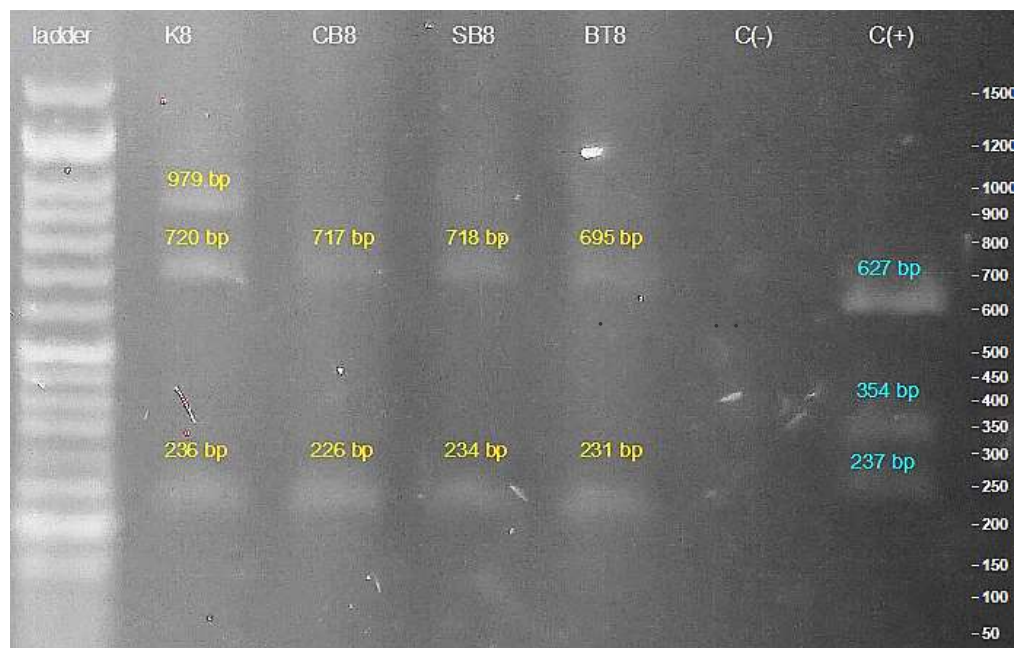
Tabla 16

Tamaño de fragmentos generados para el exón 7

Variedad de rosa	<i>In vitro</i>		<i>In silico</i>	
	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 1	Fragmento 2
K_5	802 pb	124 pb		
CB_5	797 pb	129 pb		
SB_5	800 pb	119 pb	756 pb	101 pb
BT_5	794 pb	126 pb		

Figura 16

Ensayo de escisión in vitro mediante CRISPR/Cas9 del exón 8



Nota. Geles de agarosa 1% con bromuro de etidio TBE 1X con marcador molecular 100bp Opti-DNA Marker. Carriles 6 y 7 representan los controles del ensayo general. Imagen procesada en el software Image Lab

Tabla 17

Tamaño de fragmentos generados para el exón 8

Variedad de rosa	<i>In vitro</i>		<i>In silico</i>	
	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 1	Fragmento 2
K_5	720 pb	236 pb		
CB_5	717 pb	226 pb	656 pb	201 pb
SB_5	718 pb	234 pb		
BT_5	695 pb	231 pb		

Capítulo V: Discusión

Análisis del gen de la enzima PDS en *Rosa* spp.

La edición genética en plantas se basa en la existencia de la secuencia del genoma completo. El primer paso es el aislamiento de los ácidos nucleicos para su análisis, sin embargo, su obtención en plantas y especialmente en rosáceas, se ve comprometida por contaminantes como metabolitos secundarios, degradación por endonucleasas, polisacáridos y polifenoles (Kumar et al., 2012). El ADN resultante para las cuatro variedades de rosas obtuvo valores A260/280 aceptables según Aguilar et al. (2016), sin embargo, los valores 260/230 son inferiores a 2.0, por lo que es posible la presencia de proteínas, sales o fenoles como contaminantes mínimos.

La amplificación del gen de interés y análisis de su variabilidad alélica entre especies se dividió en regiones exónicas debido a que el objetivo de la prueba de concepto con CRISPR/Cas9 es alterar la función génica de la enzima PDS; para ello se recomienda utilizar varias sgRNA que apunten a diversas regiones codificantes y permitan evaluar su eficiencia posteriormente (Concordet & Haeussler, 2018). Se obtuvieron valores de identidad de 97.5% y 84.78% considerados aceptables para análisis de filogenia y función proteica, además de validar la presencia de homología entre las secuencias (Bardoli, 2006).

Los porcentajes de variación de 1.5% y 15.22% podrían ser resultado de errores de secuenciación o heterocigosis considerando la poliploidía presente en rosas (Uitdewilligen et al., 2013), sin embargo, es complicado estimar mediante estadística simple de secuencias la presencia de heterocigosis, por lo que es necesario aplicar estudios de población y variantes polimórficas donde se descarten posibles errores de secuenciación (Bryc et al., 2013; Canver et al., 2018)

El alineamiento de secuencias entre las rosas estudiadas permitió encontrar las regiones conservadas del gen PDS para el diseño de sgRNA en los exones 5, 6, 7 y 8. De acuerdo a la investigación de Osakabe et al. (2018) existe una mayor eficiencia de mutación en el exón 7 y parcial en el exón 6 del gen PDS en manzana, por lo que se espera que la modificación de los cuatro exones tratados generen cambios fenotípicos en las variantes de rosas en estudios posteriores.

CRISPR/Cas9 in vitro del gen de la enzima PDS

En el presente trabajo se llevó a cabo la validación del sistema CRISPR/Cas9 en el genoma de cuatro variedades de rosas mediante técnicas *in vitro*. La confirmación del éxito de CRISPR/Cas9 con la formación de complejos ribonucleoproteicos (sgRNA-Cas9) no necesita estudios previos en líneas celulares, es suficiente con ensayos de escisión *in vitro* para validar la edición del genoma en varios organismos (Mehravar et al., 2019) por lo que este ensayo es la base para la aplicación de fitomejoramiento basado en CRISPR/Cas9 en rosas.

Diseño de ARN guías

La elección de los sgRNA por CRISPR se basó en los valores independientes de especificidad, eficiencia y efectos off-target, en ese orden de importancia. El primer criterio define cuanto puede un sgRNA generar la escisión fuera de la secuencia diana (Concordet & Haeussler, 2018), por lo tanto, debido a que las guías escogidas poseen altos valores de especificidad (>90%), los efectos off-target tendrían impactos mínimos en ensayos *in vivo*.

Por otro lado, la eficiencia predice que tan bien puede cortarse el gen objetivo (Concordet & Haeussler, 2018). Para este parámetro se utilizó la puntuación de Moreno-Mateos (2016) debido a que es la ideal en la expresión *in vitro* de las guías con

el promotor T7. A pesar de tener porcentajes de eficiencia menores al 70%, el resultado de escisión *in vitro* fue exitoso, sin embargo, es necesario de estudios *in vivo* para confirmar su aplicación en rosas.

Una de las mayores limitaciones del sistema CRISPR/Cas9 es la mutagénesis fuera de objetivo que se genera como resultado de secuencias homólogas en loci diferentes (baja especificidad). Los sgRNA escogidos poseen efectos off-target de mínimo tres desajustes de pares de bases; se conoce que mientras más desajustes tenga la secuencia fuera de objetivo en relación con la guía de ARN, es menos probable que se afecte el sistema CRISPR (Concordet & Haeussler, 2018).

El análisis de los efectos fuera de objetivos indicó que tres proteínas se verían posiblemente afectadas de forma no deseada. Para el sgRNA_6 es probable un silenciamiento en regiones de la superfamilia de las extensinas que son proteínas estructurales encargadas del mantenimiento de la pared celular; sin embargo al tener cuatro desajustes la secuencia diana con la guía, su complementariedad es baja y el riesgo de la edición genética en dicha región se reduce considerablemente (Lampport et al., 2011; Wada et al., 2020).

Otra proteína involucrada en los efectos off-target del sgRNA_6 es la At3g47200, encargada del mantenimiento integral de la membrana plasmática de las raíces, tronco, flores y polen (Prince et al., 2015). De la misma forma que el anterior péptido, su silenciamiento es poco probable debido a los cuatro desajustes en su secuencia nucleica con la guía de ARN. Finalmente, el sgRNA_7 posee un efecto off-target relacionado con la proteína que contiene repetición de anquirina (ANK), encargada de la aclimatación de la planta, desarrollo celular, fisiología y diferenciación del cloroplasto (López et al., 2020; Sharma & Pandey, 2016). Debido a que solo existen

tres desajustes del gen fuera de objetivo con el sgRNA_7, es probable que en estudios *in vivo* se afecte la codificación de la proteína, sin embargo, al ser la rosa una especie poliploide que posee genes con copias homólogas en todo el genoma, el knockout de un solo gen en un determinado loci no causa un cambio fenotípico sustancial (Q. Shan & Wang, 2014), por lo que se presume que el efecto de silenciamiento no sea alto.

Ensayo de escisión in vitro

Los complejos ribonucleoproteicos de sgRNA junto con la Cas9 generaron ensayos de escisión exitosos para todos los exones del gen objetivo. El corte por la nucleasa fue visualizado en geles de electroforesis siendo positivos los experimentos que formaron dos bandas de ADN. Para el exón 5 de la variedad SB, se observa una banda extra de 1214 pb, de la misma forma sucede con la variedad K del exón 8 y el fragmento control, donde se visualiza una banda de 979 pb y 627 pb respectivamente. De acuerdo con los ensayos de Takara Bio USA Inc., el volumen de producto de PCR utilizado para la escisión *in vitro* no debe exceder 100-250 ng/uL porque podría inhibir la actividad de la Cas9 o generar fragmentos no seccionados, por lo tanto, es probable que las bandas mencionadas correspondan a restos del amplicón utilizado en los ensayos que no fueron tratados por la Cas9.

Otra posibilidad es la presencia de copias homólogas de PDS por la característica de poliploidía en las rosas, por lo tanto, la escisión de la Cas9 en locus determinado no engloba las copias simultáneas generando las bandas de amplicones no seccionados en el gel de electroforesis. Ante esta situación, nace la necesidad de analizar exhaustivamente el número de copias de genes diana y sus polimorfismos para crear sgRNA eficaces (Q. Shan & Wang, 2014).

Capítulo VI: Conclusiones

- Se realizó la extracción de ADN de cuatro variedades de rosas y la PCR del gen de la enzima PDS generando fragmentos de tamaño de 1271 pb – 1439 pb para los exones 5 y 6, y un tamaño de 912 pb – 932 pb para los exones 7 y 8.
- La secuenciación Sanger y análisis de variabilidad alélica de las secuencias amplificadas permitieron obtener valores promedio de identidad de 97.5% y 84.78%, y coeficientes de similitud de 0.9 y 0.59-0.88, de las regiones 5-6 y 7-8 respectivamente. Además, se identificaron las zonas conservadas del gen para todas las plantas permitiendo diseñar sgRNA específicos para los ensayos CRISPR/Cas9.
- Se diseñaron cuatro sgRNA altamente específicos (>90%) y con baja probabilidad de generar riesgo por los efectos off-target en regiones codificantes. Se identificó que el sgRNA_5 posee cinco off-target con 4 desajustes, el sgRNA_6 y sgRNA_8 tienen nueve off-target con 4 desajustes, y finalmente el sgRNA_7 posee diez off-target de los cuales ocho de ellos tienen 4 desajustes y dos con 3 desajustes. Todas las guías poseen valores de eficiencia moderados (<70%), por lo que deben ser evaluadas en ensayos *in vivo*.
- Los sgRNA diseñados fueron amplificados y transcritos bajo el promotor T7, además fueron purificados obteniendo valores de calidad de 1.91-2.25 considerados ideales.

- La tecnología CRISPR/Cas9 para la edición del gen de copia única PDS en cuatro variedades de rosa es exitosa en ensayos *in vitro*. Se confirma la validez del ensayo mediante la visualización de dos bandas en el gel de electroforesis resultados de la escisión génica por la Cas9.

Capítulo VII: Recomendaciones

- Se propone validar la cantidad de amplicón a utilizar en el ensayo de escisión para eliminar la banda extra presente para lo exones 5 y 8 de las variedades SB y K, respectivamente. Además, analizar la presencia de copias homólogas por poliploidía de la planta
- Se recomienda realizar ensayos de digestión enzimática para verificar la escisión del gen con enzimas que se superponen 3 pb aguas arriba de la región PAM. Esto facilitaría la identificación de mutantes en estudios posteriores.
- Diseñar a futuro el sistema de entrega de complejo RNP a plantas para realizar la edición genética *in vivo*.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Aguilar, G., Sánchez, A., Barberán, C., Carrillo, J., López, J., & Aguilar, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4).
<https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Ahn, C. H., Ramya, M., Ryuan An, H., Park, P. M., Kim, Y.-J., Lee, S. Y., & Jang, S. (2020). Progress and Challenges in the Improvement of Ornamental Plants by Genome Editing. *Plant Molecular Biology*, 9(6), 687.
<https://doi.org/10.3390/plants9060687>
- Arzate, A., Bautista, M., Piña, J. L., Reyes, J., & Vázquez, L. (2014). *Técnicas tradicionales y Biotecnológicas del rosal (Rosa spp.)* (1a ed.). Ciencia Agropecuaria. Agronomía.
- Bardoli, L. (2006). *Similarity Searches on Sequence Databases*. Swiss Institute of Bioinformatics. https://embnet.vital-it.ch/CoursEMBnet/Pages06/slides/BLAST_FASTA.pdf
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Dennis, R., & Phillippe, H. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712.
<https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41–52.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Bryc, K., Patterson, N., & Reich, D. (2013). A Novel Approach to Estimating Heterozygosity from Low-Coverage Genome Sequence. *Genetics*, 185(2), 553–561. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.154500>

- Canver, M., Joung, K., & Pinello, L. (2018). Impact of Genetic Variation on CRISPR-Cas Targeting. *The CRISPR Journal*, 1(2), 159–170.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0016>
- Charrier, A., Vergne, E., Dousset, N., Richer, A., Petiteau, A., & Chevreau, E. (2019). Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System. *Frontiers in Plant Science*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>
- Concordet, J.-P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 242–245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X., & Peng, S. (2018). Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. *Computational Life Sciences*, 10(2), 455–465.
<https://doi.org/10.1007/s12539-018-0298-z>
- Dalla, L., Mahmoud, L., Moraes, T., Mou, Z., Grosser, J., & Dutt, M. (2019). Development of Improved Fruit, Vegetable, and Ornamental Crops Using the CRISPR/Cas9 Genome Editing Technique. *Plants*, 8(12), 601.
<https://doi.org/10.3390/plants8120601>
- Davey, M. R., Marchant, R., & Power, J. R. (2000). Genetic Engineering of Rose (*Rosa* Species). *Molecular Biology of Woody Plants*, 66, 179–190.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-2313-8_9
- Ferdous, J., Hanafi, M., M, R., & Muhammad, K. (2012). A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. *African Journal of Biotechnology*, 11(27), 6956–6964. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3283>
- Foucher, F., Hamama, L., Sakr, S., Baudino, S., Smulder, J., & Debener, T. (2015). Towards the Rose Genome Sequence and Its Use in Research and Breeding.

Acta Horticulturae 1064, 167–175.

<https://doi.org/doi:10.17660/actahortic.2015.1064.19>

Gerashchenkov, G. A., Rozhnova, N. A., Kuluev, B. R., Kiryanova, O., Gumerova, G., Knyazev, A., Vershnia, Z., Mikhailova, E., Chemeris, D., Matniyazov, R., Baimev, A., Gubaidullin, I., Baimev, A., & Chemeris, A. (2020). Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. *Molecular Biology*, 54, 24–42.

<https://doi.org/10.1134/S0026893320010069>

Karvelis, T., Gasiunas, G., Miksys, A., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2013). CrRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biology*, 10(5), 841–851. <https://doi.org/10.4161/rna.24203>

Kui, L., Chen, H., Zhang, W., He, S., Xiong, Z., Zhang, Y., Yan, L., Zhong, C., He, F., Chen, J., Zeng, P., Zhang, G., Yang, S., Dong, Y., Wang, W., & Cai, Y. (2017). Building a Genetic Manipulation Tool Box for Orchid Biology: Identification of Constitutive Promoters and Application of CRISPR/Cas9 in the Orchid, *Dendrobium officinale*. *Frontiers in Plant Science*.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02036>

Kuluev, B. R., Gumerova, G. R., Mikhaylova, E. V., Gerashchenkov, G. A., Rozhnova, N. A., Vershinina, N. A., Khyazev, A. V., Matniyazov, R. T., Baymiev, An. Kh., Baymiev, . Kh., & Chemeris, A. V. (2019). Delivery of CRISPR/Cas Components into Higher Plant Cells for Genome Editing. *Russian Journal of Plant Physiology Volume*, 66, 694–706.

Kumar, S., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. 12. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>

- Lampert, D., Kieliszewski, M., Chen, Y., & Cannon, M. (2011). Role of the Extensin Superfamily in Primary Cell Wall Architecture. *Plant Physiology*, 156(1), 11–19. <https://doi.org/10.1104/pp.110.169011>
- Liu, G., Zhang, Y., & Zhang, T. (2020). Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.006>
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002>
- López, C., García, Y., Natarajan, P., Bhandari, M., Abburi, V., Dutta, S., Yadav, L., Stommel, J., Nimmakayala, P., & Reddy, U. (2020). The ankyrin repeat gene family in *Capsicum* spp: Genome-wide survey, characterization and gene expression profile. *Scientific Reports*, 10(4044). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61057-4>
- Lowder, L., Malzahn, A., & Qi, Y. (2016). Rapid Evolution of Manifold CRISPR Systems for Plant Genome Editing. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01683>
- Madrid, C., & Gabriela, P. (2018). *Desarrollo de un vector viral para la edición génica mediante CRISPR/Cas9 en Vitis vinifera* [Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/173979/Desarrollo-de-un-vector-viral-para-la-edicion-genica-mediante-CRISPRCas9-en-vitis-vinifera.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Marín, F. (2013). *Análisis de variabilidad genética de los genes Muc y Tff de protección de la mucosagástrica en relación al cáncer gástrico y las lesiones precursoras* [Doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona.

- Mehravara, M., Shirazi, A., Mehdi, M., & Nazari, M. (2019). In Vitro Pre-validation of Gene Editing by CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 11(3), 259–263.
- Nanjaraj, A., Hu, Y., Li, P., Yuchi, Z., Chen, Y., & Zhang, Y. (2018). Cloning and Expression of a Nonribosomal Peptide Synthetase to Generate Blue Rose. *ACS Synth. Biol.*, 8(8), 1698–1704. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00187>
- Nguyen, & Nhung, T. (2019). *Analysis of genetic factors influencing transformation efficiency of Rosa hybrida cultivars* [Doctoral]. Universität Hannover.
- Nishihara, M., Higuchi, A., Watanabe, A., & Tasaki, K. (2018). Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in *Torenia fournieri*. *BMC Plant Biology*, 18(331). <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1539-3>
- Nishitani, C., Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K., Osakabe, K., Yamamoto, T., & Osakabe, Y. (2016). Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 6(31481). <https://doi.org/10.1038/srep31481>
- Noman, A., Aqeel, M., & He, S. (2016). CRISPR-Cas9: Tool for Qualitative and Quantitative Plant Genome Editing. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01740>
- Osakabe, Y., Liang, Z., Ren, C., Nishitani, C., Osakabe, K., Wada, M., Komori, S., Malnoy, M., Velasco, R., Poli, M., Jung, M.-H., Koo, O.-J., Viola, R., & Kanchiswamy, C. N. (2018). CRISPR–Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nature Protocols*, 13(12), 2844–2863. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0067-9>
- Park, J., & Choe, S. (2019). DNA-free genome editing with preassembled CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins in plants. *Transgenic Research*, 28, 61–64. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00136-3>

- Peña, Y. (2017). *Ciclo de Seminarios nuevas técnicas de mejoramiento genético de plantas*. CEBIOGEM, Campeche.
- Pinello, L., Canver, M., Hoban, M., Orkin, S., Kohn, D., Bauer, D., & Yuan, G. (2016). Analyzing CRISPR genome editing experiments with CRISPResso. *Nat Biotechnol.*, *34*(7), 695–697. <https://doi.org/10.1038/nbt.3583>
- Prince, S., Song, L., Qiu, D., Maldonado, J., Chai, C., Joshi, T., Patil, G., Valliyodan, B., Vuong, T., Murphy, M., Krampis, K., Tucker, D., Biyashev, R., Dorrance, A., Maroof, S., Xu, D., Shannon, G., & Nguyen, H. (2015). Genetic variants in root architecture-related genes in a Glycine soja accession, a potential resource to improve cultivated soybean. *BMC Genomics*, *16*(132). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1334-6>
- Qi, L., Larson, M., Gilbert, L., Weissman, J., Arkin, A., Lim, W., & Doudna, J. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, *152*(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Raymond, O., Gouzy, J., & Bnedahmane, M. (2018). The Rosa genome provides new insights into the domestication of modern roses. *Nature Genetics*, *50*, 772–777. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0110-3>
- Sandhya, D., Jogam, P., Allini, V., Abbagani, S., & Alok, A. (2020). The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *18*(25).
- Shan, Q., & Wang, Y. (2014). *Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system*. *9*(10), 2395–2410. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.157>
- Shan, S., Soltis, P., Soltis, D., & Yang, B. (2020). Considerations in adapting CRISPR/Cas9 in nongenetic model plant systems. *Applications in Plant Sciences*, *8*(1). <https://doi.org/10.1002/aps3.11314>

- Sharma, M., & Pandey, G. (2016). Expansion and Function of Repeat Domain Proteins During Stress and Development in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(1218).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01218>
- Svitashev, S., Young, J. K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, C., & Cigan, M. (2015). Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiology*, 169(2), 931–945.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00793>
- Thurtle, D., & Lo, T.-W. (2018). Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>
- Tian, L. (2015). Recent advances in understanding carotenoid-derived signaling molecules in regulating plant growth and development. . . *Front Plant Sci*, 6(790).
- Tussell, R., Ramayo, A., Herrera, R., Saavedra, A., & Brito, D. (2005). A fast, simple, and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. *Molecular Biology*, 2(137). <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:137>.
- Uitdewilligen, J., Wolters, A.-M., D'hoop, B., Brom, T., & Visser, R. (2013). A Next-Generation Sequencing Method for Genotyping-by-Sequencing of Highly Heterozygous Autotetraploid Potato. *PLoS One*, 10(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062355>
- Wada, N., Ueta, R., Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2020). Precision genome editing in plants: State-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering. *BMC Biotechnology*, 20(234). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02385-5>
- Wiedenheft, B., Sternberg, S., & Doudna, J. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385).
<https://doi.org/10.1038/nature10886>

- Wilson, F., Harrison, K., Armitage, A., Simkin, A., & Harrison, R. (2019). *CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry*. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0428-6>
- Xu, J., Kang, B., Naing, A., Bae, S.-J., Kim, J.-S., Kim, H., & Kim, C. K. (2020). CRISPR/Cas9-mediated editing of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase1 enhances Petunia flower longevity. *Plant Biotechnology Journal*, *18*(1), 287–297. <https://doi.org/10.1111/pbi.13197>
- Yu, J., Tu, L., Subburaj, S., Bae, S., & Lee, G.-J. (2020). Simultaneous targeting of duplicated genes in Petunia protoplasts for flower color modification via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02593-1>
- Zaidi, S. S.-A., Mahas, A., Vanderschuren, H., & Mahfouz, M. M. (2020). Engineering crops of the future: CRISPR approaches to develop climate-resilient and disease-resistant plants. *Genome Biology*, *21*(289). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02204-y>
- Zhong, Z., Zhang, Y., You, Q., Le, Y., Zhang, Y., & Qi, Y. (2018). Plant Genome Editing Using FnCpf1 and LbCpf1 Nucleases at Redefined and Altered PAM Sites. *Cell Press*, *11*(7), 999–1002. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.008>