

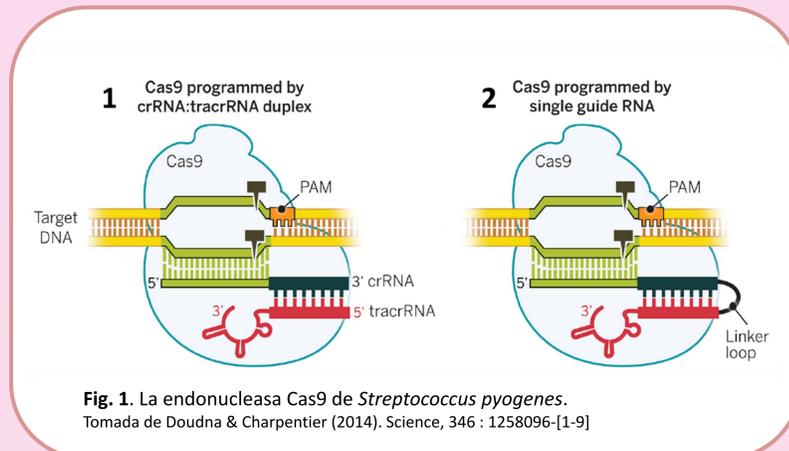
# Inactivación del gen *SISKOR* en plantas de tomate editadas genéticamente con el sistema CRISPR-Cas9

Autores: Ana F. Hervás Aracil, Araceli Martín García y Ana Vivancos Melenchón.

Tutores: Manuel Nieves Cordones (CEBAS-CSIC) y José M. Caballero (IES Juan Carlos I)

## INTRODUCCIÓN

- El sistema CRISPR-Cas9 tiene su origen en un mecanismo de defensa bacteriano. La nucleasa de DNA Cas9 une un RNA guía (gRNA) que la dirige a una secuencia del DNA que es complementaria a la del gRNA. Una vez allí, Cas9 corta el DNA de forma específica. Una de las aplicaciones más utilizadas actualmente es la inactivación de genes, ya que tras la acción de Cas9, se producen mutaciones en el sitio de corte debido a la actividad de una maquinaria celular (poco eficaz) que repara el DNA cortado (Fig. 1).
- En *Arabidopsis*, la proteína SKOR contribuye a la secreción de  $K^+$  a los vasos del xilema y, por tanto, participa en el transporte de  $K^+$  hacia la parte aérea. En el genoma del tomate se ha identificado una proteína homóloga (llamada SISKOR, *Sl: Solanum lycopersicum*).
- El objetivo del trabajo es evaluar los cambios inducidos por CRISPR-Cas9 en la secuencia de DNA del gen *SISKOR* y seleccionar aquellos que inactivan el gen. Después, conocer cómo afecta la falta de la proteína SISKOR al funcionamiento global de la planta.
- La hipótesis del trabajo es que esta proteína funciona a nivel de los haces vasculares y contribuiría a la provisión de  $K^+$  a la parte aérea.

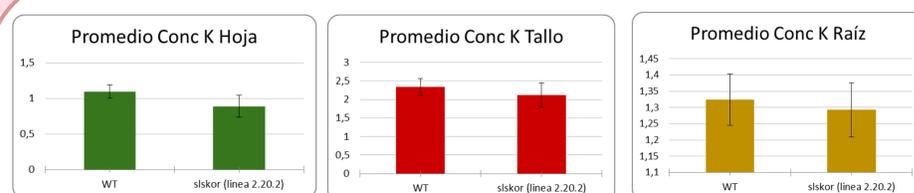


## METODOLOGÍA

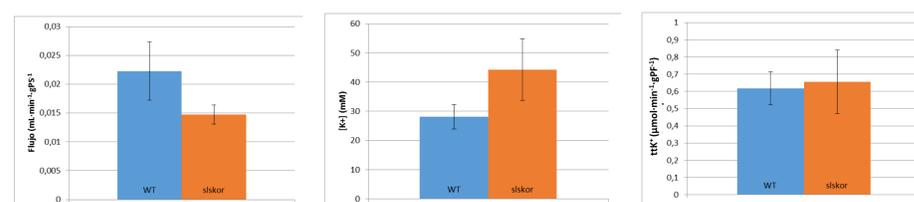
- Tomate MicroTom (Wild-type) es una variedad del tomate (*Solanum lycopersicum*), muy usada en los laboratorios, pues su tamaño, tanto del fruto como de la planta, es menor debido a la mutación en los genes *dwarf*. Su ciclo vital es más rápido, agilizando el proceso de experimentación.
- Para editar genéticamente las plantas de tomate (var. MicroTom), en primer lugar se eligió una secuencia de DNA corta (20 pb) que permitiese dirigir a Cas9-gRNA al gen *SISKOR*. Esto se llevó a cabo a través del portal Breaking-Cas y se eligió una secuencia que se encontraba en el exón 4 del gen *SISKOR*. Esta secuencia se sintetizó por una empresa privada, se ligó en un plásmido de entrada y se introdujo en *Escherichia coli* (Fig. 2). El ligamiento se comprobó por secuenciación Sanger a través de otra empresa privada. Posteriormente, se preparó un plásmido de expresión que contenía las secuencias de DNA que codifican Cas9 y el gRNA dentro de una región T-DNA. Mediante una electroporación se inserta este plásmido en *Agrobacterium tumefaciens*. A continuación, una empresa externa se encargó de producir plantas de tomate que expresaban el complejo gRNA-Cas9 mediante transformación genética.
- Para identificar los eventos de edición génica, se amplificó por PCR un fragmento de DNA del gen *SISKOR* (~1Kb) y el producto purificado se secuenció en una empresa privada. Los cromatogramas de la secuenciación se analizaron en el portal CRISP-ID. Para estudiar la función de SISKOR, se seleccionaron aquellas plantas que portaban mutaciones que alteraban la fase de lectura de *SISKOR* y que por tanto daban lugar a una proteína inactiva.
- Cultivamos estas plantas en  $\frac{1}{5}$  medio hidropónico Hoagland y se utilizaron para estudiar los efectos de la inactivación del gen. Se realizó una digestión ácida del material vegetal, de la cual se obtuvo la  $[K^+]$  de cada órgano. Por último, recolectamos la savia de una muestra de ambas plantas, savia que, diluida, se empleó para comparar las  $[K^+]$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

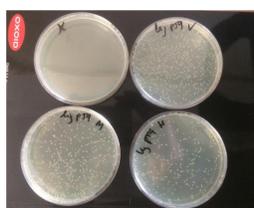
- Los cromatogramas obtenidos en el genotipado mostraron que se habían producido eventos de edición génica en el sitio esperado. Se seleccionó una línea de plantas de tomate en las que las dos copias de *SISKOR* estaban inactivadas por una delección de 49 pb y/o una inserción de 1 pb.
- En primer lugar, las plantas *slskor* presentaron un tamaño inferior con respecto a las plantas WT (Fig. 3). Por otro lado, las diferencias registradas en las  $[K^+]$  no fueron estadísticamente significativas en la raíz o tallo, pero sí en hoja (Fig 4).
- En cuanto al análisis de la savia bruta, el mutante *slskor* produce menos volumen de exudado (puede influir que la raíz tenga un menor tamaño), pero con mayor  $[K^+]$ . En el mutante *slskor*, parece que la mayor concentración en la savia compensa el menor volumen, dando lugar a tasas de transporte muy similares.



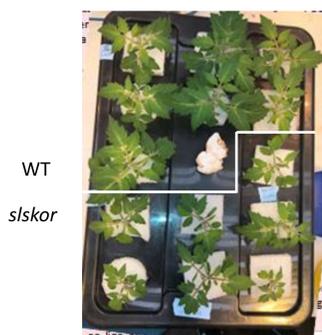
**Fig. 4.** Promedios de  $[K^+]$  (mmol/gPS) en las distintas partes de la planta, comparando WT y *slskor*. PS: peso seco.



**Fig. 5.** Promedios de flujo,  $[K^+]$  y tasa de transporte de  $K^+$  (ttK<sup>+</sup>) de la savia bruta. PF: peso fresco



**Fig. 2.** Cultivo de colonias de *Escherichia coli* en placas de Petri



**Fig. 3.** Cultivo de tomates (microTOM) WT (arriba) y *slskor* (abajo)

## CONCLUSIONES

- Se han obtenido plantas de tomate con el gen *slskor* inactivado mediante edición génica.
- Teniendo en cuenta estos resultados, hemos llegado a la conclusión de que la proteína SISKOR contribuye al transporte de  $K^+$  hacia la parte aérea. Sin embargo, los efectos de la inactivación en plantas de tomate son menores que *Arabidopsis*, por lo que deben existir otros sistemas de transporte.
- Para conocer la función de gen *slskor*, deben realizarse estudios que tengan en cuenta factores que no hemos considerado, como condiciones adversas relativas a la salinidad o la importancia del estado de desarrollo de la planta.

## AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos al CEBAS/CSIC y al IES Juan Carlos I su colaboración en la realización de este trabajo. Concretamente a Manuel Nieves Cordones, quien nos ha guiado desde el CEBAS, y a José María Caballero, que nos ha ayudado desde el instituto.